

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTU SENSU” EM BIOENERGIA  
NÍVEL DE MESTRADO

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

EMMANUEL ZULLO GODINHO

TOLEDO – PR – BRASIL

Dezembro de 2018

EMMANUEL ZULLO GODINHO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioenergia, área de concentração - Produção de Biocombustíveis e Co-produtos

Orientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

TOLEDO – PR – BRASIL

Dezembro de 2018



### CERTIDÃO

Certificamos para os devidos fins que o pós-graduando **EMMANUEL ZILLO GODINHO, RG Nº 14.049.709-6**, defendeu sua dissertação de Mestrado, intitulada: **"PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DO CAPIM ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS"** no dia 11/12/2018, sendo considerado aprovado pela banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Bioenergia – Nível Mestrado.

Resalta-se que, o Diploma de mestre somente será expedido após o cumprimento da entrega da versão final, bem como, da submissão do artigo em revista.

Por ser verdade, firmamos a presente.

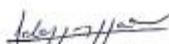
Toledo, 11 de dezembro de 2018.

Prof. DRª. TATIANA RODRIGUES DA SILVA BAUMGARTNER  
Coordenadora Local do Curso de Pós-Graduação em Bioenergia  
Nível Mestrado  
Portaria nº. 4821/2017-GRE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por EMMANUEL  
ZULLO GODINHO perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em  
Bioenergia em 11 de dezembro de 2018.

COMISSÃO JULGADORA



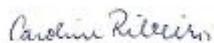
Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

Orientador



Prof. Dr.ª Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner

Coorientadora



Prof. Dr. Caroline Ribeiro

Membro



Prof. Dr.ª Maria Luiza Ferrandes Rodrigues

Membro

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Godinho, Emmanuel

PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DO CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum*) PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS / Emmanuel Godinho; orientador(a), Salah Din Mahmud Hasan; coorientador(a), Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner, 2018.

98 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2018.

1. Celulose e lignina. 2. Resíduos lignocelulósicos. 3. Cinética enzimática. 4. Reação Fenton. I. Hasan, Salah Din Mahmud . II. Baumgartner, Tatiana Rodrigues da Silva. III. Título.

## Retrato de Mãe

Uma Simples mulher existe que, pela imensidão de seu amor, tem um pouco de Deus; e pela constância de sua dedicação, tem muito de anjo; que, sendo moça pensa como uma anciã e, sendo velha , age com as forças todas da juventude; quando ignorante, melhor que qualquer sábio desvenda os segredos da vida e, quando sábia, assume a simplicidade das crianças; pobre, sabe enriquecer-se com a felicidade dos que ama, e, rica, empobrecer-se para que seu coração não sangue ferido pelos ingratos; forte, entretanto estremece ao choro de uma criancinha, e, fraca, entretanto se alteia com a bravura dos leões; viva, não lhe sabemos dar valor porque à sua sombra todas as dores se apagam, e, morta tudo o que somos e tudo o que temos daríamos para vê-la de novo, e dela receber um aperto de seus braços, uma palavra de seus lábios.

Não exijam de mim que diga o nome desta mulher se não quiserem que ensope de lágrimas este álbum: porque eu a vi passar no meu caminho.

Quando crescerem seus filhos, leiam para eles esta página: eles lhes cobrirão de beijos a fronte; e dirão que um pobre viandante, em troca da suntuosa hospedagem recebida, aqui deixou para todos o retrato de sua própria Mãe.

(Tradução de Guilherme de Almeida)

Autor: Don Ramon Angel Jara - Bispo de La Serena – Chile

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois com ele mantive minha fé e perseverança.

À minha família, em especial, meu pai Celso Francisco Godinho Junior, minha mãe Tereza Diva Zullo Godinho, minha querida e amada esposa Leonice Maria Mees e meu filho amado Gabriel Mees Godinho por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao Professor Dr. Salah D. M. Hasan, pela orientação e dedicação durante todo esse período e pelos ensinamentos durante a realização da pesquisa e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana R. S. Baumgartner pela co-orientação. Ao Prof. Dr. Fabiano B. Scheufele, pelo auxílio na modelagem matemática.

À colega de mestrado Aline Pellenz, os alunos da graduação de Engenharia Química Marco Antonio Reginato, André Ângelo Perin, Flavia Taguti Silveira e Thiago Spinardi Kaminski, que me auxiliaram nesta pesquisa. Ao Rodolfo Schaffner, da UFPR-Palotina, pela análise de MEV, ao Leandro Couto e à Aline de Pauli, da Unioeste, pelas análises de TGA, DRX e COT.

A todos os colegas do corpo discente do programa de Pós-Graduação em Bioenergia.

Ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Bioenergia.

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 Objetivos.....  | 3         |
| Objetivos específicos.....  | 3         |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1 Energia global.....   | 4         |
| 2.2 Composição química dos materiais lignocelulósicos.....  | 8         |
| 2.2.1 Celulose.....   | 10        |
| 2.2.2 Hemicelulose.....   | 12        |
| 2.2.3 Lignina.....  | 13        |
| 2.3 Capim-elefante.....   | 15        |
| 2.4 Bioconversão de resíduos lignocelulósicos.....  | 16        |
| 2.5 Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos.....  | 19        |
| 2.5.1 Pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH).....   | 22        |
| 2.5.2 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....      | 23        |
| 2.5.3 Pré-tratamento com sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)..... | 23        |
| 2.6 Hidrólise.....  | 25        |
| 2.7 Hidrólise enzimática.....   | 26        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>30</b> |
| 3.1 Biomassa.....   | 30        |
| 3.2 Pré-tratamento do capim-elefante.....   | 31        |
| 3.2.1 Pré-tratamento com sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)..... | 31        |
| 3.2.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH).....   | 33        |
| 3.2.3 Pré-tratamento alcalino oxidativo (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....                       | 33        |
| 3.3 Hidrólise enzimática do capim-elefante.....   | 34        |
| 3.4 Modelagem matemática da hidrólise enzimática.....   | 34        |
| 3.5 Métodos analíticos.....   | 38        |
| 3.5.1 Determinação da celulose.....   | 38        |
| 3.5.2 Determinação da lignina.....  | 39        |
| 3.5.3 Determinação da concentração de glicose.....  | 40        |
| 3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....  | 40        |
| 3.5.5 Análise termogravimétrica (TGA).....  | 40        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.5.6     | Caracterização por DR-X.....   | 41        |
| 3.5.7     | Análise de carbono orgânico total (COT).....   | 41        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1       | Caracterização do CC.....  | 43        |
| 4.2       | Pré-tratamento do capim-elefante com sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )..... | 46        |
| 4.3       | Pré-tratamento do capim-elefante com NaOH e $\text{H}_2\text{O}_2$ .....   | 52        |
| 4.4       | Caracterização do material.....  | 62        |
| 4.4.1     | Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....   | 63        |
| 4.4.2     | Análise de carbono orgânico total (COT).....   | 66        |
| 4.4.3     | Análise termogravimétrica (TGA).....   | 66        |
| 4.4.4     | Caracterização por DR-X.....   | 68        |
| 4.4.5     | Hidrólise enzimática.....  | 69        |
| 4.4.6     | Modelagem matemática da cinética da hidrólise enzimática.....  | 72        |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>6.</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>78</b> |
|           | <b>ANEXOS.....</b>   | <b>97</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.1.</b> Diagrama dos processos de conversão energética da biomassa.....   | 5  |
| <b>Figura 2.2.</b> Ilustração da morfologia celular, parede secundária e relação da lignina, celulose e hemicelulose na parede secundária da célula. Diâmetro aproximado da célula de 25 $\mu\text{m}$ ..... | 9  |
| <b>Figura 2.3.</b> Representação da molécula de celulose.....  | 11 |
| <b>Figura 2.4.</b> Ilustração esquemática morfológica da célula, da estrutura macro e micro.....   | 12 |
| <b>Figura 2.5.</b> Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses.....  | 13 |
| <b>Figura 2.6.</b> Ilustração esquemática dos álcoois na formação da lignina.....  | 14 |
| <b>Figura 2.7.</b> Capim-elefante ( <i>Pennisetum purpureum Schum.</i> ) .....   | 15 |
| <b>Figura 2.8.</b> Exemplo da eficiência energética do capim-elefante.....   | 18 |
| <b>Figura 2.9.</b> Fracionamento dos constituintes da biomassa após pré-tratamento.....  | 21 |
| <b>Figura 2.10.</b> Reação de hidrólise de polissacarídeo.....   | 25 |
| <b>Figura 2.11.</b> Atuação das enzimas celulasas sobre a matriz celulósica.....   | 27 |
| <b>Figura 2.12.</b> Estrutura em três dimensões dos CBM de xiloglucanos.....   | 28 |
| <b>Figura 3.1.</b> Fluxograma das metodologias experimentais utilizada no trabalho.....  | 33 |
| <b>Figura 4.1.</b> Superfícies de resposta da celulose e da lignina para diferentes níveis de temperatura (T) e de concentração de sulfato ferroso (C) obtidas para o planejamento de Doehlert.....          | 48 |
| <b>Figura 4.2.</b> Perfis de valores preditos de $Y_1$ e de $Y_2$ e função desejabilidade obtida para o planejamento Doehlert.....   | 50 |
| <b>Figura 4.3.</b> Gráfico dos efeitos individuais sobre o teor de celulose ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....   | 54 |
| <b>Figura 4.4.</b> Gráfico dos efeitos de interação sobre o teor de celulose ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....  | 54 |
| <b>Figura 4.5.</b> Gráficos dos resíduos. (a) histograma dos resíduos, (b) QQ-plot, (c) resíduos versus valores preditos e (d) resíduos padronizados versus ordem de coleta ( $\alpha=0,10$ ) .....          | 55 |
| <b>Figura 4.6.</b> Gráfico dos efeitos individuais sobre o teor de lignina ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....  | 57 |
| <b>Figura 4.7.</b> Gráfico dos efeitos de interação sobre o teor de lignina ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....   | 58 |
| <b>Figura 4.8.</b> Gráficos dos resíduos. (a) histograma dos resíduos, (b) QQ-plot, (c) resíduos versus valores preditos e (d) resíduos padronizados versus ordem de coleta ( $\alpha=0,10$ ) .....          | 58 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.9.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura ( $\times 1$ ; $\times 2$ ; $\times 250$ e $\times 500$ ) de capim-elefante não tratado e pré-tratado com a reação Fenton..... | 62 |
| <b>Figura 4.10.</b> Análise termogravimétrica (TGA) da biomassa lignocelulósica do capim-elefante pré-tratado e sem pré-tratamento.....  | 65 |
| <b>Figura 4.11.</b> Difratogramas: (a) capim-elefante sem pré-tratamento e (b) capim-elefante com pré-tratamento.....  | 65 |
| <b>Figura 4.12.</b> Produção de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise enzimática para diferentes concentrações de solução de enzima comercial Celluclast.....                       | 67 |
| <b>Figura 4.13.</b> Simulação dos modelos matemáticos, (a) $20 \text{ g L}^{-1}$ ; (b) $10 \text{ g L}^{-1}$ e (c) $5 \text{ g L}^{-1}$ de concentração da Celluclast®.....                      | 72 |

## ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| - <b>Figura 1.</b> Gráfico dos resíduos vs. valores preditos para a resposta $Y_1$ (% cellulose) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.....    | 97 |
| - <b>Figura 2.</b> Gráfico dos resíduos vs. valores preditos para a resposta $Y_2$ (% lignina) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.....      | 97 |
| - <b>Figura 3.</b> Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta $Y_1$ (% cellulose) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton..... | 98 |
| - <b>Figura 4.</b> Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta $Y_2$ (% lignina) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.....   | 98 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 2.1.</b> Exemplos de metodos de pré-tratamentos mais utilizados.....  | 20 |
| <b>Tabela 2.2.</b> Comparacao de alguns modelos cinéticos de hidrólise enzimática da celulose.....  | 30 |
| <b>Tabela 3.1.</b> Valores codificados e reais das variáveis independentes do planejamento Doehlert.....  | 35 |
| <b>Tabela 4.1.</b> Caracterização química das folhas de capim-elefante novo e velho ambos <i>in natura</i> , expresso em base seca.....                                 | 42 |
| <b>Tabela 4.2.</b> Teores de celulose e lignina em diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....   | 43 |
| <b>Tabela 4.3.</b> Composição estrutural da cana-de-açúcar do bagaço e da palha <i>in natura</i> .....  | 44 |
| <b>Tabela 4.4.</b> Composição estrutural das biomassas <i>in natura</i> .....   | 44 |
| <b>Tabela 4.5.</b> Composição estrutural do capim-elefante descrita literatura (%).....   | 45 |
| <b>Tabela 4.6.</b> Matriz de Doehlert para 2 variáveis (concentração de sulfato ferroso – C e temperatura – T) para avaliar o pré-tratamento com reação Fenton.....     | 46 |
| <b>Tabela 4.7.</b> Efeitos e coeficientes obtidos para $Y_1$ e $Y_2$ na matriz de Doehlert ( $\alpha=0,10$ ) .....  | 48 |
| <b>Tabela 4.8.</b> ANOVA do planejamento de Doehlet para ambas as respostas $Y_1$ e $Y_2$ .....   | 49 |
| <b>Tabela 4.9.</b> Resultados de celulose do pré-tratamento alcalino em diferentes temperaturas.....  | 52 |
| <b>Tabela 4.10.</b> Resultados de lignina do pré-tratamento alcalino em diferentes temperaturas.....  | 52 |
| <b>Tabela 4.11.</b> ANOVA dos resultados de celulose para diferentes temperaturas e pré-tratamentos ( $\alpha=0,10$ ) .....   | 53 |
| <b>Tabela 4.12.</b> Comparação de médias de celulose do teste de Tukey ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) .....                               | 56 |
| <b>Tabela 4.13.</b> ANOVA dos resultados de lignina para diferentes temperaturas e pré-tratamentos ( $\alpha=0,10$ ) .....  | 56 |
| <b>Tabela 4.14.</b> Comparação de médias de lignina do teste de Tukey dentro do grupo pré-tratamento ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ..... | 59 |
| <b>Tabela 4.15.</b> Comparação de médias de lignina do teste de Tukey dentro do grupo temperatura ( $\alpha = 0,10$ ) .....   | 59 |
| <b>Tabela 4.16.</b> Composição estrutural do capim-elefante.....  | 60 |
| <b>Tabela 4.17.</b> Caracterização do capim-elefante pré-tratado e <i>in natura</i> .....   | 60 |
| <b>Tabela 4.18.</b> Caracterização química do resíduo da palha de carnaúba pré-tratado, expresso em base seca.....  | 61 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 4.19.</b> Composição química do bagaco de cana-de-açúcar.....  | 61 |
| <b>Tabela 4.20.</b> Análise de carbono total (TOC) pré-tratado e <i>in natura</i> de biomassas.....  | 63 |
| <b>Tabela 4.21.</b> Resultados de concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtidos durante cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima comercial.....                             | 70 |
| <b>Tabela 4.22.</b> Resultados de rendimento e de produtividade obtidos durante a cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima comercial.....   | 71 |
| <b>Tabela 4.23.</b> Valores determinados para os parâmetros cinéticos $K_e$ , $k_{de2}$ , $k_2$ e coeficiente de determinação para diferentes concentrações iniciais e valores obtidos para a Celluclast®..... | 71 |
| <b>Tabela 4.24.</b> Valores determinados para os parâmetros cinéticos $V_{\text{emax}}$ e $v_0$ para diferentes concentrações iniciais da Celluclast® .....  | 73 |

## NOMENCLATURA

**AE** – Atividade enzimática ( $\text{U g}^{-1}$  em base seca ou  $\text{U mL}^{-1}$ )

**AR** – Açúcares redutores ( $\text{g L}^{-1}$ )

**CC** – Capim-elefante cru ou *in natura*

**CPT** – Capim-elefante pré-tratado

**CN** – Capim novo

**CV** – Capim velho

**DNS** – ácido 3,5-dinitrosalicílico

**EtOH 1G** – EtOH de primeira geração

**EtOH 2G** – EtOH de segunda geração

**F<sub>calc</sub>** – F calculado (teste “F”)

**F<sub>tab</sub>** – F tabelado (teste “F”)

**GL** – Graus de liberdade

**MQ** – Média quadrática

**MS** – Matéria Seca

**R** - Razão sólido-líquido na hidrólise enzimática ( $\text{g L}^{-1}$ )

**SQ** – Soma quadrática

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

**AUTOR: EMMANUEL ZULLO GODINHO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. SALAH DIN MAHMUD HASAN**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 11 de dezembro de 2018. 98 p.

## **RESUMO**

Com o aquecimento global decorrente da emissão de gases do efeito estufa, principalmente o CO<sub>2</sub> gerado na queima de combustíveis fósseis, políticas mundiais têm apontado para a necessidade de produção de biocombustíveis, apresenta-se como uma nova fonte alternativa de matéria-prima para a produção de EtOH o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), que é uma gramínea de grande porte, fácil manejo e cultivo e abundante em todo o Brasil. O objetivo deste trabalho foi testar diferentes métodos de pré-tratamento do capim-elefante visando a posterior hidrólise enzimática do mesmo. Além disso, realizou a modelagem matemática da hidrólise. Os métodos de pré-tratamentos testados foram os alcalinos com NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com a reação química de Fenton. O melhor resultado do pré-tratamento foi obtido a partir da reação com Fenton, no qual se obteve na média 53,80% de celulose e 10,0% de lignina. Na sequência realizou-se a hidrólise enzimática do capim pré-tratado com reação Fenton, utilizando a enzima comercial Celluclast® 1,5L, onde foi obtido o melhor rendimento (17,39%) com 20 g L<sup>-1</sup> de enzima em 72h e maior produtividade (2,51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) observada em 2h. Foi possível ajustar os modelos matemáticos propostos no processo de hidrólise na mesma concentração enzimática do capim-elefante com a obtenção dos açúcares redutores fermentescíveis. Foi observado que, para concentrações mais elevadas de enzima, o modelo matemático proposto ajusta melhor os resultados experimentais, sendo alcançado um coeficiente de determinação de R<sup>2</sup>=0,974 utilizando a enzima comercial.

**Palavras-chave:** celulose e lignina, resíduos lignocelulósicos, cinética enzimática, reação Fenton.

# **PRE-TREATMENT AND HYDROLYSIS OF CAPIM ELEPHANT (*Pennisetum purpureum*) FOR THE OBTAINING OF FERMENTESCIBABLE SUGARS**

**AUTHOR: EMMANUEL ZULLO GODINHO**

**SUPERVISOR: PROF. DR. SALAH DIN MAHMUD HASAN**

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on December, 11th 2018. 98 p.

## **ABSTRACT**

With global warming, due to the emission of greenhouse gases, mainly CO<sub>2</sub> generated in the burning of fossil fuels, global policies have pointed to the need to produce biofuel. A new alternative source of raw material for ethanol production is elephant grass (*Pennisetum purpureum*), which is a large grass, easy to handle and cultivate and abundant throughout Brazil. The objective of this work was to test different methods of pre-treatment of the elephant grass aiming the later enzymatic hydrolysis of the same. In addition, it aimed at the mathematical modeling of hydrolysis. The pretreatment methods tested were alkaline with NaOH, or with hydrogen peroxide or with chemical reaction of Fenton. The best pre-treatment result was obtained from the Fenton reaction in which 53.80% of cellulose and 10.00% of lignin were obtained. Enzymatic hydrolysis of the pretreated Fenton grass was carried out using the commercial enzyme Celluclast® 1.5L, where the best yield (17.39%) was obtained with 20 g L<sup>-1</sup> of enzyme in 72 hours and higher productivity (2.51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) observed in 2 h. It was possible to adjust the mathematical models proposed in the process of enzymatic hydrolysis of elephant grass with the obtainment of fermentable reducing sugars. It was observed that, for higher concentrations of enzyme, the proposed mathematical model wich better adjusts the experimental results reached a coefficient of determination of  $R^2 = 0.974$  using the commercial enzyme.

**Keywords:** cellulose and lignin, lignocellulosic residues, enzyme kinetic, Fenton raction

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento mundial está diretamente relacionado com a descoberta dos combustíveis fósseis, isto desde a revolução industrial, no século XVIII até os dias atuais, mesmo que estes sejam prejudiciais à humanidade, muitos países ainda usam como principal fonte de energia. Com a grande dependência desses combustíveis, as previsões de escassez no futuro e especialmente, os impactos negativos no ambiente, no clima e na saúde humana, têm despertado o interesse de órgãos governamentais, da indústria e da comunidade científica para o desenvolvimento de energias renováveis.

Nesse sentido, as produções energéticas renováveis de biomassas vegetais podem ser uma das grandes vantagens do mundo moderno no que diz respeito à geração de energias limpas, contribuindo com a redução das emissões de gases do efeito estufa (GEE) que são derivados de fontes energéticas de origem fóssil, que além de finitas são altamente poluentes.

Diversas são as rotas tecnológicas desenvolvidas na pesquisa mundial. Os bioprodutos são produzidos por diversos métodos, o que beneficia o ser humano, como: a química verde, as energias produzidas por microrganismos, os biocombustíveis, dentre outros tem mostrado grande eficiência energética e pode ser declarado como “saudável para a humanidade”, com a redução dos gases e das mudanças no clima mundial.

Os biocombustíveis ganharam importância na década de 70, devido à crise do petróleo, com a criação do PROÁLCOOL, a partir dessa década o Brasil tornou-se referência mundial na produção de etanol (EtOH) para uso em automóveis.

Dentre as biomassas, o capim-elefante tem sido estudado como potencial fonte de biomassa para produção de EtOH 2G. Dentro da pesquisa, existe a necessidade de otimizar as condições de operação em laboratório, tendo como objetivo a melhora da eficiência na produção deste biocombustível, especialmente na etapa de pré-tratamento da biomassa.

Diversas são as aplicações energéticas do capim-elefante, pode-se destacar a combustão direta, a gaseificação, o carvoejamento (processo de conversão termoquímica sem presença de oxigênio) e a hidrólise do capim (produção de EtOH). Algumas empresas já utilizam o capim-elefante como matéria-prima para a produção de *pellets* e *briquetes* (lenha ecológica).

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final da glicose. No entanto, as celulases, por serem proteínas não conseguem ultrapassar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, desta forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras da celulose constitui o principal problema para o desencadeamento do processo de degradação, e por isso, faz-se necessário o pré-tratamento antes da etapa da hidrólise (Levini *et al.*, 2010)

Diversas são as finalidades do pré-tratamento nas biomassas, destaca-se a remoção da lignina, o aumento da área superficial, a diminuição do grau de polimerização e cristalinidade da celulose visando facilitar a digestão enzimática.

Os materiais celulósicos pré-tratados precisam ser hidrolisados para a liberação de açúcares fermentescíveis e a hidrólise pode ser feita por via química ou enzimática. O uso de enzimas comerciais em pesquisas acadêmicas no âmbito de produção de EtOH 2G é considerado como uma fonte mais eficiente na conversão da celulose para a produção de açúcares fermentescíveis que poderão ser aproveitados posteriormente na obtenção de EtOH de segunda geração.

O rendimento da hidrólise enzimática depende de muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, o qual visa expor as cadeias de celulose, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais, termoestabilidade das enzimas, grau de adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, temperatura, concentração de substrato e de enzima no meio e grau de agitação. A remoção de hemicelulose aumenta o rendimento da hidrólise enzimática da celulose. As ligninas também devem ser removidas, pois a celulase adsorve sobre elas e impede o intumescimento das fibras de celulose.

A celulase refere-se a uma classe de enzimas que são produzidas essencialmente por fungos, bactérias e protozoários e catalisam a hidrólise da celulose, é considerada a terceira maior enzima industrial do mundo, isto em volume de dólares, sendo também a maior enzima usada para a conversão de biomassa em biocombustíveis, por isso, esta pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes pré-tratamentos no capim-elefante para a produção de açúcares fermentescíveis.

## **1.1 Objetivos**

O objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar os diferentes métodos de pré-tratamento do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e a hidrólise enzimática do mesmo.

**Objetivos específicos:**

- Caracterizar o capim-elefante em termos de celulose e lignina;
- Avaliar os efeitos de diferentes métodos de pré-tratamento do capim-elefante visando a liberação da celulose e remoção da lignina;
- Avaliar a cinética de hidrólise enzimática do capim-elefante pré-tratado;
- Aplicar a modelagem matemática ao processo de hidrólise enzimática.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Energia Global

A economia global é altamente dependente dos combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), chegando a consumir aproximadamente 80% em energia (Goldemberg, 2009). Com o aumento do consumo e a diminuição da oferta, o petróleo poderá elevar os preços nas Bolsas internacionais, a valores que podem vir a trazer sérios danos a economia global, além disto, a queima do petróleo causa diversos riscos ao meio ambiente mundial. Surgindo assim a necessidade de pesquisas que busquem novas fontes energéticas, principalmente renováveis, e uma opção viável são os biocombustíveis (TOSCAN, 2013).

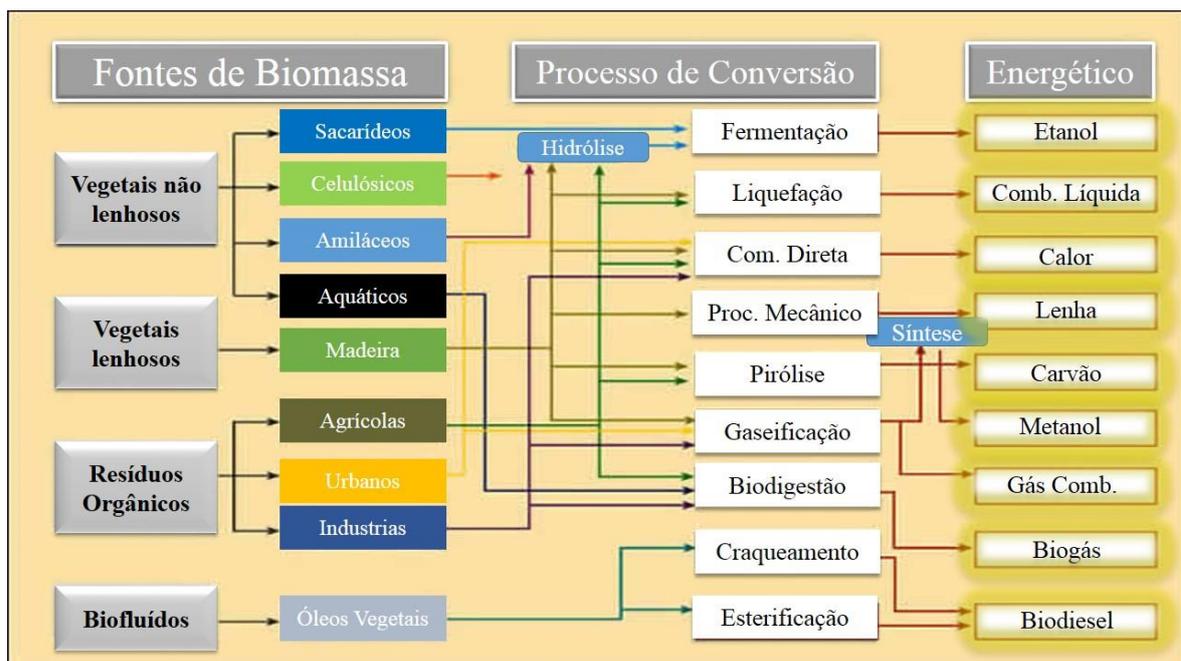
As reservas de combustíveis fósseis, ainda podem abastecer as necessidades de energia a um longo período de tempo, no entanto, estas reservas, comercialmente exploráveis, crescem a taxas bem menores que as taxas de consumo, indicando, por conseguinte, um descolamento entre as curvas de reservas e consumo. Além disso, pode-se elencar diversos fatores prejudiciais em relação a exploração desta *commodity*, os custos estão cada vez mais elevados pelas constantes crises políticas e sociais dos países produtores, o aumento na dificuldade de extração e a demora na produção de novas jazidas e de exploração de minérios e poços de petróleo (BARCELOS, 2012).

Segundo o *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA, 2017), publicado em seu relatório anual, a queima de combustíveis fósseis vem aumentando substancialmente e a atmosfera poderá manter esta substância por centenas de anos. Dados da história mostram que, antes da Revolução Industrial, a concentração de CO<sub>2</sub> era em torno de 180 e 280 ppm (partes por milhão), enquanto atualmente a concentração está acima de 400 ppm na atmosfera (SCHOLL, 2014).

A maioria dos países possuem matérias-primas para a produção do EtOH e do biodiesel, como mostra a Figura 2.1. Alguns problemas encontrados pelos governos é como eles deverão ter programas capazes de produzir grandes volumes e com custos de produção dentro do orçamento. No caso do álcool combustível, o Brasil, por sua longa e consolidada experiência no assunto, tem liderado a discussão em vários eventos internacionais e realizado acordos com outros países buscando disseminar as qualidades desse novo combustível (CONAB, 2008).

A caracterização da biomassa é uma etapa fundamental para sua utilização nos diferentes processos de conversão em energia e biocombustíveis, pois possibilita detectar variabilidade na matéria-prima, estabelecer parâmetros de qualidade, otimizar processos, entre outras vantagens (Chies, 2013). Apesar de inúmeros trabalhos utilizarem a metodologia NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008), proposta pelo “*National Renewable Energy Laboratory*”, para determinação de monossacarídeos e da lignina de Klason (Gouveia *et al.*, 2009; Pitarelo, 2007), a maior parte dos trabalhos que estudam a composição do capim-elefante realiza a análise pelo método descrito por VAN SOEST (1963).

Segundo dados do Ministério de Minas e Energia (MME) do Brasil, responsável pela publicação do Balanço Energético Nacional (BEN), em 2017, a produção de energia primária a partir de biomassa lignocelulósica obteve participação de 17,4% na matriz energética no país, sendo considerada a segunda principal fonte de energia, superada apenas pelo petróleo e seus derivados (BEN, 2017).



**Figura 2.1:** Diagrama dos processos de conversão energética da biomassa. Fonte: ANEEL (2010).

Os biocombustíveis têm atraído grande atenção em diferentes países ao redor do mundo, devido às suas características renováveis e sustentáveis, além de contribuírem para o desenvolvimento da nação com a criação de empregos, tanto os diretos como os indiretos, outro ponto que deve ser analisado é a diminuição da dependência externa de energia e do

petróleo resultando assim em reduções nas emissões de gases causadores do efeito estufa (DEMIRBAS *et al.*, 2009).

Algumas reações devem ser destacadas, como: a transesterificação e a fermentação. A transesterificação é um processo químico que consiste na reação de óleos vegetais com um produto intermediário ativo, oriundo da reação entre álcoois (mEtOH ou EtOH) e uma base como: hidróxido de sódio ou de potássio. Os bioprodutos dessa reação química geralmente são: a glicerina e uma mistura de ésteres etílicos ou metílicos. O biodiesel tem características físico-químicas muito semelhantes às do óleo diesel e, portanto, pode ser usado em motores de combustão interna (KIM *et al.*, 2003).

A fermentação é um processo biológico anaeróbico no qual as moléculas de açúcares de algumas plantas são diretamente convertidas em álcool, chamado de EtOH de primeira geração (1G), por meio da ação de microrganismos. Em termos energéticos, o produto final, o álcool, é composto por EtOH e, em menor proporção, mEtOH, e pode ser usado como combustível (puro ou adicionado à gasolina em cerca de 20%) em motores de combustão interna (SAHA *et al.*, 2005).

Atualmente, vários estudos vêm sendo realizados em diferentes países para determinar quais tipos de biomassa lignocelulósica se enquadra à realidade de cada região no mundo. Esses estudos consideram a disponibilidade da biomassa para a agricultura local e as condições climáticas e territoriais que favorecem cultivo de forma economicamente viável. Resíduos agrícolas como palhas, folhas e talos, gerados no cultivo do milho e trigo nos EUA, e do bagaço da cana-de-açúcar no Brasil e na China, são matérias-primas promissoras para a produção de EtOH de segunda geração. É estimado que o Brasil possa expandir a produção de EtOH em até 40% com a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima (FONTOURA *et al.*, 2015).

Dentre os biocombustíveis, o EtOH é um produto que pode ser produzido em grande escala com custos competitivos e com qualidades intrínsecas já comprovadas, surgindo assim como uma opção simples, imediata para fazer parte da matriz energética internacional. Estes fatores podem gerar uma grande imprevisibilidade sobre o comportamento futuro dos mercados da matéria-prima principal, podendo afetar a oferta e a demanda tanto em nível doméstico como internacional.

Segundo Negro *et al.* (2014), diversas são as fontes de materiais lignocelulósicos no mundo, nos países do mediterrânicos, a poda da oliveira é uma das plantas mais abundantes,

mesmo que a poda é feita a cada dois anos, a fim de preparar as árvores para a próxima safra. Este processo gera uma quantidade variável de poda de oliveira (até 3 ton ha<sup>-1</sup>) dependendo da condição de cultura, com isso resulta em muitos materiais lignocelulósicos que podem gerar EtOH 2G.

Segundo Chemmés *et al.* (2013), o EtOH pode ser obtido a partir de diversas matérias-primas. O EtOH tanto o de 1G como 2G e o biodiesel são exemplos de biocombustíveis, sendo o EtOH 1G obtido principalmente, a partir de alimentos como cana de açúcar, milho e beterraba e já é um processo estabelecido. O EtOH 2G utiliza-se matéria-prima não alimentícia, como resíduos agroindustriais (RABELO, 2010).

Segundo Hargreaves (2013), explica que o EtOH 3G, é proveniente de microalgas que são organismos microscópicos capazes de realizar fotossíntese e podem ser encontradas em diversos ambientes aquáticos do planeta, pois essas acumulam grande quantidade de óleo, que pode ser utilizado na produção de biodiesel. Estima-se que seja possível produzir 50000 L ha<sup>-1</sup> ano, a partir do cultivo de microalgas. Esse valor é cerca de 100 vezes maior que a produtividade média da soja, principal oleaginosa utilizada para fabricação de biodiesel no Brasil. Alternativamente, níveis similares de EtOH são obtidos a partir de certas espécies de microalgas que acumulam amido em vez de óleo.

Os resíduos desperdiçados por diversas cadeias de produção são altíssimos nos dias atuais, pode-se enumerar alguns, como: bagaço de cana-de-açúcar, as palhas e as cascas provenientes de grãos como milho, trigo, soja, dentre outros. Esses resíduos são formados de 40 a 50% de celulose, sendo o principal componente para a produção de EtOH de segunda geração (KANG *et al.*, 2004; FITZPATRICK *et al.*, 2010).

O aproveitamento destes resíduos lignocelulósicos apresentam uma grande alternativa para o aumento da eficiência energética mundial (Lee *et al.*, 2010), além disso estes estão disponíveis, de forma abundante e barata e que necessitam de uma destinação. Proporcionando uma quantidade de combustível maior por área plantada de biomassa, aumentando a sustentabilidade do processo. O aproveitamento desses resíduos impede que ocorra uma expansão desmedida das áreas de cultivo à medida que cresce a demanda por EtOH (LIEW *et al.*, 2014).

Em 2014, a empresa Raízen inaugurou a sua segunda biorrefinaria no Brasil. Esta planta industrial tem como funcionalidade a transformação da biomassa de cana-de-açúcar para produção de EtOH 2G, com uma capacidade de produção de 40 milhões de litros de

EtOH por ano. Hoje, essa inovação representa a chave para tornar o EtOH ainda mais competitivo e atender à crescente demanda por biocombustíveis no Brasil e no mundo (RAÍZEN, 2017).

Os benefícios da utilização dos combustíveis renováveis estão relacionados principalmente com os impactos econômicos e ambientais que os mesmos proporcionam. Dentre os impactos econômicos, a diversificação da matriz energética, o desenvolvimento da agricultura, o aumento dos investimentos na pesquisa e a sustentabilidade são os que se destacam. Já os impactos ambientais consistem na redução de ar poluente, o sequestro de carbono, a redução de gases estufa, a melhoria da terra e o uso adequado da água (BALAT, 2011).

Estimativas indicam que a energia proveniente da biomassa lignocelulósica representa aproximadamente 14% do consumo mundial de energia primária, podendo atingir o valor de 20% no ano de 2020, e indicadores citam que a biomassa, será a terceira maior fonte de energia primária no mundo, resultando em uma emissão de quase zero de CO<sub>2</sub> na atmosfera (HORST, 2013). Esta previsão do aumento no uso da biomassa nos próximos anos para produção energética baseia-se em três razões: crescimento populacional; urbanização e melhoria nos padrões de vida e cenário atual mundial de sustentabilidade econômico-ambiental.

Segundo Ogata (2013), a energia química armazenada em todos os seres, tanto animais e vegetais podem ser chamados de bioenergia. Na biomassa vegetal uma das formas de utilização é a produção de biocombustíveis como por exemplo, EtOH produzido a partir do capim-elefante, da cana-de-açúcar e do milho, entre outros.

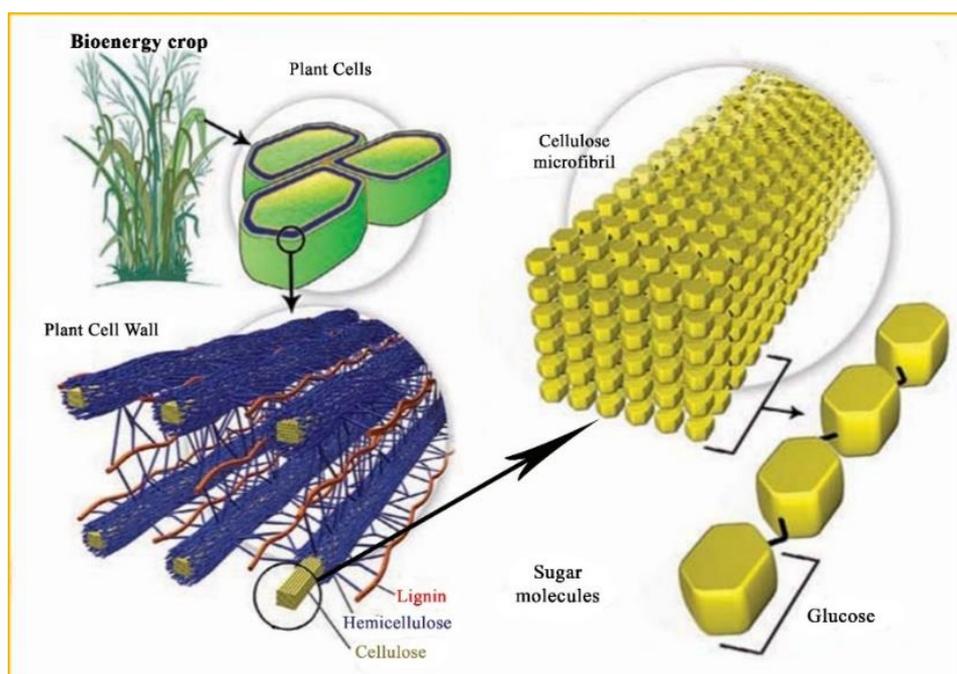
## **2.2 Composição química dos materiais lignocelulósicos**

Materiais celulósicos ou lignocelulósicos são termos genéricos e utilizados para descrever as estruturas internas da maioria dos vegetais. A composição dos materiais lignocelulósicos depende do tipo de vegetal e do seu período vegetativo, sendo esta a matéria-prima mais abundante para a humanidade com possibilidade de adição de valor para produção de bioenergia (SILVA *et al.*, 2009).

Em termos gerais, a parede celular das plantas é formada por uma complexa cadeia de carboidratos, proteínas, sais minerais e compostos fenólicos, 90% corresponde aos polissacarídeos, a maioria dos vegetais na sua parede celular aproximadamente de 15 a 40% de celulose, 30 a 40% de hemicelulose e pectina e 20% de lignina, conforme Figura 2.2 (MAICHE & HUBER, 2010).

A primeira camada da parede celular é um aglomerado de moléculas de celulose que formam um conjunto de fibras impermeáveis. Esse complexo de fibras está ligado à hemicelulose através de ligações de hidrogênio e interações não covalentes. A rede de celulose/hemicelulose está imersa em uma matriz de pectina que forma uma espécie de “gel” dentro da camada lamela média (GLÓRIA & GUERREIRO, 2006).

A celulose e hemicelulose compõem cerca de 70% da massa seca do vegetal, sendo entremeadado pela lignina que é uma macromolécula formada por álcoois aromáticos e se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (SUKUMARAN *et al.*, 2009).



**Figura 2.2:** Ilustração da morfologia celular, parede secundária e relação da lignina, celulose e hemicelulose na parede secundária da célula. Diâmetro aproximado da célula de 25  $\mu\text{m}$ . Fonte: Kirk & Cullen (1998).

Os resíduos lignocelulósicos são de grande interesse no setor agroindustrial, uma vez que podem ser utilizados para a produção de uma vasta gama de produtos pela sua disponibilidade na natureza (SILVA, 2010). É considerado uma ótima alternativa para a

geração de energia, resultando em um baixo impacto ambiental, comparando com a utilização de combustíveis fósseis (MENEZES *et al.*, 2009).

Desta forma, o aumento das pesquisas com relação a bioconversão do material lignocelulósico tem recebido grande atenção nos últimos anos visando a melhoria do aproveitamento das biomassas. No entanto, os resíduos lignocelulósicos são resistentes à bioconversão sendo utilizado no processo um pré-tratamento que provoca a ruptura do complexo celulose, hemicelulose e lignina (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

### 2.2.1 Celulose

A celulose é considerada o mais abundante composto orgânico renovável do planeta. Pesquisas são realizadas no sentido de encontrar aplicações econômicas para este resíduo agrícola que, geralmente é utilizado como ração animal ou como fonte de energia (ZHANG *et al.*, 2006).

Segundo Maiche & Huber (2010), as formas dominantes de celulose são as microfibras com diâmetro de 2 a 10 nm, intercaladas por outros componentes da parede celular, como os xiloglucanos (XG). Microfibras cristalinas são compostas por cerca de 30 a 36 filamentos de celulose agregados lateralmente (unidirecional) através de forças de *Van der Waals*<sup>1</sup> e ligações de hidrogênio<sup>2</sup>. Embora muitos progressos quanto à elucidação da estrutura das fibras cristalinas tenham sido feitos, elas continuam ainda pouco entendidas.

As fibras celulósicas são revestidas por lignina, a qual proporciona impregnação e proteção, este revestimento confere à fibra uma maior resistência ao ataque químico e biológico (SCHEUFELE *et al.*, 2012).

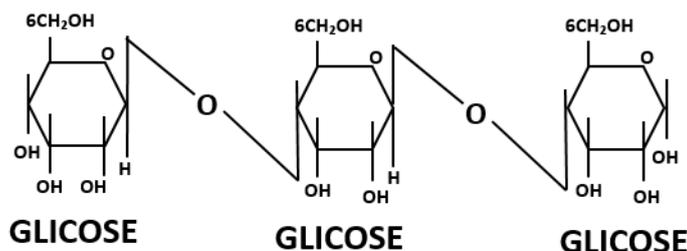
A celulose é um polímero linear formado exclusivamente por unidades de  $\beta$ -D-glicose que se ligam entre si pelos átomos de carbonos 1 e 4, através de ligações glicosídicas. As cadeias de celulose juntam-se formando fibrilas e apresentam ligações de hidrogênio

---

<sup>1</sup> As forças de atração ou repulsão entre entidades moleculares (ou entre grupos dentro da mesma entidade molecular) diferentes daquelas que são devidas à formação de ligação ou a interação eletrostática de íons ou grupos iônicos uns com os outros ou com moléculas neutras.

<sup>2</sup> A ligação de hidrogênio só pode ocorrer quando o hidrogênio estiver ligado a um átomo pequeno e muito eletronegativo, como F, O, N, Cl, etc. Quando o hidrogênio está ligado a um átomo muito eletronegativo, a densidade eletrônica em torno do próton fica bem baixa; esta parte da molécula é então fortemente atraída pelos pares de elétrons do átomo eletronegativo de outra molécula, estabelecendo a ligação de hidrogênio

entre os grupamentos de hidroxila intracadeias e intercadeias, o que resulta na cristalinidade da celulose, conforme demonstra na Figura 2.3. As regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas (TAMANINI & HAULY, 2004). Apesar dos estudos realizados, a estrutura molecular exata das microfibrilas de celulose ainda não é totalmente conhecida.

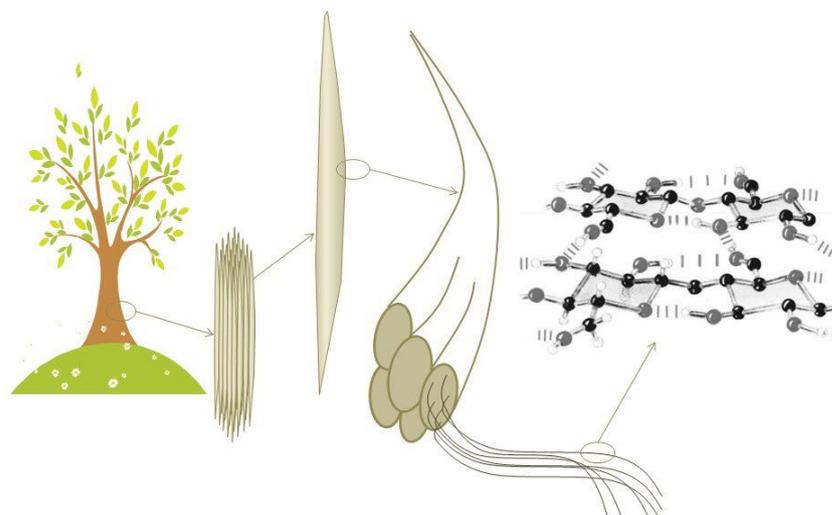


**Figura 2.3:** Representação da molécula de celulose. Fonte: Santos *et al.* (2012).

O grau de cristalinidade destas fibrilas ou a presença de outros polímeros associados à matriz celulósica são de grande importância na avaliação, pois esta interação pode influenciar na suscetibilidade da molécula de celulose a hidrólise enzimática microbiana (SOEST, 1994).

A celulose amorfa possui uma maior área superficial e é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (AGUIAR, 2010). Em relação à região cristalina, sabe-se que as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, onde a fibra possui sua maior flexibilidade (SILVA, 2010).

Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula celulose grande resistência à hidrólise, o que representa um grande desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas (Figura 2.4) (ARANTES & SADDLER, 2010). No entanto, diversos são os microrganismos que facilitam a hidrólise da celulose em uma matéria-prima vegetal, esta catálise pode ser em ambas as morfologias e também em açúcares de baixa massa molecular como a glicose e celubiose (AGUIAR & LUCENA, 2011).



**Figura 2.4:** Ilustração esquemática morfológica da célula, da estrutura macro e micro Fonte: Kirk & Cullen (1998).

### 2.2.2 Hemicelulose

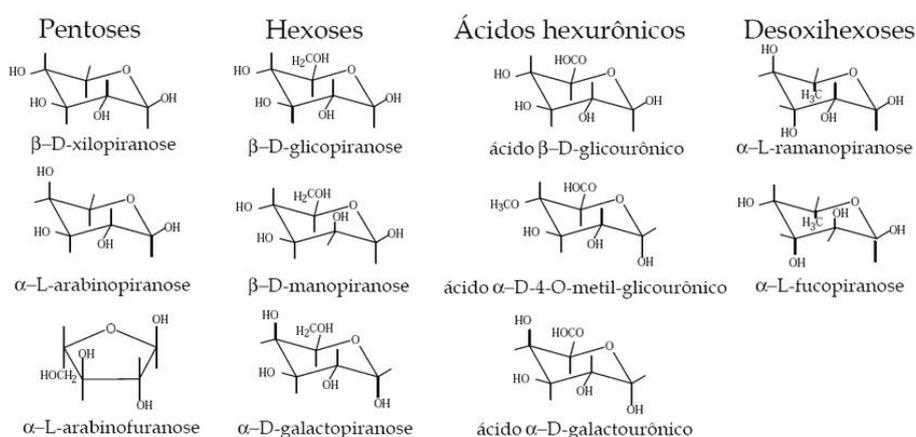
A hemicelulose é uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular que estão intimamente associados com a celulose nos tecidos das plantas (VÁSQUEZ, 2007). As hemiceluloses são heteropolímeros de pentoses e hexoses e correspondem de 10 a 40% da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos. Esta fração pode ser convertida em açúcares monoméricos, principalmente xilose, em temperaturas abaixo de 200 °C na presença de ácidos diluídos (TAMANINI & HAULY, 2004).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100 - 200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química, sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (SILVA, 2010). A hemicelulose comporta-se como um adesivo, formando ligações químicas entre a celulose e a lignina.

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas. Entretanto, concentram-se de forma mais intensa nas camadas primária e secundária, onde se encontram intimamente associadas à celulose e à lignina (SILVA, 2010).

Acredita-se que a hemicelulose esteja envolvida no alongamento e na modificação da parede celular do vegetal, e que as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas.

A Figura 2.5, evidência a composição química e as características estruturais das hemiceluloses tem uma grande variação entre as suas espécies, as localizações subcelulares e os estágios de desenvolvimento. Geralmente as hemiceluloses estão quimicamente associadas ou reticuladas a outros polissacarídeos, proteínas ou ligninas (OGEDA & PETRI, 2010).



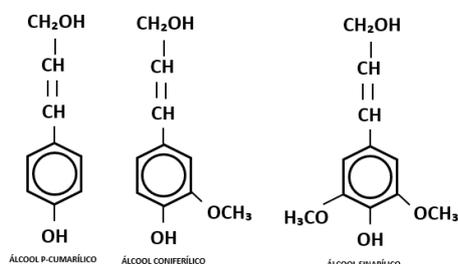
**Figura 2.5:** Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. Fonte: Martins (2005).

### 2.2.3 Lignina

A lignina é um heteropolímero amorfo, insolúvel em água formado por unidades de fenilpropano conectadas por ligações não-hidrolisáveis, que se liga tanto à hemicelulose quanto à celulose, formando uma barreira física que torna a parede celular vegetal impenetrável. Presente na parede celular, a lignina proporciona suporte estrutural, impermeabilidade e a resistência de ataques microbianos e oxidativo (PAPINUTTI & FORCHIASSIN, 2007).

A lignina está interligada com a camada de celulose-hemicelulose mediante contato superficial e/ou ligações covalentes. A estrutura molecular da lignina é altamente resistente à hidrólise química e bioquímica (MAICHE & HUBER, 2010).

Segundo, Gonçalves (2009) a lignina é um polímero fenólico, composto de unidade de p-hidróxifenil-propano, guaiacilpropano e sisingilpropano, que formam uma grande, complexa e desordenada estrutura molecular (Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Ilustração esquemática dos álcoois na formação da lignina. Fonte: Usberti *et al.* (1998).

Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica em maior proporção nas plantas, as mesmas atuam fortemente como uma estrutura de cola das fibras de celulose, o que da rigidez nos tecidos (ARATO *et al.*, 2005).

De maneira semelhante, Nascimento (2011), explica que a lignina é um material hidrofóbico e amorfo e atua como um cimento entre as fibrilas e também faz com que as fibras internas tornem mais rígidas. A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose.

Conforme Binod *et al.*, (2010) a lignina representa um dos maiores estoques de carbono (energia) da natureza, sendo considerada como o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, com potencial de insumos para a indústria química. Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia para os processos, o que garantiria a autossuficiência e eventualmente, até a possibilidade de exportar alguma energia elétrica excedente. Naturalmente, essa situação é positiva tanto para a viabilidade econômica da tecnologia quanto para os quesitos ambientais, já que reduziria a dependência por recursos energéticos fósseis externos.

Silva *et al.*, (2009) e Nascimento (2011) apontam que a lignina é bastante resistente a hidrólise ácida, porém quando tratada com soluções alcalinas a temperaturas elevadas podem ocorrer rupturas nas ligações éter entre as unidades de fenil propano, formando

grupos fenólicos responsáveis por sua solubilização. Mesmo com esta alta rigidez a lignina deve ser o ponto de partida para uma fermentação para produção de EtOH, tanto 1G como 2G (GONÇALVES, 2009).

### 2.3 Capim-elefante

Segundo Toscan, (2013), o capim-elefante tem como nome científico *Pennisetum purpureum* pertencente à família da Gramínea (*Poaceae*) perene, de hábito de crescimento cespitoso, atingindo de 3 a 5 metros de altura, com colmos eretos, dispostos em touceira aberta ou não, e que são preenchidos por um parênquima suculento, chegando a 2 cm de diâmetro, com entrenós de até 20 cm, a Figura 2.7, evidência o capim-elefante. Seus rizomas são considerados curtos, com inserções sem conformidades, e sua coloração varia entre as tonalidades clara e escura do verde, podendo alcançar até 10 cm de largura e 110 cm de comprimento.



**Figura 2.7:** Capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Fonte: Oliveira (2014)

É uma espécie de clima tropical que apresenta metabolismo do tipo  $C_4^3$  e alta produtividade, produzindo aproximadamente  $45 \text{ ton MS ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ , enquanto a cana-de-

---

<sup>3</sup> As plantas  $C_4$  possuem grande afinidade com o  $CO_2$ . Elas recebem este nome devido ao fato do ácido oxalacético possuir 4 moléculas de carbono, formado após o processo de fixação de carbono, elas podem sobreviver em ambientes áridos. Isto se dá porque as plantas  $C_4$  só atingem as taxas máximas de fotossíntese sob elevadas intensidades de radiação solar, fazendo com que fixem mais  $CO_2$  por unidade de água perdida, ou seja, elas são mais econômicas quanto ao uso da água, elas perdem menos água que as  $C_3$  durante a fixação e a fotossíntese (Guellity, 2014).

açúcar e o milho produz aproximadamente 21 ton ha<sup>-1</sup> (açúcar e bagaço) e 13 ton ha<sup>-1</sup> (grãos e fogueiros), respectivamente (BARCELOS, 2012).

Rocha *et al.*, (2017) descreveram que o capim-elefante tem uma resposta imediata e a curto prazo para a primeira colheita, o mesmo pode ser colhido após 6 meses do plantio, em regiões chuvosas e com temperaturas altas pode-se colher até 4 vezes ao ano, já para a cana-de-açúcar, a colheita se dá após um ano de plantio. Mas a competição fica empatada quando se trata de “quem é mais verde”. As duas plantas são excelentes fontes de energia renovável, a diferença está no fato de o capim-elefante ser o mais produtivo.

De acordo com Rocha *et al.*, (2017), o capim-elefante é considerado uma gramínea com alta eficiência no âmbito de volume de biomassa vegetal, em relação as plantas de mesmas espécies, tendo um rendimento de até 84% maior que a cana-de-açúcar e 37% superior que o eucalipto.

Diversas são as espécies do capim-elefante que possui uma grande utilidade para a produção de energia devido a ser uma grama perene bem alta, que pode atingir mais de 3 metros de altura, além disso, os rendimentos de biomassa variam entre 12 e 150 ton ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, dependendo da fertilidade do solo, do planejamento de cortes (gestão) e das cultivares plantadas resultando assim uma colheita de até 5 cortes no ano, Barcelos (2012). Essa produtividade torna a capim-elefante uma fonte de biomassa interessante para produzir EtOH 2G.

Fava (2008), relatou em um trabalho que existem 4 grupos de espécies de capim-elefante existentes no mercado: Cameroon; Napier; Merker e Anão.

Práticas adequadas de manejo são fundamentais para que a produtividade fique no nível esperado. Por meio de técnicas bem-sucedidas o ganho de biomassa pode ser potencializado, apresentando resultados acima da média (PONTES, 2013).

A celulose possui um papel fundamental na produção de AR, com suas características específicas, pois com a desestruturação da lignina facilitando o acesso a celulose, o capim-elefante, poderá ter melhores resultados finais, para que isto ocorra a bioconversão dos resíduos celulósicos é de grande importância.

## **2.4 Bioconversão de resíduos lignocelulósicos**

Segundo Campos (2015) o balanço energético do capim-elefante varia de 21,0 – 25,0, ou seja,  $\beta 1 - \beta 5$  unidades de energia renovável produzida em função de uma unidade de energia fóssil consumida no processo, sendo superior ao milho que está na faixa de 1,4 - 2,3, também maior que a cana-de-açúcar entre 8,1 - 21,0 demonstrando assim um grande potencial do capim-elefante como matéria-prima para a produção de biomEtOH.

Atualmente os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais (RABELO, 2010).

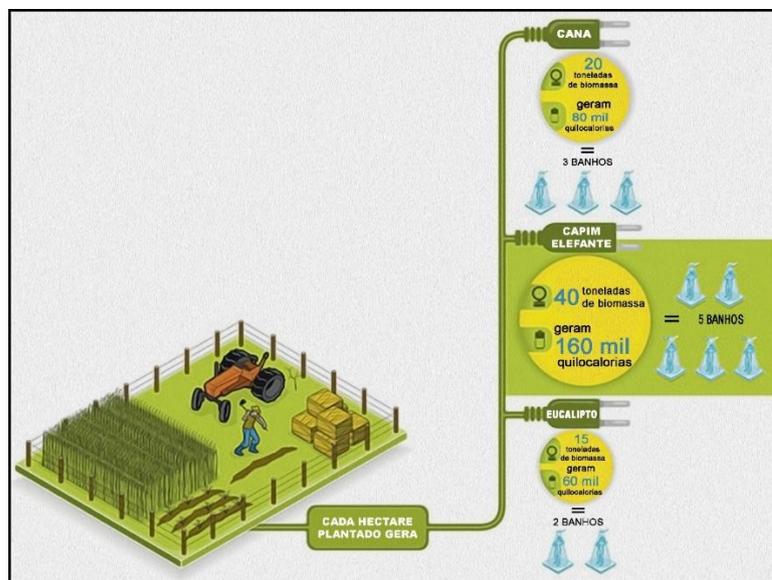
A biodegradação da celulose pelas celulases produz inúmeros microrganismos, representando maior fluxo de fontes de carbono que podem ser fixadas na atmosfera, facilitando os processos na agricultura e no tratamento de lixos urbanos. Este processo pode ser largamente utilizado na produção de produtos de origem renováveis e bioenergia substituindo os de origem fóssil. Zhang *et al.* (2006), demonstrou em estudos que com a utilização de bioprodutos e bioprocessos resultam em uma emissão de dióxido de carbono líquido igual a zero.

A conversão de materiais lignocelulósicos em biocombustíveis e outros produtos químicos de alto valor agregado pode ser obtida por meio de um sistema multienzimático composto predominantemente de celulases, xilanases, endoglicanases e  $\beta$ -galactosidase, atuando em sinergia (TOSCAN, 2013).

O capim-elefante possui uma grande quantidade de lignina quando a planta está em estágio morfológico avançado, ou seja, acima de 4 cortes, muitos laboratórios têm estudado a bioconversão desta biomassa em combustível sólido, principalmente para produção de *pellets* e bioeletricidade (Toscan, 2013). A Figura 2.8 mostra o potencial do capim-elefante para a produção de energia elétrica quando comparado com o potencial da cana-de-açúcar e do eucalipto.

Uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulolíticos é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose, como a avicelase, carboximetilcelulase e  $\beta$ -glicosidase (celulases), enzimas que atuam sobre a porção celulósica. As xilanases, mananases, glucanases e galactanases (hemicelulases) atuam sobre a porção hemicelulósica e as enzimas oxidativas como a lignina peroxidase,

manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas, que atuam sobre a lignina (FERREIRA, 2009).



**Figura 2.8:** Exemplo da eficiência energética do capim-elefante. Fonte: Rocha *et al.*, (2017).

A produção de EtOH a partir de biomassas lignocelulósicas consiste primeiramente na transformação da celulose pré-tratada em açúcares fermentescíveis utilizados pelas leveduras em uma etapa posterior da fermentação alcoólica. Entretanto, no caso de matérias-primas de composição complexa como os resíduos agroindustriais, por exemplo, a hidrólise do complexo lignocelulolítico e a conversão em materiais com alto valor agregado é dificultada, pois existe uma alta resistência nos processos bioquímicos normais (TOSCAN, 2013).

A milhares de anos o ser humano explora as enzimas de forma direta via aplicação enzimática bruta de origem animal e/ou vegetal ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbiano. A produção e o uso de enzimas de origem microbiana, de maneira controlada, são relativamente recentes, porém constituem atualmente o maior setor da indústria biotecnológica (BORTOLAZZO, 2011).

Pode-se dizer que dois grupos de enzimas são responsáveis pela degradação da estrutura da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase, atuam na degradação da lignina e destoxificam o meio de crescimento transformando os metabólitos gerados. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a

xilanase entre outras, atuam nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono (FERREIRA, 2009).

O processo de hidrólise enzimática envolve a ação das enzimas celulolíticas que apresentam um alto custo associado a uma baixa produção (ZHANG *et al.*, 2006). No entanto, esta reação pode ser conduzida em condições relativamente moderadas, ou seja, a 50 °C e à pressão atmosférica e não há formação de produtos de decomposição do açúcar.

Martins (2005) demonstrou que sítios de menor organização molecular, localizados na superfície da estrutura cristalina, são mais suscetíveis ao ataque enzimático. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos tem se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis de baixa massa molar como a glicose e a celobiose.

A sacarificação da celulose representa uma alternativa interessante para a destinação de biomassas residuais como o bagaço de cana, o capim-elefante e resíduos de atividades florestais. No entanto, apesar de muitos estudos, a compreensão das características do substrato é que atribui a maior eficiência a taxa de hidrólise da celulose. Algumas das características mais influentes incluem a acessibilidade, o grau de cristalinidade, o grau de polimerização e a distribuição da lignina (PALONEN *et al.*, 2004).

Os maiores obstáculos para a produção de EtOH 2G são os custos associados à sacarificação da celulose e hemicelulose e a conversão da xilose em EtOH (CAMPOS, 2015).

Dentro da bioconversão, o pré-tratamento é importante para o processo de desestruturação da lignina e maior exposição da celulose, para os próximos processos como a hidrólise enzimática.

## **2.5 Pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos**

Os pré-tratamentos devem ser práticas necessárias para que ocorram as mudanças estruturais e as composições nos materiais lignocelulósicos, a Tabela 2.1 mostra os diversos tipos de pré-tratamentos. Alguns tratamentos com produtos químicos, como os ácidos e os alcalinos ou até o uso de técnicas de ruptura molecular, tais como ultrassom e plasma, podem

remover lignina e hemicelulose em certa medida e aumentar a porosidade e a concentração de celulose amorfa (TOSCAN, 2013).

**Tabela 2.1:** Exemplos de metodos de pré-tratamentos mais utilizados

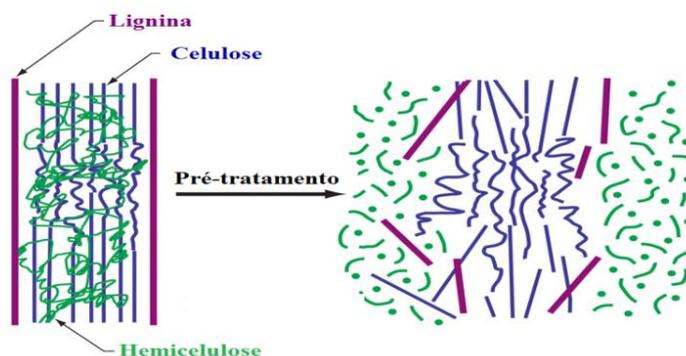
| Processo                                     | Descrição  |
|--|--|
| <b>Físico</b>                                |  |
| <b>Explosão á vapor</b>                      | A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160 a 260 °C) seguida de uma rápida descompressão.   |
| <b>Termohidrólise</b>                        | Utiliza água quente e alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose.  |
| <b>Químicos</b>                              |  |
| <b>Hidrólise ácida</b>                       | Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico ou nítrico, concentrados ou diluídos.  |
| <b>Hidrólise alcalina</b>                    | Pelo uso de bases como hidróxido de sódio ou cálcio.   |
| <b>Organosolvente</b>                        | Uma mistura de um solventeorgânico (mEtOH, EtOH e acetona, por organosolvente exemplo) com um catalisador ácido (H2SO4, HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose.                 |
| <b>Biológicos</b>                            |  |
| <b>Fungos</b>                                | Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente é utilizado em combinação com outros processos.  |
| <b>Combinados</b>                            |  |
| <b>Explosão a vapor catalizada</b>           | Adição de H2SO4 (ou SO4) na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos vapor catalisada inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose. |
| <b>Afex (<i>Ammonia fibre explosion</i>)</b> | Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão.  |
| <b>Explosão de CO<sub>2</sub></b>            | Similar à explosão de vapor, utilizando o CO <sub>2</sub> .  |

Fonte: Adaptado de Oliveira (2014).

Para Gonçalves (2009), o material lignocelulósico possui estrutura complexa que limita a eficiência da hidrólise enzimática e a conversão a polissacarídeos fermentescíveis, com isso, os pré-tratamentos devem ser economicamente viáveis, para satisfazer a condição de ser possível a implantação em escala industrial sem demandar muitos investimentos, adequando as configurações da planta produtora de EtOH 1G. Nascimento (2011), apoia com a tese de que é imprescindível o pré-tratamento nos resíduos agrícolas antes de uma hidrólise enzimática, como representado na Figura 2.9.

Diversos são os fatores que devem ser considerados quando se emprega uma estratégia de pré-tratamento para um resíduo de biomassa, pois esses fatores incluem baixo investimento de capital, de energia, eficácia geral do pré-tratamento e aplicabilidade em uma

ampla variedade de substratos. Desejando vantagens adicionais, tais como a capacidade de recuperar o teor de hemicelulose na solução aquosa. Mais importante ainda, os pré-tratamentos devem reduzir o custo de capital, o custo operacional e o custo de biomassa (XU *et al.*, 2016).



**Figura 2.9:** Fracionamento dos constituintes da biomassa após pré-tratamento. Fonte: Pena (2011).

Segundo Higa *et al.*, (2012), o pré-tratamento oxidativo tem sido muito usado para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica. Rabelo (2007), demonstrou que o peróxido de hidrogênio reage com a lignina em determinadas condições, sendo bastante usado como alvejante em polpas altamente lignificadas na produção de papel. A adição de hidróxido de sódio (NaOH) ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) torna a deslignificação mais efetiva e permite a solubilização da hemicelulose. Isso por causa da ação do ânion hidroperóxido ( $HOO^-$ ), formado em pH alcalino, que corresponde à principal espécie ativa no peróxido. Em meio alcalino, também ocorre a decomposição do peróxido em radicais hidroxila ( $OH^-$ ) e superóxido ( $O^-$ ) que são os responsáveis pela oxidação estrutural da lignina.

Segundo Silva (2014), quando as frações estão livres, estruturalmente aptas a alterar sua morfologia e facilitando a eficiência no processo de hidrólise, em particular da lignina que pode ser considerada uma grande barreira física, que torna as fibras desse material cimentada entre si.

Com isso ressalta-se que é de suma importância estabelecer uma metodologia de pré-tratamento que possa remover a hemicelulose e a lignina, conseqüentemente aumentando a área superficial e diminuindo o grau de polimerização da celulose, mas também deve-se observar que este pré-tratamento deve afetar o mínimo possível da degradação da celulose. Esta metodologia deve resultar em altas taxas de rendimentos de açúcares fermentescíveis,

apresentando baixo custo final com menor redução de resíduos gerados para a produção do EtOH 2G (GRIMALDI, 2013).

### **2.5.1 Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio (NaOH)**

Segundo Magalhães (2011), os compostos alcalinos podem ser utilizados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, pois tem a função de solubilizar as estruturas da lignina na biomassa em altas temperaturas e pressões elevadas. Os pré-tratamentos alcalinos mais utilizados são: hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio. Comparado a outros pré-tratamentos o meio alcalino apresenta menores perdas de açúcares provindos da celulose mantendo o mesmo valor de custo benefício em relação aos pré-tratamentos ácidos.

Os resultados de um pré-tratamento alcalino em uma estrutura lignocelulósica são solubilizações, redistribuições e a condensação da lignina, modificando também as estruturas cristalinas da celulose (GRIMALDI, 2013). Rabelo (2010), salienta que as bases podem ter boas respostas em um pré-tratamento, mas depende muito do conteúdo da lignina presente, caso a biomassa for considerada velha o efeito poderá ser pequeno.

O mecanismo de pré-tratamento alcalino é baseado na saponificação intermolecular das ligações cruzadas de ésteres da xilana que estão presentes na hemicelulose juntamente com outros componentes, como a exemplo, lignina e hemicelulose. A porosidade do material lignocelulósico aumenta com a remoção dessa ligação cruzada (TARKOW e FEIST, 1969).

Algumas particularidades são vistas nos reagentes alcalinos como o hidróxido de sódio que aumenta significativamente a digestibilidade da biomassa, porém é considerada cara em relação aos componentes deste grupo. A amônia é extremamente volátil e também cara, além de que deve ter uma atenção maior na sua manipulação, já a uréia sua manipulação é bem mais fácil, mas também é considerada um produto de alto valor agregado, contudo pode ser considerado importante reagente para a digestibilidade da biomassa quando comparado com o de outras bases. Por outro lado, o hidróxido de cálcio apresenta diversas vantagens em relação aos reagentes citados anteriormente, pois é de fácil manipulação e possui baixo custo, outra vantagem significativa é que a cal (óxido de cálcio) pode ser recuperado quando se trata a água com gás carbônico (CHANG *et al.*, 1998).

Além do pré-tratamento alcalino de NaOH, outro que se destaca neste processo é o pré-tratamento alcalino com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.5.2 Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O peróxido de hidrogênio é apresentado como um pré-tratamento de destaque no cenário das pesquisas para a degradação da lignina e conseqüentemente o aumento da acessibilidade da celulose para a digestibilidade enzimática, relata (RABELO, 2010).

Rabelo (2007), ressalta que o uso de peróxido de hidrogênio como pré-tratamento em diversas condições tem sido usado largamente por vários pesquisadores como um alvejante em polpas de madeiras altamente lignificadas para a produção de papel.

Comparado com os pré-tratamentos ácidos e os hidrotérmicos, o peróxido de hidrogênio tem baixa solubilização na celulose e na hemicelulose, quando se adiciona peróxido com ácidos ou juntamente com os hidrotérmicos, a taxa de remoção da lignina torna-se alta no material lignocelulósico (OLIVEIRA, 2012).

Guerra *et al.* (2014), demonstraram que ao aumentar a concentração do peróxido de hidrogênio em um pré-tratamento de uma biomassa, os resultados foram bem significativos para os que se esperam uma grande eficiência em uma hidrólise enzimática.

Conforme descrito anteriormente, o peróxido de hidrogênio é considerado um importante agente da deslignificação e solubilização da hemicelulose, isto porque forma ânion hidroperóxido ( $HOO^-$ ), em um pH alcalino, em contrapartida o peróxido de hidrogênio é considerado instável em condições alcalinas decompondo-se em radicais hidroxil ( $OH^-$ ) e superóxido ( $O_2^-$ ). Estes radicais citados oxidam a estrutura da lignina na biomassa atacando os grupos hidrofílicos (carboxil), quebrando algumas ligações que levam a dissolução da lignina e hemicelulose (SUN *et al.*, 2004; RABELO, 2010).

O pré-tratamento alcalino de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ser considerado como principal substância em uma reação química, tanto quanto atua individualmente ou em mistura com outras reações como na reação de Fenton.

### 2.5.3 Pré-tratamento com Sulfato Ferroso Heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Gonçalves (2009), relata que a combinação entre o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) com um sal ferroso em meio ácido, os pesquisadores chamam de reação Fenton formando diversos radicais hidroxilas ( $\overline{\text{HO}}$ ) que é considerado um eficaz oxidante de compostos orgânicos. Pode-se dizer que a eficiência da reação Fenton aumenta quando a mesma é irradiada com luz Ultravioleta (UV), chamado de foto-Fenton.

Araújo *et al.* (2002) demonstraram que a eficiência do reagente Fenton na degradação da lignina residual contida no licor negro, que é um resíduo do processo Kraft de fabricação de papel. Os resultados de degradação foram até 95% de lignina nas amostras, usando o Fenton com 60 mM de peróxido de hidrogênio e 1 mM de cloreto de ferro II. Contudo quando o tratamento teve a exclusão do sal ferroso a degradação da lignina foi quase zero.

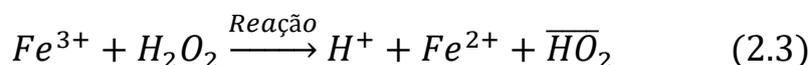
Na reação entre o peróxido de hidrogênio e o sal ferroso, os íons ( $\text{Fe}^{2+}$ ) agem como catalisadores da decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), levando à formação de íons hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), radicais hidroxila ( $\overline{\text{HO}}$ ) e íons ( $\text{Fe}^{3+}$ ). A equação (2.1) a seguir demonstra o mecanismo aceito para essa reação.



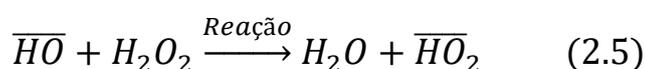
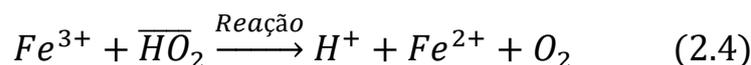
No entanto pode ocorrer uma série de reações durante este processo. O radical hidroxila ( $\overline{\text{HO}}$ ) formado na equação (2.2) pode reagir com os os íons ( $\text{Fe}^{2+}$ ), formando íons ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (2).



Os íons ( $\text{Fe}^{3+}$ ) também pode reagir com o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), gerando os íons ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e radicais peroxila ( $\overline{\text{HO}}_2$ ), na equação (2.3).



A reação do radical peroxila ( $\overline{HO}_2$ ) com íons ( $Fe^{3+}$ ) leva a formação de íons ( $Fe^{2+}$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), na equação (2.4), enquanto que a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pelo radical hidroxila ( $\overline{HO}$ ) leva a formação de água ( $H_2O$ ) e radicais peroxila ( $\overline{HO}_2$ ), na equação (2.5) (GONÇALVES, 2009).

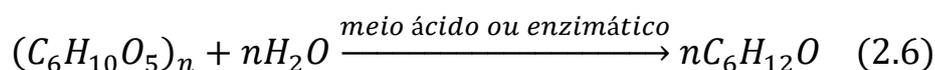


Gonçalves (2009), relatou que existem diversos fatores que podem aumentar a eficiência da reação de Fenton em uma biomassa, como: a concentração inicial de peróxido de hidrogênio, a proporção entre os reagentes ( $H_2O_2/Fe^{2+}$ ), a temperatura, o pH do meio e o tempo de reação. Em uma análise Pérez *et al.* (2002) verificaram que ao aumentar a temperatura do meio aumentou significativamente a degradação dos poluentes orgânicos.

Dentro da literatura de pré-tratamento, a reação de Fenton, é considerada a principal reação de desestruturação da lignina e de maior contato com a celulose, facilitando o processo da hidrólise enzimática.

## 2.6 Hidrólise

A hidrólise pode ser dividida em duas vertentes: a ácida (via química) e a enzimática (via bioquímica), a eficiência dos métodos depende de varias condições, como: o tratamento, o tipo da biomassa e as propriedades dos agentes hidrolíticos (TOSCAN, 2013). A Equação 2.6 representa a reação de hidrólise em um polissacarídeo.



**Figura 2.10:** Reação de hidrólise de polissacarídeo, adaptado (TOSCAN, 2013).

A hidrólise ácida é considerada um processo antigo e também muito utilizado para conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis. Neste processo, o reagente que mais é utilizado é o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) devido o baixo custo e com uma grande disponibilidade no meio ambiente (Tura, 2014), porém existem outros ácidos que é usado nas análises, como: o clorídrico, o sulfuroso, o fluorídrico e o nítrico. Este processo, pode ser dividido em hidrólise com ácido diluído e com ácido concentrado, podendo diferenciar os mesmos pelas temperaturas aplicadas e também as soluções desejadas (BERNARDO NETO, 2009).

Rabelo (2007), confirmou que a eficiência deste método tem taxas de respostas esperadas pelos pesquisadores, pois facilita as reações finais e também aproveitam ainda mais o material devido à viabilidade econômica financeira do processo, mas alguns pontos devem ser considerados para a aplicação desta tecnologia, pois existe a necessidade de neutralizar a solução intermediária antes da fermentação para que não ocorra a inibição dos processos.

A hidrólise ácida atua quebrando as microfibras dos nanocristais. O ácido mais usado é o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) que gera uma solução coloidal estável provocando uma repulsão eletrostática entre os nanocristais, ao mesmo tempo este ácido não flocula, já o ácido clorídrico não provoca o mesmo efeito (PEREIRA, 2010).

Rabelo (2010), coloca que além da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática tem apresentado resultados de grande valia para as academias, pois é quando se aplica enzimas em materiais lignocelulósicos para a produção de açúcares fermentescíveis.

Conforme descrito, a hidrólise enzimática possui diversas linhas de operação, podendo ser ácida, química e a enzimática, que também pode ser chamado de bioquímica, o qual é a específica para este projeto de pesquisa.

## **2.7 Hidrólise enzimática**

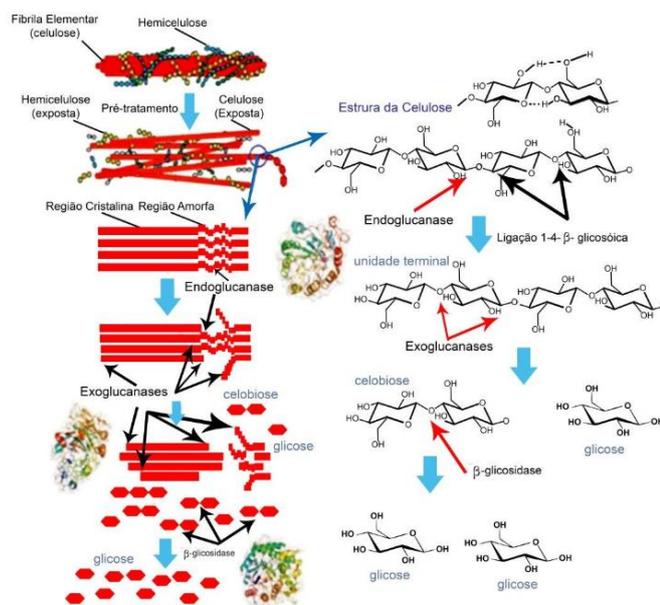
A hidrólise enzimática é a etapa onde as cadeias de celulose são quebradas até sua unidade monomérica chamada de glicose. A biomassa lignocelulósica é altamente resistente a hidrólise, principalmente em altas taxas de lignina. Por isso é necessário fazer um pré-

tratamento para facilitar a ação do ácido ou das enzimas e garantir a conversão da celulose em glicose (HIGA *et al.*, (2012).

Segundo Levine *et al.*, (2010), destacaram que mesmo com alta eficiência nos processos, devem se atentar em alguns pontos porque as celulases, por serem proteínas não conseguem ultrapassar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, desta forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras da celulose constitui o principal problema para o desencadeamento do processo de degradação, e por isso, faz-se necessário o pré-tratamento antes da etapa da hidrólise.

Segundo Toscan (2013), as celulases podem ser classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, podendo dividir em três grandes grupos: endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4); exo- $\beta$ -1,4- glucanases (EC 3.2.1.91); e  $\beta$ -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21), conforme Figura 2.10.

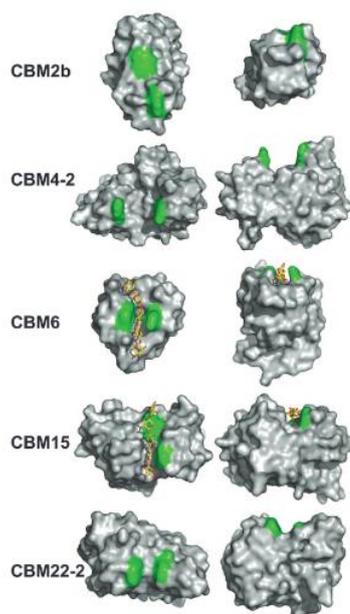
A celulase refere-se a uma classe de enzimas que são produzidas essencialmente por fungos, bactérias e protozoários e catalisam a hidrólise da celulose (RIBEIRO, 2010). Silva (2010), ressalta que as enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades de glicose, elas rompem as ligações glicosídicas da celulose, liberando oligossacarídeos e glicose.



**Figura 2.10:** Atuação das enzimas celulases sobre a matriz celulósica. Fonte: TOSCAN (2013).

As glicosidases obtêm energia livre através da clivagem das ligações glicosídicas. Essas enzimas possuem uma complexa estrutura molecular na qual uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos não-catalíticos, ou seja, *carbohydratebinding modules* (CBM) – Figura 2.11 se ligam aos terminais redutores dos polissacarídeos. Os CBM aumentam a taxa de hidrólise do módulo catalítico das glicosidases esses domínios “abraçam” as microfibrilas amorfas e cristalinas de celulose, e, dessa forma, facilitam a sacarificação (MAICHE & HUBER, 2010).

Conforme Ogeda & Petri (2010), afirmam que se a hidrólise enzimática for malsucedida, o resultado pode ser a formação de compostos que reduzem a eficiência na fermentação final.



**Figura 2.11:** Estrutura em três dimensões dos CBM de xiloglucanos. Fonte: MCCARTNEY *et al.*, 2006.

Segundo Damaso *et al.* (2012) as celulasas hidrolisam a celulose que está presente nos materiais lignocelulósicos, como resíduos industriais, florestais e gramíneas produzindo glicose. Esta enzima é considerada a terceira maior enzima industrial do mundo, isto em valores monetários, mas após mostrar grande eficiência na conversão de biomassa para EtOH, a mesma poderá ser a maior em escala de produção (DELABONA *et al.*, 2014).

Quando se hidrolisa a celulose o produto gerado é a própria glicose e a celobiose (um dímero de glicose). Por outro lado, a hidrólise de ligninas e hemiceluloses geram açúcares e

subprodutos como difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético, que muitas vezes inibem a fermentação microbiana (SCHEUFELE *et al.*, 2012).

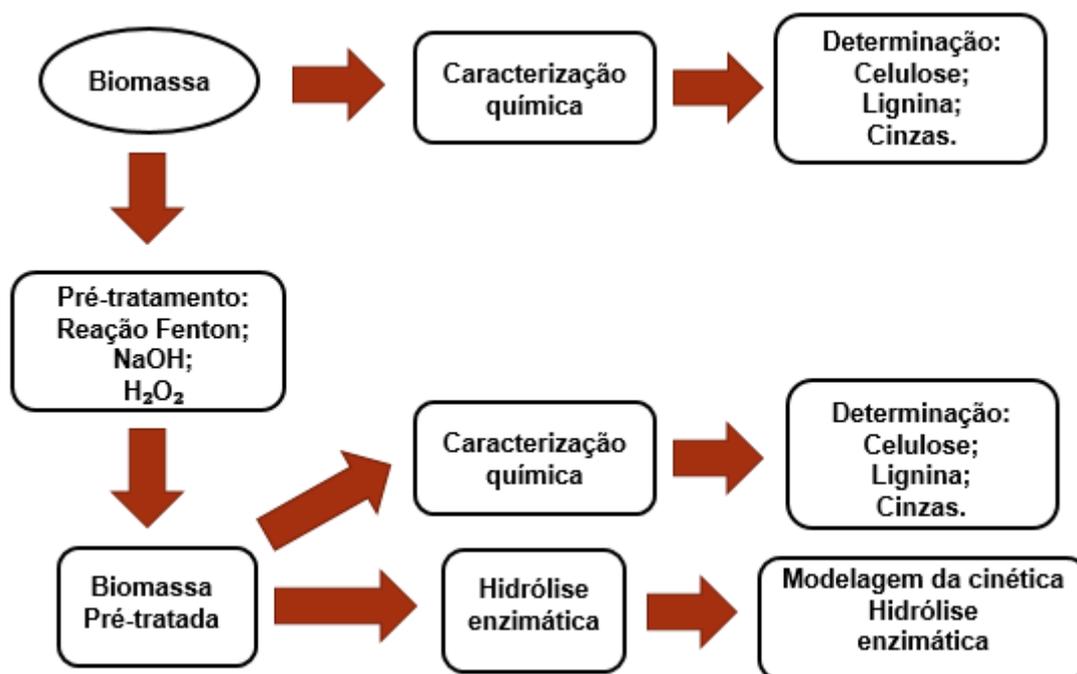
De acordo com Pereira (2013), as reações enzimáticas dependem de alguns fatores para que possam ter êxitos nos produtos finais, como: a temperatura, o pH, o tamanho do inóculo, as fontes de carbono, a presença de indutores ou de inibidores, a aeração e o tempo de crescimento.

Outros fatores podem ser primordiais para que tenha um bom rendimento na hidrólise enzimática, tais como: tipo de pré-tratamento, a termoestabilidade das enzimas, a concentração, o tempo de duração da hidrólise, pH do meio e a temperatura na reação (AGUIAR & LUCENA, 2011).

Os autores Ogeda & Petri (2010) apontam também que ao remover grande parte da hemicelulose o rendimento da hidrólise enzimática pode aumentar significativamente, isto porque a celulase adsorvida sobre ela o impede o intumescimento das fibras de celulose.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 3.1 apresenta um fluxograma com a sequência dos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.



**Figura 3.1:** Fluxograma das metodologias experimentais para obtenção de glicose a partir de pré-tratamento e hidrólise do capim-elefante. Fonte: Acervo pessoal

#### 3.1 Biomassa

Foi utilizado como matéria-prima, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schum.*), cultivar BRS Capiapu, produzido no campo da Fazenda Brizhanta, distrito de São Miguel localizado no município de Toledo, PR, Brasil (24°81'26.0"S 53°86'12.1"W, a 417m de altitude), em julho de 2016, em sulcos de 0,20 m de profundidade e com adubação de plantio realizada de acordo com a análise de solo e recomendações para a cultura de capim-elefante. Foi colhido com 365 dias após plantio e também foi colhido um capim com mais de 3 anos. Primeiramente, as análises foram feitas em folhas de plantas novas com menos de 1 ano de plantio, posteriormente foram analisados dentro da mesma área biomassa com folhas velhas, ou seja, acima de 3 anos de plantio. Muniz *et al.*, (2015), relataram que folhas mais jovens contêm maior concentração de celulose.

Antes do pré-tratamento o capim foi seco em estufa de secagem e esterilização (Nova Instruments, modelo HI 1514) a 45 °C por 3 dias. Em seguida foi triturado e estocado em saco de polipropileno, sob refrigeração, até o uso.

## **3.2 Pré-tratamento do capim-elefante**

Para a quantificação do capim-elefante foi usado o método de Van Soest (1963) adaptado por Siqueira *et al.* (2016), para determinar as quantidades de fibras de celulose, lignina e cinzas.

### **3.2.1 Pré-Tratamento com reação Fenton**

O tratamento do capim-elefante com Fenton foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, pesou-se 5 g de capim triturado e seco e adicionou-se 50 mL da solução de sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), em diferentes concentrações. Na segunda etapa foi adicionado 50 mL de solução de peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 6%, chamado de FP<sub>1</sub>. Depois de tampado, para evitar a volatilização e perda do peróxido, foi levado à incubadora *shaker* por 24 h à 150 rpm. A concentração de sulfato ferroso e a temperatura foram as duas variáveis trabalhadas no planejamento experimental do tipo Doehlert, cujos valores reais usados e os seus respectivos níveis estão definidos na Tabela 3.1. Após o tempo de incubação, a suspensão foi submetida à filtração a vácuo. O material recuperado (sólido filtrado) foi lavado com água corrente e seco em estufa a 50 °C até peso constante. O material sólido resultante foi acondicionado em papel alumínio em freezer para posterior análise de celulose e lignina.

Para a análise estatística do planejamento de Doehlert foi utilizado o *software* STATISTICA™, versão 8.0, da STATSOFT, considerando o módulo *Surface Design*, no qual foram definidos os níveis das variáveis de acordo com a matriz pré-estabelecida de Doehlert (1970), a qual obedece a critérios próprios para a construção da matriz de dados, visando a geração de modelo de segunda ordem, considerando que essa matriz não seja do tipo ortogonal e nem rotatória. Uma alternativa muito útil para os planejamentos fatoriais é a matriz proposta por Doehlert (1970). Esse tipo de planejamento é facilmente aplicado em

processos de otimização, gerando modelos de segunda ordem. Necessita de menos experimentos e pode se mover através de toda a faixa (domínio) das variáveis. O planejamento de Doehlert apresenta um domínio experimental esférico no qual se verifica uniformidade de preenchimento do espaço. Nos planejamentos de Doehlert o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Para planejamento com duas variáveis, uma das variáveis é avaliada em 5 níveis enquanto que a outra é avaliada somente em três níveis. Isso permite uma livre escolha dos fatores a serem atribuídos com maior ou menor número de níveis. Normalmente, para se estabelecer cinco níveis, se escolhe aquele fator que tenha resultado maior efeito.

**Tabela 3.1:** Valores codificados e reais das variáveis independentes do planejamento Doehlert

|                               |        |      |    |       |    |
|-------------------------------|--------|------|----|-------|----|
| <b>X<sub>1</sub> (C) – mM</b> | -1     | -0.5 | 0  | 0.5   | 1  |
|                               | 10     | 15   | 20 | 25    | 30 |
| <b>X<sub>2</sub> (T) - °C</b> | -0.866 |      | 0  | 0.866 |    |
|                               | 25     |      | 40 | 55    |    |

C: concentração de sulfato ferroso; T: temperatura

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para desenvolver uma correlação matemática visando avaliar a influência dos parâmetros concentração de sulfato ferroso ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ) sobre os resultados de concentração de celulose ( $Y_1$ ) e de lignina ( $Y_2$ ), conforme a Equação (3.1). Os resultados de  $Y_1$  e de  $Y_2$  foram ajustados segundo o seguinte modelo de regressão de segunda ordem:

$$Y = a + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + b_{11} \cdot X_1^2 + b_{22} \cdot X_2^2 + b_{12} \cdot X_1 X_2 \quad (3.1)$$

Onde:

Y = Resposta predita pela regressão (valores de  $Y_1$  para celulose ou de  $Y_2$  para lignina);

a = Intercepto do eixo da resposta;

$b_1$  e  $b_2$  = Coeficientes dos termos lineares (L) das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ ;

$b_{11}$  e  $b_{22}$  = Coeficientes dos termos quadráticos (Q) das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ ;

$b_{12}$  = Coeficiente do termo de interação entre as variáveis  $X_1$  e  $X_2$ .

Foram determinados pelo programa o *software* STATISTICA™, versão 8.0, da STATSOFT, a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis para o planejamento, juntamente com os valores obtidos de erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo e o coeficiente de determinação  $R^2$  do modelo matemático proposto. O nível de significância utilizado nas análises estatísticas foi de 10% ( $\alpha = 0,10$ ). Foi também calculada a análise de variância (ANOVA) do planejamento de modo a verificar a adequabilidade ou o grau de ajuste da regressão obtida.

### **3.2.2 Pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH)**

O tratamento com NaOH foi realizado de acordo com procedimento descrito por Krishna, (2000). Pesou-se 4,0 g de capim triturado, seco e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL, juntamente com solução de NaOH a 4 % (20 mL de solução por grama de capim), ou seja, 80 mL no total. A suspensão foi levada à autoclave, nas temperaturas de 80 °C e de 120 °C por 30 min. Após a autoclave a suspensão foi submetida à filtração à vácuo e o material recuperado (sólido filtrado) foi lavado com água corrente, e neutralizado com ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a 8%.

Para a análise estatística dos experimentos foi utilizado o *software* Action™, versão 3.1.43, da Estatcamp. Foram determinados pelo programa, a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis por meio de Análise de Variância (ANOVA), juntamente com os gráficos dos efeitos e análise de resíduos. As médias dos tratamentos foram comparadas usando o Teste de Tukey. O nível de significância utilizado nas análises estatísticas foi de 10% ( $\alpha = 0,10$ ).

### **3.2.3 Pré-tratamento alcalino oxidativo ( $H_2O_2$ )**

O tratamento alcalino-oxidativo com  $H_2O_2$  foi adaptado da metodologia descrita por Krishna (2000). Foi pesado 4,0 g do capim triturado, seco e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL juntamente com solução de  $H_2O_2$  1% (50 mL de solução por grama de capim), ou seja, 200 mL de  $H_2O_2$ . Ajustou-se o pH da solução com NaOH para 11,5. Adicionou-se as amostras na autoclave à temperatura de 80 °C e 120 °C por 30 min. Após o tempo de

tratamento, o material foi submetido à filtração a vácuo e feitas lavagens sucessivas até o sólido filtrado apresentar pH neutro.

Para a análise estatística dos experimentos foi utilizado o *software* Action™, versão 3.1.43, da Estatcamp. Foram determinados pelo programa a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis por meio de Análise de Variância (ANOVA), juntamente com os gráficos dos efeitos e análise de resíduos. O nível de significância utilizado nas análises estatísticas foi de 10% ( $\alpha = 0,10$ ).

### 3.3 Hidrólise Enzimática do capim-elefante

A hidrólise enzimática do capim-elefante pré-tratado com a reação Fenton com peróxido de hidrogênio a 20%, denominado FP<sub>2</sub>, foi realizado de acordo com a metodologia de Oliveira (2012), adaptada. Adicionou-se em um erlenmeyer de 250 mL, 50 mL de solução tampão citrato de sódio pH 4,8 a 50 mM na proporção de 4% (p/v), ou seja, 2 g (em base seca) de matéria-prima, pré- tratada, sendo posteriormente adicionado 0,53 mL de Celluclast® 1.5L (SIGMA). Após, o erlenmeyer foi colocado em um *shaker* a uma temperatura constante de 50 °C e com uma frequência do agitador de 150 rpm. A hidrólise foi realizada em duplicata para a condição de pré-tratamento pelo período de 72 h, conforme sendo analisado nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 13, 24, 36, 48 e 72 h após o início da reação.

A análise de açúcar redutor (AR) foi realizada conforme método de Miller (1959), retirando-se 0,5 mL, após o tempo especificado e adicionando-se 0,5 mL de DNS, levando esta amostra para o banho-maria (já aquecido) a 100 °C, por 5 min. Decorrido o tempo da hidrólise a amostra foi levada ao banho de gelo. Adicionou-se 5 mL de H<sub>2</sub>O deionizada e as amostras foram lidas em espectrofotômetro à 540 nm.

Considerando o total de celulose na amostra e sua massa inicial, é possível calcular o rendimento das reações de hidrólise. Para isso, utilizaram-se os valores máximos obtidos na concentração de glicose e o fator de conversão de glicose em celulose (Lu *et al.*, 2013). Os cálculos do rendimento da hidrólise foram realizados pela Equação 3.2:

$$RH (\%) = \left( \frac{[Gli]}{[Cel]} \times 0,9 \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo: RH%: rendimento da hidrólise em porcentagem; [Gli]: concentração de glicose da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ); [Cel]: concentração de celulose da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ); 0,9: fator de conversão da celulose.

### 3.4 Modelagem matemática da Hidrólise Enzimática

Os materiais celulósicos são insolúveis, estruturados, e consistem de componentes que são resistentes à degradação enzimática, o que exige da hidrólise muitas ações que possam melhorar a reação final da operação, mas estes mecanismos são altamente complexos, que tornam a modelagem matemática as vezes incerta em relação à muitos parâmetros físicos, cinéticos e de transferência de massa (GAN *et al.*, 2003).

Rabelo (2010) ressalta que cada modelo matemático tem características específicas, podendo formular diversas condições da hidrólise, como: o consumo e o tipo de substrato, a sinergia das enzimas celulasas, a inibição pelo produto, a adsorção não produtiva e as resistências difusionais, dentre outras, por isso é importante ao se estabelecer uma modelagem da cinética enzimática que se incluam informações importantes, mas que não sejam tão complexas.

Dentro deste contexto pode-se chamar de modelos empíricos aqueles modelos estatísticos que podem otimizar as condições operacionais em uma reação enzimática, no entanto estão restritos às faixas de operação estudadas.

Salienta-se que os modelos mecanísticos são baseados em alguns princípios básicos e até avançados, porém teorias complexas e suposições podem dificultar os trabalhos e não ter exatidão nos resultados finais (ZHANG *et al.*, 2010).

A Tabela 3.2 apresenta algumas características cinéticas e uma modelagem aproximada de diferentes estágios de compreensão da complexa reação de hidrólise da celulose.

**Tabela 3.2:** Comparação de alguns modelos cinéticos de hidrólise enzimática da celulose (GAN *et al.*, 2003)

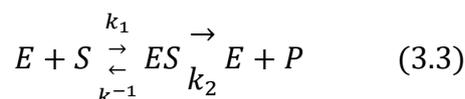
| Estado do substrato <sup>a</sup> | Sistema enzimático <sup>b</sup>                  | Abordagem cinética <sup>c</sup> | Tipo de inibição | Referências                |
|----------------------------------|--|---------------------------------|------------------|----------------------------|
| MH                               | E <sub>12</sub>                                  | QSS                             | Competitiva      | HOWELL e STUCK (1975)      |
| MH                               | E <sub>123</sub>                                 | MM                              | Competitiva      | HUANG (1975)               |
| GP                               | E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> , E <sub>3</sub> | MM                              | Não-Competitiva  | OKAZAKI e MOO-YOUNG (1978) |
| MH                               | E <sub>123</sub>                                 | QSS                             | Competitiva      | HOWELL e MANGAT (1978)     |
| CA                               | E <sub>123</sub>                                 | MM                              | -                | PEITERSEN e ROSS (1978)    |
| CA                               | E <sub>123</sub>                                 | QSS                             | Competitiva      | RYU <i>et al.</i> (1982)   |
| MH                               | E <sub>12</sub> , E <sub>3</sub>                 | -                               | Não-Competitiva  | FAN e LEE (1983)           |
| AI                               | E <sub>123</sub>                                 | QSS                             | Competitiva      | GAN <i>et al.</i> (2003)   |

<sup>a</sup>MH: Material homogêneo; **GP**: Grau de polimerização; **CA**: Cristalino e amorfo; **AI**: Ativo e Inerte

<sup>b</sup>E<sub>1</sub>: Endoglicanase; E<sub>2</sub>: Celobiohidrolase; E<sub>3</sub>: β-glicosidase; E<sub>12</sub>: Combinação E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>; E<sub>123</sub>: Combinação E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>; <sup>c</sup>QSS: Estado quase-estacionário; MM: Michaelis-Menten

### 3.4.1 Desenvolvimento do modelo matemático

A hidrólise enzimática é representada a partir da enzima celulase (E) (g L<sup>-1</sup>) sendo adsorvida nos sítios ativos do substrato insolúvel (S) (g L<sup>-1</sup>) que posteriormente forma o complexo (ES) (g L<sup>-1</sup>), o qual irá produzir glicose (P) (g L<sup>-1</sup>) e a enzima celulase (E), sendo este procedimento representado pela Equação 3.3, conforme descrição de ZHANG *et al.* (2010) e SHEN & AGBLEVOR (2008):



Em que k<sub>1</sub> (L h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>) é a constante cinética de adsorção da enzima, k<sub>-1</sub> (h<sup>-1</sup>) é a constante cinética de desorção da enzima e k<sub>2</sub> é a constante cinética de formação de produto. Aplicando a lei de ação de massa e a teoria de estado semi-estacionário, tem-se as seguintes equações matemáticas deduzidas, sendo estas representadas pela Equação 3.4 e Equação 3.5 (ZHANG *et al.*, 2010; SHEN & AGBLEVOR, 2008):

$$[P] = [S_0] \cdot \left[ 1 - \exp \left( -k_2 \int_0^t \frac{[E]}{[E]dt + K_e} \right) \right] \quad (3.4)$$

$$K_e = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.5)$$

Em que  $K_e$  é a constante cinética de equilíbrio,  $[S_0]$  é a concentração inicial de substrato,  $[P]$  é a concentração de produto e  $[E]$  é a concentração de enzima. A Equação 3.4 expressa a relação entre a concentração de produto (glicose) e tempo de hidrólise o qual indica que a concentração de produto aumenta com o tempo e a máxima concentração de produto é  $[S_0]$ .

Para obter a relação entre concentração de glicose e tempo, é necessário conhecer a atividade da enzima celulase durante o processo de hidrólise enzimática e a fase de desativação da celulase. Portanto, considerando a desativação da celulase uma reação de segunda ordem, a taxa de desativação pode ser expressa pela Equação 3.6 (ZHANG et al., 2010):

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{de2} \cdot [E]^2 \quad (3.6)$$

Em que  $K_{de2}$  ( $L \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ ) é a constante cinética de ordem 2 de desativação da celulose (ZHANG et al., 2010). A partir da Equação 3.6, considerando a condição inicial ( $[E] = [E_0]$ ) em  $t = 0$ , se obtém a Equação 3.7:

$$[E] = \frac{[E_0]}{1 + [E_0] \cdot k_{de2} \cdot t} \quad (3.7)$$

Substituindo a Equação 3.7 na Equação 3.4 e integrando com a condição inicial ( $[P] = 0$  em  $t = 0$ ), obtém-se a Equação 3.8:

$$[P] = [S_0] \cdot \left[ 1 - \left[ 1 + \frac{K_e \cdot [E_0]}{K_e + [E_0]} \cdot k_{de2} \cdot t \right]^{\frac{k_2}{K_e \cdot k_{de2}}} \right] \quad (3.8)$$

A Equação 3.8 representa o modelo matemático obtido, explicitando a relação entre a concentração de produto [P] o tempo de hidrólise  $t$  para uma contração inicial de enzima  $[E_0]$ . Na Equação 3.9,  $t$  e  $[E_0]$  são as variáveis independentes e  $[P]$  é a variável dependente. Ao utilizar este modelo matemático, ajustando a concentração enzimática e o tempo de hidrólise, é possível obter o máximo aproveitamento da celulase para aplicações industriais.

Por fim, foi analisada a velocidade inicial da hidrólise enzimática ( $v_0$ ) em ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), um parâmetro bastante importante para estudar a cinética das enzimas. Para o modelo matemático estabelecido, sabe-se que ( $v_0$ ) é igual a diferencial da variação da concentração de produto de acordo com o tempo, sendo assim, diferenciando a Equação 3.3, temos:

$$v_0 = \left[ \frac{d[P]}{dt} \right]_{t=0} = \frac{k_2 \cdot [S_0] \cdot [E_0]}{K_e + E_0} \quad (3.9)$$

A Equação 3.9, representa um modelo que se relaciona com a concentração de substrato, assim como Henri-Michaelis-Menten. Porém, para o presente trabalho, se torna mais adequado relacionar  $v_0$  de acordo com a concentração inicial de enzima  $[E_0]$  representando a Equação 3.10 (ZHANG et al., 2010; BAILEY, 1989):

$$v_0 = \frac{V_{emax} \cdot [E_0]}{K_m + [E_0]} \quad (3.10)$$

Em que  $V_{emax}$  ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) é a máxima velocidade inicial de hidrólise enzimática e  $K_m$  é a constante cinética de meia saturação.

Comparando as Equações 3.9 e 3.10, é possível deduzir que:

$$K_m = K_e \quad (3.11)$$

$$V_{emax} = k_2 \cdot [S_0] \quad (3.12)$$

### 3.5 Métodos Analíticos

#### 3.5.1 Determinação da Celulose

O capim-elefante foi analisado de acordo com o método de Siqueira *et al.* (2016), onde pesou-se 1,0 g da amostra de capim-elefante e adicionou-se 16,5 mL de uma solução de reagente ácido, previamente preparado com ácido acético glacial 72,73%, água destilada 18,18% e ácido nítrico 9,09%, ou seja, 12 mL de ácido acético glacial 3 mL de água destilada e 1,5 mL de ácido nítrico. Posteriormente foi realizada a etapa de digestão da celulose, onde a amostra foi colocada em banho-maria, em ebulição, por 30 min. Após a digestão foi adicionado 20 mL de álcool etílico PA. O material foi filtrado, adicionando 20 mL de benzeno e 20 mL de éter sulfúrico e lavado com 20 mL de álcool etílico. O conteúdo filtrado foi levado à estufa a  $105 \pm 2$  °C até peso constante. O teor de celulose foi calculado utilizando a Equação 3.13:

$$\text{Teor de celulose} = \left( \frac{M_{fc} - M_f}{M_a} \right) * 100 \quad (3.13)$$

Sendo:

$M_{fc}$  = massa funil + celulose (g);

$M_f$  = massa do funil (g);

$M_a$  = Massa da amostra (g);

Teor de celulose (%)

#### 3.5.2 Determinação da Lignina

A determinação da lignina seguiu o método proposto por Morais *et al.* (2011). Adicionou-se 1,0 g de capim tratado e transferiu-se cada amostra para um béquer onde adicionou-se 17,0 mL de ácido sulfúrico 72,0%, resfriado em geladeira de 10 a 15 °C antes do uso. Agitou-se vigorosamente o material com um bastão de vidro, até homogeneização, formando uma pasta. As amostras foram mantidas em uma capela para deixar em digestão

por 24 h. Posteriormente, o ácido sulfúrico que estava na digestão com o capim foi diluído para 4,0% adicionando-se 289,0 mL de água destilada. O conteúdo foi transferido para um balão de fundo redondo de 500 mL e mantido em refluxo por 4 h. O conteúdo do balão foi filtrado e levado à estufa a  $80 \pm 2$  °C até massa constante. Após a secagem em estufa, o material levado a mufla à  $500 \pm 2$  °C por 2 h. A amostra foi pesada e incinerada, para que pudesse determinar o teor de cinzas a partir da Equação 3.14 e conseqüentemente calcular o teor de lignina presente no capim pela Equação 3.15.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \left( \frac{M_{fc} - M_f}{M_a} \right) * 100 \quad (3.14)$$

$$\text{Teor de lignina (\%)} = \left( \frac{M_{fl} - M_f}{M_a} \right) * 100 - TC \quad (3.15)$$

Sendo:

$M_f$  = massa do funil (g);

$M_a$  = Massa da amostra (g);

$M_{fl}$  = massa funil + lignina após a secagem na estufa (g);

$M_{fc}$  = massa do funil + cinzas após a calcinação em mufla (g);

Teor de lignina (%)

### 3.5.3 Determinação da concentração de glicose

As concentrações de glicose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e realizadas no laboratório do grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos, do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), Lorena/SP, nas seguintes condições: coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,05M, fluxo de 0,6 mLmin<sup>-1</sup>; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (MILLIPORE).

### 3.5.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias do material antes e depois do processo de pré-tratamento foram obtidas por um microscópio eletrônico de varredura (Tescan Vega 3) do LABCATPROBIO/UFPR/Campus Palotina, com ampliações entre 200-500x. As amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro por um metalizado e depois fixadas em um suporte de amostra por meio de uma fita de carbono. Além das imagens, o equipamento contém um sistema de espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDX) (Penta FET Precision - Oxford), que permitiu uma avaliação semi-quantitativa da composição química.

### 3.5.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

O equipamento usado foi o STA 6000, da Perkin Elmer. As condições experimentais foram: faixa de temperatura de 30 a 825°C, razão de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL min<sup>-1</sup>, cadinho de cerâmica e massa da amostra de aproximadamente 7 mg. A Análise Termogravimétrica fornece informações e características sobre o comportamento de materiais diante de um aumento progressivo de temperatura. Por meio de gráficos é possível comparar as curvas e picos visualizando o efeito dos tratamentos (BECKERMANN & PICKERING, 2018).

### 3.5.6 Caracterização por DR-X

A caracterização microestrutural do material foi realizada aplicando-se difratometria de Raio X (Bruker modelo D2-PHASER). As medidas foram realizadas operando no modo de varredura contínua, com radiação Cu-K $\alpha$  (1.5418 Å) e filtro de níquel, com voltagem de 30 KV e corrente de 10 mA. Foi utilizada uma velocidade de varredura em 2 $\theta$  de 0,02°/min e um tempo por passo de 1 s, na faixa de 5° a 80°.

A cristalinidade da fibra de celulose foi avaliada por Difração de Raio-X. O Índice de Cristalinidade (IC) foi obtido através da razão entre a máxima intensidade do pico 002 ( $I_{002}$ ,  $2\theta = 22,5$ ) e o mínimo da depressão ( $I_{am}$ ,  $2\theta = 18,5$ ) entre os picos 001 e 002 (Segal *et al.*, 1959; Rodrigues *et al.*, 2007) de acordo com a Equação 3.16.

$$(\%)IC = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{am}} \times 100 \quad (3.16)$$

Sendo que  $I_{002}$  é a intensidade máxima no pico 002 e  $I_{am}$  é referente à mínima depressão da estrutura amorfa.

Com esta análise, foi possível detectar a remoção da parte amorfa da biomassa lignocelulósica, bem como a modificação da estrutura cristalina da celulose.

### **3.5.7 Análise de carbono orgânico total (COT)**

Medidas de carbono orgânico total foram realizadas utilizando um analisador de carbono orgânico por espectrometria NDIR (infravermelho não dispersivo) equipado com um mostrador OCT-L (Shimadzu, modelo TOC-L) e uma unidade de medição de nitrogênio total (TNM-1). O carbono orgânico é obtido pela diferença entre o carbono total e o carbono inorgânico. As amostras utilizadas foram previamente filtradas utilizando membrana (0,45  $\mu\text{m}$ ) e diluídas a 25 mL com água destilada.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do capim-elefante

A Tabela 4.1 apresenta a composição físico-química do capim-elefante em termos de teor de celulose e de lignina tanto para o capim novo (CN) como para o velho (CV). Em ambas as biomassas a composição da celulose reduziu consideravelmente da CN para a CV, sendo que a CN é uma planta com até dois anos de corte (colheita), já quando a biomassa é considerada velha, o número de cortes está acima de 4 anos, sendo que a média no teor de celulose passou de 52,24% no CN para o 35,01% CV resultando em uma diminuição de 12,01%. A composição da lignina no capim teve um aumento considerável do CN para o velho de 11,30% percentuais. Este aumento no teor de lignina se deve principalmente a clivagem de ligações de éter e a hidrólise das ligações internas da lignina, assim como as ligações lignina-hemicelulose (MOREIRA NETO *et al.*, 2013).

**Tabela 4.1:** Caracterização físico-química das folhas de capim-elefante novo e velho ambos *in natura*, expresso em base seca.

| Biomassa | Análises     |              |
|----------|--------------|--------------|
|          | Celulose (%) | Lignina (%)  |
| CN       | 52,24 ± 3,10 | 10,00 ± 0,53 |
| CV       | 35,01 ± 0,90 | 24,44 ± 0,83 |

Fonte: autor

CN: capim (biomassa) novo; CV: capim (biomassa) velho.

Devido a fatores como a temperatura, constituição do solo, umidade, variedade, método de plantio, época de colheita, entre outros, os valores obtidos de celulose e de lignina podem sofrer variação (ZHAO *et al.*, 2009). Os teores de celulose e de lignina obtidos neste trabalho se aproximam dos valores já descritos na literatura. Campos (2017), relata que ao analisar a composição, principalmente em relação à celulose que apresenta um teor de 21,59%. Entretanto, observa-se uma alta quantidade de lignina presente no material, cerca de 33,92 %, no que dificulta a ação das enzimas no processo de hidrólise enzimática.

CAMPOS (2015), ao analisar o capim-elefante com 365 dias após o plantio, ou seja, um CN, observou que a composição química em relação a celulose e a lignina nesta planta, foi de 38,0 e 7,6%. Comparando estes valores com a Tabela 4.1, em que a celulose neste trabalho alcançou um resultado de 52,24% e a lignina 10,00%, verifica-se que o valor da

composicao química da celulose está superior ao da literatura e a lignina ficou um pouco acima do mesmo autor.

PEREIRA (2013), caracterizando quimicamente o capim-elefante, no âmbito de celulos e lignina, o mesmo obteve 37,0% de celulose com 8,4% de lignina, comparando com o resultado desta pesquisa na Tabela 4.1, a celulose foi de 53,3% e lignina 10,0%, ou seja, 16% melhor resultado na pesquisa e 1,6% a mais em relação a lignina.

Ao comparar os resultados, na Tabela 4.1, verifica-se que a média entre o CN e CV foi de 17,22%, bem próximo dos valores da Tabela 4.2, que teve uma média de 24,5%, já em relação a celulose, pode-se afirmar que a composição dos resíduos da palha da cana-de-açúcar, estão entre 26,74 a 54,18%, na Tabela 4,2, de acordo com os resultados apresentados nesta pesquisa com capim-elefante de 52,24% para a CN e 35,01% para a CV.

DA SILVA (2013) relata que é bem pouca a diferença da composição química da cana-de-açúcar em relação ao bagaço e a palha, conforme Tabela 4.2. Comparando com os resultados desta pesquisa, os valores são superiores, levando em conta que esta diferença pode ser acarretada principalmente pela época de plantio.

**Tabela 4.2:** Teores de celulose e lignina em diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, madeira, resíduos agrícolas, coníferas e folhosas

| Referências                    | Composição  |               |
|--------------------------------|-------------|---------------|
|                                | % Celulose  | % Lignina     |
| Pitarelo, 2007                 | 41,1        | 31,4          |
| Gouveia <i>et al.</i> , 2009   | 42,8        | 22,4          |
| Canilha <i>et al.</i> , 2011   | 45,0        | 19,1          |
| Rabelo <i>et al.</i> , 2011    | 38,4        | 25,0          |
| Ogata, 2013                    | 26,7 - 54,2 | 17,70 - 27,12 |
| Da Silva (2013) <sup>bc</sup>  | 46,0        | 22,60         |
| Da Silva (2013) <sup>pc</sup>  | 45,2        | 21,80         |
| Guilherme (2014) <sup>m</sup>  | 40,0 – 45,0 | 20,0 – 30,0   |
| Guilherme (2014) <sup>ra</sup> | 40,0        | 22,0 – 30,0   |
| Guilherme (2014) <sup>c</sup>  | 42,0        | 28,0          |
| Guilherme (2014) <sup>f</sup>  | 45,0        | 22,0          |

Fonte: Adaptado Ogata, 2013.

Guilherme (2014)<sup>bc</sup>: bagaço da cana-de-açúcar; Guilherme (2014)<sup>pc</sup>: palha da cana-de-açúcar; Guilherme (2014)<sup>m</sup>: madeira; Guilherme (2014)<sup>ra</sup>: resíduos agrícolas; Guilherme (2014)<sup>c</sup>: coníferas; Guilherme (2014)<sup>f</sup>: folhosas.

GUILHERME (2014), em um trabalho de pesquisa obteve composição química de algumas biomassas diferentes das analisadas corriqueiramente. Os resultados de celulose foram entre 40,0 a 45,0% e a lignina entre 20,0 a 35,0%, respectivamente. Conforme Tabela 4.2, tais variações encontradas na literatura, podem ser explicadas pelo tipo diferente de biomassa, área plantada, ambiente, tipo de solo, etc.

WANDERLEY *et al.* (2013), analisaram o bagaço da cana-de-açúcar referente as constituições químicas de celulose e lignina, em um determinado estágio da planta e os resultados de celulose e lignina foram 42,8 e 22,1%. Ogata (2013), confirmou que a composição inicial de celulose e lignina na cana-de-açúcar está em torno de 26,74 a 54,18% de celulose e de 17,70 a 27,12% de lignina, conforme Tabela 4.2.

Scholl (2014), analisando a composição química principalmente em relação a celulose e lignina, mostrou que o CC possui uma quantidade maior quando está sendo analisado em plantas mais velhas, acima de 4 anos de plantio, ressaltando este posicionamento, o autor dessa pesquisa, expõe que o CN, possui uma celulose em média de 10,00%, já a CV 24,44%.

TOSCAN (2013) determinou os teores de celulose e lignina de diferentes amostras de variedades de capim-elefante conforme Tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Composição estrutural do capim-elefante descrita literatura (%)

| Genótipos capim-elefante                            | Celulose | Lignina | Método utilizado  | Referência                             |
|---|----------|---------|-------------------|--|
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Napier              | 47,3     | 7,6     | Van Soest         | Benedetti <i>et al.</i> (2008)         |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Napier              | 50,5     | 10,7    | Van Soest         | Lopes <i>et al.</i> (2009)             |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Berm.               | 35,0     | 3,0     | Van Soest         | Brandon <i>et al.</i> (2011)           |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Napier              | 39,2     | 2,4     | Van Soest         | Brandon <i>et al.</i> (2011)           |
| <i>P. purpureum</i> , Schum.                        | 36,0     | 20,8    | Lignina de Klason | Menegol (2012)                         |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Napier              | 34,4     | 4,6     | Van Soest         | Chen <i>et al.</i> (2012)              |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Napier              | 33,1     | 3,1     | Van Soest         | Singh <i>et al.</i> (2012)             |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Napier              | 32,9     | 3,6     | Van Soest         | Wongwatanapalboon <i>et al.</i> (2012) |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv Mott                | 35,6     | 3,7     | Van Soest         | Wongwatanapalboon <i>et al.</i> (2012) |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. cv King Napier         | 32,0     | 3,1     | Van Soest         | Wongwatanapalboon <i>et al.</i> (2012) |
| <i>P. purpureum</i> , Schum. X <i>P. americanum</i> | 33,9     | 3,6     | Van Soest         | Wongwatanapalboon <i>et al.</i> (2012) |

Fonte: Adaptado de Toscan (2013)

Os resultados obtidos na Tabela 4.3, mostram que a variedade Napier do capim-elefante foi a biomassa com maior liberação de celulose com 50,5% e também maior liberação de lignina com 2,4%, este resultado de lignina, mostra que quanto menor esta quantidade, melhor rendimento em produção de AR. Este resultado apresentado, está de acordo com os dados desta pesquisa, pois obteve uma média de 52,2% de celulose e 10,0% de lignina, estas diferenças, pode-ser interpretado por diversos componentes como estágio de desenvolvimento da planta, adubação diferenciada, método analisado.

OLIVEIRA (2012), em um trabalho de pesquisa constatou que a composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresentou resultados de celulose e lignina de 38,09% e 23,02%, respectivamente. Para a celulose de cana-de-açúcar, BOUSSARSAR *et al.* (2009)

encontraram valor de 45%, enquanto que RABELO *et al.* (2011) encontrou o valor de 38,4%, GARCIA (2009) obteve o valor de 37,35%. Tais variações são comumente encontradas na literatura, pois a composição química de cada espécie de cana-de-açúcar sofre vários tipos de influência como, por exemplo, temperatura, umidade, constituição do solo, época de colheita, entre outros, o mesmo pode acontecer com o capim-elefante, entretanto este é uma planta C<sub>4</sub>, que aumenta a taxa fotossintética na mesma área foliar de planta.

## 4.2 Pré-tratamento do capim-elefante com reação Fenton

Com o pré-tratamento de qualquer resíduo lignocelulósico busca-se um aumento no teor de celulose e diminuição no teor de lignina. A Tabela 4.4 apresenta os resultados de celulose e de lignina obtidos de acordo com o planejamento fatorial do tipo Doehlert. Observa-se que os valores mais elevados de celulose foram os do ponto central do planejamento (ensaios 1 a 3), ao passo que o menor valor de lignina foi obtido no ensaio 5, o qual corresponde à maior concentração do sulfato ferroso.

**Tabela 4.4:** Matriz de Doehlert para 2 variáveis (concentração de sulfato ferroso – C e temperatura – T) para avaliar o pré-tratamento com reação Fenton

| Ensaio             | C – X <sub>1</sub> | T – X <sub>2</sub> | % Celulose – Y <sub>1</sub> | % Lignina – Y <sub>2</sub> |
|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1                  | 0                  | 0                  | 55,45                       | 10,21                      |
| 2                  | 0                  | 0                  | 53,50                       | 10,40                      |
| 3                  | 0                  | 0                  | 52,47                       | 9,97                       |
| 4                  | -1                 | 0                  | 48,05                       | 11,58                      |
| 5                  | 1                  | 0                  | 49,86                       | 9,02                       |
| <b>Média</b>       | -                  | -                  | 51,87                       | 10,24                      |
| <b>Controle</b>    | Água               | 0                  | 51,02                       | 12,23                      |
| 6                  | 0,5                | 0,866              | 51,23                       | 10,80                      |
| 7                  | -0,5               | 0,866              | 51,62                       | 13,00                      |
| <b>Média</b>       | -                  | -                  | 51,42                       | 11,90                      |
| <b>Controle</b>    | Água               | 0,866              | 52,94                       | 14,45                      |
| 8                  | 0,5                | -0,866             | 46,80                       | 10,14                      |
| 9                  | -0,5               | -0,866             | 47,10                       | 10,71                      |
| <b>Média</b>       | -                  | -                  | 46,95                       | 10,43                      |
| <b>Controle</b>    | Água               | -0,866             | 48,34                       | 13,87                      |
| <b>Média geral</b> |                    |                    | 50,57                       | 11,26                      |

Ensaios: 1; 2; 3 – nível 0 (20 mM) adic. 33,3 mL solução mãe + 16,7 mL H<sub>2</sub>O; 5 - nível +1 (30 mM) adic. 50,0 mL solução mãe sem diluição.

O controle na Tabela 4.4 corresponde ao ensaio realizado sem a presença do sulfato ferroso e do peróxido de hidrogênio, apenas com H<sub>2</sub>O deionizada, para fins de comparação com aqueles ensaios que usam esses dois elementos. O controle foi realizado na mesma

condição de temperatura, por isso tem-se três controles na tabela, ou seja, um para cada temperatura.

De modo geral, comparando-se os resultados obtidos de celulose nos ensaios com os seus respectivos controles verificaram-se valores mais altos apenas para os ensaios do ponto central (1 a 3), ou seja, nestes ensaios obtiveram-se valores mais altos de celulose em relação ao controle. Nos demais ensaios verificou-se perda de celulose, o que pode ser decorrente de combinações inadequadas das variáveis temperatura e concentração de sulfato ferroso.

Com relação à concentração de lignina todos os ensaios apresentaram resultados inferiores aos seus respectivos controles, indicando efetividade na remoção ou degradação da lignina com o mecanismo de reação Fenton.

A celulose apresentou média de 50,57% para as diferentes concentrações de sulfato ferroso e temperaturas. Trabalhando com sorgo, Michalska *et al.* (2012) verificaram que os valores médios de celulose ficaram em torno de 31,4% de celulose pré-tratando com Fenton e peróxido. Estes valores estão próximos dos resultados apresentados na Tabela 4.4.

Bhange *et al.* (2015), analisando-se diversas biomassas misturadas pré-tratando com Fenton e peróxido de hidrogênio na razão de ¼ (v/v), obtiveram como resultados de caracterização de celulose e lignina em 38,54 e 25,68%, respectivamente, abaixo dos resultados apresentados nesta pesquisa.

Uma estratégia eficaz de pré-tratamento é remover a lignina e hemicelulose sem causar muito dano à celulose (Gabhane *et al.*, 2015). No presente estudo, como mostra a Tabela 4.4, houve um aumento de 44,55% na celulose e uma remoção de 90,98% no componente de lignina no Fenton e peróxido no pré-tratamento.

Kato *et al.* (2014), trabalhando com *Micanthus h.*, palha de milho e palha de trigo para obter o melhor resultado em deslignificação pré-tratando com Fenton-peróxido nas condições de 10 g de biomassa, 176 mmol peróxido de hidrogênio e 1,25 mmol Fe<sup>2+</sup> com 200 mL de água deionizada, obteve uma média na lignina de 12,5%. Esses dados mostram que os resultados desta pesquisa estão de acordo com a literatura, conforme a Tabela 4.6, que mostrou uma porcentagem de lignina entre 9,02 a 14,45%.

Na Tabela 4.5 são apresentados os valores dos efeitos e dos coeficientes da regressão para Y<sub>1</sub> (% celulose) e para Y<sub>2</sub> (% lignina).

**Tabela 4.5:** Efeitos e coeficientes obtidos para  $Y_1$  e  $Y_2$  na matriz de Doehlert ( $\alpha=0,10$ )

| Termo           | $Y_1$       |                 |              | $Y_2$        |                |              |
|-----------------|-------------|-----------------|--------------|--------------|----------------|--------------|
|                 | Efeito      | p-valor         | Coef.        | Efeito       | p-valor        | Coef.        |
| Intercepto      | 53,8        | <b>0,000264</b> | 53,80        | 10,19        | <b>0,00014</b> | 10,19        |
| ( $X_1$ ) C (L) | 0,48        | 0,632485        | 0,24         | <b>-1,31</b> | <b>0,00882</b> | <b>-0,65</b> |
| ( $X_1$ ) C (Q) | <b>-2,4</b> | <b>0,072398</b> | <b>-1,21</b> | 0,05         | 0,64198        | 0,02         |
| ( $X_2$ ) T (L) | <b>4,4</b>  | <b>0,097879</b> | <b>2,23</b>  | <b>1,47</b>  | <b>0,02073</b> | <b>0,73</b>  |
| ( $X_2$ ) T (Q) | <b>-6,8</b> | <b>0,081403</b> | <b>-3,40</b> | <b>1,88</b>  | <b>0,02358</b> | <b>0,94</b>  |
| 1L x 2L         | -0,04       | 0,97898         | -0,02        | <b>-0,81</b> | <b>0,06362</b> | <b>-0,40</b> |

$Y_1$ : Celulose (%);  $Y_2$ : Lignina (%).

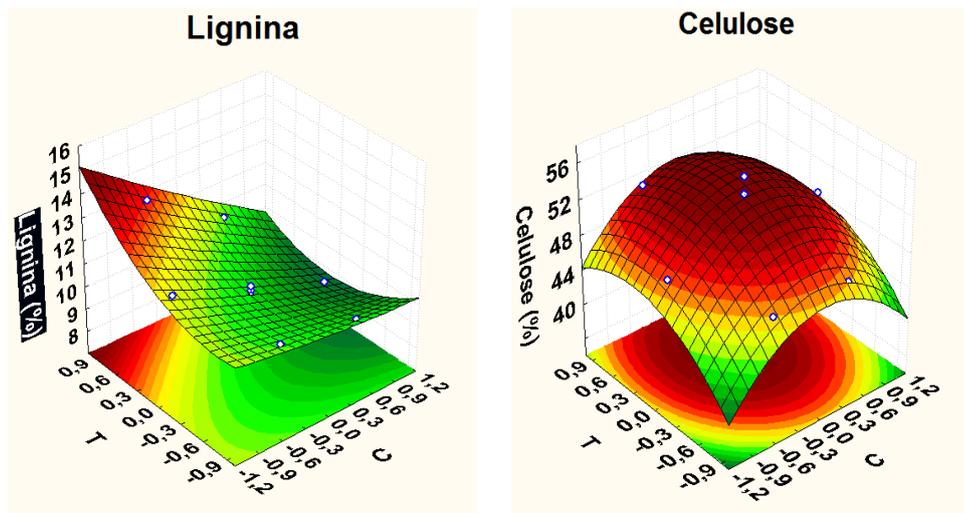
São apresentados os p-valor indicando que são significativos os efeitos dos termos cujos p-valor são inferiores ao nível de significância estabelecido ( $\alpha=0,10$ ). Neste caso, os valores indicados em negrito na Tabela 4.5, obedecem a essa indicação. Ou seja, para a resposta  $Y_1$  (celulose) apenas o termo quadrático de  $X_1$  e os termos linear e quadrático de  $X_2$  são significativos e influenciam a resposta, no nível de significância considerado. O sinal negativo do efeito indica que, se ao aumentar o nível da variável, o valor da resposta irá diminuir. Para a resposta  $Y_2$  (lignina) apenas o termo quadrático de  $X_1$  não exerce influência sobre a mesma. Para a variável temperatura ( $X_2$ ), tanto o termo linear quanto o termo quadrático, influenciaram significativamente para ambas as respostas. A interação entre  $X_1$  e  $X_2$  só foi significativa para a lignina ( $Y_2$ ) e o seu efeito negativo indica que o aumento simultâneo da concentração de sulfato ferroso e da temperatura diminui o teor de lignina.

A Figura 4.1 mostra a superfície de resposta obtida para a % de celulose ( $Y_1$ ) e para a % de lignina ( $Y_2$ ). Observam-se comportamentos opostos, ou seja, a obtenção de um pico de concentração de celulose no ponto central do planejamento e valores mais baixos de lignina para níveis mais baixos de temperatura e de concentração de sulfato ferroso.

As equações (4.1) e (4.2) da regressão quadrática descrevem os perfis de concentração de celulose ( $Y_1$ ) e de lignina ( $Y_2$ ) mostrados nas superfícies de resposta.

$$Y_1 = 53,80 + 0,24 \cdot X_1 - 1,21 \cdot X_1^2 + 2,23 \cdot X_2 - 3,4X_2^2 - 0,02 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (4.1)$$

$$Y_2 = 10,19 - 0,65 \cdot X_1 + 0,02 \cdot X_1^2 + 0,73 \cdot X_2 + 0,94X_2^2 - 0,40 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (4.2)$$



**Figura 4.1:** Superfícies de resposta da celulose e da lignina para diferentes níveis de temperatura (T) e da concentração de sulfato ferroso (C) obtidas para o planejamento de Doehlert.

A Figura 4.1, demonstra a superfície de resposta dos resultados de lignina e celulose, na figura da lignina o gráfico formado é o inverso da celulose, pois provou que quanto menor a (%) lignina melhor, comprovando o resultado está de acordo com a análise estatística, pois o resultado está muito próximo do ponto central. Na figura da celulose o melhor resultado está bem próximo do ponto central.

A análise de variância do planejamento é apresentada na Tabela 4.6 para ambas as respostas em ( $Y_1$  e  $Y_2$ ), e tem o intuito de indicar o grau de adequabilidade ou não dos modelos ajustados.

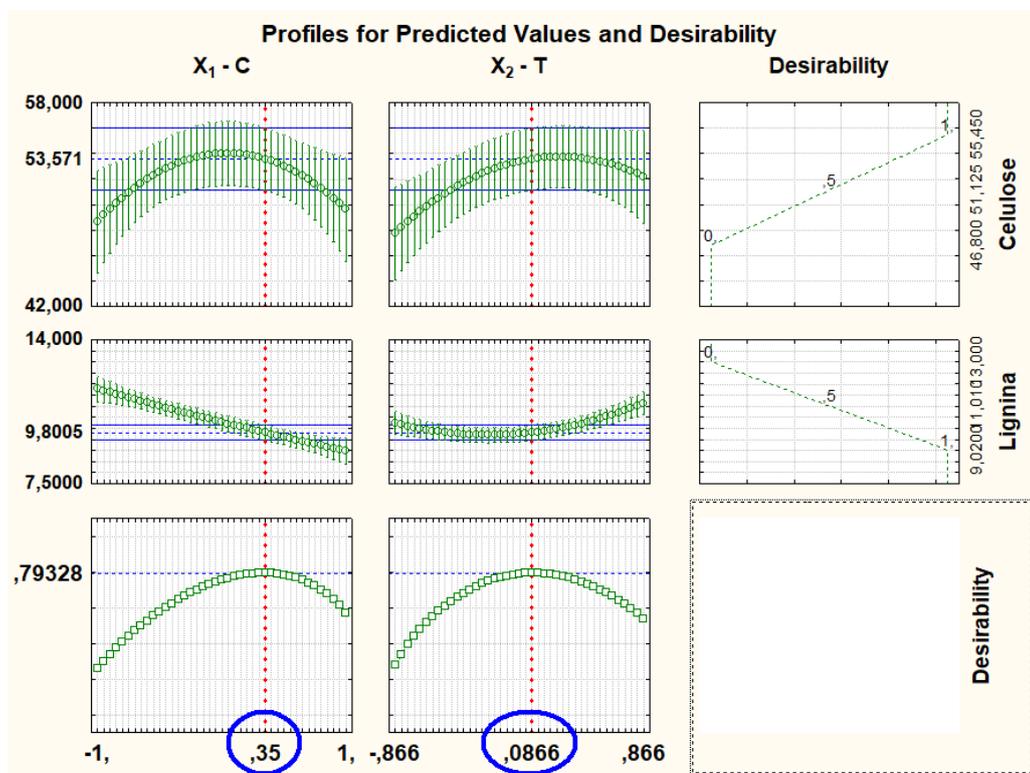
**Tabela 4.6:** ANOVA do planejamento de Doehlet para ambas as respostas  $Y_1$  e  $Y_2$

| Fonte de variação      | SQ     |        | Df | MS     |       | F            |              | p-valor       |               |
|------------------------|--------|--------|----|--------|-------|--------------|--------------|---------------|---------------|
|                        | $Y_1$  | $Y_2$  |    | $Y_1$  | $Y_2$ | $Y_1$        | $Y_2$        | $Y_1$         | $Y_2$         |
| ( $X_1$ ) C (L)        | 0,715  | 5,192  | 1  | 0,715  | 5,192 | 0,312        | 111,83       | 0,6324        | 0,0088        |
| ( $X_1$ ) C (Q)        | 28,246 | 0,013  | 1  | 28,246 | 0,013 | 12,331       | 0,29         | 0,0723        | 0,6419        |
| ( $X_2$ ) T (L)        | 20,025 | 2,169  | 1  | 20,025 | 2,169 | 8,742        | 46,72        | 0,0978        | 0,0207        |
| ( $X_2$ ) T (Q)        | 24,752 | 1,899  | 1  | 24,752 | 1,899 | 10,805       | 40,89        | 0,0814        | 0,0235        |
| $X_1(L)$ x $X_2(L)$    | 0,002  | 0,660  | 1  | 0,002  | 0,660 | 0,00088      | 14,23        | 0,9789        | 0,0636        |
| <b>Regressão</b>       | 64,933 | 9,950  | 5  | 12,986 | 1,989 | <b>6,929</b> | <b>60,27</b> |               |               |
| <b>Falta de ajuste</b> | 1,041  | 0,007  | 1  | 1,041  | 0,007 | 0,454        | 0,152        | <b>0,5695</b> | <b>0,7244</b> |
| <b>Erro puro</b>       | 4,581  | 0,092  | 2  | 2,290  | 0,046 |              |              |               |               |
| <b>Resíduo</b>         | 5,622  | 0,099  | 3  | 1,874  | 0,033 |              |              |               |               |
| <b>Total</b>           | 70,555 | 10,049 | 8  |        |       |              |              |               |               |

Teste F regressão:  $Y_1$ :  $F_{TAB}(5; 3; 0,10) = 5,31$   $F_{calc}/F_{TAB} = 6,929/5,31 = 1,30$   
 $Y_2$ :  $F_{TAB}(5; 3; 0,10) = 5,31$   $F_{calc}/F_{TAB} = 60,27/5,31 = 11,35$

Conforme o p-valor de  $Y_1$  e  $Y_2$  a falta de ajuste das regressões não é significativa no nível de 10% de significância estatística. Por outro lado, o teste F para a regressão mostra um melhor ajuste para a resposta  $Y_2$  (lignina), pois a relação  $F_{\text{calc}}/F_{\text{TAB}} = 11,35$  é maior do que 10,0. Segundo Montgomery (2013), a relação de  $F_{\text{calc}}/F_{\text{TAB}}$  acima de 10,0 indica um bom ajuste da regressão. O coeficiente de determinação do modelo para a lignina foi  $R^2 = 0,99$  e para a celulose  $R^2 = 0,92$ .

Os gráficos de resíduos vs valores preditos obtidos para as respostas  $Y_1$  e  $Y_2$  (Figuras 1 e 2 do ANEXO) mostram aleatoriedade dos resíduos em torno do zero indicando uma distribuição normal dos mesmos e os gráficos da probabilidade normal dos resíduos (Figuras 3 e 4) indicam a ausência de *outliers*, validando assim a análise estatística realizada. A Figura 4.2 mostra os perfis de valores preditos de  $Y_1$  e de  $Y_2$  e função a desejabilidade obtida para o planejamento Doehlert. O método *Desirability* é um método utilizado para determinar as melhores condições de ajuste de processo, tornando possível a otimização simultânea de múltiplas respostas. Com isso, as melhores condições das respostas são obtidas simultaneamente, minimizando-se, maximizando-se ou buscando-se valores nominais de especificações, dependendo da situação mais conveniente para o processo (Wang & Van, 2009).



**Figura 4.2:** Perfis de valores preditos de  $Y_1$  e de  $Y_2$  e função desejabilidade obtida para o planejamento Doehlert.

Os valores de concentração ( $X_1$ ) e de temperatura ( $X_2$ ) que satisfazem simultaneamente a condição de valores mais elevados de celulose e mais baixos de lignina podem ser determinados pela função desejabilidade. Segundo Paiva (2008), a vantagem da utilização da média geométrica é fazer com que a solução global seja alcançada de maneira balanceada, permitindo que todas as respostas atinjam os valores esperados, forçando o algoritmo a se aproximar das especificações impostas.

Neste contexto, com um nível de desejabilidade alcançado de 0,793, os melhores resultados são obtidos no nível 0,35 de  $X_1$  (que corresponde a 23,5% de concentração) e 0,0866 de  $X_2$  (que corresponde a 40,5 °C), próximo ao ponto central, onde se obteria 53,57% de celulose e 9,80 % de lignina, condição que pode ser aproximada aos resultados obtidos na Tabela 4.5 referente a matriz de dados do planejamento. Assim, a concentração de sulfato ferroso de 23,5 mM e temperatura de 40,5 °C satisfazem simultaneamente a melhor condição de  $Y_1$  e de  $Y_2$ , dentro da faixa de trabalho estabelecida para o planejamento.

Conforme Zheng *et al.* (2014), nos últimos anos, a aplicação da reação Fenton ao pré-tratamento da lignocelulose tem sido testada. A reação de Fenton é amplamente utilizada no pré-tratamento de águas residuais e sendo uma reação não seletiva pode oxidar quaisquer compostos orgânicos. São utilizados íons ferrosos e peróxido de hidrogênio. Na reação de redução-oxidação, são gerados radicais hidroxila, os quais podem oxidar fortemente os compostos orgânicos. Além disso, verificou-se que a reação de Fenton pode aumentar a sua susceptibilidade à enzima celulase e melhorar a degradação da lignina. A reação de Fenton é conveniente e rentável, por isso pode ser uma alternativa promissora para pré-tratar a lignocelulose.

Michalska *et al.* (2012), analisaram três diferentes tipos de plantas, um híbrido do capim-elefante, uma planta rústica e uma oleaginosa (*Miscanthus giganteus*, *Sida hermaphrodita* e *Sorghum Moensch*, respectivamente). Os pesquisadores pré-trataram com Fenton e peróxido com 30% deste último, os resultados de celulose variaram entre 52,1 a 60,2% e a lignina entre 8,7 a 28,8%, estes resultados tendem a assegurar com os dados desta pesquisa.

### **4.3 Pré-tratamento do capim-elefante com NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

No pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, a principal função do oxigênio ativo que foi obtido através de reações do peróxido em meio alcalino, é a remoção da lignina através da geração de compostos oxigenados. Em meio alcalino fraco, o peróxido age de forma seletiva nos compostos fenólicos, promovendo uma cisão parcial da lignina, causando a sua degradação sem alterar a fração celulósica dos materiais lignocelulósicos. Segundo Rabelo (2010), comparando o pré-tratamento com peróxido alcalino a outros processos, este apresenta como vantagem a redução da cristalinidade da celulose e decomposição da lignina em gás carbônico, água e ácido carboxílico. Além disso, substâncias inibidoras como furfural e 5-hidroximetilfurfural não são produzidas, ao contrário da maioria dos outros métodos de pré-tratamento.

Foram avaliados os efeitos da temperatura (80 e 120 °C) no pré-tratamento alcalino com NaOH e no pré-tratamento alcalino com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre os conteúdos de celulose e lignina no capim-elefante, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8, respectivamente.

**Tabela 4.7:** Resultados de celulose do pré-tratamento alcalino em diferentes temperaturas

| Temperatura (°C) | NaOH (celulose %)   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (celulose %) |
|------------------|---------------------|--|
| 80               | 55,83               | 55,62                                      |
|                  | 58,06               | 55,40                                      |
|                  | 56,91               | 50,53                                      |
|                  | Média = 56,94 ±1,11 | Média = 53,85 ±2,87                        |
| 120              | 55,55               | 56,74                                      |
|                  | 58,32               | 54,80                                      |
|                  | 57,18               | 49,64                                      |
|                  | Média = 57,01 ±1,39 | Média = 53,73 ±3,67                        |

**Tabela 4.8:** Resultados de lignina do pré-tratamento alcalino em diferentes temperaturas

| Temperatura (°C) | NaOH (lignina %)    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (lignina %) |
|------------------|---------------------|---|
| 80               | 16,65               | 10,49                                     |
|                  | 16,25               | 11,08                                     |
|                  | 15,38               | 14,82                                     |
|                  | Média = 16,09 ±0,65 | Média = 12,13 ±2,35                       |
| 120              | 17,09               | 13,46                                     |
|                  | 22,06               | 14,57                                     |
|                  | 16,04               | 16,97                                     |
|                  | Média = 18,40 ±3,21 | Média = 15,00 ±1,79                       |

Avaliando os resultados de celulose com diferentes temperaturas o NaOH se destacou tanto na temperatura de 80 °C, quanto para 120 °C. Conforme observado na Tabela (4.9), as médias de teor de celulose foram semelhantes para ambas as temperaturas (80 e 120 °C), tanto para o pré-tratamento com NaOH como para com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Reforçando os dados desta pesquisa, Minmunin *et al.* (2105), relataram que ao pré-tratar o capim-elefante com NaOH em diferentes concentrações tiveram como resultados de celulose e lignina entre 68,50 a 60,20 e 8,20 a 6,50, respectivamente.

O pré-tratamento alcalino com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou alto desempenho na remoção da lignina, com taxa de remoção de lignina de 87,89%, comparando com o pré-tratamento NaOH a remoção da lignina foi de 85%. Apoiando com os resultados, Zhang & Zhu (2016), analisando 6 modelos de pré-tratamento de Fenton e NaOH, a combinação dos dois métodos mostrou uma sinergia no desempenho, com cerca de 50% de lignina removida e um aumento de quase 100% no teor de celulose trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar.

A biomassa utilizada neste estudo apresentou inicialmente 32% de lignina. Após o pré-tratamento com NaOH a 80 °C a lignina média foi de 16,09% e após pré-tratado com a temperatura de 120 °C a média foi de 18,40%. Assim, no que se refere a deslignificação do capim, para 80 °C a remoção de lignina foi de 49,7% e para 120 °C a remoção foi de 42%.

Quando pré-tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas mesmas temperaturas citadas anteriormente, a composição química da lignina foi de 12,13 a 15,00%, respectivamente. Confirmando com estes dados, Phitsuwan *et al.* (2016), que ao pré-tratar o capim-elefante com NaOH na concentração e temperatura (2%; 121 °C a 1 h), o mesmo removeu 84,1% de lignina, e utilizando a concentração de 1% de NaOH com 0,8% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removeu 69,5% de lignina.

Entretanto, para cada temperatura é possível verificar diferença entre os teores médios de celulose em função do tipo de pré-tratamento. Isso pode ser confirmado por meio da análise estatística, ou seja, pela análise de variância (ANOVA) dos experimentos, conforme a Tabela 4.9. Verifica-se que, no nível de significância de 10%, apenas o tipo de álcali utilizado no pré-tratamento (NaOH ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) influencia no teor de celulose (p-valor < 0,10).

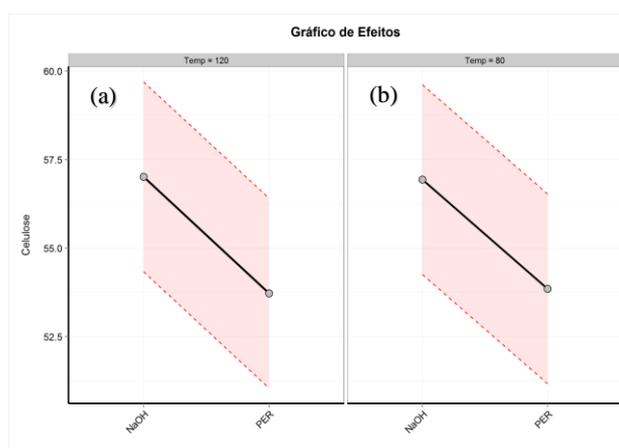
**Tabela 4.9:** ANOVA dos resultados de celulose para diferentes temperaturas e pré-tratamentos ( $\alpha=0,10$ )

| Fontes de Variação      | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrado Médio | Estat. F | p-valor       |
|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------|----------|---------------|
| Tratamento              | 1                  | 30,451            | 30,451         | 4,88540  | <b>0,0581</b> |
| Temperatura             | 1                  | 0,001             | 0,001          | 0,00022  | 0,9885        |
| Tratamento: Temperatura | 1                  | 0,030             | 0,030          | 0,00486  | 0,9461        |
| Resíduos                | 8                  | 49,864            | 6,233          |          |               |

Conforme apresentado, na Tabela 4.9, a ANOVA apresenta os resultados do p-valor do tratamento, da temperatura e da interação do tratamento com temperatura, o único resultado significativo foi o do tratamento com (p-valor<0,1).

Entretanto, a análise de variância e o Teste F na Tabela 4.9, não são suficientes para indicar qual o melhor pré-tratamento, uma vez que o Teste F informa somente se há diferenças entre as médias dos tratamentos realizados. Assim, se faz necessário aplicar um teste, que permita a comparação entre as médias dos tratamentos, para determinar qual ensaio foi mais efetivo no pré-tratamento.

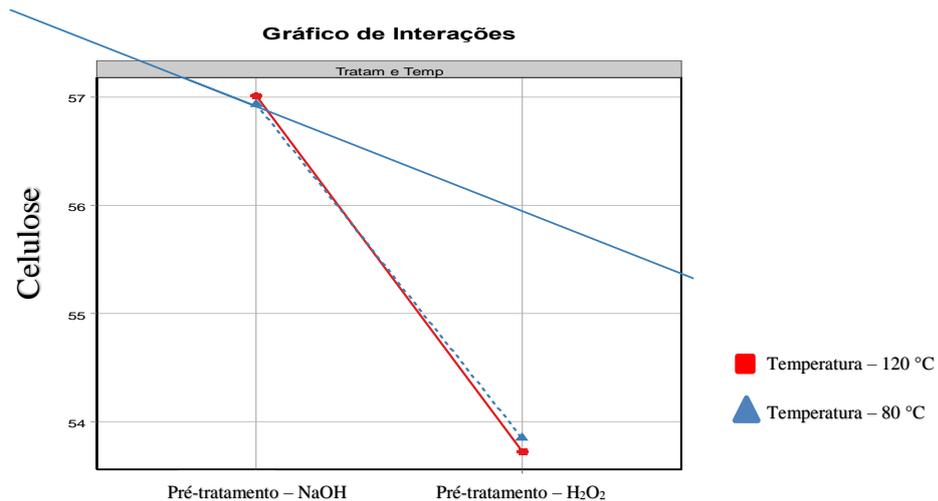
A Figura 4.3 mostra o gráfico dos efeitos individuais da temperatura e do tipo de pré-tratamento sobre o teor de celulose, onde verificou-se o mesmo comportamento para ambas as temperaturas, porém com mudanças de teor significativas para os diferentes pré-tratamentos.



**Figura 4.3:** Gráfico dos efeitos individuais sobre o teor de celulose ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

A Figura 4.3.a mostra que ao mudar o pré-tratamento de  $H_2O_2$  para NaOH, houve um aumento significativo na liberação da celulose, em 120 °C, o mesmo acontece quando analisado a 80 °C na Figura 4.3.b.

Conforme a Tabela da ANOVA a interação entre as variáveis temperatura e tipo de pré-tratamento não é significativa, conforme se pode visualizar no gráfico da Figura 4.4. Isso indica que a resposta independe do nível em que as variáveis se encontram.

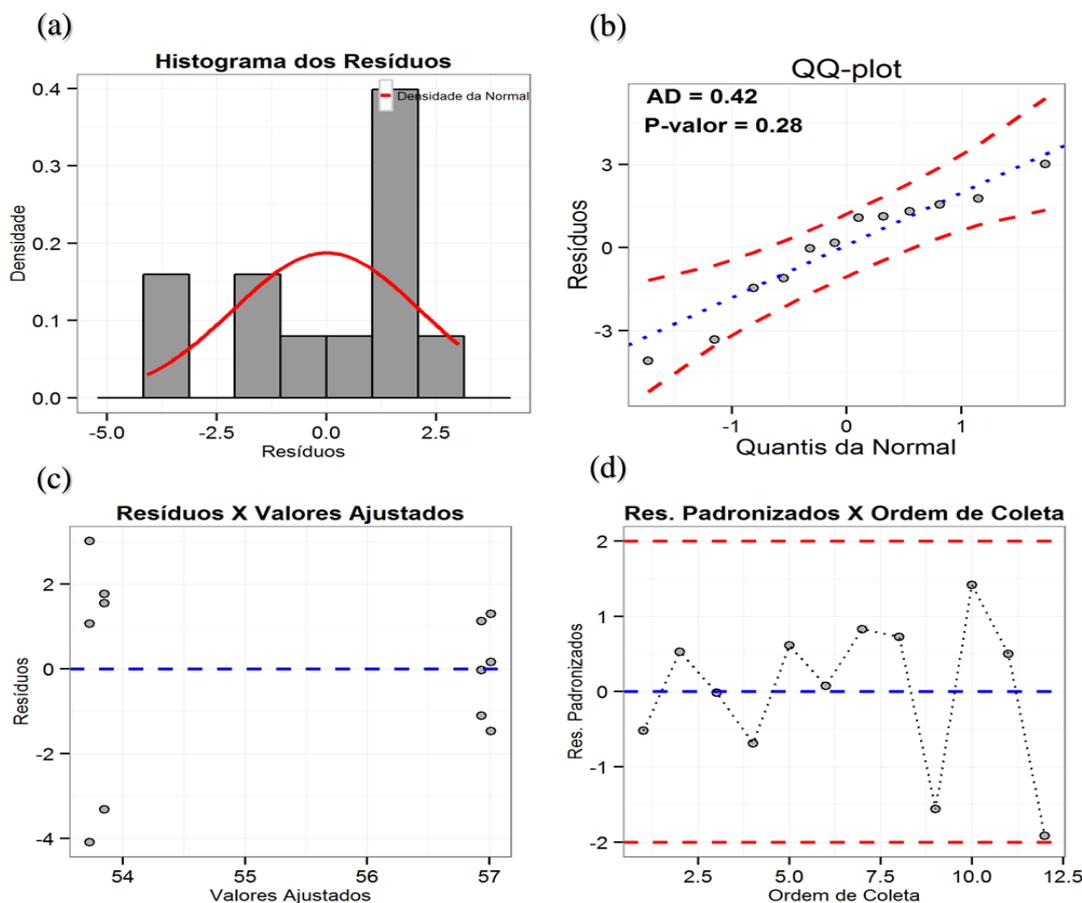


**Figura 4.4:** Gráfico dos efeitos de interação sobre o teor de celulose ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Na Figura 4.4, Observa-se que há interação entre os fatores de pré-tratamento NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, juntamente com as diferenças de temperaturas (80 e 120 °C), dado que as retas estão se cruzando, ou seja, quando existe a mudança do pré-tratamento NaOH, o comportamento do pré-tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é parecido nos dois níveis indicando que existe uma relação entre o NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Figura 4.5, apresenta os gráficos de resíduos, sendo o histograma geral (a), o QQ-plot (b), resíduos x valores ajustados (c) e resíduos padronizados versus ordem de coleta (d).

Nos gráficos de resíduos na Figura 4.5.c observa-se a distribuição aleatória dos resíduos em torno do zero bem como na ordem de coleta dos ensaios na Figura 4.5.d. Verifica-se também que no gráfico da probabilidade normal dos resíduos, já na Figura 4.5.b não há a presença de *outliers* e que os resíduos aderem a uma distribuição normal, com p-valor = 0,28 ( $> 0,10$ ) determinado pelo teste de normalidade de Anderson-Darling (AD). Essas observações quanto aos resíduos na ANOVA satisfazem a premissa da Estatística paramétrica e permite uma análise mais aprofundada dos dados.



**Figura 4.5:** Gráficos dos resíduos. (a) histograma dos resíduos, (b) QQ-plot, (c) resíduos versus valores preditos e (d) resíduos padronizados versus ordem de coleta ( $\alpha=0,10$ ).

A Tabela 4.10 apresenta o teste de Tukey, que é considerado um teste rigoroso e de fácil aplicação, utilizado nesse caso como um complemento para o estudo da análise de variância, sendo que as médias foram comparadas duas a duas.

**Tabela 4.10:** Comparação de médias de celulose do teste de Tukey ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

| Fator | Médias (%) | Grupos |
|-------|------------|--------|
| NaOH  | 56,97      | a      |
| PER   | 53,78      | b      |

Nesta Tabela foi considerado apenas a comparação entre as médias de celulose dentro do pré-tratamento, a qual foi a variável que se apresentou como significativa a partir da ANOVA na Tabela 4.10. As letras “a” e “b” indicam que as médias são diferentes dentro do tratamento ( $p$ -valor = 0,033). Analisando-se os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que os melhores resultados obtidos de celulose foram para o pré-tratamento com NaOH,

independentemente da temperatura. Considerando que o melhor pré-tratamento é aquele que proporciona maior concentração de celulose disponível, o pré-tatamento com NaOH se mostrou mais efetivo.

Conforme se pode observar na Tabela 4.10, as médias de teor de lignina variaram tanto em decorrência da temperatura como em decorrência do tipo de álcali usado no pré-tratamento. Além disso, as médias observadas para a lignina foram mais baixas para temperaturas mais altas, indicando o efeito dessa variável na remoção da lignina, o que é desejável em termos do pré-tratamento da lignocelulose.

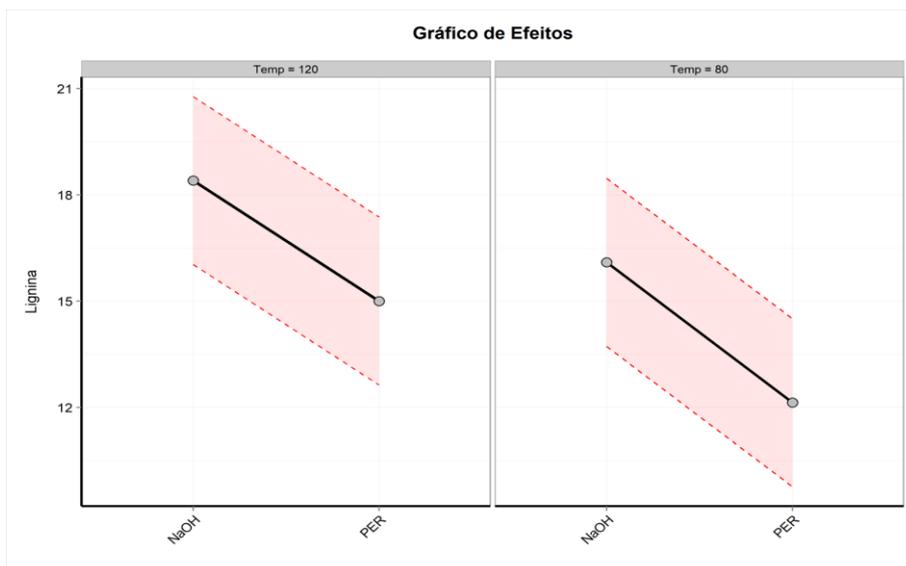
Isso pode ser apoiado por meio da análise estatística, ou seja, pela análise de variância dos experimentos, conforme a Tabela 4.11.

**Tabela 4.11:** ANOVA dos resultados de lignina para diferentes temperaturas e pré-tratamentos ( $\alpha=0,10$ )

| Fontes de Variação             | Graus de Liberdade | Soma de Quadrados | Quadrado Médio | Estat. F | p-valor       |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|----------------|----------|---------------|
| <b>Pré-tratamento</b>          | 1                  | 40,63             | 40,63          | 8,331    | <b>0,0203</b> |
| <b>Temperatura</b>             | 1                  | 20,12             | 20,12          | 4,125    | <b>0,0767</b> |
| <b>Tratamento: Temperatura</b> | 1                  | 0,23              | 0,23           | 0,048    | 0,8318        |
| <b>Resíduos</b>                | 8                  | 39,01             | 4,88           |          |               |

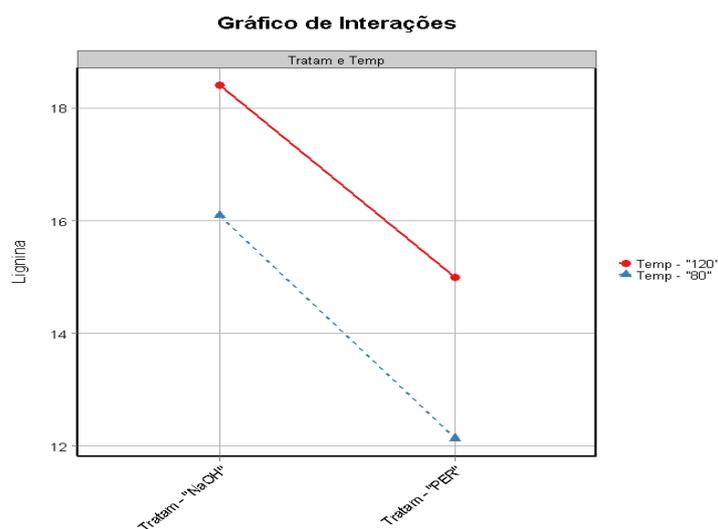
Verifica-se que, no nível de significância de 10%, tanto a temperatura como o tipo de alcalino utilizado no pré-tratamento (NaOH ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) influencia no teor de lignina (p-valor < 0,10).

As Figuras 4.6 e 4.7 mostram os gráficos dos efeitos individuais da temperatura e do tipo de pré-tratamento e de interação sobre o teor de lignina.



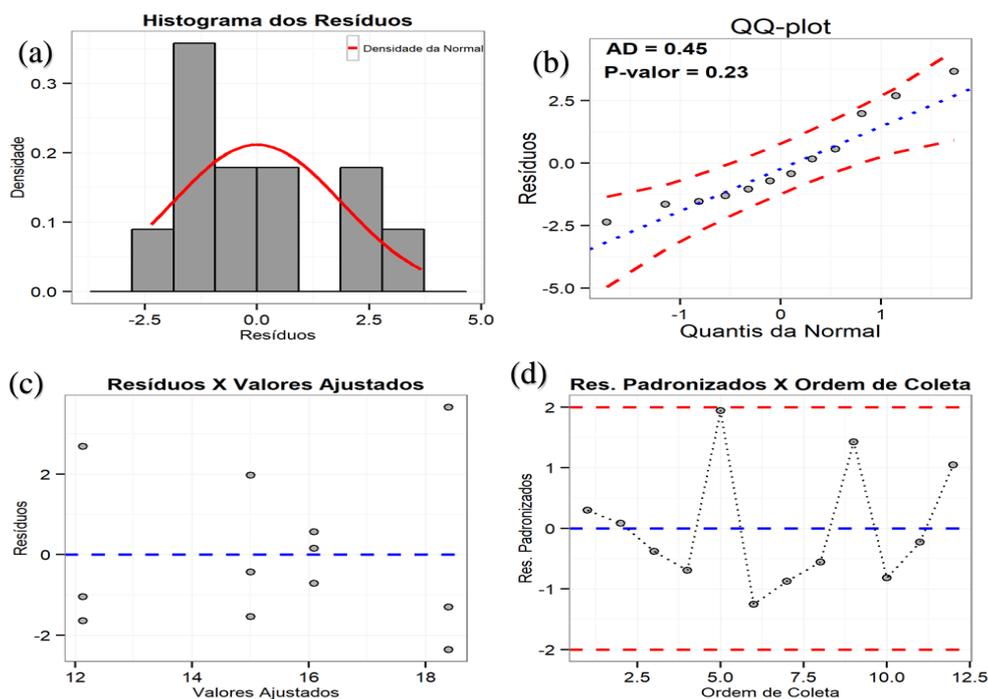
**Figura 4.6:** Gráfico dos efeitos individuais sobre o teor de lignina ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

A Figura 4.6, verifica o mesmo comportamento para ambas as temperaturas, porém com mudanças de teor significativas para os diferentes pré-tratamentos. Além disso, conforme a Tabela da ANOVA a interação entre as variáveis temperatura e tipo de pré-tratamento não é significativa, conforme se pode visualizar no gráfico da Figura 4.7. Isso indica que a resposta independe do nível em que as variáveis se encontram.



**Figura 4.7:** Gráfico dos efeitos de interação sobre o teor de lignina ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

A Figura 4.8, apresenta os gráficos de resíduos, sendo o histograma geral (a), o QQ-plot (b), resíduos x valores ajustados (c) e resíduos padronizados versus ordem de coleta (d).



**Figura 4.8** Gráficos dos resíduos. (a) histograma dos resíduos, (b) QQ-plot, (c) resíduos versus valores preditos e (d) resíduos padronizados versus ordem de coleta ( $\alpha=0,10$ ).

Nos gráficos de resíduos na Figura 4.8.c observa-se a distribuição aleatória dos resíduos em torno do zero bem como na ordem de coleta dos ensaios na Figura 4.8.d. Verifica-se também que no gráfico da probabilidade normal dos resíduos, já na Figura 4.8.b não há a presença de *outliers* e que os resíduos aderem a uma distribuição normal, com  $p\text{-valor} = 0,23$  ( $> 0,10$ ) determinado pelo teste de normalidade de Anderson-Darling (AD). Essas observações quanto aos resíduos na ANOVA satisfazem a premissa da Estatística paramétrica e permite uma análise mais aprofundada dos dados.

A Tabela 4.12 apresenta o teste de Tukey onde as médias foram comparadas entre si a 10% de probabilidade, onde apresenta a igualdade ou a diferença entre si. Nesta Tabela foi considerado apenas a comparação entre as médias de lignina dentro do pré-tratamento.

**Tabela 4.12:** Comparação de médias de lignina do teste de Tukey dentro do grupo pré-tratamento ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

| Fator | Médias (%) | Grupos |
|-------|------------|--------|
| NaOH  | 17,24      | a      |
| PER   | 13,56      | b      |

A Tabela 4.12, apresenta a letras “a” e “b” indicam que as médias são diferentes dentro do tratamento (p-valor = 0,026), nas médias de NaOH 17,24 (%) e 13,56 (%) para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Tabela 4.13, apresenta o teste de Tukey onde as médias foram comparadas dentro do grupo da temperatura.

**Tabela 4.13:** Comparação de médias de lignina do teste de Tukey dentro do grupo temperatura ( $\alpha = 0,10$ )

| <b>Fator</b>  | <b>Médias (%)</b> | <b>Grupos</b> |
|---------------|-------------------|---------------|
| <b>120 °C</b> | 16,70             | <b>a</b>      |
| <b>80 °C</b>  | 14,11             | <b>a</b>      |

Conforme a Tabela 4.13, comparando as médias entre temperaturas, teve que letras iguais não diferem estatisticamente em relação ao teste de Tukey a 10% de probabilidade (p-valor = 0,144).

Comparando o pré-tratamento com peróxido alcalino a outros processos, este apresenta como vantagem a redução da cristalinidade da celulose e decomposição da lignina em gás carbônico, água e ácido carboxílico. Além disso, substâncias inibidoras como furfural e 5-hidroximetilfurfural não são produzidas, ao contrário da maioria dos outros métodos de pré-tratamento (RABELO, 2010).

Nascimento (2011), trabalhando com pré-tratamento de NaOH no bagaço de cana de açúcar, com de 1% NaOH a 15 min; 1% NaOH a 30 min e 1% NaOH a 60 min obteve maior porcentagem de celulose com 35,3%, 34,7% e 34,9%, respectivamente. Tendo uma média de 34,9 % de celulose corrigida e um desvio padrão entre todos os teores de celulose de 3%. Em uma segunda etapa com o mesmo pré-tratamento, apenas aumentando gradativamente a porcentagem de NaOH, sendo que a condição 7% NaOH com 30 min do mesmo autor, onde ocorreu a maior deslignificação, resultando em torno de 5% de lignina na biomassa, comparando com os resultados da Tabela 4.7, os resultados desta pesquisa foram melhores que este citado com bagaço de cana-de-açúcar.

A Tabela 4.14 apresenta a composição estrutural do capim-elefante considerando a celulose e a lignina.

**Tabela 4.14:** Composição estrutural do capim-elefante

| Amostra                       | Celulose (%) | Lignina (%) | Referência                   |
|-------------------------------|--------------|-------------|------------------------------|
| <i>in natura</i>              | 22,60        | 19,40       | Cardona <i>et al.</i> (2014) |
| Hidróxido de sódio            | 56,97        | 16,53       | Este trabalho                |
| Hidróxido de sódio            | 31,20        | 6,80        | Cardona <i>et al.</i> (2014) |
| Acido sulfurico               | 24,00        | 13,40       | Cardona <i>et al.</i> (2014) |
| Peróxido de hidrogênio        | 54,62        | 12,88       | Este trabalho                |
| Peróxido de hidrogênio + NaOH | 39,30        | 11,00       | Cardona <i>et al.</i> (2014) |

Fonte: Adaptado autor

Cardona *et al.* (2014) publicaram resultados de capim-elefante com diversos pré-tratamentos, como NaOH, diluição em ácido, explosão a vapor e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, conforme Tabela 4.14. Os resultados apresentados reforçam os dados da nossa pesquisa pois, ao pré-tratar o capim-elefante com NaOH, obtivemos 56,97% de celulose, utilizando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os autores obtiveram 53,78%, conforme a Tabela 4.14.

Na Tabela 4.15, é possível visualizar a composição química de diferentes amostras de capim-elefante. De acordo com a literatura citada, os teores de celulose estão na faixa de 36,4 a 75,6%, a lignina de 0,00 a 53,1% (PENSRI *et al.*, 2016).

**Tabela 4.15:** Caracterização do capim-elefante pré-tratado e *in natura*

| Amostra                   | Celulose (%) | Lignina (%) | Referência                  |
|---------------------------|--------------|-------------|-----------------------------|
| Cru ou <i>in natura</i> * | 36,4         | 0,0         | Pensri <i>et al.</i> (2016) |
| Alcalino NaOH 1,0 %       | 64,0         | 53,1        | Pensri <i>et al.</i> (2016) |
| Alcalino NAOH 2,0 %       | 69,3         | 28,1        | Pensri <i>et al.</i> (2016) |
| Alcalino NAOH 3,0 %       | 75,6         | 13,9        | Pensri <i>et al.</i> (2016) |

Fonte: Adaptado de Pensri *et al.* (2016)

Comparando os resultados de celulose e lignina com diferentes autores citados na Tabela 4.15, observa-se que para uma mesma biomassa utilizada (capim-elefante), os teores de celulose obtidos neste trabalho pré-tratado com NaOH se mostrou superior aos demais autores. Já o teor de lignina pré-tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi o que se mostrou com valores mais próximos dos demais autores, sendo superior aos teores obtidos.

A Tabela 4.16, apresenta os resultados da caracterização da palha de carnaúba pré-tratando com NaOH em diferentes concentrações.

**Tabela 4.16:** Caracterização química do resíduo da palha de carnaúba pré-tratado, expresso em base seca.

| Análises            | Pré-tratamento |         |         |         |
|---------------------|----------------|---------|---------|---------|
|                     | NaOH 1%        | NaOH 2% | NaOH 3% | NaOH 4% |
| <b>Celulose (%)</b> | 29,69          | 38,48   | 38,15   | 46,63   |
| <b>Lignina (%)</b>  | 26,79          | 17,92   | 24,63   | 23,48   |

Fonte: Adaptado Campos, 2017

Campos (2017), reforçou conforme Tabela 4.16, que ao pré-tratar a palha da carnaúba com 4 diferentes concentrações de NaOH, que ao aumentar a concentração do NaOH a liberação de celulose aumenta conforme a dosagem, mostrando que os resultados de apresentados nesta pesquisa estão de acordo com a literatura, pois na mesma porcentagem de NaOH (2%) os resultados foram de 56,97% e 17,24%, de celulose e lignina, respectivamente. .

A Tabela 4.17, apresenta a caracterização química do bagaço da cana-de-açúcar, utilizando dois pré-tratamentos diferentes, o explosão a vapor e explosão a vapor com NaOH.

**Tabela 4.17:** Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

| Componente          | Explosão a vapor | Explosão a vapor + NaOH |
|---------------------|------------------|-------------------------|
| <b>Celulose (%)</b> | 47,7             | 87,3                    |
| <b>Lignina (%)</b>  | 34,3             | 5,7                     |

Fonte: Adaptado WANDERLEY *et al.*, 2013

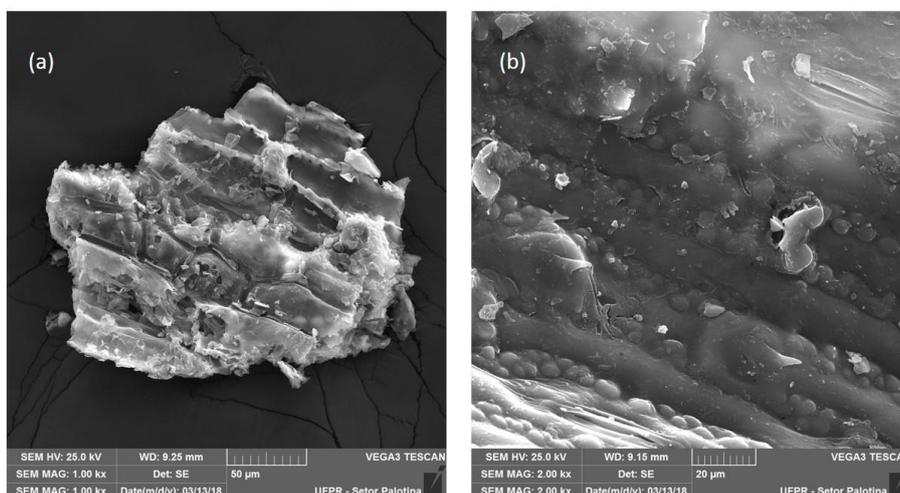
WANDERLEY *et al.* (2013) trabalhando com bagaço da cana-de-açúcar, usando dois tipos de pré-tratamentos, a explosão a vapor e explosão a vapor mais hidróxido de sódio tendo como controle o bagaço *in natura* sem pré-tratamento, a celulose variou de 42,8 a 87,3%, a lignina variou de 5,7 a 34,3%, conforme Tabela 4.17. Com estes resultados os autores salientam que a lignina é considerada uma barreira física e protetora para um ataque enzimático, pois não poderia ser efetivamente removida apenas por pré-tratamento de explosão de vapor.

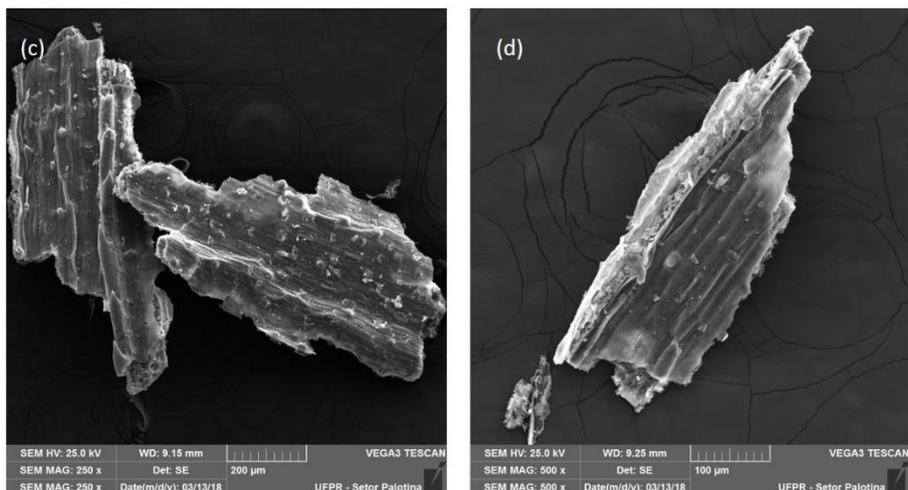
Portanto, o melhor pré-tratamento em termos de liberação da celulose do capim-elfante foi aquele realizado com NaOH a 120 °C, com 57,01% de celulose, já para a remoção de lignina o melhor foi aquele com a reação Fenton, onde se obteve 10,00% de lignina. No planejamento de Doelhart o melhor resultado foi no ponto central a 53,80% de celulose e 10,00% de lignina.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

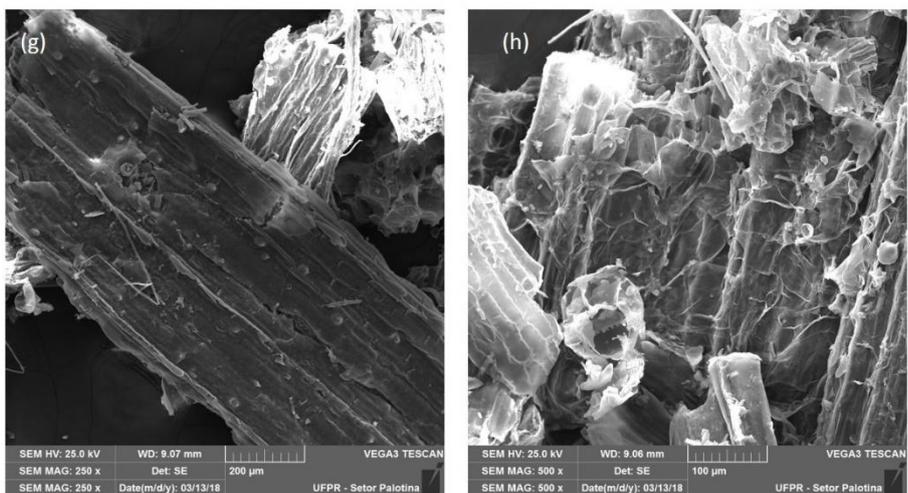
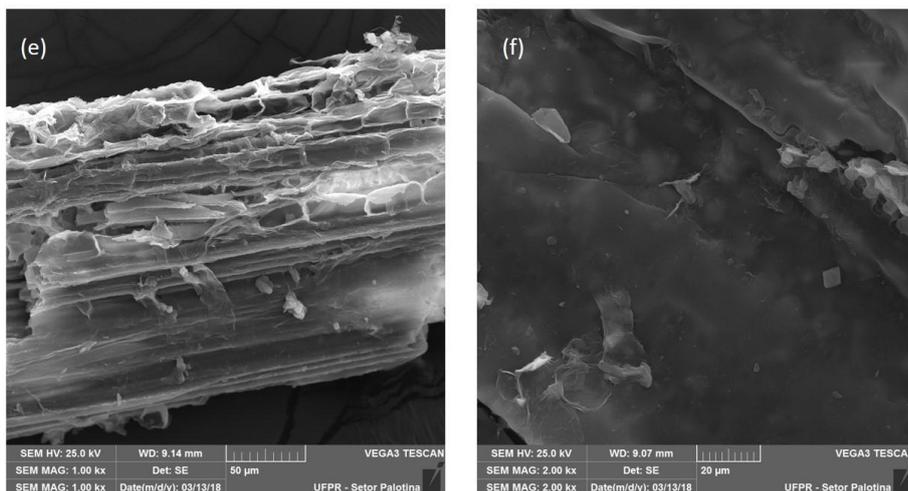
### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram feitas micrografias por MEV do capim-elefante pré-tratado com Fenton-peróxido, obtido da melhor condição do planejamento de Doehlert, destacando-se o ponto central, Figuras 4.9 (e), (f), (g) e (h). Da mesma forma, para comparação morfológica, foi usado o capim-elefante sem pré-tratamento nas Figuras 4.9 (a), (b), (c) e (d). Além da influência da severidade do pré-tratamento sobre as perdas de massa e sobre a composição química do capim-elefante, alterações também podem ser observadas na estrutura física da biomassa pré-tratada com Fenton ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Verifica-se que as amostras pré-tratadas com Fenton com peróxido de hidrogênio sofreram fragmentações nas amostras. Essas mudanças estruturais nas amostras pré-tratadas podem favorecer a exposição da celulose. Uma vez que o tamanho da partícula da biomassa diminui conforme o aumento da temperatura e o tempo de processo, diversas substâncias podem ser perdidas e detectadas na fração líquida do pré-tratamento.





**Figuras 4.9a, 4.9b, 4.9c e 4.9d.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura ( $\times 1$ ;  $\times 2$ ;  $\times 250$  e  $\times 500$ ) de capim-elefante sem pré-tratamento MEV do capim-elefante sem tratamento.



**Figuras 4.9e, 4.9f, 4.9g e 4.9h.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura ( $\times 1$ ;  $\times 2$ ;  $\times 250$  e  $\times 500$ ) de capim-elefante pré-tratado pela reação Fenton.

É possível observar claramente que a biomassa não tratada (Figura 4.9a) tinha uma estrutura compacta, lisa e homogênea, que foi alterada após o pré-tratamento. Alterações morfológicas na estrutura da biomassa podem ser observadas quando o pré-tratamento foi realizado (Figura 4.9e). Essas alterações foram mais evidentes quando a gravidade da reação foi aumentada (Figura 4.9f), sendo observada uma grande desconstrução na estrutura do material e na formação de partículas muito pequenas quando aplicado os reagentes Fenton e peróxido de hidrogênio. Han *et al.* (2010) também observaram redução no tamanho da partícula quando aumentada a temperatura e o tempo de residência foram aumentados durante o tratamento da palha de trigo pela explosão a vapor.

É possível observar que o pré-tratamento promoveu uma abertura e uma fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico da biomassa, tornando a celulose mais disponível à hidrólise enzimática.

Resultados de análise de MEV no bagaço de cana-de-açúcar são apresentados por Da Silva (2013), o qual comparou a morfologia *in natura* e após o pré-tratamento com líquidos iônicos, tendo como superfície “lisa” e compacta *in natura*, enquanto a biomassa pré-tratada exibiu estruturas fibrilares de morfologia nanoscópica da ordem de 50 nm de espessura. As estruturas observadas confirmam o aumento expressivo na área de superfície do bagaço, o que também pode explicar as altas taxas de hidrólise e rendimentos obtidos neste estudo, já que esse tipo de estrutura facilita o acesso das enzimas à superfície da celulose.

Kataria *et al.* (2017), em um trabalho com pré-tratamento no capim-elefante com explosão a vapor, avaliando diferentes temperaturas e concentração ácida, mostraram que quanto maior a temperatura em um pré-tratamento a vapor maior a desestruturação da biomassa, pois houve uma maior desestruturação da parede celular, os autores sugeriram que sob essas condições não apenas as frações de hemicelulose e lignina foram atacadas, mas também a celulose.

Conforme Menegol *et al.* (2016), a caracterização morfológica da fibra com uso do MEV, teve como uma biomassa mais compacta e lisa, mantendo a mesma preservada após 12 h em um reator hidrolisado rotativo sem esferas e enzimas. A morfologia do capim-elefante na presença de esferas e enzimas diferentes, notando-se que o uso de esferas promoveu mudanças estruturais na fibra do capim-elefante, observadas como trincas e

fragmentação da fibra, observaram também que lacunas e uma alta exposição da estrutura interna causadas pela ação enzimática.

#### 4.4.2 Análise de Carbono Orgânico Total (COT)

Análises de carbono orgânico total (COT) foram realizadas na amostra de líquido obtida na filtração após pré-tratamento com Fenton na melhor condição do planejamento Doehlert (Ensaio 1 a 3, da Tabela 4.6), onde obteve um valor médio de TOC de 2,8 g L<sup>-1</sup>. Na amostra sem tratamento (*in natura*) o resultado médio foi de 4,7 g L<sup>-1</sup>, sendo assim, podemos afirmar que houve perda de carbono do capim devido ao mecanismo de deslignificação e também devido a perdas de frações de hemicelulose na etapa de lavagem.

Kato *et al.* (2014), analisando COT de *Miscanthus g.* e palha de trigo com pré-tratamento com Fenton-peróxido a 100 mL a 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 250 mg FeCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O em um período de 120 h, obtiveram como resultado COT de 1,92 e 1,15 g L<sup>-1</sup>, respectivamente e como controle apenas usando 200 mL de água deionizada obtiveram COT de 0,11 e 0,13 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, conforme Tabela 4.18. Conforme dados obtidos nesta pesquisa, ao pré-tratar o capim-elefante com Fenton-peróxido o resultado de carbono total foi de 2,8 g L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.18:** Análise de carbono total (COT) pré-tratado e *in natura* de biomassas

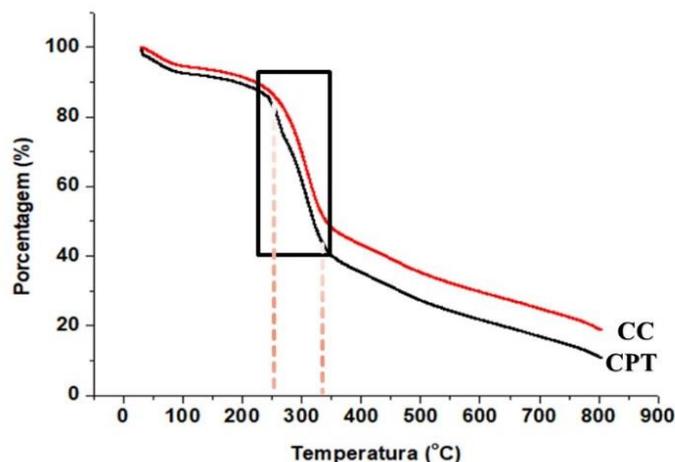
| Biomassa  | TOC   | Referência                |
|---|-------|---------------------------|
| 10 g <i>Miscanthus</i> , 200 mL dl H <sub>2</sub> O   | 0,117 | Kato <i>et al.</i> (2014) |
| 10 g palha de trigo, 200 mL dl H <sub>2</sub> O   | 0,131 | Kato <i>et al.</i> (2014) |
| 10 g <i>Miscanthus</i> , 100 mL 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 100 mL 250 mg FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O – 120 h | 1,922 | Kato <i>et al.</i> (2014) |
| 10 g palha de trigo, 100 mL 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 100 mL 250 mg FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O – 120 h     | 1,158 | Kato <i>et al.</i> (2014) |
| 5 g capim-elefante Fenton-peróxido  | 2,80  | Este trabalho             |

Fonte: adaptado Kato *et al.* (2014) e autor

As fotomicrografias reforçaram que nas análises de COT, as quais evidenciam uma grande solubilização dos componentes, tornando as fibras mais expostas a cada etapa de processamento da biomassa e com isso aumentando sua área superficial.

#### 4.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 4.10 representa as curvas obtidas das análises em atmosfera oxidativa, onde é possível observar, nos gráficos de TGA, três eventos, conforme KATARIA *et al.* (2017).



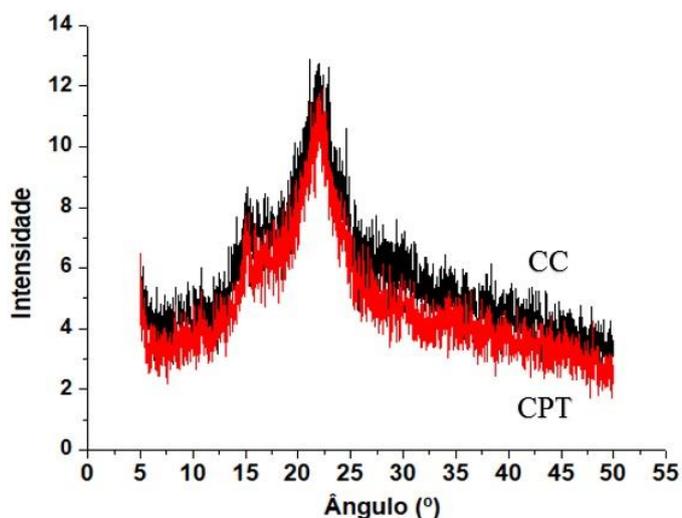
**Figura 4.10.** Análise termogravimétrica (TGA) da biomassa lignocelulósica do capim-elefante pré-tratado e sem pré-tratamento. **CC:** capim-elefante cru ou in natura; **CPT:** capim-elefante pré-tratado com a reação Fenton

O primeiro evento iniciou-se a 50 °C, o mesmo está diretamente relacionado com a perda da umidade da amostra, devido às características hidrofílicas da celulose, pois há uma retenção maior de água na fibra tratada e na nanocelulose, já que as fibras estão mais expostas. O segundo evento é relacionado à pirólise da celulose, onde a perda de massa da amostra, iniciando com uma perda de 10% de massa a uma temperatura de 250 °C, posterior a perda foi de 60% com uma temperatura de 305 °C, este processo é fundamental, pois como a lignina possui uma alta resistência à pirólise, funciona como um retardante à oxidação devido à estabilidade conferida pelos diversos grupos de aromáticos na molécula, fazendo com que a fibra bruta tenha uma menor degradação de celulose do que a fibra tratada.

O terceiro evento é referido a pirólise da lignina, ou seja, nesta etapa iniciou a partir de 400 °C, finalizando a 800 °C com uma perda na biomassa de 90%. Mórán *et al.* (2008) reportaram que em atmosfera inerte a hemicelulose e a lignina são os primeiros a se degradar, por volta dos 200 °C, sendo que a lignina persiste até a temperatura de 700 °C, enquanto que a hemicelulose pirolisa completamente aos 315 °C. A celulose começa aos 315 °C e chega até aos 400 °C. Mesmo em uma atmosfera oxidativa os resultados apresentam uma semelhança quanto ao comportamento destas três substâncias.

#### 4.4.4 Caracterização por DR-X

A partir dos resultados das análises de difratometria de raio X do capim-elefante não tratado e pré-tratado, foram obtidos os valores de índice de cristalinidade para cada material, os quais encontram-se graficados de acordo com a Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Difratogramas: (a) capim-elefante sem pré-tratamento e (b) capim-elefante com pré-tratamento. CC: capim-elefante cru ou in natura; CPT: capim-elefante pré-tratado com a reação Fenton

Analisando-se a Figura 4.11, a difração de raios X foi realizada para investigar a estrutura cristalina do capim-elefante. Verificou-se que a celulose é o único componente, dentre os três principais da biomassa, que apresenta estrutura parcialmente cristalina com picos característicos localizados entre  $2\theta = 22,0^\circ$  e  $25,0^\circ$ . Além disso, observou-se a presença de outros picos de difração que podem ser atribuídos aos componentes inorgânicos presentes na biomassa.

Muitos estudos mostram que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos aumentam após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, justificado pela remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas (CAO & TAN, 2002; ZHAO *et al.*, 2008).

Porém, o índice de cristalinidade de um material lignocelulósico, o qual mede a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total, deve ser corrigido pelo rendimento da etapa de pré-tratamento pelo qual o material lignocelulósico é submetido. Como

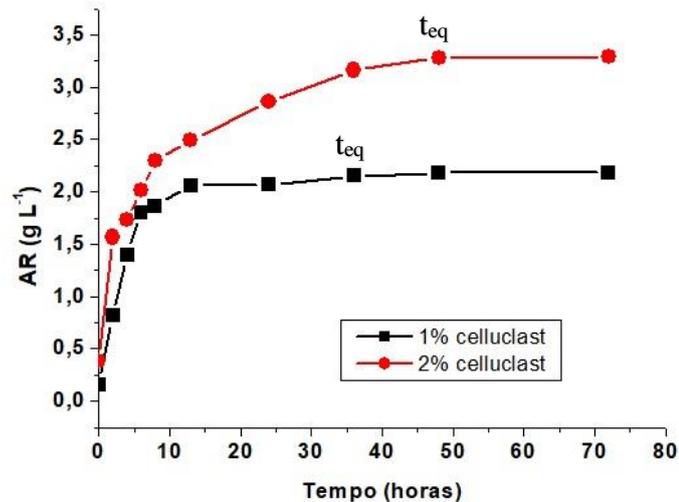
resultado, tem-se um índice de cristalinidade menor devido à redução da recalcitrância do material lignocelulósico, já que a cada etapa de pré-tratamento e deslignificação há um rompimento da estrutura rígida da biomassa vegetal diminuindo a barreira física ao transporte de massa (HIMMEL *et al.*, 2007).

Analisando o capim-elefante cru e diluído com hidróxido de sódio e posterior uma dosagem de íon, Marcotullio *et al.* (2011) e Xu *et al.* (2016), relataram que os valores de cristalinidade foram 35,1% e 45,6%, respectivamente, na mesma pesquisa quando pré-trataram com hidróxido de sódio e a reação Fenton o valor foi de 39,0%. Os principais picos de difração de 16,0° e 22,0° foram atribuídas às estruturas cristalinas típicas da celulose I (101 e 002), respectivamente. Após o pré-tratamento, o aumento de CrIs de SB pré-tratados pode ser atribuído à dissolução da lignina parcial, xilana e outros componentes, diminuindo assim o caráter amorfo geral (He *et al.*, 2016).

#### **4.4.5 Hidrólise Enzimática**

Foi realizado o estudo da hidrólise enzimática do capim-elefante pré-tratado na melhor condição obtida com reação Fenton adicionando no peróxido de hidrogênio 20% (FP<sub>2</sub>), da matriz de Doehlert (Tabela 4.6), o qual teve como melhor resultado de celulose com média de 53,8%. Foi utilizada para tal a solução comercial Celluclast® 1.5L (SIGMA) com uma carga de enzima de 24 FPU mL<sup>-1</sup> na hidrólise, conforme descrito na seção 3.3.

Na Figura 4.12, são apresentados os resultados de concentração de AR obtidos a partir da hidrólise enzimática de capim-elefante após o processo de pré- tratamento com Fenton, onde foram testadas as concentrações de 1 e 2% de solução enzimática.



**Figura 4.12:** Produção de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise enzimática para diferentes concentrações de solução de enzima comercial Celluclast.

Os resultados de sacarificação da celulose do capim pré-tratado mostram que na presença de 2% da enzima Celluclast® se obteve a maior conversão da celulose em açúcares redutores. É possível perceber que, para ambas as concentrações da enzima, a conversão se torna constante após um determinado tempo em  $t_{eq}$ , onde  $t_{equilíbrio}$ .

Verifica-se pelo perfil de hidrólise a 1% de solução enzimática (Figura 4.12) que a primeira fase é rápida (15 h) e, à medida que aumenta o tempo de hidrólise, ocorre pouca variação na glicose liberada, indicando o equilíbrio da reação enzimática. Alguns fatores podem interferir no final da reação, como o acúmulo de glicose no meio que pode causar um efeito redutor, a perda da atividade enzimática e a dificuldade de acesso das enzimas ao substrato, pois pode ter um aumento de celulose cristalina (ZHANG *et al.*, 2006; JØRGENSEN *et al.*, 2007).

Quando analisada a hidrólise na concentração de 2%, percebe-se que o tempo de equilíbrio é maior, com mais de 30 h e, a partir deste tempo a variação dos açúcares liberados mantém constante, com pouca alteração. Quantitativamente, este tempo obtido diminui a produtividade do processo e a um custo dobrado devido à concentração da enzima.

A biomassa obtida nas condições de pré-tratamento foi submetida à hidrólise enzimática por Kataria *et al.* (2017), os quais mostraram os resultados obtidos após 96 h de sacarificação. O rendimento de sacarificação (conversão de celulose em glicose) de cerca de 55% foi obtido para a amostra de biomassa pré-tratada, que foi 7 vezes maior do que o valor alcançado quando se utilizou a biomassa não tratada, estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados neste trabalho. Este resultado demonstra a importância de um pré-tratamento prévio para aumentar o rendimento de açúcar por hidrólise. Em materiais

lignocelulósicos, a celulose é fisicamente associada à hemicelulose, e fisicamente e quimicamente associada à lignina.

Um fator que pode interferir no rendimento da hidrólise enzimática nas biomassas é a alta cristalinidade da celulose. Samuel *et al* (2010), avaliaram os efeitos do pré-tratamento no capim-elefante com ácido sulfúrico em relação ao não pré-tratado. Nesse estudo, apesar do pré-tratamento ácido ter removido a hemicelulose quase por completo, o ácido não reduziu a cristalinidade da celulose. De forma análoga, o mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho, mesmo que usando o Fenton-peróxido.

Em um experimento usando 35 FPU g<sup>-1</sup> da enzima Novozyme 188, Michalska *et al.* (2012), hidrolisando *Miscanthus giganteus*<sup>4</sup>, *Sida hermaphrodita* e *Sorghum Moensch* obtiveram como resultados 5,6, 7,2 e 9,1 g L<sup>-1</sup> de AR, respectivamente, observando os resultados do híbrido *Miscanthus giganteus* e utilizando nesta pesquisa 24 FPU g<sup>-1</sup> de Cellucast®, obteve 3,4 g L<sup>-1</sup> de AR, este resultado está próximo do 5,6 g L<sup>-1</sup> do híbrido citado.

Segundo Su *et al.* (2015), a combinação de dois ou mais métodos para um pré-tratamento sequencial geralmente promove a eficiência da hidrólise enzimática, pois limita a geração de substâncias tóxicas inibitórias e quebra completamente os substratos simultaneamente. Neste estudo, foi investigado a combinação de pré-tratamento de Fenton com diferenças nas concentrações do peróxido de hidrogênio no capim-elefante. Assim, na hidrólise, para 1% de enzima obteve-se rendimento de 30,6% e, para 2% de enzima, obteve-se rendimento de 36,0% em rendimento. Após 80 h, a eficiência da hidrólise atingiu 61,8%, quase 2,0 vezes a do capim-elefante pré-tratado com 1%.

Pereira (2013), analisando quatro tipos de biomassa (capim-andropogon, bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e capim-mombaça), e pré-tratando as mesmas com ácido sulfúrico, para que pudesse observar os rendimentos de AR entre o pré-tratado em relação ao não tratado, utilizando o fungo *Saccharomyces cerevisiae* a 25 FPU g<sup>-1</sup>, os rendimentos do capim-elefante foi de 11,66 não tratado e 16,58 g L<sup>-1</sup> pré-tratado, correlacionando com este trabalho de pesquisa o AR ficou abaixo do encontrado pelo autor, que teve um rendimento final de 3,43 g L<sup>-1</sup>, em contrapartida, analisando o rendimento de AR em (%), o resultado desse autor foi superior obtendo 61,8%.

---

<sup>4</sup> *Miscanthus giganteus* (*miscanthus giganteus*, *miscanthus gigante*, capim elefante) é um híbrido estéril (não invasivo) de *M. sinensis* e *M. sacchariflorus*, assim como o *Pennisetum purpureum* (que cresce na mesma altura), ele também é chamado de "capim-elefante".

A Tabela 4.19, apresenta os resultados de AR com capim-elefante com diferentes enzimas utilizadas na hidrólise enzimática.

**Tabela 4.19:** Resultado de AR do capim-elefante

| Biomassa      | Enzima                              | AR (g L <sup>-1</sup> ) | Referência      |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| CE (110 °C)*  | Cellic CTe3                         | 25,67                   | Vanilli (2014)  |
| CE (180 °C)** | Cellic CTe3                         | 35,62                   | Vanilli (2014)  |
| CE (110 °C)*  | Cellic CTe3 + 10% Cellic HTe3       | 39,42                   | Vanilli (2014)  |
| CE (180 °C)** | Cellic CTe3 + 10% Cellic HTe3       | 43,98                   | Vanilli (2014)  |
| CE cv Roxo    | 6% Cellic CTe2                      | 7,00                    | Mairesse (2015) |
| CE cv Napier  | 6% Cellic CTe2                      | 7,90                    | Mairesse (2015) |
| CE cv Roxo    | 5,4% Cellic CTe2 + 0,6% Cellic HTe2 | 8,00                    | Mairesse (2015) |
| CE cv Napier  | 5,4% Cellic CTe2 + 0,6% Cellic HTe2 | 7,60                    | Mairesse (2015) |
| CE cv Roxo    | Fungo filamentoso v/v 1/10          | 1,10                    | Mairesse (2015) |
| CE cv Napier  | Fungo filamentoso v/v 1/10          | 1,00                    | Mairesse (2015) |
| CE            | 2% Celluclast®                      | 3,29                    | Este trabalho   |
| CE            | 1% Celluclast®                      | 2,18                    | Este trabalho   |

Fonte: Adaptado autor

CE: Capim-elefante

Segundo Siqueira *et al.* (2016), obtiveram como resultado após a o pré-tratamento químico do capim,-elefantea concentração de 7,1 g L<sup>-1</sup> à 72 horas, este trabalho confirma os resultados encontrados por esta pesquisa que obteve um AR de 3,8 g L<sup>-1</sup>.

Teixeira (2016) estudou o emprego de diferentes concentrações de enzimas nas proporções (1:50, 1:75, 1:100, 1:125, 1:150, 1:175 e 1:200) no capim-elefante e observou que quanto menor a diluição maios o resultado de AR, com ponto máximo de 12,4 g L<sup>-1</sup> a 1:50 e 2,87 g L<sup>-1</sup> em uma diluição 1:200. Estes valores estão de acordo com os resultado apresentados neste trabalho de pesquisa.

#### 4.4.6 Modelagem matemática da cinética da hidrólise enzimática

Foi realizada a modelagem matemática da hidrólise enzimática do capim-elefante pré-tratado com a reação Fenton, utilizando as equações descritas no ítem 3.4.1. Os resultados experimentais utilizados para fins de ajuste foram os de concentração de glicose obtidos na hidrólise, considerando as concentrações de enzima Celluclast® de 0,5, 1 e 2%, que correspondem à 5, 10 e 20 g L<sup>-1</sup>, conforme se pode verificar na Tabela 4.20. É possível verificar o efeito das diferentes concentrações iniciais de enzima de acordo com o tempo para a hidrólise enzimática, o que torna evidente, que ao aumentar o tempo e a concentração inicial da enzima maior será a produção de glicose. Além disso, é possível observar que, com o passar do tempo, a velocidade de hidrólise enzimática reduz, o que se deve,

principalmente, a desativação enzimática, a qual é influenciada por muitos fatores, como tensão de cisalhamento, temperatura, inibição de produtos e adsorção ineficaz da celulase. Além da desativação enzimática, a atuação de complexos contendo hemiceluloses/ligninas/cinzas contra a adsorção enzimática e a perda da consistência do substrato são fatores que interferem na taxa do processo de hidrólise enzimática (GANESH *et al.*, 2000).

**Tabela 4.20.** Resultados de concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtidos durante cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima comercial.

| Tempo (h) | $[\text{E}_0] = 5 \text{ g L}^{-1}$ | $[\text{E}_0] = 10 \text{ g L}^{-1}$ | $[\text{E}_0] = 20 \text{ g L}^{-1}$ |
|-----------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 2         | $0,47 \pm 0,02$                     | $4,49 \pm 1,01$                      | $5,03 \pm 0,71$                      |
| 4         | $0,70 \pm 0,00$                     | $4,95 \pm 0,08$                      | $5,75 \pm 0,24$                      |
| 6         | $0,86 \pm 0,00$                     | $5,75 \pm 0,24$                      | $7,08 \pm 0,15$                      |
| 8         | $0,94 \pm 0,04$                     | $6,53 \pm 0,12$                      | $8,96 \pm 0,19$                      |
| 13        | $1,11 \pm 0,03$                     | $7,08 \pm 0,15$                      | $9,33 \pm 0,025$                     |
| 24        | $1,15 \pm 0,02$                     | $8,11 \pm 0,08$                      | $9,33 \pm 0,025$                     |
| 36        | $1,21 \pm 0,00$                     | $8,96 \pm 0,19$                      | $10,42 \pm 0,53$                     |
| 48        | $1,25 \pm 0,02$                     | $9,29 \pm 0,07$                      | $11,43 \pm 0,27$                     |
| 72        | $1,35 \pm 0,00$                     | $9,33 \pm 0,02$                      | $12,00 \pm 0,50$                     |

Foram determinados os rendimentos (%), conforme equação 3.2, e as produtividades ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) da hidrólise enzimática considerando os dados da Tabela 4.20, obtendo-se então a Tabela 4.21. Pode-se observar que o melhor rendimento (17,39%) foi obtido na concentração de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de enzima no tempo de 72 h. Por outro lado, a maior produtividade ( $2,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) é observada no tempo de 2 h para a mesma concentração de enzima.

**Tabela 4.21.** Resultados de rendimento e de produtividade obtidos durante a cinética de hidrólise utilizando diferentes concentrações da enzima comercial.

| Tempo | Rendimento (%)                      |                                      |                                      | Produtividade ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) |                                      |                                      |
|-------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
|       | $[\text{E}_0] = 5 \text{ g L}^{-1}$ | $[\text{E}_0] = 10 \text{ g L}^{-1}$ | $[\text{E}_0] = 20 \text{ g L}^{-1}$ | $[\text{E}_0] = 5 \text{ g L}^{-1}$                | $[\text{E}_0] = 10 \text{ g L}^{-1}$ | $[\text{E}_0] = 20 \text{ g L}^{-1}$ |
| 2     | 0,68                                | 6,50                                 | 7,28                                 | 0,23   | 2,24                                 | 2,51                                 |
| 4     | 1,01                                | 7,17                                 | 8,33                                 | 0,17   | 1,23                                 | 1,43                                 |
| 6     | 1,24                                | 8,33                                 | 10,26                                | 0,14   | 0,95                                 | 1,18                                 |
| 8     | 1,36                                | 9,46                                 | 12,98                                | 0,11   | 0,81                                 | 1,12                                 |
| 13    | 1,60                                | 10,26                                | 13,52                                | 0,08   | 0,54                                 | 0,71                                 |
| 24    | 1,66                                | 11,75                                | 13,52                                | 0,05   | 0,33                                 | 0,38                                 |
| 36    | 1,75                                | 12,98                                | 15,10                                | 0,03   | 0,24                                 | 0,28                                 |
| 48    | 1,81                                | 13,46                                | 16,56                                | 0,02   | 0,19                                 | 0,23                                 |
| 72    | 1,95                                | 13,52                                | 17,39                                | 0,02   | 0,12                                 | 0,16                                 |

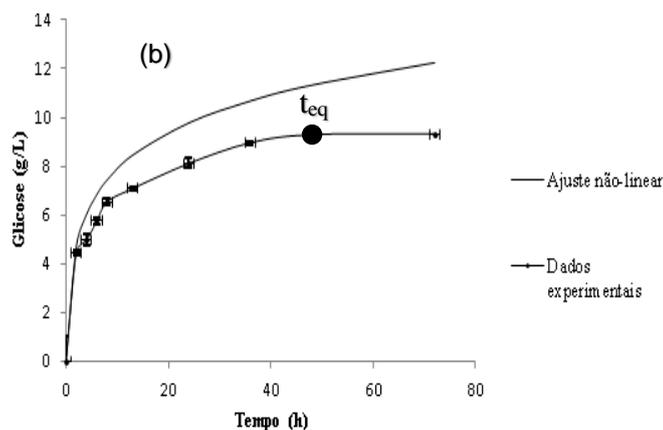
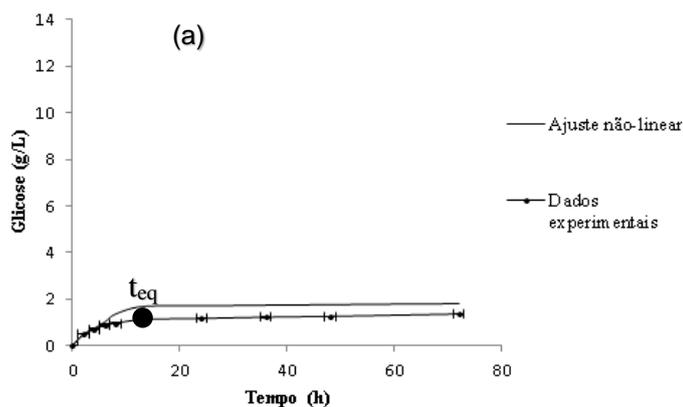
Os dados experimentais presentes na Tabela 4.21 foram ajustados não linearmente para a enzima Celluclast®, sendo este ajuste representado pelas Figuras 4.13a, 4.13b e 4.13c.

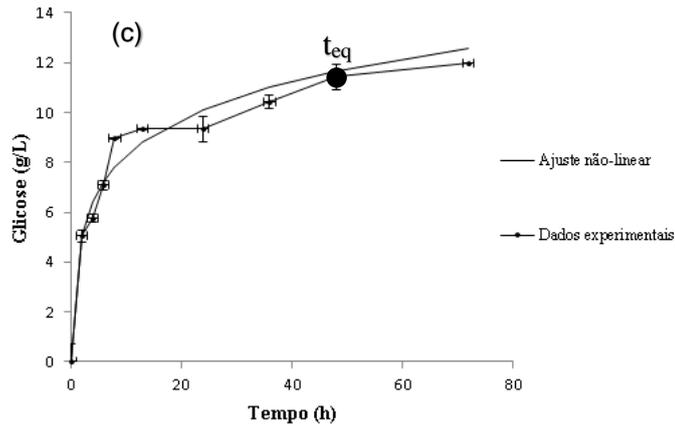
Posteriormente, a partir do ajuste não-linear, foram obtidos os parâmetros cinéticos  $K_e$ ,  $K_{de2}$  e  $K_2$ , os quais estão dispostos na Tabela 4.22.

**Tabela 4.22.** Valores determinados para os parâmetros cinéticos  $K_e$ ,  $k_{de2}$ ,  $k_2$  e coeficiente de determinação para diferentes concentrações iniciais e valores obtidos para a Celluclast®.

| Parâmetros | Enzima comercial        |                          |                          |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | $[E_0] = 5 \text{ g/L}$ | $[E_0] = 10 \text{ g/L}$ | $[E_0] = 20 \text{ g/L}$ |
| $K_e$      | 18,43                   | 26,56                    | 28,12                    |
| $k_2$      | 0,42                    | 0,69                     | 0,91                     |
| $k_{de2}$  | 0,62                    | 0,70                     | 0,89                     |
| $R^2$      | 0,960467                | 0,987701                 | 0,974224                 |

A Figura 4.13a, demonstra que a produção de AR vem sendo crescente no tempo de 1 a 10 h, com uma produção máxima de  $9 \text{ g L}^{-1}$ , a partir daí a produção começa a estabilizar. Gan *et al.* (2003), apresentam valores próximos ao exposto neste trabalho.





**Figura 4.13.**  $t_{eq}$   $t_{equilíbrio}$ . Resultados experimentais de concentração de glicose obtidas na hidrólise enzimática e simulação dos modelos matemáticos para (a)  $5 \text{ g L}^{-1}$ ; (b)  $10 \text{ g L}^{-1}$  e (c)  $20 \text{ g L}^{-1}$  de concentração da Celluclast®.

Utilizando as Equações descritas em 3.4.1, os dados experimentais presente na Tabela 4.22 foram ajustados não linearmente para a determinada enzima, sendo este ajuste representado pelas Figuras 4.13a, 4.13b, 4.13c. Posteriormente, a partir do ajuste não-linear, foram obtidos os parâmetros cinéticos  $K_e$ ,  $k_{de2}$  e  $k_2$ , os quais estão dispostos na Tabela 4.23.

SUBHEDAR *et al.* (2018), relatam que ao trabalhar com amendoim (*Arachis hypogaea*), coco (*Cocos nucifera*) e pistache (*Pistacia vera*), alterando alguns itens nos parâmetros operacionais, como a temperatura, concentração de NaOH e tempo, teve como resultado final de deslignificação da biomassa 41,8%, 45,91% e 38,04%, respectivamente, estes resultados são reforçados com os resultados desta pesquisa. Na pesquisa os autores citados anteriormente, trabalhando com modelagem da cinética, propôs colocar a taxa constante em  $k \text{ h}^{-1}$ , ficaram assim 0,098, 0,106 e 0,088, relacionando com esta pesquisa em média das concentrações 0,91.

Para o cálculo da velocidade inicial da hidrólise enzimática ( $v_0$ ) em  $(\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1})$ , o qual é um parâmetro importante para estudar a cinética das enzimas, foram usadas as Equações 3.9 e 3.10, utilizando os dados da cinética enzimática (Tabela 4.20). Assim, foram obtidos os dados da Tabela 4.23.

**Tabela 4.23.** Valores determinados para os parâmetros cinéticos  $V_{\text{emax}}$  e  $v_0$  para diferentes concentrações iniciais da Celluclast®.

| Parâmetros   | Celluclast®                  |                               |                               |
|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|  | $[E_0] = 5 \text{ g L}^{-1}$ | $[E_0] = 10 \text{ g L}^{-1}$ | $[E_0] = 20 \text{ g L}^{-1}$ |
| $V_{\text{emax}} \text{ (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$ | 21,48                        | 34,56                         | 45,51                         |
| $v_0 \text{ (g L}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$             | 7,99                         | 9,45                          | 18,91                         |

$V_{\text{emax}}$ : Velocidade inicial máxima e  $v_0$ : velocidade inicial

Ao observar os resultados da Tabela 4.23, observa-se que para a enzima comercial, quanto maior a concentração inicial de enzima, maior será  $V_{\text{emax}}$  e, conseqüentemente,  $v_0$ . Os valores da  $V_{\text{emax}}$  e  $v_0$  deste trabalho, estão de acordo com os dados apresentados por Teoh & Don (2011), que trabalharam com fibras de palma com pré-tratamento biológico, obteve na modelagem, valores próximos deste trabalho, como:  $k_0$  a 6,341,  $V_{\text{max}}$  a 0,106 e  $R^2$  a 0,915.

Ao analisar os resultados obtidos para o tempo de hidrólise e para a concentração inicial enzimática foi possível ajustar os modelos matemáticos propostos no processo de hidrólise enzimática do capim-elefante com a obtenção dos açúcares redutores fermentescíveis necessários à posterior produção de EtOH de segunda geração. Foi observado que, para concentrações mais elevadas de enzima, o modelo ajusta melhor os resultados experimentais, sendo alcançado um coeficiente de determinação  $R^2=0,974$  para a enzima comercial. A partir das simulações realizadas é possível prever o comportamento do processo de hidrólise com vistas a determinar as condições ótimas de obtenção dos açúcares fermentescíveis. Com isso é possível promover a rentabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática a partir da relação destes três parâmetros, podendo vir a ser utilizado em novos projetos e em aplicações industriais.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram um aumento na concentração de celulose associado a uma diminuição do teor de lignina utilizando a reação de Fenton, sendo os melhores resultados (53,80% de celulose e 10,00% de lignina) obtidos na condição do ponto central do planejamento de Doehlert, que corresponde a concentração de sulfato ferroso de 20 mM e temperatura de 40 °C. O emprego do planejamento Doehlert contribuiu para uma otimização rápida e eficiente do processo e forneceu informações importantes sobre a interação entre as variáveis. Os melhores resultados obtidos com o pré-tratamento de NaOH em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foram 57,01% na celulose quando aplicado uma temperatura de 120 °C e na lignina com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 80 °C com 12,13%.

Conclui-se que, dentre os pré-tratamentos analisados os teores de celulose variaram de 49,64 a 53,80%. Em relação à lignina, os materiais apresentaram uma variação de 10,00 a 22,98% de componente. A caracterização físico-química morfológica dos materiais indica que o capim-elefante é um resíduo de biomassa promissor para a produção de EtOH 2G por apresentar um teor de celulose considerável. As análises evidenciaram a remoção da lignina o qual está relacionado em uma estrutura complexa à celulose, dificultando a acessibilidade das celulasas a este carboidrato.

Foi possível observar que, na hidrólise enzimática o maior rendimento (17,39%) foi obtido na concentração de 20 g L<sup>-1</sup> de enzima no tempo de 72 h. Por outro lado, a maior produtividade (2,51 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) é observada no tempo de 2 h para a mesma concentração de enzima.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2010. 118 p. Dissertação (Mestrado).
- AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulasas por *A. Niger* e cinética da desativação celulósica. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, p. 385-391. 2011.
- ANEEL. Agência Nacional de Energia Elétrica. **Biomassa**. Brasília, 2010. Disponível em: < [http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/biomassa/5\\_3.htm](http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/biomassa/5_3.htm)>. Acesso em 10 nov. 2017.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, Inglaterra, v. 3, p. 4, fev. 2010.
- ARATO, C.; PYE, E. K.; GJENNESTAD, G. The lignol approach to biorefinery of wood biomass to produce ethanol and chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 871 - 882, 2005.
- ARAÚJO, E.; MALAVER, A. J. R.; GONZÁLEZ, A. M.; ROJAS, O. J.; PEÑALOZA, N.; BULLÓN, J.; LARA, M. A.; DMITRIEVA, N. Fenton's Reagent-Mediated Degradation of Residual Kraft Black Liquor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 97, p. 91 - 103, 2002.
- BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL. BEN. Disponível em <[https://ben.epe.gov.br/downloads/S%c3%adntese%20do%20Relat%c3%b3rio%20Final\\_2017\\_Web.pdf](https://ben.epe.gov.br/downloads/S%c3%adntese%20do%20Relat%c3%b3rio%20Final_2017_Web.pdf)> Acesso em nov. 2017.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, Trabzon, p. 858 - 875, 2011.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioEtOH**. 2012. 334 f. Tese (Doutorado).

BERNARDO NETO, O. **Integração das principais tecnologias de obtenção de EtOH através do processamento de celulose (2ª geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1ª geração)**. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle, 2009. 137p. Dissertação (Mestrado).

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 13, p. 4767 – 4774, jul. 2010.

BORTOLAZZO, N. G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado).

CAMPOS, B. B. **Produção de EtOH em biomassa de capim-elefante por *Khyvermonyces marxianus* CCCT 7735**. Viçosa: Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, 2015. 34f. Dissertação (Mestrado).

CAMPOS, A. O. **Avaliação do pré-tratamento alcalino na hidrólise enzimática dos resíduos da palha de carnaúba**. Natal: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017. 55f. Dissertação (Mestrado).

CANILHA, L., MILAGRES, A. M. F., SILVA, S. S., SILVA, J. B. A., FELIPE, M. G. A., ROCHA, G. J. M., FERRAZ, A., CARVALHO, W. Sacarificação da biomassalignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44. 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 38, p. 1467–1475, 2011.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291 - 1296, 2002.

CARDONA, E.; RIOS, J.; PEÑA, J.; RIOS, L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Bioenergy Reserch Journal**, v. 118, p. 41-47, fev. 2014.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 135 – 159, set. 1998.

CHEMMÉS, C. S.; SILVA, F. C. da; SOUZA, L. S.; AZEVEDO JUNIOR, R. A. de; CAMPOS, L. M. A. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de EtOH de segunda geração. In: SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PRODUÇÃO ACADÊMICA, 2013, Salvador. **Anais...** Disponível em: <http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa>. Acesso em: 01 novembro 2017.

CHIES, V. **Pesquisa investe na caracterização da biomassa para obtenção de biocombustíveis**. Disponível (online). < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1494116/pesquisa-investe-na-caracterizacao-da-biomassa-para-obtencao-de->

[biocombustíveis](#)>. Acesso em 21 nov. 2017.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Superintendência de Informações do Agronegócio. **O EtOH como um Novo Combustível Universal**. Brasília, 2008. Disponível em: <  
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-EtOH-como-um-novo-combustivel-universal-conab/o-EtOH-como-um-novo-combustivel-universal-conab.pdf>>. Acesso em 3 nov. 2017.

DAMASO, M. C. T.; FARINAS, C. S.; SALUM, T. F. C. **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos**. Cap: Produção e imobilização de enzimas aplicadas à produção de EtOH e biodiesel, p. 101-125, 2012.

DA SILVA, A. S. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com líquidos iônicos: efeito na desestruturação da parede celular e na eficiência da hidrólise enzimática**. Rio de Janeiro: Instituto de Química, 2013. 127f.: il.; 31 cm.. Tese (Doutorado).

DELABONA, P. S.; FARINAS, S. C.; PIROTA A. B. **Enzymatic hydrolysis of Sugarcane Bagasse Using Enzyme Extract and Whole Solid-state Fermentation Medium of Two Newly Isolated Strains of *Aspergillus oryzae***. *Chemical Engineering Transactions*, v. 38, p. 259-264. 2014.

DEMIRBAS, M. F., BALAT, M., & BALAT, H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion Management**, v. 50, p. 1746 – 1760, 2009.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell design. **Appl Stat**, n. 19, v. 3, p. 231 - 239, 1970.

FAVA, A. R. **Avaliação de clones de capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schum.*) para utilização em capineira no cerrado matogrossense**. Cuiabá: Faculdade de

Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado).

FERREIRA, Luiz F. R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2009. 134p. Tese (Doutorado).

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8915–8922, 2010.

FONTOURA, C. F.; BRANDÃO, L. E.; GOMES, L. L. Elephant grass biorefineries: towards a cleaner Brazilian energy matrix? **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 85–93, 2015.

GLÓRIA, B. A. da; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. 2ed. atual: Editora Viçosa, 2006. Disponível em: <  
<http://docente.ifsc.edu.br/jocleita.ferrareze/MaterialDidatico/Bot%C3%A2nica%20e%20Fisiologia%20Vegetal/ANATOMIA%20VEGETAL%20-%202%C2%AA%20edi%C3%A7%C3%A3o%20-%20Beatriz%20Apezzato-da-Gl%C3%B3ria.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582–587, mar. 2009.

GONÇALVES, C. **Aplicação de Agentes Oxidantes no Pré-Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar e sua Influência na Sacarificação da Celulose**. São Caetano do Sul: Escola de Engenharia, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2009. 73p. Dissertação (Mestrado).

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. do; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500 - 1503, 2009.

GRIMALDI, M. P. **Efeito dos pré-tratamentos químicos e físicos do bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise enzimática**. Araraquara: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado).

GUELLITY, M. **Plantas C3, C4 e CAM: fixação de carbono**. Eu quero biologia, Ribas do Rio Pardo, MS, 2014. Disponível em: <<http://www.euquerobiologia.com.br/2014/02/plantas-c3-c4-e-cam-fixacao-de-carbono.html>>. Acesso em 30 de outubro 2017.

GUERRA, J. V. S.; ANDRADE, R. R.; COSTA, A. C.; "Avaliação da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino considerando altas cargas de sólidos", p. 534 - 538. **Anais...** Rio de Janeiro: Blucher, 2014.

GUILHERME, A. A. **Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de EtOH**. Rio Grande do Norte: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014. 258f. Tese (Doutorado).

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, 2006.

HAN, G.; DENG, J.; ZHANG, S.; BICHO, P.; WU, Q. Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 28 – 33, jan. 2010.

HE, Y. C.; DING, Y.; XUE, Y. F.; YANG, B.; LIU, F.; WANG, C.; ZHU, Z. Z.; QING, Q.; WU, H.; ZHU, C.; TAO, Z. C.; ZHANG, D. P. Enhancement of enzymatic saccharification of corn stover with sequential Fenton pretreatment and dilute NaOH extraction. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 324 – 330, oct. 2015.

HE, Y. C.; LIU, F.; GONG, L.; DI, J. H.; DING, Y.; MA, C. L.; ZHANG, D. P.; TAO, Z. C.; WANG, C.; YANG, B. Enzymatic in situ saccharification of chestnut shell with high ionic liquid-tolerant cellulases from *Galactomyces* sp. CCZU11-1 in a biocompatible ionic liquid-cellulase media. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 133 – 139, fev. 2016.

HIGA, F. G. R.; TAMBOURGI, E. B.; GIANNETTI, A. A. M. Aplicação do peróxido de hidrogênio como reforço da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Exacta**, São Paulo. v. 10, n. 2, p. 281 – 288, 2012.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, p. 804 - 807, 2007.

HORST, Diogo José. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**. Ponta Grossa: Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. 106f. Dissertação (Mestrado).

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels*, **Bioprouction and Biorefening**, v. 1, p. 119-134, 2007.

CHIEPPE JÚNIOR, J. B. **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 74 p. : il.

- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 153-156, 2004.
- KATARIA, R.; MOL, A.; SCHULTEN, E.; HAPPEL, A.; MUSSATTO, S. I. Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 48 – 58, nov. 2017.
- KATO, D. M.; ELÍA, N.; FLYTHE, M.; LYNN, B. C. Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry. **Bioresource Technol**, v. 162, p. 273 – 278, 2014.
- KIM, T. H.; KIM, J. S.; SUNWOO, C.; LEE, Y.Y. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, China, v. 90, p. 29 – 47, out. 2003.
- KIRK, T. K; CULLEN D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by wooddegrading fungi. In: Young, R.A. & Akhtar, M. (eds.): **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 273-307.
- LEE, S.; TERAMOTO, Y.; ENDO, T. Enhancement of enzymatic accessibility by fibrillation of woody biomass using batch-type kneader with twin-screw elements. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 769 – 774, jan. 2010.
- LEVINE, S. E; FOX, J. M; BLANCH, H. W; CLARK, D. S. **A Mechanistic Model of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 107, n. 1, p. 37 – 51, set. 2010.

- LIEW, W. H.; HASSIM, M. H.; DENNY, K. S. Review of evolution and sustainability assessment of biofuel production. **Journal of Cleaner Production**. v. 71, p. 11 – 29, mai. 2014.
- LU, J.; LI, X. Z.; ZHAO, J.; QU, Y. Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid Hot Water. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 144, p. 539 - 547, 2013.
- MAGALHÃES, T. da S. **Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de EtOH celulósico por hidrólise enzimática**. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista, 2011. 63 f.: il, 30 cm. Dissertação (Mestrado).
- MAICHE, Rodolfo; HUBER, Charles. Desenvolvimento da produção de bioEtOH nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**, Pelotas, v. 7, n. 2. jun. 2010. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/47658260\\_BioEtOH\\_nos\\_Estados\\_Unidos\\_analise\\_e\\_perspectivas\\_da\\_producao\\_e\\_pesquisa\\_focando\\_as\\_rotas\\_bioquimicas](https://www.researchgate.net/publication/47658260_BioEtOH_nos_Estados_Unidos_analise_e_perspectivas_da_producao_e_pesquisa_focando_as_rotas_bioquimicas)>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- MARCOTULLIO, G.; KRISANTI, E.; GIUNTOLI, J.; DE JONG, W. Selective production of hemicellulose-derived carbohydrates from wheat straw using dilute HCl or FeCl<sub>3</sub> solutions under mild conditions. X-ray and thermo-gravimetric analysis of the solid residues. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5917 – 5923, maio 2011.
- MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulósico de *Penicillium echinulatum***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 121p. Dissertação (Mestrado).
- MCCARTNEY, L.; BLAKE, A.; FLINT, J.; BOLAM, D.; BORASTON, A.; GILBERT, H.; KNOX, J. P. Differential recognition of plant cell walls by microbial xylan-specific carbohydrate-binding modules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

**the United States**, Richardson, TX, v.103, 12f, p. 4765 – 4770, mar. 2006.

MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Potential of a *Penicillium echinulatum* enzymatic complex produced in either submerged or solid-state cultures for enzymatic hydrolysis of elephant grass. **Fuel**, v. 133, p. 232-240, 2014.

MENEGOL, D.; FONTANA, R. C.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Second-generation EtOH production from elephant grass at high total solids. **Bioresource Technology**, Caxias do Sul, v. 11, 01, jul. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416304011?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68 - 78, jan./abr. 2009.

MICHALSKA, K., MIAZEK, K., KRZYTEK, L., LEDAKOWICZ, S. Influence of pretreatment with Fenton's reagent on biomass production and methane yield from lignocellulose biomass. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 72 - 78, 2012.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MINMUNIN, J.; LIMPITIPANICH, P.; PROMWUNGKWA, A. Delignification of Elephant Grass for Production of Cellulosic Intermediate. **Science Direct Energy Procedia**, v. 79, p. 220 – 225, 2015.

MORÁN, J. I.; ALVAREZ, V. A.; CYRAS, V. P.; VÁZQUEZ, A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, p. 149– 159, 2008.

MOREIRA NETO, J.; GARCIA, D. R.; RUEDA, S. M. G.; COSTA, A. C. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse subjected to different pretreatments. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.36, p.1579-1590, 2013.

MUNIZ, A. R. C.; BERDET, G. & DA SILVA, L. **Potencialidade do Capim-elefante para a produção de EtOH de segunda geração**. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica 8, 2015.

NASCIMENTO, Viviane Marcos. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de EtOH e obtenção de xilooligômeros**. São Carlos: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2011. 136f. Dissertação (Mestrado).

NEGRO, M. J.; ALVAREZ, C.; BALLESTEROS, I.; ROMERO, I.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E.; MANZANARES, P.; MOYA, M.; OLIVA, J. M. Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 101 – 107, fev. 2014.

NOAAA. **Trends in Atmospheric Carbon Dioxide**. Disponível em: <<https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/ff.html>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. Piracicaba: Escola de Ciências, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2013. 108 p. Dissertação (Mestrado).

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. *Química Nova*, v.

33, n .7, p. 1549 - 1558. 2010.

OLIVEIRA, C. C. S. **Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. 81p. Dissertação (Mestrado).

OLIVEIRA, L. de P. S. **Cinética da hidrólise enzimática do capim-elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) pré-tratado, utilizando celulases produzidas por *Aspergillus niger*.** Recife: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 2014. 111f. Dissertação (Mestrado).

PALONEN, H.; THOMSEN, A. B.; TENKANEN, M.; SCHMIDT, A. S.; VIKARI, L. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 117, p. 1 – 17, abr. 2004.

PAPINUTTI, V. L.; FORCHIASSIN, F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. **J. Food Eng.** v. 81, p. 54 – 59, jul. 2007.

PENA, Fernanda Rodrigues. **Otimização de parâmetro concentração de hidróxido de sódio, empregado no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, visando à obtenção de EtOH celulósico.** Assis: Programa de Iniciação Científica, Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, 2011. 45p. (Iniciação Científica).

PENSRI, BUNTHITA; AGGARANGSIB, PRUK; CHAIYASOC, THANONGSAK; CHANDET, NOPAKARN. Potential of Fermentable Sugar Production from Napier cv. Pakchong 1 Grass Residue as a Substrate to Produce Bioethanol. **Energy Procedia.** v. 89, p. 428 – 436. 2016.

- PEREIRA, A. L. S. **Extração de Nanocelulose de Fibras Vegetais**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010. 46p. Graduação em Engenharia Química (Monografia).
- PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. Instituto de Ciências Biológicas, 2013. 84p. Dissertação (Mestrado).
- PEREIRA, D. G. S. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de EtOH de segunda geração**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013, xii, 52f.: il. (Algumas color); 29 cm. Dissertação (Mestrado).
- PÈREZ, M.; TORRADES, F.; GARCÍA-HORTAL, J. A.; DOMÈNECH, X.; PERAL, J. Removal of Organic Contaminants in Paper Pulp Treatment Effluents under Fenton and Photo-Fenton Conditions. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 36, p. 63-74, fev. 2002.
- PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 247 – 256, oct. 2016.
- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. 125p. Dissertação (Mestrado).
- PONTES, G. M. **Avaliação da produtividade de biomassa de capim-elefante e sorgo sacarino no estado do ceará para uso energético**. São Paulo: Escola de Economia de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas – EESP – FGV, 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado).

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré- tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado).

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de EtOH de segunda geração.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 440 f. Tese (Doutorado).

RABELO, S. C.; FONSECA, A. N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p. 2600 - 2607, 2011.

RAÍZEN, **Tecnologia em Energia Renovável: EtOH de segunda geração.** Disponível em: < <https://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/EtOH-de-segunda-geracao> >. Acesso em 21 de novembro de 2017.

RIBEIRO, J. A. B. **Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando Extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768.** Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado).

ROCHA, Â. M.; SILVA, M. S.; FERNANDES, F. M.; PAULILLO, L. C. M. S.; TORRES, E. A. **Prospecção tecnológica do capim-elefante e sua relevância como matéria-prima para a produção energética.** *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 10, n. 2, p. 475 - 499, abr./jun. 2017.

- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3693 - 3700, dez. 2005.
- SAMUEL, R.; PU, Y.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Solid-state NMR characterization of switchgrass cellulose after dilute acid pretreatment. **Biofuels**, v. 1, p. 85 - 90, 2010.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de EtOH. **Quím. Nova**. v. 35, n. 5, p. 1004 – 1010, jan. 2012.
- SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L.; Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **ENGEVISTA**, v. 14, n. 3, p. 310-321, dezembro. 2012.
- SCHOLL, Angélica Luisi. **Capim-elefante pré-tratado por explosão a vapor como matéria-prima para produção de enzimas, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica**. Caxias do Sul: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2014. 178 f. Dissertação (Mestrado).
- SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Optimization of enzymeloading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 41, p. 241–250, 2008.
- SILVA, R.; SHIRANI, K. H.; EDVANI C. M.; ADLEY F.R. **Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos**. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 661-671. 2009.

SILVA, Neumara. L. C. **Produção de bioEtOH de Segunda Geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Rio de Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado).

SILVA, I. S. **Pré-tratamento alcalino do bagaço da cana-de-açúcar em Reator de Leito Fixo Percolado: avaliação do efeito de temperatura e concentração de NaOH na digestibilidade enzimática do material.** Lorena: Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2014. 42 f. Monografia.

SIQUEIRA, L. N. de; GUARDA, E. A.; GUARDA, P. M.; SILVA, R. B. R. da; BARBOSA, R. S. Rendimento de hidrólise e produção de EtOH lignocelulósico a partir de biomassa de capim-elefante. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 4, dez. 2016. DOI:10.18067/jbfs.v3i4.112.

SOEST, V. **Nutritional ecology of the ruminant**, 2 edición, Cornell University Press, (1994).

SUBHEDAR, P. B.; RAY, P.; GOGATE, P. R. Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, parte B, p. 140 - 150, jan. 2018.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**. abr. 2008.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renew. Energy**, v. 34, p. 421 – 424, 2009.

SUN, J. X., SUN, X. F, SUN, R. C., SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195 – 204, 2004.

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315- 330, out./dez. 2004.

TARKOW, H., FEIST, W. C. A Mechanism for Improving the Digestibility of Lignocellulosic Materials with Dilute Alkali and Liquid NH<sub>3</sub>. **American Chemical Society**, Washington, v. 95, p. 197 – 218. 1969

TOSCAN, Andréia. **Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise enzimática do capim-elefante**. Caxias do Sul: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2013. 146f. Dissertação (Mestrado).

USBERTI, J. A. F.; TEIXEIRA, J. P. F.; GALLO, P. B.; PEREIRA, C. A. **Produção de EtOH de gramíneas forrageiras tropicais**. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 23(2), p. 175-187, 1988. Disponível em:<<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/13796>>. Acesso em 12 de jun. 2017.

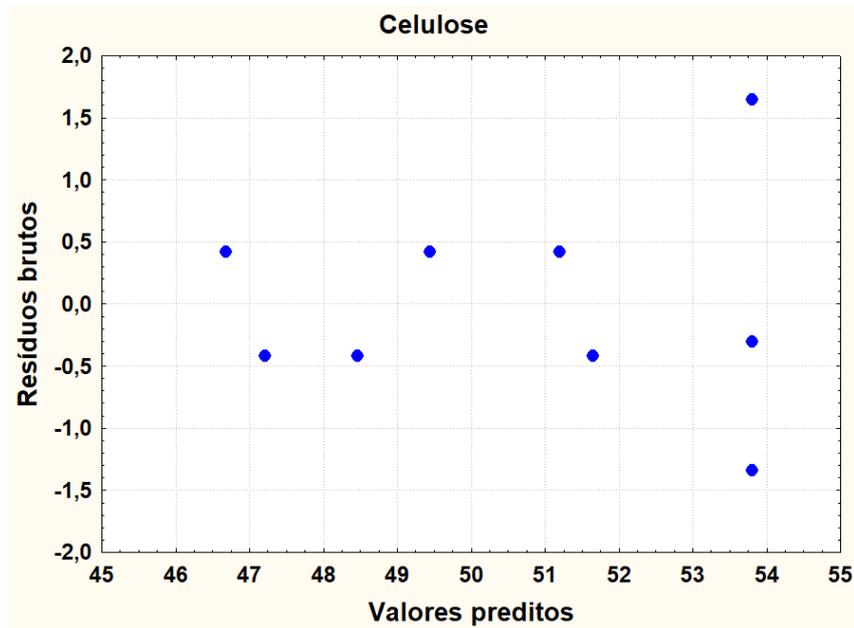
VÁSQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de Processo de Hidrólise Enzimática e fermentação Simultâneas para a Produção de EtOH a partir de Bagaço de Cana-de-açúcar**. Rio de Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Paraná, 2007. 205p. Tese (Doutorado).

VAN SOEST, P.J. V. **Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II - a rapid method for determination of fiber and lignin**. *Journal of the A.O.A.C.*, v. 46, n. 5, p. 829 - 835. 1963.

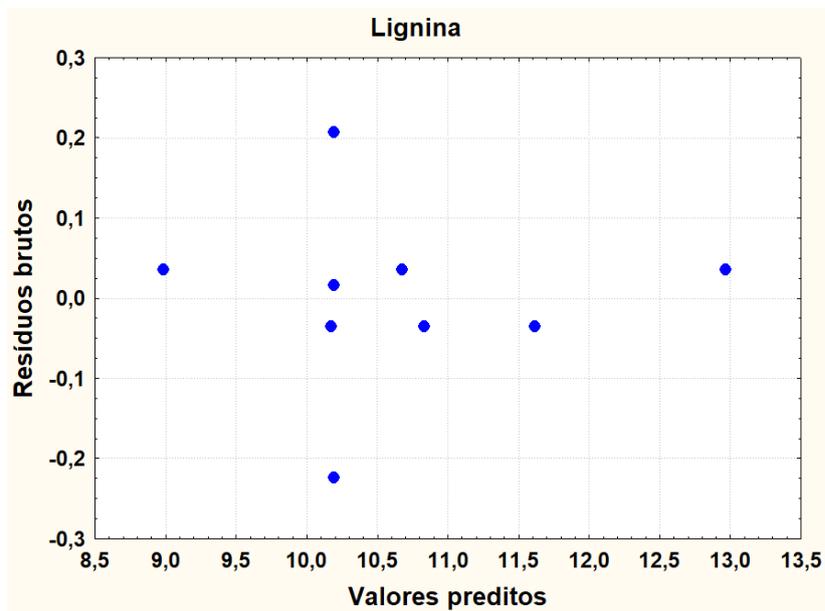
- XU, J.; WANG, X.; LIU, X.; XIA, J.; ZHANG, T.; XIONGA, P. Enzymatic in situ saccharification of lignocellulosic biomass in ionic liquids using an ionic liquid-tolerant cellulases. **Biomass and Bioenergy**, China, v. 93, p. 180 – 186, out. 2016.
- XU, G. C.; DING, J. C.; HAN, R. Z.; DONG, J. J.; NI, Y. Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 364 – 369, mar. 2016.
- WANG, J.; WAN, W. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 3, p. 1253 – 1259, fev. 2009.
- ZHANG, Y.; XU, J. L.; XU, H. J.; YUAN, Z. H. & GUI, Y. Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8261–8266, 2010.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452 – 481, 2006.
- ZHANG, T.; ZHU, M. J. Enhancing enzymolysis and fermentation efficiency of sugarcane bagasse by synergistic pretreatment of Fenton reaction and sodium hydroxide extraction. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 769 – 777, oct. 2016.
- ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 950 - 956, 2008

ZHAO, X. B.; CHENG, K. K.; LIU, D. H. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 815– 827, 2009.

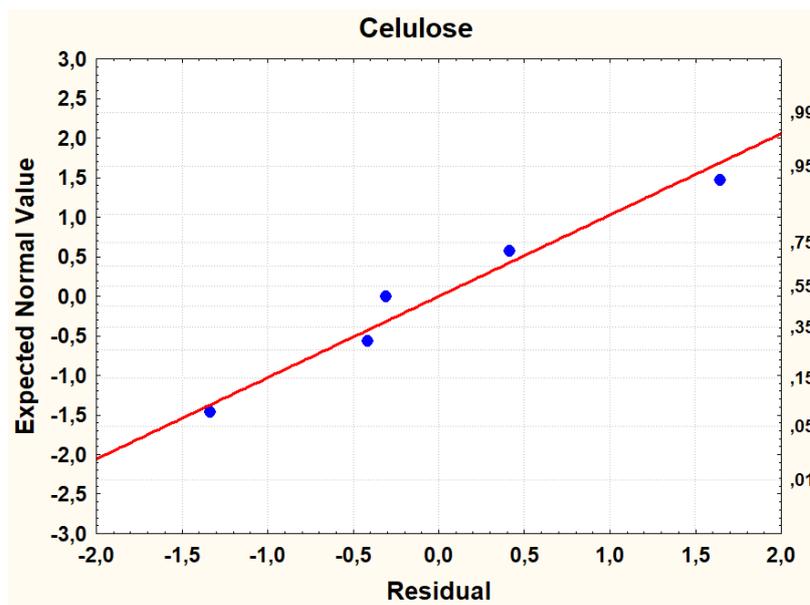
## ANEXOS



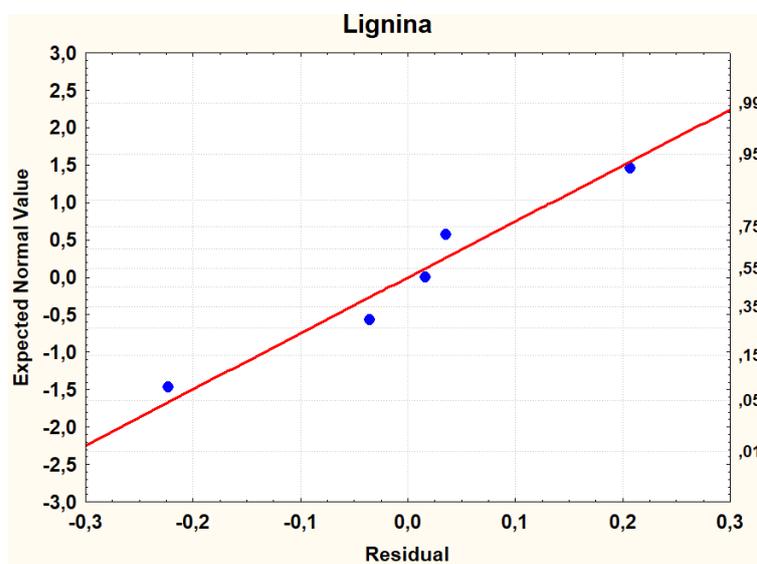
**Figura 1.** Gráfico dos resíduos vs. valores preditos para a resposta  $Y_1$  (% cellulose) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.



**Figura 2.** Gráfico dos resíduos vs. valores preditos para a resposta  $Y_2$  (% lignina) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.



**Figura 3.** Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta  $Y_1$  (% celulose) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.



**Figura 4.** Gráfico da probabilidade normal dos resíduos para a resposta  $Y_2$  (% lignina) no planejamento de Doehlert para o pré-tratamento com Fenton.