



**Universidade Federal da Paraíba**  
**Centro de Tecnologia em Desenvolvimento Regional**  
**Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira**



## **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DA PALHA DE  
CANA-DE-AÇÚCAR**

**IVANILDO JACINTO DA SILVA JUNIOR**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Maria de Vasconcelos

**João Pessoa-PB**

**2018**

Ivanildo Jacinto da Silva Junior

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA  
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**IVANILDO JACINTO DA SILVA JUNIOR**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Tecnologia em Produção Sucroalcooleira  
do Centro de Tecnologia e  
Desenvolvimento Regional da  
Universidade Federal da Paraíba, como  
requisito para a obtenção do grau de  
Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Maria  
de Vasconcelos

**Catalogação na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

J95p Silva Junior, Ivanildo Jacinto da.  
PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA  
DE CANA-DE-AÇÚCAR / Ivanildo Jacinto da Silva Junior. -  
João Pessoa, 2018.  
45 f. : il.

Orientação: Solange Maria de Vasconcelos.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CTDR.

1. Produção sucroalcooleira. Palha de cana-de-açúcar.
2. Pré-tratamento alcalino. Hidrólise enzimática. I.  
Vasconcelos, Solange Maria de. II. Título.

UFPB/BC

TCC aprovado em 01/11/18 como requisito para a conclusão do curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Solange Maria de Vasconcelos

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Maria de Vasconcelos - (UFPB – Orientadora)

---

Erika Adriana de Santana Gomes

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erika Adriana de Santana Gomes - (UFPB – Membro Interno)

---

Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves - (UFPB – Membro Interno)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida, tornando possível entre frequentes erros e acertos cada memorável experiência mediante os caminhos traçados.

Aos meus extraordinários pais Ivanildo Jacinto e Maria Eunice, que partilharam de cada gota de suor para garantir a conquista dos meus objetivos, e por todos os valorosos ensinamentos passados.

Aos meus irmãos, Lucivania, Ivanice e Ivanilton, meus cunhados Thiago e Jefferson, que estiveram presentes e proporcionaram o incentivo necessário.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Maria de Vasconcelos, pela orientação, aprendizado científico e profissional, busca por estrutura e recursos e, especialmente pelas oportunidades e confiança depositadas. Obrigado!

A cada sobrevivente do curso de Tecnologia Sucroalcooleira, em especial ao futuro profissional Jordão Pedro, pela amizade e auxílio no desenvolvimento experimental desse trabalho, sempre com muita dedicação.

Ao imprescindível suporte técnico, especialmente a Diego e José Carlos, pelas valiosas sugestões, agradável convivência, bom humor e principalmente pela confiança.

As amigas Isabella e Letícia, pelo auxílio durante os numerosos experimentos.

A Universidade Federal da Paraíba, corpo docente, direção e administração, pelas oportunidades dispostas.

Aos amigos que partilharam de experiências vividas durante esta graduação.

Por último, mas não por isso menos importante, a todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido e que representa mais uma grande etapa vencida em minha vida.

## RESUMO

As razões para o interesse pelos biocombustíveis variam de um país para outro, mediante os benefícios ambientais, sociais e econômicos, tornando-se paulatinamente enfatizadas ao longo do tempo. O Brasil é um dos países com maior potencial tecnológico para produção de biocombustíveis. Atualmente, o etanol apresenta uma grande demanda comercial, porém o país vem enfrentando um crescente déficit na oferta de etanol combustível. No sentido de sanar a sobreposição da demanda sobre a oferta do etanol brasileiro no mercado, pesquisas orientadas para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica surgem como uma segunda forma de geração de etanol. O processo difere da forma convencional apenas na separação das frações da biomassa lignocelulósica (lignina, hemicelulose e celulose) através de etapas adicionais denominadas de pré-tratamento e hidrólise. Resíduos lignocelulósicos, como a palha de cana-de-açúcar, podem ser utilizados para produção de etanol de segunda geração. O presente trabalho teve como principal objetivo o estudo do pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com hidróxido de sódio, em diferentes concentrações e diferentes tempos de aplicação, de forma a encontrar as melhores condições em termos de solubilização de componentes macromoleculares que, por sua vez, favoreçam o acesso das enzimas à celulose, na etapa de hidrólise enzimática. O trabalho foi realizado em três etapas principais. Primeiramente, a palha foi peneirada, lavada, seca e triturada para obtenção de uma amostra homogênea de granulometria de 20 mesh. Na segunda etapa, a palha foi submetida a um pré-tratamento realizado conforme um planejamento experimental  $2^2$ , cujas variáveis estudadas foram a concentração de NaOH (1 – 4%, m/v) e tempo (10 – 30 min). Todos os ensaios de pré-tratamento foram realizados em autoclave a 121 °C, mantendo uma carga de sólidos de 10% (m/v). A eficiência dos pré-tratamentos foi verificada prioritariamente pela determinação da solubilização de componentes macromoleculares e pela liberação de açúcares redutores na etapa subsequente de hidrólise enzimática. Na terceira etapa, as frações sólidas de palha obtidas em cada pré-tratamento foram submetidas à hidrólise enzimática, em duplicata, a 50 °C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio), sob agitação constante de 150 rpm em shaker agitador, utilizando-se uma enzima do Complexo Celulase (Novozymes) aplicando-se uma carga enzimática de 15 FPU/g<sub>palha</sub>, durante 72 horas. Os pré-tratamentos com NaOH 4% (m/v), durante 10 e 30 minutos, apresentaram a maior solubilização de componentes macromoleculares, sendo de 55,06 e 56,54%, respectivamente. Em relação à liberação de açúcares redutores, após a etapa de hidrólise enzimática, estes variaram de 7,19 a 19,33 g/L, sendo as maiores concentrações de 15, 61 e 19,33 g/L, para os tempos de pré-tratamento de 10 e 30 minutos, respectivamente é concentração de NaOH 4% (m/v), que se referem às condições mais severas aplicadas no presente estudo. Os resultados foram analisados estatisticamente através do software Statistica 10.0. Os modelos codificados para a solubilização dos componentes macromoleculares ( $S_{cm}$ ) a açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática (AR<sub>HE</sub>), foram significativos a 95% de confiança. Evidenciando que, o pré-tratamento alcalino e hidrolise enzimática, mostram-se alternativas elencáveis para geração de etanol através da palha de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** palha de cana-de-açúcar; pré-tratamento; hidróxido de sódio; hidólise enzimática.

## ABSTRACT

The reasons for the interest in biofuels vary among the different countries due its environmental, social and economic benefits, being its use gradually emphasized nowadays. Brazil is one of the countries with the greatest technological potential for the production of biofuels. Currently, ethanol has a high commercial demand, but the country has been facing a growing deficit in the supply of this fuel. In order to fix the problem of the demand on the supply of Brazilian ethanol in the market, researches on the use of lignocellulosic biomass appears as an alternative for the second ethanol generation. The difference of the conventional process is only the separation of the lignocellulosic biomass fractions (lignin, hemicellulose and cellulose) followed by additional steps as pretreatment and hydrolysis. Lignocellulosic residues, such as sugarcane straw, can be used to produce second generation ethanol. The main goal of this work was the study of the pretreatment of sugarcane straw with sodium hydroxide, in different concentrations and different application times, in order to find the best conditions regarding the solubilization of the macromolecular components that may favor the access of the enzymes to the cellulose, in the stage of enzymatic hydrolysis. The work was carried out in three main steps. Firstly, the straw was sieved, washed and dried in order to obtain a homogeneous sample of 20 mesh. In the second stage, the straw was subjected to a pretreatment according to an experimental planning, named 22, whose main variables studied were NaOH concentration (1 - 4%, w/v) and the time of application (10-30 min). All pretreatment tests were carried in autoclave at 121 ° C, keeping a solid feed in 10% (w/v). The efficiency of the pretreatments was verified first of all, by the determination of the solubilization of the macromolecular components and followed by the release of the reducing sugars in the enzymatic hydrolysis step. In the third part of this work, the solid straw fractions, obtained in each pretreatment, were submitted to enzymatic hydrolysis, in duplicate, at 50 °C, and pH 4.8 (buffer solution of sodium citrate), under constant stirring of 150 rpm, applying then a load of 15 FPU/gstraw of an enzyme from the Cellulase Complex (Novozymes), during 72 hours. The pretreatment with NaOH 4% (w/v), during 10 and 30 minutes, presented the highest solubilization of macromolecular components, 55.06 and 56.54%, respectively. Regarding the release of reducing sugars, after the step of enzymatic hydrolysis, values were obtained from 7.19 to 19.33 g/L, among the highest concentrations of 15, 61 and 19.33 g/L, and application times of 10 and 30 minutes, respectively, under 4% NaOH concentration (w/v). Those conditions were the most severe ones applied in this study. The results were statistically analyzed using the software Statistica 10.0. The coded models for the solubilization of the macromolecular components (Scm) to the reducing sugars released in the enzymatic hydrolysis (ARHE) were significant, presenting 95% confidence. Therefore, there is evidence that alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis are alternatives to ethanol production from sugarcane straw.

**Keywords:** sugar cane straw; pre-treatment; sodium hydroxide; enzymatic hydrolysis.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Produção de etanol hidratado e anidro, importação e exportação de etanol respectivamente no Brasil segundo a ANP.....	16
Figura 2 - Etapas para produção do bioetanol de segunda geração.....	17
Figura 3 - Estrutura lignocelulósica .....	19
Figura 4 – Representação esquemática da lignina.....	21
Figura 5 - Ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico.....	25
Figura 6 - Palha limpa (a), palha preparada (b) e amostras de palha prontas para o pré-tratamento alcalino (c).....	26
Figura 7 - Curva de calibração para determinação de açúcares redutores.....	29
Figura 8 - Curva de calibração para determinação da atividade enzimática.....	31
Figura 9 - Amostras de palha em duplicata antes (a) e depois (b) da hidrólise respectivamente.....	34
Figura 10 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para a solubilização de componentes macromoleculares respectivamente.....	40
Figura 11- Superfícies de resposta e curvas de contorno representando AR dos hidrolisados enzimáticos da palha respectivamente.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração.....	18
Tabela 2 – Produção de cana-de-açúcar no Brasil por ano-safra segundo o MAPA.....	22
Tabela 3 – Níveis das variáveis independentes para o processo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar.....	27
Tabela 4 – Matriz de planejamento fatorial $2^2$ .....	28
Tabela 5 – Resultados obtidos após o pré-tratamento.....	33
Tabela 6 – Açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática.....	35
Tabela 7 – Estimativas dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento (AR <sub>PT ALCALINO</sub> ).....	36
Tabela 8 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento.....	37
Tabela 9 – Avaliação ANOVA para açúcares redutores no hidrolisado alcalino (AR <sub>PT ALCALINO</sub> ).....	37
Tabela 10 – Estimativas dos efeitos para a solubilização de componentes macromoleculares na etapa de pré-tratamento.....	38
Tabela 11 – Coeficientes de regressão para a solubilização dos componentes macromoleculares (S <sub>cm</sub> ) após a etapa de pré-tratamento.....	39
Tabela 12 – Avaliação ANOVA para a solubilização de componentes macromoleculares....	39
Tabela 13 – Estimativas dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática (AR <sub>HE</sub> ).....	41
Tabela 14 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática.....	41
Tabela 15 – Avaliação ANOVA para os açúcares redutores liberados na etapa de hidrólise enzimática.....	42

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivo .....	14
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	14
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Eanol Combustível .....	15
2.1.1 <i>Eanol de 1<sup>a</sup> Geração</i> .....	16
2.1.2 <i>Eanol de 2<sup>a</sup> Geração</i> .....	16
2.2 Biomassa lignocelulósica .....	17
2.2.1 <i>Composição da Biomassa Lignocelulósica</i> .....	19
2.2.2 <i>Palha de cana-de-açúcar</i> .....	21
2.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	22
2.4.1. <i>Pré-tratamento químico alcalino</i> .....	23
2.5 Hidrólise Enzimática .....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Palha .....	25
3.2 Preparo da Palha .....	25
3.3 Planejamento Experimental.....	26
3.3.1 <i>Pré-tratamento</i> .....	28
3.4 Hidrólise enzimática da palha pré-tratada .....	28
3.5 Metodologia Analítica .....	29
3.5.1 <i>Análise de açúcares redutores</i> .....	29
3.5.2 <i>Cálculo de rendimento e solubilização</i> .....	30
3.5.3 <i>Determinação da atividade enzimática</i> .....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Pré-tratamento com aplicação do planejamento experimental .....	33

4.2 Hidrólise Enzimática .....	34
4.3 Análise estatística do planejamento experimental.....	36
4.3.1 Açúcares redutores no hidrolisado alcalino .....	36
4.3.2 Solubilização de componentes macromoleculares.....	38
4.3.3 Açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática ( $AR_{HE}$ ) .....	40
5 CONCLUSÃO .....	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

A energia é fundamental para o desenvolvimento, estando conectada de muitas formas aos desafios que cercam a humanidade. Modificada através dos séculos, a matriz energética no século XX foi dominada por combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), no mesmo período, o desmatamento e a degradação do solo eram associados a utilização da biomassa, por isso, ficou conhecido como o combustível dos povos mais pobres e subdesenvolvidos (GOLDEMBERG, 2009). Segundo Leal e Leite (2007), no final do século XX, inicia-se grandes preocupações com a poluição atmosférica, principalmente com a queima de combustíveis fósseis, responsáveis pelo aquecimento global através da elevação dos níveis de dióxido de carbono na atmosfera (o principal gás de efeito estufa). Os impactos do fenômeno são apresentados através de eventos como a Convenção do Clima no Rio de Janeiro, em 1992, e posteriormente com a assinatura do Protocolo de Quioto, em 1997, marcando oficialmente a responsabilidade das nações signatárias do quadro sobre as mudanças climáticas.

A utilização moderna da biomassa como combustível está em expansão. Fatores como: utilização de veículos tipo flex e menor geração de gases poluentes em relação as ofertas globais de petróleo, atrai novos consumidores anualmente (GOLDEMBERG, 2009).

O etanol combustível está presente no Brasil desde o ano de 1920, porém, foi durante a crise do petróleo (1974-1986), que o país investiu fortemente neste seguimento, estabelecendo o etanol como o maior sucesso comercial dos combustíveis de biomassa (LEITE; LEAL, 2007). Atualmente, a cana-de-açúcar utilizada para produção de etanol, é produzida com produtividade média de 80 t/ha, através da utilização de tecnologias como a mecanização imperfeita, fertilizantes e defensivos agrícolas, e demandando a renovação frequente das lavouras possibilitando o balanço energético positivo na geração do etanol (PEREIRA; ROITMAN; GRASSI, 2018).

Segundo Milanez et al. (2012), o setor sucroalcooleiro brasileiro passa por um crescente déficit na oferta de etanol, gerando uma sobreposição da demanda sobre a oferta nas bombas dos postos de combustíveis. Kohlhepp (2010) sugere que a ampliação da produção é uma das formas de sanar o déficit existente. Neste contexto, é necessária a expansão de monoculturas de cana-de-açúcar, prática que, segundo organizações não governamentais de grupos de ambientalistas e o Movimento dos Sem-Terra (MST), gera graves consequências como a destruição da Floresta tropical, gasto excessivo de água, escassez de alimentos, trabalho escravo, etc. Assim sendo, é um desafio para os pesquisadores manter a posição competitiva do etanol brasileiro não estimulando a expansão da esfera agrobusiness no

mercado fundiário nacional (ORTIZ, 2007). Pesquisas no campo de aproveitamento da biomassa lignocelulósica desenvolveram uma segunda forma de geração de etanol. O processo se diferencia apenas na separação das frações da biomassa lignocelulósica (lignina, hemicelulose e celulose) através de etapas adicionais denominadas de pré-tratamento e hidrólise (NASCIMENTO, 2011). Resíduos sólidos como o bagaço e a palha da cana podem ser utilizados para produção de etanol de segunda geração, pois possuem açúcares da cana na forma de celulose (PEREIRA; ROITMAN; GRASSI, 2018).

A palha de cana-de-açúcar é um resíduo que vem, desde 1990, gerando inúmeros estudos e análises detalhadas das massivas quantidades disponíveis no campo, dos impactos agrícolas e das possíveis rotas de recolhimento. Possuindo um potencial energético e econômico para incrementar o volume de etanol produzido, mantendo a área de plantio. Das usinas brasileiras, 61% não utilizam a palha produzida pela colheita mecanizada. As problemáticas existentes de implementação deste resíduo como produto se iniciam no âmbito estrutural até o processual. Dos desafios estruturais, existem necessidades de especificação de volumes de palha no campo para minimizar impactos e manter a sustentabilidade no ciclo da planta; logística de transporte sustentando níveis adequados de impurezas presentes na palha; modificações próprias para resolução destas problemáticas. A atuação de políticas públicas de incentivo para proporcionar a utilização da palha, podem dar o devido impulso para estas tecnologias, estabelecendo de fato uma opção para os biocombustíveis (ÚNICA, 2016).

Uma das principais campanhas de investimentos e incentivo para o setor industrial dos biocombustíveis, é a importante criação do RenovaBio, que busca consolidar o protagonismo do Brasil no combate ao aquecimento global, pretendendo substituir, até 2030, até 55% da gasolina por etanol. Proposto pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), o projeto tem o compromisso de gerar melhorias sociais, estimando proporcionar 1 milhão de novos empregos, além de também, minimizar importações de combustíveis (JARDIM, 2017). A adesão de práticas de utilização de resíduos como a palha para produção de novas vias energéticas, ainda apresentam elevados custos, o que intimida investidores, por não terem ainda a certeza de um retorno esperado. Contudo, a partir de mecanismos de incentivo, como o Renovabio, pode-se viabilizar as contribuições brasileiras para a redução dos efeitos das mudanças climáticas. Através do mercado do carbono, o Brasil tem a oportunidade de transformar emissões evitadas em títulos, o CBio, sendo negociado na bolsa de valores como ativos financeiros, viabilizando a produção de etanol de palha de cana (PEREIRA; ROITMAN; GRASSI, 2018).

## 1.1 Objetivo

### 1.1.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral do trabalho foi a avaliação das etapas de pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática aplicados à palha de cana-de-açúcar.

### 1.1.2 *Objetivos Específicos*

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de NaOH com diferentes tempos de exposição sobre o resíduo de palha de cana-de-açúcar, seguindo um planejamento fatorial  $2^2$  com repetições no ponto central.
- Avaliar o desempenho da hidrólise enzimática das amostras de palha pré-tratadas em diferentes condições, utilizando o complexo Celulase (NS – 22086), sobre condições controladas de temperatura, pH e agitação.
- Determinar os rendimentos em base seca, solubilização de componentes macromoleculares, e a concentração de açúcares obtidos na etapa de pré-tratamento alcalina e na hidrólise enzimática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

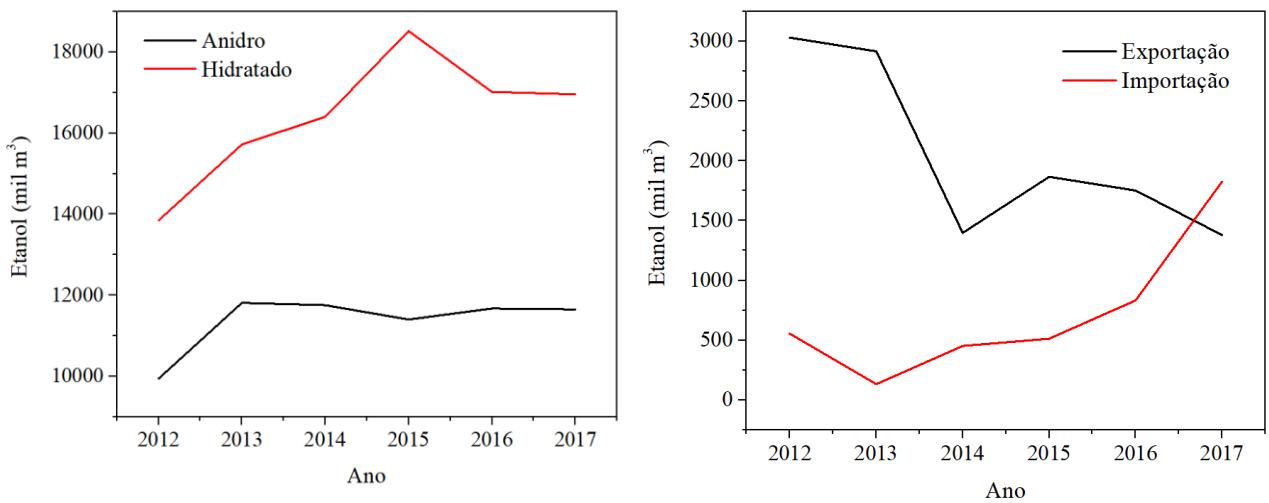
### 2.1 Etanol Combustível

O etanol combustível ( $C_2H_5OH$ ) diferentemente da gasolina, é uma substância pura, formada por um único tipo de molécula, que potencialmente proporciona uma equivalente matriz de energia. Distinção que segundo Carvalho (2011), quando levada à áreas de abrangência da operação do transporte que utilizam como matriz energética somente a queima de combustíveis fósseis, demonstra a superior emissão de poluentes nocivos à saúde e ao ambiente urbano como monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de nitrogênio e os óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>), além da geração de materiais particulados (MP) quando comparado a utilização do etanol.

O etanol combustível é firmado como potencial matriz energética no setor de transporte brasileiro a partir do ano 1975, período marcado pelo início do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), através de um decreto presidencial. O programa visava o atendimento das necessidades da política de combustíveis automotivos estabilizando interações de mercado interno e externo. Os financiamentos do Estado são reduzidos drasticamente em 1989, deixando como legado uma base para o mercado do etanol combustível no Brasil, que junto ao aspecto sustentável consolidou o etanol combustível no mercado automotivo brasileiro e o Brasil como o maior produtor de etanol mundial a partir da cana-de-açúcar (ÚNICA, 2007).

A posição do Brasil de país com maior produção de etanol combustível é ultrapassada pelos Estados Unidos (EUA), e segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2017) o Brasil, no ano de 2017, aumentou as importações em 119,4% em relação ao ano anterior, superando a exportação do mesmo produto com cerca de 99% das importações de etanol de milho provindas dos EUA. A Figura 1 apresenta os perfis de produção, importação e exportação de etanol pelo Brasil.

Figura 1 – Produção de etanol hidratado e anidro, importação e exportação de etanol respectivamente no Brasil segundo a ANP



Fonte: ANP, 2017.

### 2.1.1 *Etanol de 1<sup>a</sup> Geração*

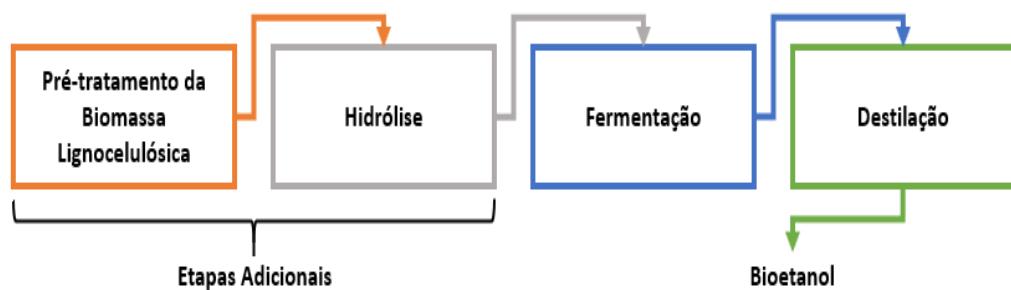
O etanol pode ser gerado através da via fermentativa, com a exploração de matérias-primas ricas em sacarose, denominando-se etanol de primeira geração. O processo tem início com o preparo da matéria-prima para posterior extração da solução açucarada rica em sacarose, que será fermentada por leveduras e, sequencialmente destilada para obtenção do etanol combustível. As culturas utilizadas como matérias primas variam de acordo com sua disponibilidade, como é o caso da União Europeia, que utiliza o trigo e a beterraba sacarina, os Estados Unidos, que utilizam o milho, o Canadá e a China, que fazem uso do milho e do trigo e o Brasil, com a cana-de-açúcar. (LIMA, 2017).

### 2.1.2 *Etanol de 2<sup>a</sup> Geração*

O etanol de segunda geração consiste na transformação da biomassa lignocelulósica em uma solução fermentescível para posterior formação convencional do etanol. Para obtenção deste objetivo são necessárias etapas preliminares (Figura 2), devido às propriedades inerentes da lignocelulose de inibição fermentativa (NASCIMENTO, 2011). Segundo Tomé (2014), as propriedades inibidoras responsáveis por esta característica é a complexa matriz lignocelulósica, que pode ser quebrada através de pré-tratamentos em conjunto com uma

etapa de hidrólise para potencializar a etapa fermentativa, através da liberação de açúcares fermentescíveis, obtendo o etanol de segunda geração propriamente dito.

Figura 2 – Etapas para produção do bioetanol de segunda geração



Fonte: Autor, 2018.

## 2.2 Biomassa lignocelulósica

Segundo Sousa (2014), a biomassa pode ser classificada como material renovável de origem animal ou vegetal, que possui uma disponibilidade potencial de produção periódica, sem restrições de períodos milenares de produção, diferentemente dos combustíveis fósseis. A biomassa lignocelulósica refere-se a todos os resíduos originários de uma fonte vegetal, amplamente conhecidos através de agroindústrias. Atualmente, são massivamente utilizados pela agroindústria como subprodutos, sendo utilizados como combustíveis para obtenção de calor, como fertilizantes para o solo, entre outras utilidades, minimizando os impactos ambientais e agregando valor a determinadas culturas regionais. Podem-se visualizar alguns exemplos na Tabela 1.

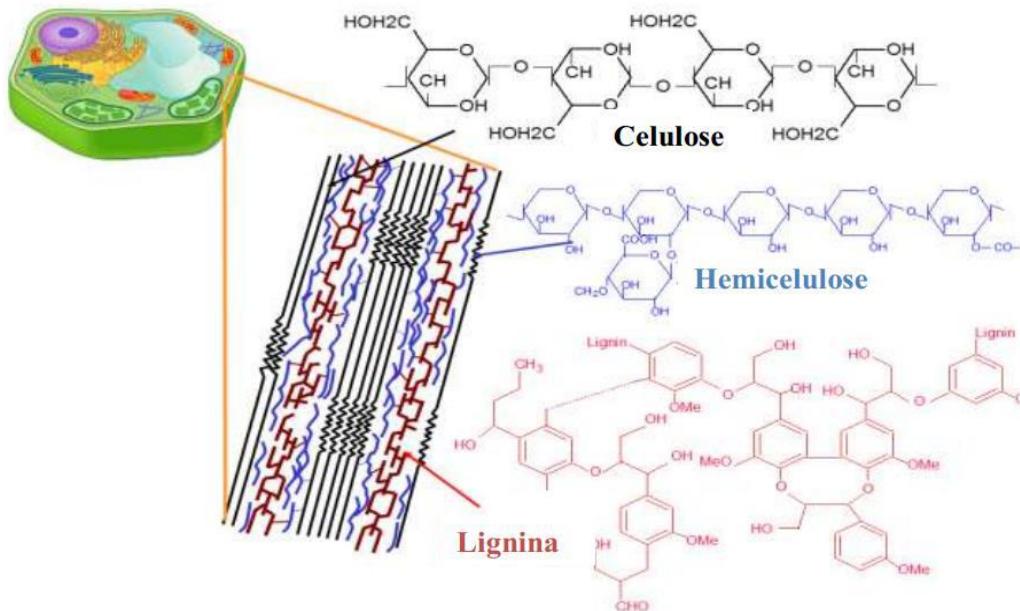
Tabela 1 – Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol de segunda geração

<b>Biomassa</b>	<b>% Celulose</b>	<b>% Hemicelulose</b>	<b>% Lignina</b>
<b>Lignocelulósica</b>			
<i>Palha de cana</i>	40-44	30-32	22-25
<i>Bagaço de cana</i>	32-48	19-24	23-32
<i>Madeira dura</i>	43-47	25-35	16-24
<i>Madeira mole</i>	40-44	25-29	25-31
<i>Talo de milho</i>	35	25	35
<i>Espiga de milho</i>	45	35	15
<i>Algodão</i>	95	2	0,3
<i>Palha de trigo</i>	30	50	15
<i>Sisal</i>	73,1	14,2	11
<i>Palha de arroz</i>	43,3	26,4	16,3
<i>Forragem de milho</i>	38-40	28	7-21
<i>Fibra de coco</i>	36-43	0,15-0,25	41-45
<i>Fibra de bananeira</i>	60-65	6-8	5-10
<i>Palha de cevada</i>	31-45	27-38	14-19

Fonte: Santos et al. (2012).

Atualmente, os materiais lignocelulósicos não alimentares são vistos como um potencial insumo para produção de etanol combustível. Suas estruturas são compostas basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, como descrito na Figura 3. Contém quantidades significativas de açúcares, o que com o pré-tratamento adequado transformaria em uma nova rota produtiva para um mesmo quantitativo de área plantada (BONOMI; MAIORANO; RODRIGUES, 2008).

Figura 3 – Estrutura lignocelulósica



Fonte: Sousa, 2014.

## 2.2.1 Composição da Biomassa Lignocelulósica

### 2.2.1.1 Celulose

A celulose é o homopolissacarídeo mais abundante na formação estrutural de plantas, sendo normalmente relacionada à hemicelulose e à lignina, podendo também ser encontrada em sua forma pura no algodão. É formada por um complexo de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades de glicose em cadeia linear, formando cadeias organizadas por replicações através de ligações de hidrogênio entre dois monômeros de glicose. Estas ligações podem construir estruturas organizadas denominadas de cristalinas, ou desorganizadas, denominadas amorfas, sendo estas mais susceptíveis a ação de reagentes (PRATTO, 2015).

### 2.2.1.2 Hemicelulose

Segundo Pinto (2010), as hemiceluloses são polissacarídeos com natureza química distinta entre espécies de plantas, com menor peso molecular que a celulose e de grande interação estrutural com a mesma, atuando como material cimentante. Estes polímeros são formados por pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e

ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glucurônico e ácidos galacturônicos), podendo formar cadeias ramificadas.

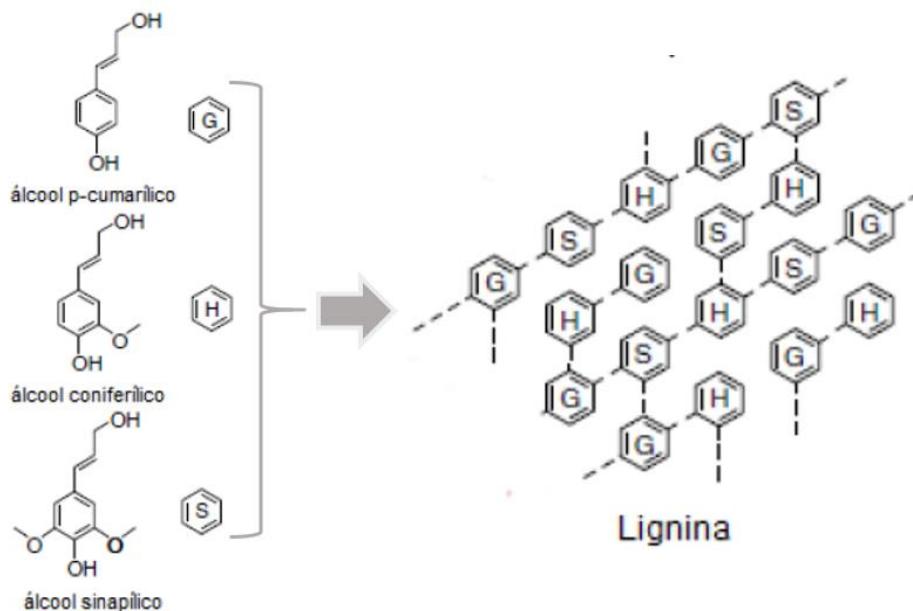
Em plantas perenes como a cana-de-açúcar, a mais abundante fração da hemicelulose é a xilana, estando presente nos resíduos agrícolas destas classes vegetais citadas. As xilanias formam ligações glicosídicas de moléculas de xilose contendo ramificações de pentoses e hexoses, em sua maioria, substituída por outros monômeros de açúcares, formando uma associação íntima entre a celulose e a lignina (XAVIER, 2016).

### 2.2.1.3 Lignina

A lignina é um heteropolímero com alta resistência à degradação derivado de grupos fenilpropanóides, constituídas de unidades básicas álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que formam estruturas complexas com uma grande variedade de grupos funcionais com regiões amorfas (LORENCINI, 2013).

Segundo Fengel e Wegener (1989), a variação das proporções de unidades básicas constituintes da lignina proporcionam diferentes concentrações da mesma na biomassa lignocelulósica, conferindo diferentes características à planta. Quando há uma maior polimerização de álcool coniferílico, há grande formação de madeiras moles. Para o copolímero de álcoois coniferílico e sinapílico, comumente geram-se madeiras duras, e quando há predominância de álcoois p-cumarílico, forma-se gramíneas, como a cana-de-açúcar. A Figura 4 ilustra uma estrutura de lignina.

Figura 4 – Representação esquemática da lignina



Fonte: Pratto, 2015.

Componente considerado o mais importante não-carboidratado da biomassa lignocelulósica, a lignina, fornece características hidrofóbicas, previne o ataque de micro-organismos celulolíticos à parede celular da planta e proporciona rigidez a mesma.

A lignina está covalentemente ligada à hemicelulose, através de ligações éster com a xilana, formando uma matriz complexa envolvida das microfibrilas de celulose. O teor de lignina em base seca, geralmente varia entre 20 e 40% do peso nas madeiras duras e moles, e de 10 a 40% para espécies gramíneas (PINTO, 2010).

#### 2.2.2 Palha de cana-de-açúcar

A massiva produção no setor sucroenergético em paralelo ao seu aproveitamento integral de insumos agrícolas e resíduos gerados, são cada vez mais explorados através de pesquisas de inovação tecnológica (ÚNICA, 2007). A palha é um resíduo, assim como o bagaço, dentro do processo de industrialização da cana-de-açúcar em produto acabado, representando cerca de 14% de cada resíduo, por tonelada de cana adquirida (SANTOS et al., 2012).

Como qualquer outro resíduo industrial, a palha varia suas características de acordo com a procedência da matéria-prima. Um estudo feito por Santos et al. (2012), diz que para

cada 1 tonelada de palha de cana são gerados cerca de 287 litros teóricos de etanol. Grande parte da palha é descartada nos campos através da colheita da cana crua (não queimada) pelo uso de máquinas, ou eliminada através da queima dos canaviais, prática que vem sendo abolida através do Decreto Federal n. 2.661/98 que estabelece o fim gradativo da prática. Ambas as práticas objetivam a obtenção do colmo da cana de açúcar.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017), a produção nacional de cana-de-açúcar no Brasil na safra 2016/2017 foi de 657,2 milhões de toneladas (Tabela 2), o que, levando em consideração o estudo apresentado equivaleria a 92 milhões de toneladas de palha e consequentemente 26,4 milhões m<sup>3</sup> teóricos de etanol de 2<sup>a</sup> geração.

Tabela 2 - Produção de cana-de-açúcar no Brasil por ano-safra segundo o MAPA

<b>ANO SAFRA 2016/2017</b>	
<b>Região/UF</b>	<b>Produção (mil t)</b>
Centro-Sul	612.467,2
Norte/Nordeste	44.776,9
Brasil	657.244,1

Fonte: MAPA, 2017.

## 2.4 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento é uma classe de tratamentos responsáveis por formar açúcares e/ou facilitar a subsequente hidrólise enzimática evitando degradação ou perda de carboidratos, não gerando inibidores para as etapas subsequentes de formação do etanol. Sua importância é visível pelas características presentes em resíduos lignocelulósicos. Os constituintes presentes na malha celular (lignina e hemicelulose) que representam uma barreira para a etapa de fermentação sendo os principais alvos do pré-tratamento. Além disso, o pré-tratamento é capaz de provocar alterações nas estruturas cristalinas e amorfas da celulose. A etapa preliminar, possibilita a redução de custos no processo de hidrólise enzimática, aumentando a porosidade da matéria-prima, proporcionando menor quantitativo de enzimas por açúcares fermentescíveis liberados (PINTO, 2010). Não existe um pré-tratamento universal, e sim diferentes combinações que, de acordo com as especificações requeridas e seu potencial valor

agregado de produção, tornará efetivamente possível a escolha do pré-tratamento. Atualmente, existem numerosos tipos de pré-tratamentos, podendo ser classificados em quatro grupos: pré-tratamento físico (moagem), físico-químico (explosão a vapor), químico (ácidos, alcalinos, agentes oxidantes) ou biológicos e/ou suas ações combinações (NASCIMENTO, 2011).

Segundo Tomé (2014), muitos tipos de pré-tratamento estão em fase de pesquisa, porém existem alguns processos bem conhecidos como os pré-tratamentos: explosão com vapor; processo hidrotérmico catalisado ou não; ácido; e alcalino.

#### *2.4.1. Pré-tratamento químico alcalino*

O pré-tratamento alcalino atua promovendo uma intensa deslignificação da biomassa através do inchaço das estruturas fibrosas onde a água ocupa os espaços formados quebrando as ligações de hidrogênio entre hemicelulose e a lignina-carboidratos, removendo todos os grupos acetil e reduzindo o quantitativo de lignina para 10% quando efetivo. Os principais reagentes utilizados pela via alcalina são o hidróxido de sódio, amônia, etileno diamina e hidróxido de cálcio, onde suas concentrações variam de acordo com as características da matéria-prima utilizada (NASCIMENTO, 2011).

### **2.5 Hidrólise Enzimática**

A produção do etanol de segunda geração requer a hidrólise dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) presentes na biomassa lignocelulósica, esse processo pode ser efetuado através do emprego dos métodos de hidrólise ácida ou enzimática para que haja liberação de açúcares fermentescíveis. Ambos os métodos possuem o mesmo objetivo, porém se diferem principalmente no catalisador utilizado no processo. A hidrólise ácida utiliza ácidos minerais concentrados (concentração maior do que 5%) ou diluídos (concentração menor do que 5%). É importante ressaltar que, pelo fato do ácido mineral ser um catalisador não específico, é essencial o controle da reação para não levar a reações paralelas indesejáveis. Na hidrólise enzimática, enzimas celulolíticas atuam sinergicamente em diferentes sítios da cadeia celulósica, sendo catalisadores de elevada especificidade onde as reações secundárias não ocorrem, o que se torna uma grande vantagem quando comparada à hidrólise ácida. Em outras palavras, a enzima tem um superior controle das reações,

promovendo maior eficiência, porém com tempo de reação lento e com uma sensibilidade à ação dos inibidores de reação (LUCARINI et al., 2017).

O processo de degradação enzimática da celulose consiste na atuação coletiva da complexa mistura de celulases de especificidade para diferentes substratos celulósicos principalmente em ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, que solubilizam a celulose. De acordo com a especificidade de atuação as celulases são divididas em três tipos principais de enzimas: endoglicanases; exoglicanases;  $\beta$ -glicosidases. (SILVA, 2016)

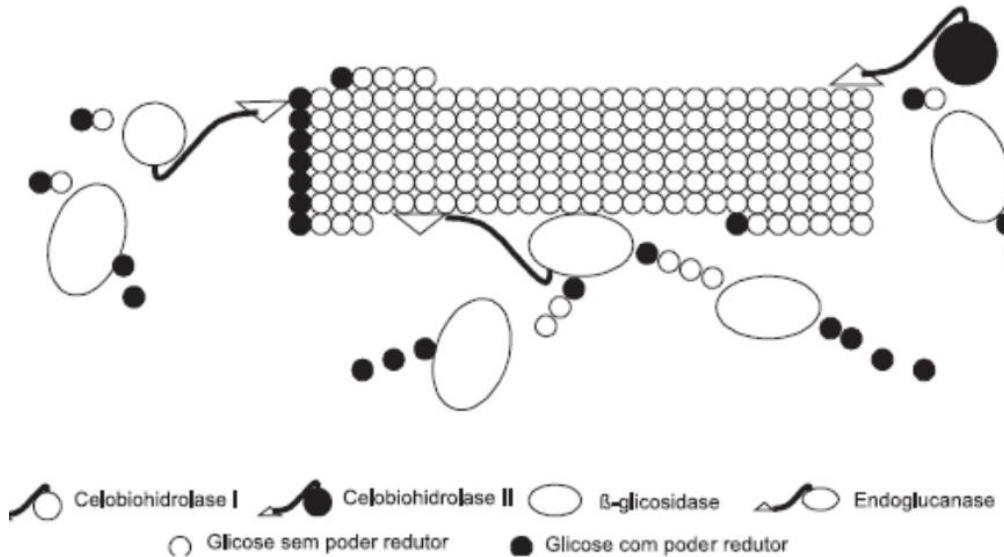
O grupo endoglicanase é responsável por iniciar a hidrólise, elas clivam ligações internas da fibra celulósica, agindo de forma aleatória em regiões amorfas da celulose e seus derivados liberando polissacarídeos de diversos graus de polarização (LORENCINI, 2013). Segundo Castro e Pereira Junior (2010), a ação destas criam pontos terminais, redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) ou não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose adjacente).

Segundo Silva (2016), as exoglicanases é uma classe de potencial hidrolisador a partir das extremidades de polímeros. Dentro dessa classe estão as celobiohidrolases (CBH) que são exoglicanases derivadas de fungos, que estão entre as enzimas de maior eficiência como agentes celulíticos, possuindo como nome sistemático 1,4- $\beta$ -D-glicana celobiohidrolase. Elas se dividem em: celobiohidrolases do tipo I, que tem a função de hidrolisar terminais redutores e celobiohidrolases do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. O produto da hidrólise dessas enzimas é a celobiose. As CBH também provocam um fenômeno conhecido como amorfogênese que envolve a ruptura física do substrato, aumentando assim as regiões intersticiais. Também estão incluídos, na classe exoglicanases, as glicano-hidrolase (GH) que possuem como nome sistemático 1,4- $\beta$ -D-glicana glicobiohidrolase. A hidrólise promovida por esse tipo de enzima age na liberação de glicose diretamente do polímero. Assim como as celobiohidrolases, as exoglicohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose ou glicose).

As  $\beta$ -glicosidases são geradas através de micro-organismos, plantas ou animais. Esse grupo extenso de enzimas de complexo celulítico  $\beta$ -glicosidases (BG) trabalham hidrolisando a celobiose e os oligossacarídeos convertendo-os em glicose. Esse grupo tem sido proposto recentemente pela comunidade científica como degradante de  $\beta$ -glucanos para produção de glicose. As  $\beta$ -glicosidases sofrem inibição pela celobiose e também pelo produto de hidrólise gerado. Por fim é importante ditar que o rendimento disponibilizado pelo complexo enzimático celulolítico é superior aos rendimentos individuais das enzimas. E este efeito é denominado como sinergia (Figura 5). Isso ocorre, por exemplo, quando a endoglicanase, atua

nas regiões amorfas da fibra e disponibiliza terminais redutores e não redutores para a atuação da CBH (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

Figura 5 – Ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico



Fonte: Castro; Pereira Jr., 2010.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas desenvolvidas neste trabalho foram realizadas nos laboratórios de Tecnologia Sucroalcooleira, Operações Unitárias e Processos, e de Físico-química do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da UFPB.

#### 3.1 Palha

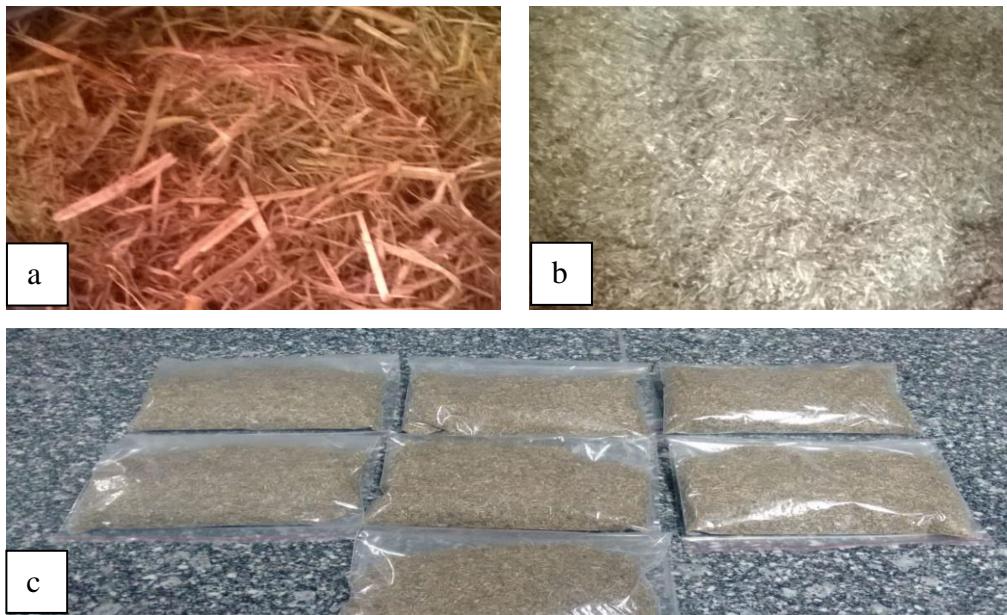
A palha de cana-de-açúcar utilizada no presente trabalho foi cedida pela Usina Japungu (Santa Rita – PB). Foi transportada, para o Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da UFPB, em sacos tipo nylon, sendo em seguida, seca sob a luz solar, para redução de umidade.

#### 3.2 Preparo da Palha

A palha, Figura 6, foi peneirada em uma peneira, do tipo arupemba, e lavada com água corrente para remoção de impurezas minerais e, por fim, seca em uma estufa durante 24h a 60 C°. Após seca, a palha foi moída em um moinho de facas (SL – 31, da SOLAB), com peneira de mesh 10. A palha moída passou em um conjunto de peneiras em mesa vibratória

em pequenas quantidades, em peneira de mesh 20, para obtenção de uma granulometria homogênea, com menos de 5% da palha moída ficando retida na peneira 20 mesh, sendo esta utilizada nos experimentos.

Figura 6 – Palha limpa (a), palha preparada (b) e amostras de palha prontas para o pré-tratamento alcalino (c)



Fonte: Autor, 2018.

### 3.3 Planejamento Experimental

O estudo do pré-tratamento teve por objetivo determinar as condições que favorecessem um melhor acesso das enzimas do complexo celulase ao substrato (palha de cana-de-açúcar), de forma a se ter uma maior conversão de celulose em açúcares redutores. Em tal estudo, utilizou-se a técnica do planejamento experimental linear  $2^2$ , com três pontos centrais, totalizando sete experimentos. Os fatores independentes foram o tempo e a concentração de hidróxido de sódio. Como fatores dependentes ou respostas, foram escolhidos os açúcares redutores liberados no hidrolisado alcalino após a etapa de pré-tratamento (denominado  $AR_{PT}$  ALCALINO), solubilização dos componentes macromoleculares ( $S_{cm}$ ) e, açúcares redutores provenientes da hidrólise enzimática ( $AR_{HE}$ ).

Os níveis e a planilha experimental estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Níveis das variáveis independentes para o processo de pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar

Variáveis Independentes	Símbolo	Limites		
		-1	0	+1
Tempo (min)	X <sub>1</sub>	10	20	30
Concentração de NaOH (%), m/v)	X <sub>2</sub>	1	2,5	4

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 4 – Matriz de planejamento fatorial 2<sup>2</sup>

Experimento	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	Tempo (min)	[NaOH] <sup>*</sup>	Tempo (min)	[NaOH] <sup>*</sup>
01	-1	-1	10	1,0
02	+1	-1	30	1,0
03	-1	+1	10	4,0
04	+1	+1	30	4,0
05 (PC)	0	0	20	2,5
06 (PC)	0	0	20	2,5
07 (PC)	0	0	20	2,5

<sup>\*</sup> m/v; PC: ponto central

Fonte: Autor, 2018.

Nas análises dos resultados, foi utilizado um programa estatístico Statistica 10.0. As variáveis independentes e as respostas (em valores codificados) foram correlacionadas através de modelo linear, representado pela Equação 1, em que:  $y_i$  representa a variável de resposta;  $\beta_0$ ,  $\beta_j$ ,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes do modelo de regressão;  $X_i$  e  $X_j$  representam os níveis codificados das variáveis independentes.

$$y_i = \beta_0 + \sum \beta_j X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

A metodologia do planejamento fatorial e a análise de superfície de resposta permitem considerar simultaneamente vários fatores em diferentes níveis e as interações entre eles, reduzindo dessa forma, o número de experimentos.

### 3.3.1 Pré-tratamento

Amostras de 35 g de palha (base seca), na granulometria de 20 mesh, foram introduzidas em Erlenmeyers de 500 mL. Os pré-tratamentos foram realizados em autoclave a 121 °C, variando as condições tempo e concentração de hidróxido de sódio, definidas de acordo com o planejamento experimental (Tabela 3), mantendo uma relação sólido: líquido de 1:10, ou 10% (m/v). A autoclave foi fechada e iniciou-se o aumento da temperatura, sendo a contagem de tempo inicializada após a autoclave atingir 121 °C. Finalizada a reação, esperou-se a redução da temperatura para abertura da autoclave.

A palha de cana pré-tratada foi filtrada em um filtro de tecido sintético. A polpa obtida (fração sólida) foi lavada 5 vezes (600 mL por lavagem) com água aquecida a 70 °C para remoção da fração líquida rica em açúcar, obtendo uma neutralização do pH na quinta água de lavagem.

As frações sólidas obtidas foram separadas para a etapa posterior análises de solubilização e rendimento, após isto, foi efetuada a hidrólise enzimática. Para isto foram secas em estufa a 60 °C, durante 24 horas.

As frações líquidas foram submetidas à análise para quantificação de açúcares redutores.

### 3.4 Hidrólise enzimática da palha pré-tratada

As hidrólises enzimáticas das amostras de palha pré-tratadas, seguindo o planejamento experimental (Tabela 4 – item 3.3), foram realizadas em duplicata, utilizando um Complexo Celulase (NS – 22086) cedido pela Novozymes Latin America Ltda. Os ensaios de hidrólise foram realizados de acordo com metodologia utilizada por Vasconcelos (2012), em frascos Erlenmeyer de 250 mL nas seguintes condições: volume reacional de 100 mL, concentração de palha de 2,0% (m/v), 50 °C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), agitação de 150 rpm, em incubadora shaker (LUCA – 223, da LUCADEMA). A carga enzimática utilizada foi de 15 FPU/g<sub>palha</sub> e o tempo total de hidrólise de 72 horas. Ao final de 72 horas, as amostras foram submetidas a um banho em ebulição e banho de gelo, para inativação das enzimas. Em seguida, foram filtradas e submetidas à análise para determinação de açúcares redutores.

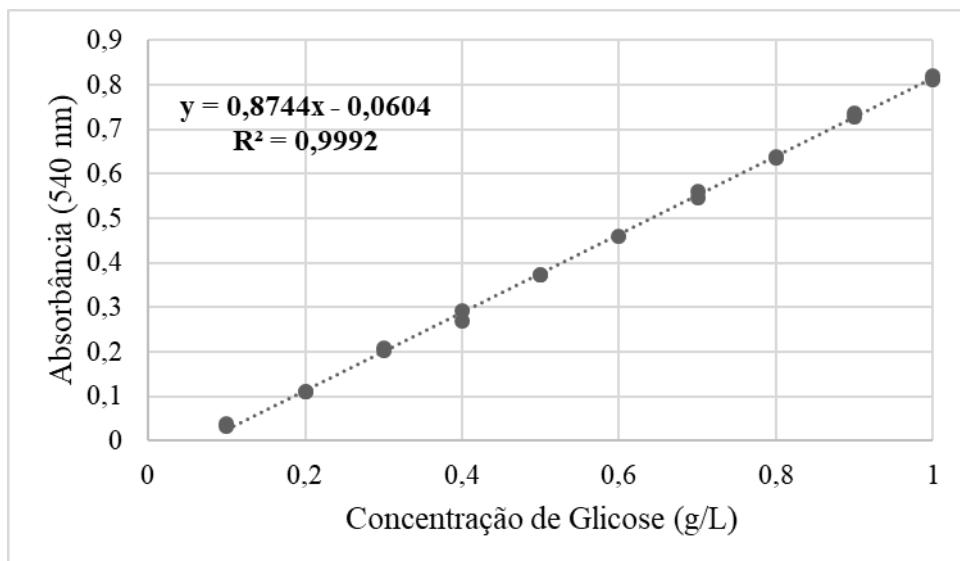
### 3.5 Metodologia Analítica

#### 3.5.1 Análise de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores (ARs) presentes no hidrolisado alcalino (após a etapa de pré-tratamento) e, no hidrolisado enzimático, se deu pela aplicação do método DNS (Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico) descrito por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013). Inicialmente, foi construída uma curva de calibração, em duplicata, a partir de uma solução padrão de glicose, da qual foram realizadas diluições de forma a se obter concentrações de glicose num intervalo de 0,1 a 1,0 g/L (Figura 7). Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL de cada diluição e 1 mL da solução de DNS. Em seguida, os tubos foram levados a aquecimento em banho termostático (Q218-9) a 100 °C, por 5 minutos. Ao final deste tempo, os tubos foram submetidos à resfriamento em banho de gelo, para interrupção da reação. À mistura reacional foram adicionados 8 mL de água destilada, completando um volume de 10 mL. Na sequência as amostras foram homogeneizadas e realizou-se a leitura de absorbância, em espectrofotômetro (Edutec-FFQ-9005) a 540 nm.

As amostras foram analisadas seguindo o mesmo procedimento empregado na construção da curva de calibração, sendo realizadas diluições quando necessário, de forma a se ter uma absorbância dentro do limite da curva construída.

Figura 7 – Curva de calibração para determinação de açúcares redutores



Fonte: Autor, 2018.

### 3.5.2 Cálculo de rendimento e solubilização

Foram determinados, por gravimetria, os rendimentos das frações sólidas obtidas no pré-tratamento, em relação ao peso seco da palha inicialmente submetida ao pré-tratamento, conforme a Equação 2:

$$Y = \frac{M_f}{M_i} \cdot 100 \quad (2)$$

onde:

$M_f$  = massa final de bagaço (base seca), após pré-tratamento (g);

$M_i$  = massa inicial de bagaço (base seca), antes do pré-tratamento (g).

Para o cálculo da solubilização dos componentes macromoleculares, a partir da fração sólida de palha, foi utilizada a Equação 3 (adaptada de Vasconcelos, 2012).

$$S_{cm} = 100 - Y \quad (3)$$

sendo:

$S_{cm}$  = solubilização dos componentes macromoleculares (% , m/m);

$Y$  = rendimento da fração sólida de bagaço (% , m/m).

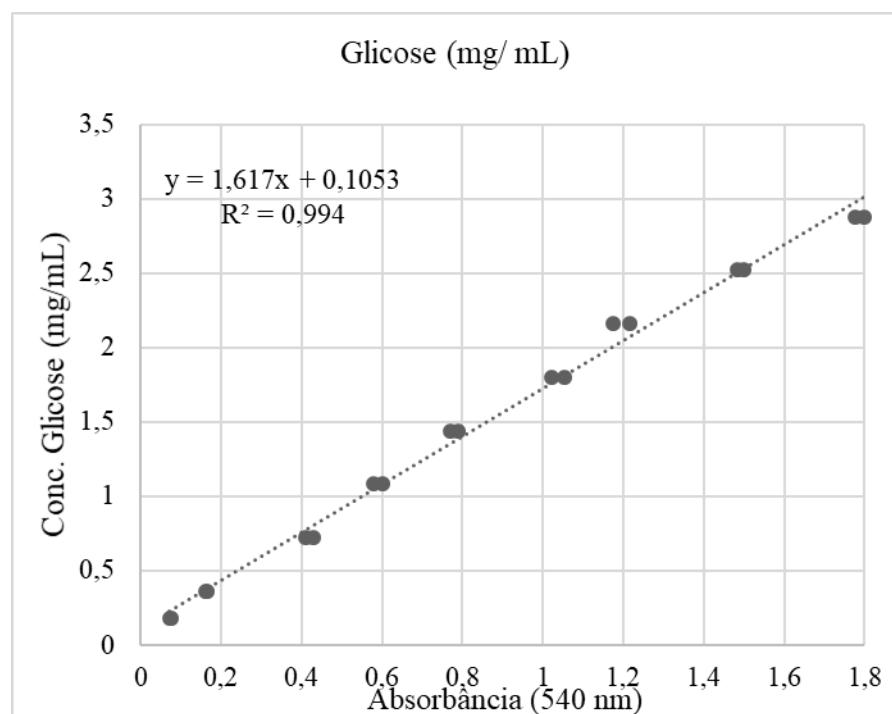
### 3.5.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática é expressa em Unidades Internacionais (U), onde 1 U corresponde à quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu$ mol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura) especificadas para cada caso. Quando o substrato é o papel de filtro, a Unidade Internacional é expressa em Unidade de Papel de Filtro (FPU).

Para a determinação da atividade enzimática em FPU (Unidade de Papel de Filtro) utilizou-se a metodologia de Ghose (1987), porém de forma adaptada.

A primeira etapa consistiu na preparação de uma curva de calibração (Figura 8), para quantificação de açúcares redutores, tomando por base a glicose.

Figura 8 – Curva de calibração para determinação da atividade enzimática



Fonte: Autor, 2018.

O substrato utilizado para a determinação da atividade enzimática consistiu em tiras de papel de filtro Whatman nº 1, medindo 1 cm x 6 cm (aproximadamente 50 mg). Os reagentes utilizados foram: tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e reagente DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico).

O ensaio enzimático foi realizado da seguinte maneira: tiras do papel de filtro, enroladas em formas de espiral, foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM. Os tubos foram submetidos à aquecimento em banho termostático (Q218-9) a 50 °C, por 1 minuto, antes de se adicionar a amostra (complexo celulase, diluída), de modo a se ter um equilíbrio da temperatura. Após 1 minuto, adicionou-se 0,5 mL da amostra de enzima, em cada tubo, agitando-se cuidadosamente.

Foi realizado em paralelo o ensaio para controle da enzima o qual teve como objetivo a determinação da concentração inicial de açúcares redutores presentes na amostra de enzima. Para isso, foram adicionados apenas 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL da amostra (enzima) foram adicionados em tubos de ensaio, sem a adição do substrato (papel de filtro). Um branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

Todas as reções ocorreram a 50 °C, em banho termostático, durante 60 minutos. Para interrupção das reações, foi retirado 0,5 mL da mistura contida em cada tubo de ensaio, sendo adicionado de imediato em outros tubos contendo 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). Todos os tubos foram submetidos a um banho em água a 100 °C, durante 5 minutos, e, em seguida, resfriados até a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas com 6,5 mL de água destilada, procedendo-se, então, à leitura da absorbância em espectrofotômetro (Edutec-FFQ-9005), a 540 nm. A determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático foi realizada através da utilização da curva padrão de glicose previamente preparada, utilizando a Equação 4.

$$Atividade (U/mL) = \frac{Dil \cdot x (Abs_{am} - Abs_{branco}) \cdot x Fator (mg/mL) \cdot x Vol.total (mL)}{tempo (min) \cdot x 0,18 (mg/\mu mol) \cdot x Vol.amostra (mL)} \quad (4)$$

Onde:

Dil = diluição da enzima (se necessário)

Abs<sub>am</sub> = valor da absorbância da amostra (enzima)

Abs<sub>branco</sub> = valor da absorbância do branco

Fator = fator obtido da curva de calibração

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Pré-tratamento com aplicação do planejamento experimental

Após a etapa de pré-tratamento seguindo o planejamento experimental foram quantificados os açúcares redutores liberados no hidrolisado alcalino (AR<sub>PT ALCALINO</sub>), bem como o rendimento da fração sólida remanescente e por diferença, a solubilização dos componentes macromoleculares da palha de cana-de-açúcar (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados obtidos após o pré-tratamento

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	AR <sub>PT ALCALINO</sub> (g/L)	Rendimento (%)	Solubilização (%)
01	-1(10)	-1(1,0)	2,01	64,26	35,74
02	+1(30)	-1(1,0)	2,21	57,63	42,37
03	-1(10)	+1(4,0)	2,28	44,94	55,06
04	+1(30)	+1(4,0)	2,46	43,46	56,54
05	0(20)	-1(2,5)	2,14	50,11	49,89
06	0(20)	-1(2,5)	2,11	50,34	49,66
07	0(20)	+1(2,5)	2,20	50,17	49,83

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: concentração de hidróxido de sódio

Fonte: Autor, 2018.

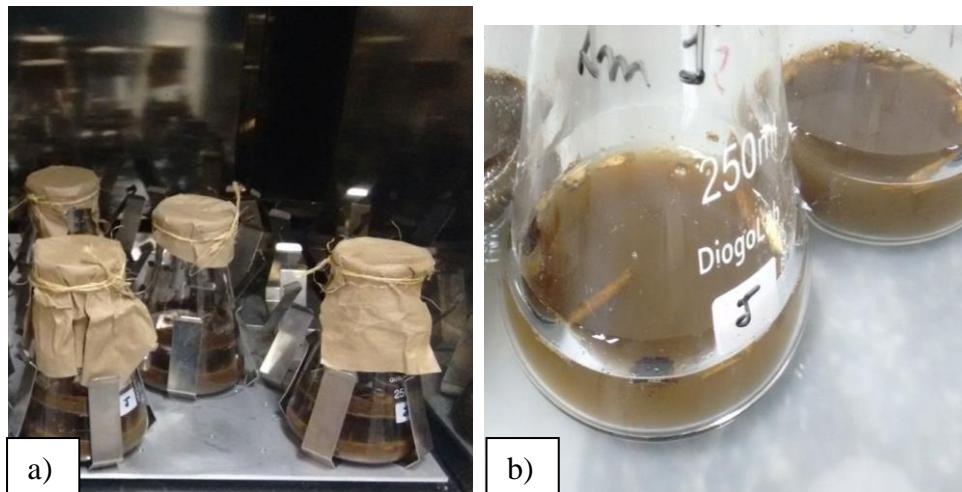
As concentrações de açúcares redutores foram relativamente baixas, não atingindo 3,0 g/L e não houve grandes variações dentro das condições de tempo e concentração de hidróxido de sódio aplicadas. A solubilização dos componentes macromoleculares dá um indicativo da eficiência do pré-tratamento. Através dos dados da Tabela 5, observa-se que a maior solubilização (56,54%) ocorreu no experimento 04, no qual se empregou condições mais severas de pré-tratamento (30 min e 4,0% de NaOH). Embora, não tenha ocorrido variações significativas de açúcares redutores no hidrolisado alcalino, a solubilização teve uma variação significativa. Segundo Nascimento (2011), o pré-tratamento alcalino da biomassa, promove a quebra de ligações de hidrogênio entre hemicelulose e a lignina-carboidratos, objetivando a intensa deslignificação da mesma. Assim, provavelmente, a solubilização dos componentes macromoleculares identificada foi devida à lignina.

Campos (2017) aplicando um pré-tratamento com NaOH em concentração igual ou superior a 2%, à resíduos da palha de carnaúba, por 30 minutos e 121 °C, obteve extração de aproximadamente 74% de lignina.

#### 4.2 Hidrólise Enzimática

As amostras de palha de cana-de-açúcar pré-tratadas conforme as condições do planejamento experimental foram submetidas ao processo de hidrólise enzimática de acordo com as condições descritas no item 3.4. Todas as hidrólises foram realizadas em duplicata (Figura 9).

Figura 9 – Amostras de palha em duplicata antes (a) e depois (b) da hidrólise respectivamente



Fonte: Autor, 2018.

A eficiência da hidrólise foi quantificada em termos de açúcares redutores liberados (Tabela 6).

Tabela 6 – Açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	AR <sub>HE</sub> (g/L)
01	-1(10)	-1(1,0)	7,19 ± 0,21
02	+1(30)	-1(1,0)	9,03 ± 0,06
03	-1(10)	+1(4,0)	15,61 ± 0,09
04	+1(30)	+1(4,0)	19,33 ± 0,15
05	0(20)	-1(2,5)	14,95 ± 0,16
06	0(20)	-1(2,5)	14,93 ± 0,13
07	0(20)	+1(2,5)	15,05 ± 0,24

X<sub>1</sub>: tempo; X<sub>2</sub>: concentração de hidróxido de sódio;

AR<sub>HE</sub>: açúcares redutores no hidrolisado alcalino

Fonte: Autor, 2018.

Através da Tabela 6, observa-se que a concentração de açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática das amostras de palhas pré-tratadas, variaram de 7,19 a 19,33 g/L. Observa-se ainda, que o maior valor de concentração foi para a amostra pré-tratada nas condições do ensaio 04, coincidindo com o ensaio no qual ocorreu uma maior solubilização de componentes macromoleculares.

Jorgensen; Kristensen; Felby (2007); Peri et al. (2007) e Van Dyk; Pletschke (2012) *apud* Vasconcelos (2012) relataram alguns dos fatores responsáveis por influenciarem a hidrólise enzimática entre os quais estão as características do substrato, como: grau de polimerização da celulose, porosidade, teor de hemicelulose e teor de lignina; e as características do complexo enzimático tais como carga enzimática, inibição do complexo pelo acúmulo de produto intermediário (celobiose) e produto final (glicose) e perda de atividade devido à desnaturação.

Ao se considerar as características do substrato fica evidente que, nos experimentos realizados, quanto maior a solubilização dos componentes macromoleculares (provavelmente, lignina) maior foi a atuação da enzima do complexo celulase sobre a palha, levando a uma maior liberação de açúcares redutores, como a glicose, principal componente da celulose.

### 4.3 Análise estatística do planejamento experimental

Ao se empregar a ferramenta do planejamento experimental é possível estudar a influência de mais de uma variável e suas interações sobre um determinado processo. Buscou-se neste trabalho determinar, dentro de limites estabelecidos, as melhores condições de pré-tratamento alcalino da palha de cana-de-açúcar, que levasse uma maior liberação de açúcares redutores, com vistas a uma futura obtenção de etanol de segunda geração. Buscou-se também determinar a liberação de açúcares redutores no hidrolisado alcalino e a solubilização de componentes macromoleculares. Neste caso, as variáveis independentes estudadas foram o tempo de pré-tratamento e a concentração de hidróxido de sódio. Com os resultados experimentais obtidos, foi possível ajustar os dados para a obtenção de equações de primeira ordem, que relacionem cada uma das respostas (açúcares redutores no hidrolisado alcalino, solubilização de componentes macromoleculares, e açúcares redutores após a hidólise enzimática) com as variáveis independentes estudadas. As equações foram obtidas a partir das regressões lineares dos dados experimentais utilizando-se o software Statistica 10.0.

#### 4.3.1 Açúcares redutores no hidrolisado alcalino

A tabela 7 apresenta as estimativas dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento, podendo-se observar que apenas a variável concentração de hidróxido de sódio apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança.

Tabela 7 – Estimativas dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento (AR<sub>PT ALCALINO</sub>)

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	2,20	0,03	0,000005	2,11	2,29
X <sub>1</sub>	0,19	0,08	0,091919	-0,06	0,44
X <sub>2</sub>	0,26	0,08	0,044104	0,01	0,51
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-0,01	0,08	0,905671	-0,26	0,24

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: concentração de hidróxido de sódio;

p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

Verificados os efeitos significativos, com o objetivo de se obter o modelo codificado de primeira ordem para os açúcares redutores liberados no hidrolisado alcalino, realizou-se uma análise dos coeficientes de regressão (Tabela 8)

Tabela 8 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados após a etapa de pré-tratamento

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	2,20	0,03	0,000005	2,11	2,29
X <sub>1</sub>	0,10	0,04	0,091919	-0,03	0,22
X <sub>2</sub>	0,13	0,04	0,044104	0,01	0,25
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	-0,01	0,04	0,905671	-0,13	0,12

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: concentração de hidróxido de sódio;

p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

O modelo codificado que representa a concentração de açúcares redutores liberados no hidrolisado alcalino é dado pela Equação 5. Os dados de análise de variância (ANOVA) para os açúcares redutores (AR<sub>PT ALCALINO</sub>) estão apresentados na Tabela 9.

$$AR_{PT ALCALINO} (g/L) = 2,20 + 0,10 X_1 + 0,13 X_2 - 0,01 X_1 X_2 \quad (5)$$

Tabela 9 – Avaliação ANOVA para açúcares redutores no hidrolisado alcalino (AR<sub>PT ALCALINO</sub>)

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F <sub>calc</sub>	R <sup>2</sup> (%)
Regressão	0,10	3	0,03	5,74	85,16
Resíduo	0,02	3	0,01		
Falta de ajuste	0,01	1			
Erro puro	0,00	2			
Total	0,12	6			

F<sub>0,05;3;3</sub> = 9,28 (Teste F = F<sub>calc</sub>/F<sub>tab</sub> = 0,62)

Fonte: Autor, 2018.

O coeficiente de determinação ou explicação ( $R^2$ ) fornece uma medida da proporção de variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, sendo em geral, expresso em percentual, variando de 0 a 100% (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Observa-se que para a resposta açúcares redutores no hidrolisado alcalino ( $AR_{PT}$  ALCALINO), o coeficiente de explicação ficou abaixo de 90% (85,16%). O valor de F calculado foi menor que o F tabelado, ou seja, o teste F apresentou um valor inferior a 1. Dessa forma o modelo de regressão que representa a liberação de açúcares redutores no hidrolisado após a etapa de pré-tratamento não é significativo e nem preditivo, pois segundo Barros Neto (1996) *apud* Santos et al. (2008), para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa, mas também preditiva, valor do teste F deve ser no mínimo maior que 4.

#### 4.3.2 Solubilização de componentes macromoleculares

As estimativas dos efeitos para a solubilização de componentes macromoleculares estão apresentadas na Tabela 10. Observa-se que a variável concentração de hidróxido de sódio apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança.

Tabela 10 – Estimativas dos efeitos para a solubilização de componentes macromoleculares na etapa de pré-tratamento

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	48,44	0,68	0,000006	46,29	50,60
$X_1$	4,06	1,79	0,108521	-1,64	9,75
$X_2$	16,75	1,79	0,002591	11,05	22,44
$X_1 \cdot X_2$	-2,58	1,79	0,246082	-8,27	3,12

$X_1$ : tempo,  $X_2$ : concentração de hidróxido de sódio;

p: probabilidade de significância –  $p < 0,05$  (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

A Tabela 11 ilustra os coeficientes de regressão, a partir da qual se obtém a modelo codificada de primeira ordem (Equação 6).

Tabela 11 – Coeficientes de regressão para a solubilização dos componentes macromoleculares ( $S_{cm}$ ) após a etapa de pré-tratamento

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	48,44	0,68	0,000006	46,29	50,60
$X_1$	2,03	0,90	0,108521	-0,82	4,88
$X_2$	8,37	0,90	0,002591	5,52	11,22
$X_1 \cdot X_2$	-1,29	0,90	0,246082	-4,14	1,56

$X_1$ : tempo,  $X_2$ : concentração de hidróxido de sódio;

p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

$$S_{cm} (\%) = 48,44 + 2,03 X_1 + 8,37 X_2 - 1,29 X_1 X_2 \quad (6)$$

Os dados de análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a solubilização de componentes macromolecules estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação ANOVA para a solubilização de componentes macromoleculares

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calc}}$	$R^2$ (%)
Regressão	303,47	3	101,16	31,53	96,93
Resíduo	9,62	3	3,21		
Falta de ajuste	9,60	1			
Erro puro	0,03	2			
Total	313,09	6			

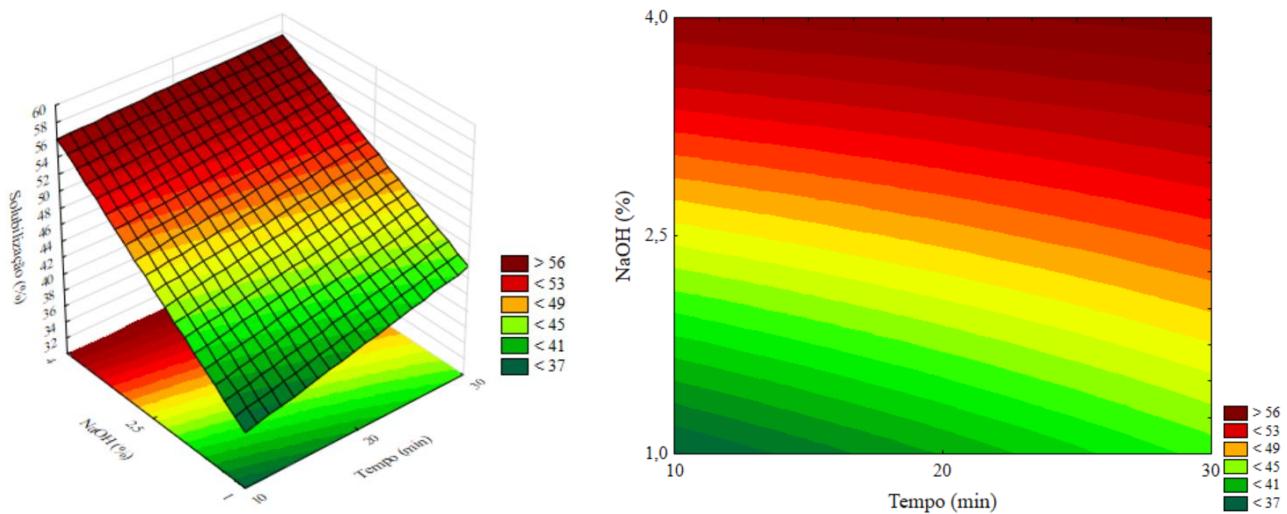
$F_{0,05;3;3} = 9,28$  (Teste  $F = F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}} = 3,40$ )

Fonte: Autor, 2018.

A análise de variância mostrou uma boa correlação do modelo com coeficiente de correlação de 96,93%. Além disso, o F calculado se apresentou superior ao F tabelado, sendo o modelo de primeira ordem para solubilização de componentes macromoleculares significativo.

A Figura 10 ilustra o gráfico de superfície de resposta e curva de contorno referentes à solubilização de componentes macromoleculares da palha de cana-de-açúcar, após a etapa de pré-tratamento, construídas com base no modelo apresentado na Equação 6.

Figura 10 – Superfície de resposta e curva de contorno para a solubilização de componentes macromoleculares respectivamente



Fonte: Autor, 2018.

A partir da Figura 10 percebe-se que a maior solubilização para os componentes macromoleculares ocorreu quando se empregou a maior concentração de hidróxido de sódio. Também há uma tendência da influência do tempo de exposição, sobre o aumento da solubilização de componentes macromoleculares.

#### 4.3.3 Açúcares redutores liberados após hidrólise enzimática ( $AR_{HE}$ )

A Tabela 13 ilustra as estimativas dos efeitos para açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática. Visualiza-se que a variável concentração de hidróxido de sódio apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança. Na Tabela 14, estão apresentados os coeficientes de regressão utilizados para obter o modelo codificado de primeira ordem (Equação 7).

Tabela 13 – Estimativas dos efeitos para os açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática (AR<sub>HE</sub>)

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	13,73	0,63	0,000207	11,74	15,72
X <sub>1</sub>	2,78	1,65	0,191358	-2,48	8,04
X <sub>2</sub>	9,36	1,65	0,010922	4,10	14,62
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,94	1,65	0,609534	-4,32	6,20

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: concentração de hidróxido de sódio;

p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 14 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados após a etapa de hidrólise enzimática

	Efeito	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	13,73	0,63	0,000207	11,74	15,72
X <sub>1</sub>	1,39	0,83	0,191358	-1,24	4,02
X <sub>2</sub>	4,68	0,83	0,010922	2,05	7,31
X <sub>1</sub> . X <sub>2</sub>	0,47	0,83	0,609534	-2,16	3,10

X<sub>1</sub>: tempo, X<sub>2</sub>: concentração de hidróxido de sódio;

p: probabilidade de significância – p < 0,05 (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

Fonte: Autor, 2018.

$$AR_{HE} ( g/L ) = 13,73 + 1,39 X_1 + 4,68 X_2 + 0,04 X_1 X_2 \quad (7)$$

Os dados de análise de variância (ANOVA) para os açúcares redutores liberados na etapa de hidrólise enzimática estão apresentados na Tabela 15. A análise de variância mostrou uma boa correlação do modelo com coeficiente de correlação de 92,14%. Além disso, o F calculado se apresentou superior ao F tabelado, sendo o modelo de primeira ordem para os açúcares redutores no hidrolisado enzimático, significativo. Pode-se analisar as superfícies de resposta e curvas de contorno representando dos açúcares redutores no hidrolisado enzimático na Figura 11.

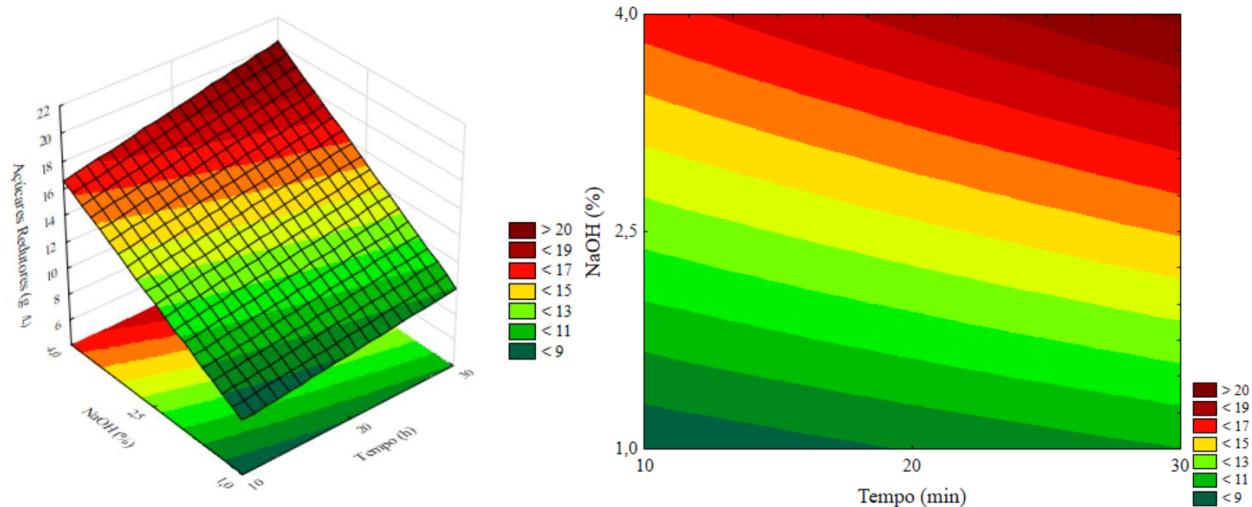
Tabela 15 – Avaliação ANOVA para os açúcares redutores liberados na etapa de hidrólise enzimática

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	$F_{\text{calc}}$	$R^2 (\%)$
Regressão	96,22	3	32,07	11,73	92,14
Resíduo	8,21	3	2,74		
Falta de ajuste	8,20	1			
Erro puro	0,01	2			
Total	104,43	6			

$F_{0,05;3;3} = 9,28$  (Teste  $F = F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}} = 1,26$ )

Fonte: Autor, 2018.

Figura 11 – Superfícies de resposta e curvas de contorno representando AR dos hidrolisados enzimáticos da palha respectivamente



Fonte: Autor, 2018.

Observa-se através da superfície de resposta e curva de contorno (Figura 11), que o aumento da concentração de hidróxido de sódio e do tempo, bem como a combinação de ambas as variáveis apresentam uma tendência de aumentar a liberação de açúcares redutores na etapa de hidrólise enzimática.

## 5 CONCLUSÃO

O pré-tratamento alcalino efetuado no presente trabalho, com a palha de cana de açúcar, obteve até 56,54 % de solubilização dos componentes macromoleculares, com uma provável deslignificação intensa da biomassa. Os resultados de solubilização destes componentes, segundo a análise ANOVA, foram estatisticamente significativos a 95% de confiança. Ainda no pré-tratamento, foram obtidas concentrações de açúcares redutores de até 2,16 g/L a 4% de NaOH, 30 min, 121 °C.

O procedimento de hidrólise enzimática mostrou-se eficiente, obtendo até 19,33 g/L de açúcares redutores nas condições de 4% de NaOH a 30 min a 121 °C. Onde as concentrações de açúcares redutores, segundo a análise ANOVA, também foram estatisticamente significativas, a 95% de confiança.

Portanto, sugere-se que com pré-tratamento alcalino junto a hidrólise enzimática de resíduos celulósicos, com a palha de cana-de-açúcar, seja uma alternativa para a geração de açúcares para rotas de produção para o bioetanol, mostrando-se uma importante via sustentável de produção para os combustíveis alternativos, devido seu caráter abundante e renovável, diminuindo também a geração de resíduos dos processos industriais e agrícolas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **ANUÁRIO ESTATÍSTICO BRASILEIRO DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS: 2017.** Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 2 out. 2018.

BONOMI, A. MAIORANO, A. E. e RODRIGUES M. F. A. **Técnica aproveita lignocelulose da cana para produzir etanol.** Estratégia, visão agrícola Nº8, 2008.

CAMPOS, A. O. **AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA PALHA DE CARNAÚBA.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2017.

CARVALHO, C.H. R. **EMISSÕES RELATIVAS DE POLUENTES DO TRANSPORTE MOTORIZADO DE PASSAGEIROS NOS GRANDES CENTROS URBANOS BRASILEIROS.** IPEA, boletim regional, urbano e ambiental, Brasília, abril de 2011.

CASTRO, A. M. e PEREIRA JUNIOR, N. **PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE CELULASES NA HIDRÓLISE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quim. Nova, Vol. 33, No. 1, p. 181-188, Rio de Janeiro, 2010.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **WOOD CHEMISTRY, ULTRASTRUCTURE, REACTIONS.** Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FURLAN, V. JÚNIOR M. **PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS CELULÓSICOS DA AGROINDÚSTRIA DO ARROZ.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, 2009.

GOLDEMBERG, J. **BIOMASSA E ENERGIA.** Quim. Nova, V. 32, Nº. 3, pp. 582-587, São Paulo, 2009.

JARDIM, A. **RENOVABIO: REVOLUÇÃO ECONÔMICA E SOCIOAMBIENTAL.** AgroANALYSIS, São Paulo, V. 37, Nº. 12, p. 48, dez. 2017. ISSN 0100-4298. Disponível em: <<http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/article/view/76577>>. Acesso em: 2 out. 2018.

KOHLHEPP G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estud. av., V.24, Nº.68, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000100017>>. Acesso em: 2 out. 2018.

LEAL, M. R. L. V.; LEITE, R. C. C. **O BIOCOMBUSTÍVEL NO BRASIL.** NOVOS ESTUDOS, CEBRAP, 78, pp. 15-21, jul. de, 2007.

**LIMA, G. F. N. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO HIDROLISADO DE MANIPUEIRA.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Produção Sucroalcooleira) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2017.

**LORENCINI, P. OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DE BAGAÇO DE CANA PARA A SUA UTILIZAÇÃO COMO SUBSTRATO NA PRODUÇÃO BIOLÓGICA DE HIDROGÊNIO.** Dissertação (Mestrado em Ciências - Química) - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

**LUCARINI, A. C. et. al. ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DA CANA DE AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.** The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC, ISSN: 2446-9416. V. 03 Nº. 02 (2017) 242–253, 2017. Disponível em: <<https://jcec.ufv.br/index.php/req2/article/view/242>>. Acesso em: 2 out. 2018.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 2 out. 2018.

**MILANEZ, A. Y. et. al. O DÉFICIT DE PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL ENTRE 2012 E 2015: DETERMINANTES, CONSEQUÊNCIAS E SUGESTÕES DE POLÍTICA.** Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://web.bnbes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1521>>. Acesso em: 2 out. 2018.

**NASCIMENTO, V. M. PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO (NaOH) DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL E OBTENÇÃO DE XILOOLIGÔMERO.** Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

**ORTIZ, D. R. L. SUSTENTABILIDADE DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE CANA DE AÇÚCAR NO BRASIL.** 2007.

**PEDRO, L. O. V. ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE SOLUÇÕES DILUÍDAS DE DIFERENTES AÇUCARES UTILIZANDO MICROCALORIMETRIA DE FLUXO.** Universidade Estadual de Campinas, Quim. Nova, V. 20, Nº. 5, Campinas, 1997.

**PEREIRA G., ROITMAN T. e GRASSI C. BOLETIM DE CONJUNTURA: AGOSTO/2018.** FGV ENERGIA, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://fgvenergia.fgv.br/publicacao/boletim-de-conjuntura-agosto2018>>. Acesso em: 2 out. 2018.

**PINTO, T. O. P. PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS PELOS FUNGOS *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COM DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS.** Dissertação (mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2010.

**PRATTO, B. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR ESTUDO CINÉTICO E MODELAGEM MATEMÁTICA SEMI-MECANÍSTICA.**

Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

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 ETANOL**. Universidade Federal de Viçosa, Quim. Nova, V. 35, Nº. 5, p. 1004-1010, 2012. Disponível em: <[http://quimicanova.sqb.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=3583](http://quimicanova.sqb.org.br/detalhe_artigo.asp?id=3583)>. Acesso em: 2 out. 2018.

SANTOS, S. F. M.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. **APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NO ESTUDO DA PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE POLIGALACTURONASE**. Quim. Nova, V. 31, Nº. 8, p. 1973-1978, 2008.

SILVA, J. A. **CATÁLISE ENZIMÁTICA NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharel em Química) - Universidade Federal de São João del-Rei. São João del-Rei, 2016.

SOUSA C. A. B. **PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE CELULASES PRODUZIDAS POR Trichoderma reesei LCB 48 NA FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA DA PALMA FORRAGEIRA**. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina grande, 2014.

TOMÉ, J. A. T. R. **DESENVOLVIMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO COM VAPOR DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2014.

**ÚNICA. PRODUÇÃO E USO DO ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL: Respostas às questões mais frequentes**. São Paulo, 2007.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S; ARAGÃO, F. A. S., 2013. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos.

VASCONCELOS, S. M. **Pré-Tratamento hidrotérmico e com ácido fosfórico diluído de bagaço de cana-de-açúcar para aplicação em biorrefinarias**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.

XAVIER F. D. **PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DA FIBRA DE SISAL**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2016.