



**MARIA CLARA KELLES MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE  
DIFERENTES BIOMASSAS**

**LAVRAS – MG  
2023**

**MARIA CLARA KELLES MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES  
BIOMASSAS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Engenharia Química, para obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

**MARIA CLARA KELLES MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES  
BIOMASSAS**

**EVALUATION OF ETHANOL PRODUCTION FROM DIFFERENT BIOMASSES**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Engenharia Química, para obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 10 de março de 2023.

Prof<sup>a</sup>.Dra. Suellen Mendonça Nascimento UFLA

Prof. Dr. João Moreira Neto UFLA

Prof. Dr. Luciano Jacob Corrêa  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Iolanda e Paulo, por todo o apoio e confiança depositados em mim ao longo de toda essa jornada.

Aos meus irmãos, Pedro e Ana, por sempre estarem presentes e me apoiando, não imagino a vida sem vocês.

Ao meu namorado, Vinicius, por todo o apoio, companheirismo, incentivo e confiança.

Às minhas amigas, em especial a Mylene e Luiza por estarem comigo desde o primeiro dia da faculdade e serem a minha base e apoio durante toda a graduação. À Maria Angélica por estar presente em grande parte dessa trajetória, por cada palavra e gesto de incentivo e motivação.

Ao meu orientador, Prof. Luciano Jacob Corrêa, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por ser tão solícito.

Muito obrigada!

## RESUMO

O estudo de diferentes biomassas para a produção de etanol de segunda geração é de grande importância, pois permite avaliar a viabilidade técnica e econômica da utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Com a crescente demanda por fontes renováveis de energia e a necessidade de reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, o aproveitamento de resíduos como fonte de energia se torna uma alternativa interessante. Além disso, o estudo de diferentes biomassas permite identificar quais são as melhores fontes para a produção de etanol de segunda geração, considerando aspectos como disponibilidade, custo e eficiência do pré-tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar o melhor pré-tratamento para duas biomassas, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de malte, através da quantificação da glicose disponível para a fermentação após hidrólise enzimática. Os pré-tratamentos avaliados foram o hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino para o bagaço de cana-de-açúcar, e físico (moagem) e alcalino para o bagaço de malte. As condições operacionais da hidrólise empregadas foram de pH 4,8, temperatura de 50 °C e tempo de 48 horas, com uma carga enzimática de 10 FPU/g<sub>BAGAÇO</sub> e carga de sólido de 10% (m/v) para um volume reacional de 50 mL. Para o bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento alcalino apresentou maior concentração de glicose, mas não houve diferenças estatísticas significativas em relação ao pré-tratamento explosão a vapor, estes pré-tratamentos apresentaram concentração final de  $83,254 \pm 10,327$  g/L e  $69,753 \pm 0,794$  g/L, respectivamente. Já para o bagaço de malte, o pré-tratamento físico foi mais eficiente do que o pré-tratamento alcalino, com a concentração final de  $19,088 \pm 0,653$  g/L e  $12,057$  g/L, nesta ordem. A concentração de glicose liberada no pré-tratamento alcalino não foi coerente com a literatura. Fatores como a agressividade do pré-tratamento alcalino ou a insuficiência das condições operacionais empregadas podem estar relacionados com a menor concentração de glicose obtida.

Palavras chave: Etanol de segunda geração. Bagaço de cana-de-açúcar. Bagaço de malte. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

## ABSTRACT

The study of different biomasses for the production of second-generation ethanol is of great importance as it allows for the technical and economic feasibility evaluation of using agroindustrial residues as raw materials for biofuel production. With the increasing demand for renewable energy sources and the need to reduce dependence on fossil fuels, the use of waste as an energy source has become an interesting alternative. Moreover, studying different biomasses helps identify the best sources for second-generation ethanol production, considering aspects such as availability, cost, and efficiency of pretreatment. This study aimed to evaluate the best pretreatment for two biomasses, sugarcane bagasse and malt bagasse, by quantifying the available glucose for fermentation after enzymatic hydrolysis. The evaluated pretreatments were hydrothermal, steam explosion, and alkaline for sugarcane bagasse, and physical (milling) and alkaline for malt bagasse. The operational conditions for hydrolysis were pH 4.8, a temperature of 50°C, and time of 48 hours, with an enzyme loading of 10 FPU/g<sub>BAGASSE</sub> and a solid loading of 10% (w/v) for a reaction volume of 50 mL. For sugarcane bagasse, the alkaline pretreatment showed a higher glucose concentration, but there were no statistically significant differences compared to the steam explosion pretreatment, with a final concentration of  $83.254 \pm 10.327$  g/L and  $69.753 \pm 0.794$  g/L, respectively. For malt bagasse, the physical pretreatment was more efficient than the alkaline pretreatment, with a final concentration of  $19.088 \pm 0.653$  g/L and  $12.057$  g/L, respectively. The glucose concentration released in the alkaline pretreatment was not consistent with the literature. Factors such as the aggressiveness of the alkaline pretreatment or the insufficiency of the operational conditions employed may be related to the lower glucose concentration obtained.

**Keywords:** Second-generation ethanol. Sugarcane bagasse. Malt bagasse. Pretreatment of lignocellulosic biomass.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos. ....	6
Figura 2 - Etapas da produção de etanol de segunda geração. ....	10
Figura 3 - Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica. ....	11
Figura 4 - Ação sinérgica das enzimas celulase na hidrólise da celulose. ....	18
Figura 5 - Pré-tratamento alcalino (a) Bagaço misturado ao NaOH (b) Bagaço após a autoclave (c) Bagaço após a filtração. ....	22
Figura 6 - Determinação da umidade dos bagaços (a) Balança de determinação de umidade (b) Bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico seco. ....	23
Figura 7 - Hidrólise enzimática (a) Meio reacional do bagaço de malte com pré-tratamento físico; (b) Meio reacional na incubadora shaker Lucadema; (c) Centrífuga Excelsa® (d) Amostra centrifugada; (e) Fase sobrenadante coletada. ....	24
Figura 8 - Curva característica de glicose. ....	28
Figura 9 - Perfil de concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para o bagaço de cana-de-açúcar com os pré-tratamentos hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino. ....	30
Figura 10 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para o bagaço de malte com os pré-tratamentos físico (moagem) e alcalino. ....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de diferentes biomassas lignocelulósicas. ....	5
Tabela 2 - Produção de etanol total a partir da cana-de-açúcar na Safra 2022/23.....	7
Tabela 3 - Concentração de glicose do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico.....	29
Tabela 4 - Concentração de glicose do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento explosão a vapor. ....	29
Tabela 5 - Concentração de glicose do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento alcalino. ....	29
Tabela 6 - Concentração de glicose do bagaço de malte com pré-tratamento físico (moagem). ....	32
Tabela 7 - Concentração de glicose do bagaço de malte com pré-tratamento alcalino. ....	32
Tabela 8 - Teste de Tukey para o bagaço de cana-de-açúcar. ....	36
Tabela 9 - Teste de Tukey para o bagaço de malte.....	36

## LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BCA	Bagaçõ de Cana-de-Açúcar
BGL	$\beta$ -glicosidases
BNDES	Banco Nacional De Desenvolvimento Econõmico e Social
CBH	Celobiohidrolases
CERVBRASIL	Associaçãõ Brasileira da Indústria da Cerveja
CGEE	Centro de Gestãõ e Estudos Estratégicos
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EG	Endo-1,4- $\beta$ -glucanases
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
E2G	Etanol de Segunda Geraçãõ
MOP	Monooxigenases de polissacarídeos
SHF	<i>Separated Enzymatic hydrolysis and fermentation</i>
SSF	<i>Saccharification with a simultâneos fermentation</i>
UNICA	União Da Indústria De Cana-De-Açúcar

## LISTA DE SÍMBOLOS

CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
g	Gramas
g/L	Gramas por Litro
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gay Lussac
h	Horas
Kg	Quilogramas
kg <sub>f</sub> .cm <sup>-2</sup>	Quilograma-força por centímetro quadrado
NaOH	Hidróxido de Sódio
m	Massa (g)
mm	Milímetros
μL	Microlitro
mL	Mililitros
min	Minutos
m/m	Proporção massa/massa
m/v	Proporção massa por volume
nm	Nanômetros
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo (h)
v	Volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1	Objetivo geral	2
1.2	Objetivos específicos	2
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	3
2.1	Histórico do etanol	3
2.2	Biomassa	4
2.2.1	Materiais lignocelulósicos	4
2.2.1.1	Bagaço de cana-de-açúcar	7
2.2.1.2	Bagaço de malte	8
2.3	Produção do etanol de segunda geração	9
2.3.1	Pré-tratamento	10
2.3.1.1	Explosão a vapor	12
2.3.1.2	Hidrotérmico	12
2.3.1.3	Alcalino	13
2.3.1.4	Moagem	14
2.3.1.5	Ácido	14
2.3.2	Hidrólise	15
2.3.2.1	Hidrólise ácida	15
2.3.2.2	Hidrólise enzimática	16
2.3.3	Fermentação	18
2.3.4	Destilação	19
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	21
3.1	Materiais	21
3.2	Métodos	21
3.2.1	Pré-tratamento	21
3.2.1.1	Explosão a vapor	21
3.2.1.2	Hidrotérmico	21
3.2.1.3	Alcalino	22
3.2.1.4	Físico (moagem)	23
3.2.2	Atividade enzimática	23
3.2.3	Determinação da umidade	23
3.2.4	Hidrólise enzimática	24

3.2.5	Quantificação de açúcares redutores .....	25
3.2.5.1	Preparo do reagente 3,5-dinitrosalicílico (Método DNS) .....	25
3.2.5.2	Curva padrão de glicose .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
4.1	Atividade enzimática.....	27
4.2	Determinação da umidade.....	27
4.3	Curva padrão de glicose .....	27
4.4	Quantificação de açúcares do hidrolisado.....	28
4.4.1	Bagaço de cana-de-açúcar.....	28
4.4.2	Bagaço de malte.....	32
4.4.3	Análise estatística .....	35
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de biocombustíveis tem se tornado um tema cada vez mais debatido e estudado, a fim de diminuir o uso de combustíveis fósseis, em um cenário de instabilidade no preço do petróleo e da tentativa de diminuição da emissão de gases estufa (FREITAS, 2022). Essas substâncias, derivadas de biomassa renovável, podem substituir compostos de origem fóssil na geração de energia de forma parcial ou integral, e, por serem biodegradáveis, causam um menor impacto ao meio ambiente (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP, 2022).

Nesse contexto, o etanol de segunda geração (E2G) é um biocombustível produzido a partir da extração de açúcares fermentescíveis de materiais lignocelulósicos, como resíduos agroindustriais, e é um potencial substituto da gasolina e outros combustíveis não renováveis (MARTINS, 2018). Além de reaproveitar o bagaço proveniente da indústria sucroalcooleira, valorizando a biomassa e gerando um aumento de até 50% da produção de etanol sem alterar a área plantada, o E2G advindo do bagaço da cana-de-açúcar apresenta uma redução de 30% dos gases do efeito estufa em comparação ao etanol de primeira geração, e de 90% de CO<sub>2</sub> quando comparado à gasolina (RAÍZEN, 2023; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2022).

Uma outra alternativa para a produção de etanol é o milho. Diferentemente da cana, onde o açúcar é disponibilizado após a moagem, e dos materiais lignocelulósicos, que necessitam do pré-tratamento da biomassa para liberar os açúcares, o milho possui o amido, e para convertê-lo em açúcares fermentescíveis são necessárias as etapas de moagem, cozimento, liquefação e sacarificação (FERNANDES, 2019). Após a exposição dos açúcares, as etapas seguintes são semelhantes para as três rotas citadas, sendo elas a fermentação e a destilação.

A produção de etanol a partir do milho e do bagaço de cana-de-açúcar podem ser relacionadas, uma vez que o milho pode ser utilizado como matéria prima, no período de entressafra, ou não, da cana de açúcar, já que é de fácil estocagem, ao contrário da cana, que é rapidamente degradada após a colheita. Essa iniciativa contribui para que a planta não fique ociosa no período de entressafra. Para comportar os dois tipos de processo, a usina deve funcionar no regime “*flex*”, caracterizado pela usina de cana-de-açúcar que utiliza o milho apenas na entressafra, ou “*flex full*”, que produz etanol a partir de ambas as biomassas durante a safra da cana. Porém, já existem também as usinas “*full*”, que possuem apenas o milho como matéria prima (NEVES et. al, 2021).

É importante ressaltar que a disponibilidade da biomassa varia de acordo com a região (JÚNIOR, 2013). Enquanto o bagaço de malte pode, por exemplo, ser uma fonte abundante de biomassa em regiões com grande produção de cerveja, outras regiões podem ter disponibilidade limitada dessa biomassa. O mesmo acontece para regiões com grande produção de cana-de-açúcar, que podem ter uma oferta mais ampla de bagaço de cana como fonte do material lignocelulósico. Nesse sentido, é relevante avaliar a viabilidade técnica e econômica do uso de diferentes biomassas levando em conta a disponibilidade, custos de transporte e processamento, além do potencial do material para a produção de etanol.

Apesar de ser uma fonte promissora de energia, os materiais lignocelulósicos, compostos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, apresentam certa resistência para a liberação da celulose, real fonte de açúcar utilizada para produzir o etanol de segunda geração. Tendo isso em vista, torna-se necessário avaliar os efeitos dos diferentes pré-tratamentos para cada material, já que esta etapa é responsável pela alteração da estrutura da biomassa e conseqüentemente pela maior exposição dos polímeros às enzimas, que os transformam em açúcares fermentescíveis na hidrólise (CORRÊA, 2016).

## **1.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho é avaliar o potencial de diferentes biomassas para a produção de etanol de segunda geração.

## **1.2 Objetivos específicos**

- i) Quantificar a glicose disponível para fermentação no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de malte, com diferentes pré-tratamentos.
- ii) Avaliar o melhor pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, dentre eles o hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino.
- iii) Avaliar o melhor pré-tratamento do bagaço de malte, dentre eles o físico (moagem) e o alcalino.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico do etanol

O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil foi introduzido quando o país ainda era uma colônia, e a produção de açúcar rapidamente assumiu um lugar de destaque na economia nacional, apresentando-se como a primeira grande riqueza agrícola e industrial do Brasil. A utilização do etanol de cana-de-açúcar, por sua vez, se iniciou no país apenas no início do século XX, em um cenário de crise no mercado açucareiro interno. Porém, a indústria do etanol realmente se estabeleceu na década de 70, com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) (CAMPOS, 2017; LOPES, 2011).

Tendo como motivação a primeira crise mundial do petróleo em 1973 e o receio de seus impactos no Brasil, o Proálcool foi criado em 1975 com o objetivo de substituir, de forma gradativa, a frota de veículos movidos por combustíveis fósseis por aqueles movidos a um combustível renovável, reduzindo, conseqüentemente, os impactos da crise e a dependência do país em relação à gasolina importada (UNICA, 2022).

Ao longo da década de 80, o preço do açúcar subia e o do petróleo abaixava, culminando no enfraquecimento das iniciativas governamentais para a produção do biocombustível e impactando diretamente na venda dos veículos movidos a etanol. Tal fato se reverteu com o lançamento do primeiro veículo bicombustível no Brasil, em 2003, com a tecnologia *flex*, que permite o uso tanto do etanol, quanto da gasolina, e também da mistura, em qualquer proporção, de ambos os combustíveis (UNICA, 2022).

Atualmente, apesar do crescimento do mercado de carros elétricos provocar o enfraquecimento do apoio ao setor de biocombustíveis, diante das várias iniciativas de descarbonização, nacionais e internacionais, o desenvolvimento e consumo dos biocombustíveis deverão ser favorecidos a longo prazo. A Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), instituída pela Lei nº 13.576/2017, é a mais expressiva no Brasil em termos de políticas, e tem como principal instrumento estabelecer metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, estimulando dessa forma o aumento da produção e participação dos biocombustíveis na matriz energética de transportes do país (ANP, 2022; VIDAL, 2022).

Se tratando de biocombustíveis, o etanol se mostra uma alternativa potente e promissora. Além de possibilitar a combustão mais limpa e melhor desempenho dos motores, mesmo quando misturado à gasolina, o etanol pode ser produzido a partir de diferentes

biomassas e rotas produtivas (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL - BNDES; CENTRO DE GESTAO E ESTUDOS ESTRATEGICOS – CGEE, 2008). O etanol de primeira geração (E1G) é obtido a partir da fermentação da glicose contida nas culturas de amido e açúcar, enquanto o de segunda geração (E2G), ou etanol celulósico, é caracterizado por utilizar materiais lignocelulósicos, sendo necessária a etapa de conversão da celulose em glicose, açúcar fermentescível, para a posterior fermentação. Existe ainda o etanol de terceira geração, que tem organismos marinhos como matéria-prima, como algas. As algas possuem alto teor de lipídios e carboidratos, se tornando assim uma alternativa promissora para a produção de etanol (JAMBO et al., 2016).

Ainda hoje o mercado sucroalcooleiro é muito expressivo na economia do país. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor de etanol do mundo, sendo responsável por aproximadamente 27% do volume mundial do biocombustível em 2021. A maior parte do etanol produzido no país tem a cana-de-açúcar como biomassa, porém, a produção do etanol à base de milho já se mostra crescente e expressiva (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA, 2022; UNICA, 2022).

## **2.2 Biomassa**

A biomassa é um material renovável e biodegradável de origem orgânica, vegetal ou animal, e pode ser utilizada na produção de energia. O uso de fontes renováveis de energia é um assunto cada vez mais pautado por reduzir a emissão de gases e materiais nocivos para a atmosfera. Tendo isso em vista, a utilização da biomassa como fonte de energia é de interesse geral, já que além de ser renovável e sustentável, permite o reaproveitamento de resíduos e é significativamente menos poluente que fontes de energias não-renováveis (STEVANOVIĆ; STEVANOVIĆ, 2022).

### **2.2.1 Materiais lignocelulósicos**

O material lignocelulósico pode ser caracterizado como uma matéria vegetal seca, composta majoritariamente por celulose (30 a 50%), hemicelulose (15 a 35%) e lignina (10 a 30%). Este material é o mais abundante e renovável do mundo para a produção de biocombustíveis e tem como principal fonte os setores de: Agricultura, na produção de grãos, cana-de-açúcar e milho, por exemplo; Floresta, envolvendo principalmente a madeira; e

Indústria, responsável pela geração de resíduos lignocelulósicos como casca de arroz, bagaço e palha de cana-de-açúcar e de milho (CAI et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017).

Tradicionalmente, a biomassa lignocelulósica tem o uso voltado para a queima e aquecimento, porém, dependendo da rota de conversão utilizada, podendo esta ser termoquímica ou bioquímica, este material pode ser transformado em energia ou em portadores de energia, ou seja, pode ser convertido em produtos energéticos ou combustíveis. Apesar de ter baixo custo e ser abundante, os materiais lignocelulósicos possuem uma estrutura complexa, e para serem utilizados em biorrefinarias, a etapa de pré-tratamento, que visa facilitar o acesso aos compostos de interesse presentes na biomassa, se torna necessária (CAI et al., 2017; KONAN et al., 2022).

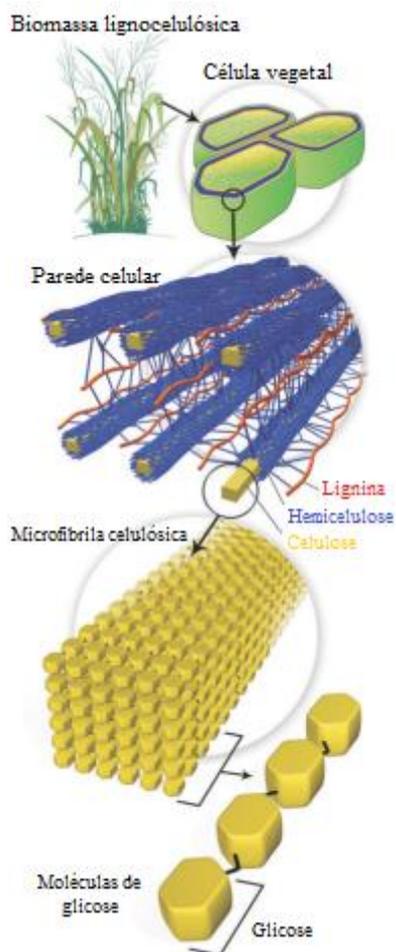
As células vegetais se diferenciam das células animais pela presença da parede celular, que concentra a celulose, hemicelulose e lignina. Segundo Rodrigues et al. (2017), a quantidade dos constituintes que formam a biomassa lignocelulósica varia de acordo com a matéria-prima, sua idade, estágio vegetativo e condições de crescimento, salientando a importância da quantificação desses compostos em cada material. A Tabela 1 apresenta a composição de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Tabela 1 - Composição de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Biomassa	Composição química (%)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Bagaço de cana-de-açúcar	32,0 – 48,0	19,0 – 24,0	23,0 – 32,0	Adaptado de PRATTO, 2015
Palha de cana-de-açúcar	40,0 – 44,0	30,0 – 32,0	22,0 – 25,0	
Bagaço de malte	15,1 – 16,9	28,3 – 31,5	20,4 – 21,2	Adaptado de MASSARDI et al., 2020

Se tratando da produção do etanol celulósico, a celulose é o principal produto de interesse presente na biomassa, já que está diretamente relacionada com a quantidade de glicose presente no material, que por sua vez, é determinante para a etapa de fermentação, onde os açúcares fermentescíveis são consumidos para produzir o biocombustível (BARBOSA, 2015). A Figura 1 apresenta a estrutura dos materiais lignocelulósicos:

Figura 1 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

A celulose é um polímero natural de cadeia linear, formado por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas de moléculas D-glicose, composto denominado  $\beta$ -D-1,4-anidroglicopiranosose. Esse monômero apresenta hidroxilas livres, que reagem e formam ligação de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas ligações são responsáveis pela formação da parte cristalina do polissacarídeo, porém, a celulose apresenta parte de sua estrutura amorfa. A reatividade da molécula de celulose está diretamente ligada às regiões amorfas presentes em sua estrutura, que são uma das principais responsáveis pela higroscopicidade dos materiais lignocelulósicos, por apresentar alta reatividade com a água e conseqüentemente torná-la passível da deterioração (CORRÊA, 2016; RODRIGUES et al., 2017).

A hemicelulose, classificada como um heteropolissacarídeo, se distingue da glicose por ser constituída de diversos açúcares, ter cadeia ramificada e possuir menor grau de polimerização, conseqüentemente, menor massa molar. Por ser amorfa e ramificada, a hemicelulose é mais acessível e reativa, portanto, mais facilmente hidrolisada em monossacarídeos. Este polímero é formado principalmente por pentoses (xilose, arabinose) e

hexoses (manose, glicose e galactose), e está associado às fibras de celulose e à lignina (BARBOSA, 2015; OGATA, 2013; SAAD, 2010).

Diferentemente da celulose e hemicelulose, a lignina é um polímero aromático de estrutura complexa, sintetizado a partir de três estruturas fenólicas básicas: o álcool coniferílico, álcool p-cumarílico e o álcool sinapílico (OGATA, 2013; RODRIGUES et al., 2017). Essa substância oferece resistência e rigidez mecânica e age como uma cola, conferindo coesão ao conjunto de células e consequentemente dificultando a separação dos compostos fundamentais. Além disso, a lignina possui caráter hidrofóbico, o que a torna resistente ao ataque de microrganismos (SAAD, 2010).

Substâncias extrativas e não-extrativas também estão presentes nos materiais lignocelulósicos, mas não fazem parte da estrutura da parede celular lignocelulósica. Os extrativos são definidos como a fração do material que pode ser extraída, em solventes polares e apolares, e sua quantidade varia de acordo com a espécie vegetal. Esta fração é responsável por algumas características da planta, como cor, cheiro e resistência natural ao apodrecimento. Por sua vez, os materiais não extrativos são substancialmente componentes inorgânicos, como as cinzas (NASCIMENTO, 2011; PRATTO, 2015).

### 2.2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, que por sua vez, tem o açúcar, o etanol e a bioeletricidade como principais produtos. O Terceiro Levantamento da Safra de Cana-de-açúcar 2022/23, divulgado pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) em 27 dezembro de 2022, mostra que a produção total de cana-de-açúcar estimada é de 598,34 milhões de toneladas, enquanto a previsão da produção total de etanol, a partir da cana-de-açúcar, é de 26,59 bilhões de litros, volume 0,7% maior do que o obtido na safra anterior. A Tabela 2 apresenta a estimativa da produção de etanol total, a partir da cana-de-açúcar, para cada região do Brasil, em dois levantamentos da Safra 2022/23 comparados com a última safra.

Tabela 2 - Produção de etanol total a partir da cana-de-açúcar na Safra 2022/23 (Continua)

Região/UF	Etanol (Em mil litros)		
	Safra 2021/22 (a)	Safra 2022/23 Lev. Anterior (b)	Safra 2022/23 Lev. Atual (c)
Norte	262.835,0	268.577,0	268.971,0
Nordeste	1.877.191,0	2.073.078,0	1.993.574,4

Tabela 3 - Produção de etanol total a partir da cana-de-açúcar na Safra 2022/23 (Conclusão)

Região/UF	Etanol (Em mil litros)		
	Safra 2021/22 (a)	Safra 2022/23 Lev. Anterior (b)	Safra 2022/23 Lev. Atual (c)
Centro-Oeste	8.236.479,0	8.547.676,2	8.364.702,0
Sudeste	14.961.123,0	13.872.775,3	14.871.899,2
Sul	1.064.599,0	1.065.733,8	1.096.933,0
Norte/nordeste	2.140.026,0	2.341.655,0	2.262.545,4
Centro-sul	24.262.201,0	23.486.185,3	24.333.534,2
<b>Brasil</b>	<b>26.402.227,0</b>	<b>25.827.840,2</b>	<b>26.596.079,7</b>

Fonte: Adaptado de CONAB (2022).

A extração do caldo da cana para a produção de açúcar e álcool, gera um resíduo fibroso, o bagaço. Por possuir grande potencial energético, ele pode ser utilizado na geração de energia, principalmente dentro do próprio setor sucroalcooleiro, como combustível para caldeira. Em decorrência da expressiva produção de cana-de-açúcar no país, a grande quantidade de resíduo gerada, dá espaço também para a produção do etanol de segunda geração, proporcionando um aumento de até 50% na produção do biocombustível sem aumentar a área plantada e contribuindo, conseqüentemente, para a diminuição do impacto ambiental (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2022; RAÍZEN, 2023; ROCHA, 2017; VENCESLAU, 2018).

A quantidade de bagaço produzido depende do teor de fibra da cana envolvida no processo. Para uma média de 46% de fibra e 50% de umidade, são gerados 280 kg de bagaço para cada tonelada de cana processada. Considerando os dados do Terceiro Levantamento da Safra 2022/23 emitido pela CONAB, para os 598 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas, serão gerados mais de 167 milhões de toneladas de bagaço até o fim da Safra (EMBRAPA, 2022). Considerando a eficiência da hidrólise da celulose entre 75 a 80% e a fermentação da glicose de 90%, para uma tonelada de bagaço seco com 37% de celulose, seriam obtidos de 300 a 350 litros de etanol (ROSA e GARCIA, 2009).

### 2.2.1.2 Bagaço de malte

O bagaço de malte é o principal resíduo sólido do processo de produção da cerveja. Neste processo, os grãos de malte são moídos e misturados à água, gerando um caldo açucarado que posteriormente formará o mosto. Este, por sua vez, será futuramente filtrado, dando origem ao resíduo lignocelulósico (SANTOS, 2014a).

A participação do Brasil no mercado cervejeiro é cada vez mais expressiva, justificando a alta geração do resíduo no país. O bagaço de malte representa cerca de 85% dos resíduos sólidos gerados no processo cervejeiro, sendo que para os processos empregados atualmente, a cada 100 litros de cerveja produzidos, são gerados de 15 a 20 kg do resíduo com 70 a 80% de umidade. Segundo o último levantamento feito pela Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, são produzidos cerca de 14,1 bilhões de litros de cerveja por ano no país. Em concordância com esses dados, são gerados anualmente aproximadamente 2,45 milhões de toneladas de bagaço em base úmida, o correspondente a cerca de 0,61 milhões de toneladas do resíduo seco (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA - CERVBASIL, 2017; MASSARDI et al., 2020; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2022; SANTOS, 2014a).

O trabalho de Garcia (2012) mostra que aproximadamente 650 milhões de litros de etanol, a partir do bagaço de malte gerado no país, poderiam ser produzidos anualmente. Este dado é baseado na fermentação do hidrolisado pela levedura *Pichia stipitis*, considerando a conversão alcançada no estudo, a produção anual de 2 milhões de toneladas de bagaço de malte e condições previamente estabelecidas na pesquisa.

Ainda que este resíduo seja rico em celulose, fibras, proteínas e outros compostos de interesse, sua maior parte é destinada à elaboração de ração animal. Porém, devido à dificuldade de armazenamento, seu alto teor de umidade e dificuldade de transporte, que impactam diretamente na contaminação por microrganismos, podendo acarretar ainda em distúrbios no gado, faz-se necessária a avaliação de diferentes formas de reaproveitamento do bagaço de malte como matéria-prima para produtos de maior valor agregado (MASSARDI et al., 2020; SANTOS, 2014a).

### **2.3 Produção do etanol de segunda geração**

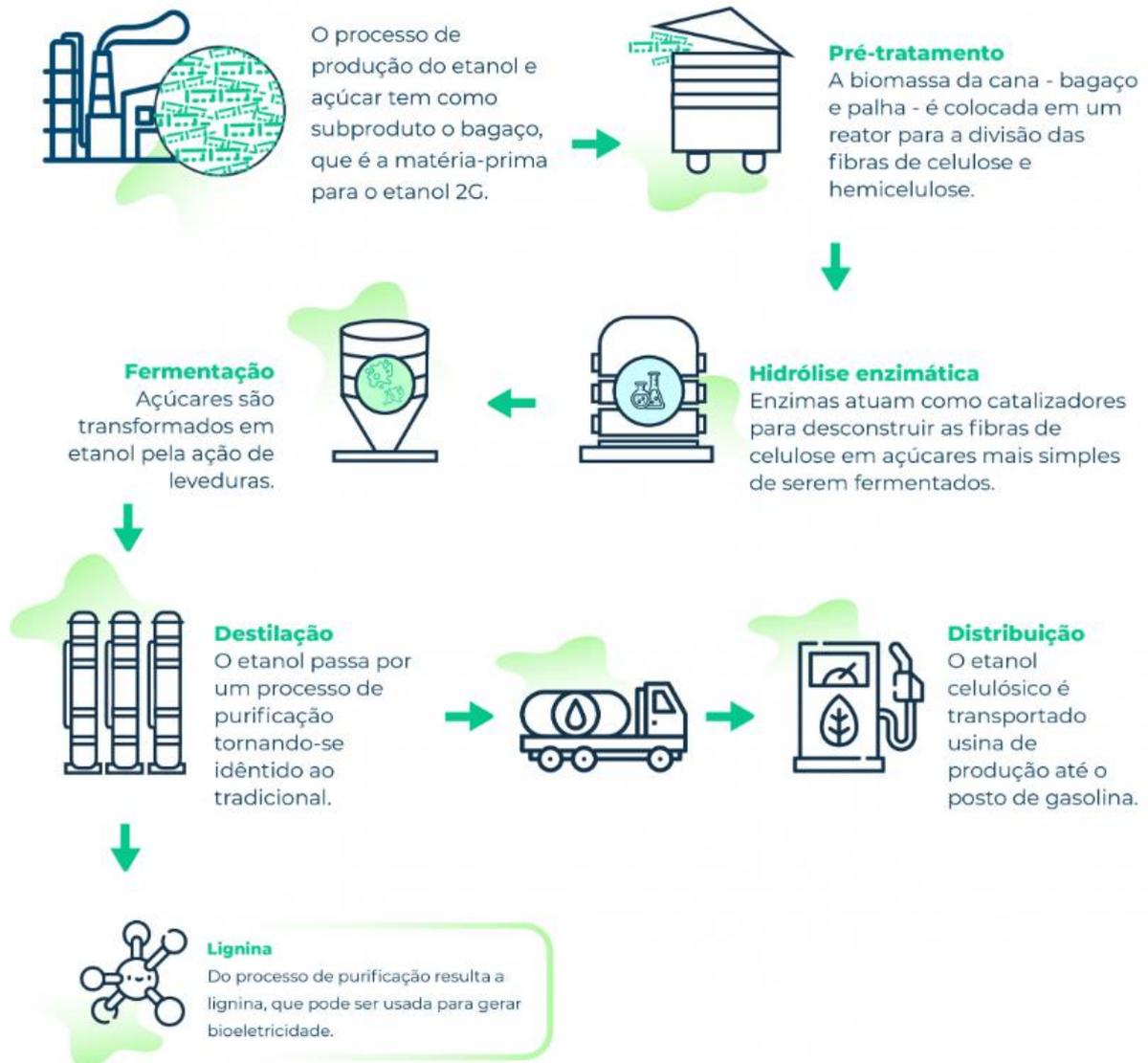
O etanol de primeira geração é originado a partir da sacarose concentrada no caldo e no melaço da cana-de-açúcar. Neste processo convencional, apenas um terço da sacarose encontrada na cana é aproveitado, enquanto o restante fica retido no bagaço e na palha. A partir do desenvolvimento de novas tecnologias é possível utilizar essa energia residual para a produção de etanol (UNICA, 2022).

O combustível gerado a partir do reaproveitamento dessa biomassa é chamado de etanol de segunda geração ou etanol celulósico, nome dado a todo etanol obtido a partir da biomassa vegetal. No processo de produção do etanol de segunda geração, são necessárias as

etapas adicionais de pré-tratamento e hidrólise da biomassa, que por sua vez, são responsáveis pela disponibilização do açúcar fermentescível consumido na etapa de fermentação.

A Figura 2 apresenta o esquema de produção do etanol de segunda geração:

Figura 2 - Etapas da produção de etanol de segunda geração.



Fonte: UNICA (2022).

Por ser um processo mais caro, devido às etapas adicionais, são necessários estudos voltados para a produção do etanol de segunda geração para torná-lo viável (MORAIS et al., 2017).

### 2.3.1 Pré-tratamento

A associação dos componentes dos materiais lignocelulósicos dificultam o acesso aos

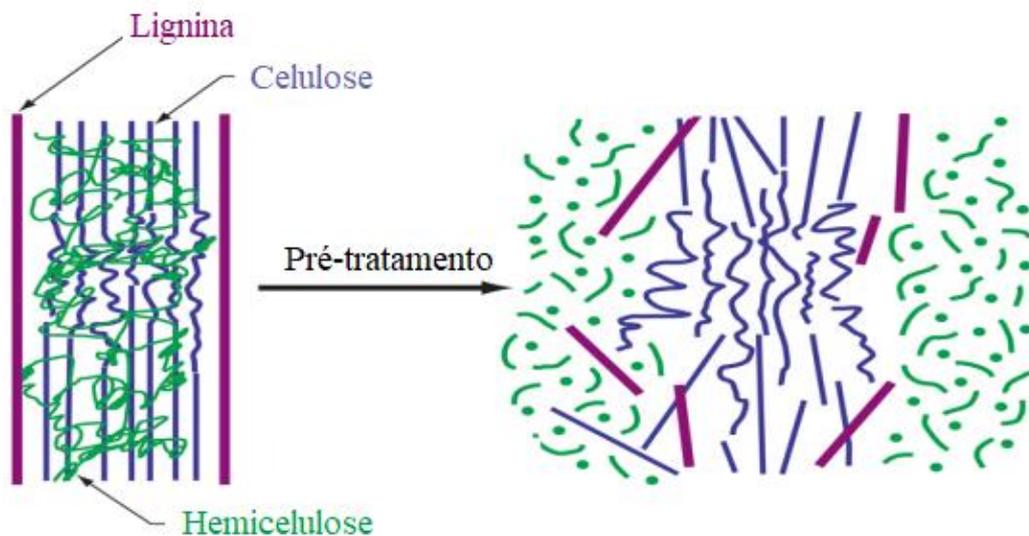
açúcares fermentescíveis. Deste modo, o pré-tratamento da biomassa tem como objetivo desconstruir a estrutura lignocelulósica e aumentar a acessibilidade da enzima, melhorando a digestibilidade da celulose. A eficiência desta etapa é determinante para as etapas seguintes do processo, impactando diretamente no custo final de produção (ALVIRA et al., 2010; KONAN et al., 2022).

Diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes características físico-químicas, e cada pré-tratamento tem um efeito próprio na fração de celulose, hemicelulose e lignina, de forma que a escolha do método e das condições do pré-tratamento deve ser feita de acordo com a configuração do processo selecionado para as etapas subsequentes de hidrólise e fermentação (ALVIRA et al., 2010).

Os pré-tratamentos podem ser classificados em químico, físico, biológico e a combinação entre eles. O tratamento físico aumenta a área da superfície através da redução do tamanho da biomassa, enquanto os métodos físico-químicos requerem um alto controle das condições de operação, por ocorrerem a alta temperatura e pressão. Os métodos químicos, por sua vez, degradam a hemicelulose ou removem a lignina, causando o afrouxamento da rede estrutural lignocelulósica. Por fim, os pré-tratamentos biológicos são usados para deslignificar a biomassa, porém, apresentam maiores tempos de reação e podem causar a perda de uma grande quantidade de carboidratos (CANILHA et al., 2012).

A Figura 3 ilustra o efeito do pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos:

Figura 3 - Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Silva (2017).

### 2.3.1.1 Explosão a vapor

Explosão a vapor é o pré-tratamento físico-químico mais empregado para materiais lignocelulósicos. Neste processo, a biomassa é submetida ao vapor pressurizado por um período de tempo, que varia de segundos a minutos, e, em seguida, é despressurizada repentinamente, resultando em uma rápida mudança de temperatura, que é responsável pela ruptura das ligações da celulose, hemicelulose e lignina. (ALVIRA et al., 2010).

Este pré-tratamento combina os efeitos químicos e forças mecânicas, compreendidos respectivamente pela auto-hidrólise da hemicelulose e redução repentina da pressão. A auto-hidrólise pode ser entendida como a quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose e consequente formação do ácido acético, devido às altas temperaturas empregadas no processo. Por outro lado, durante a descompressão, a estrutura lignocelulósica é rompida devido a brusca evaporação da umidade presente nas fibras (ALVIRA et al., 2010; MONTAGNER, 2019).

A combinação dessas duas etapas resulta na redução do tamanho das partículas da biomassa e na solubilização de hemicelulose, gerando uma corrente líquida rica neste polissacarídeo e uma corrente sólida constituída substancialmente por celulose e lignina. Conseqüentemente, ocorre o aumento da exposição da superfície da celulose e a acessibilidade da enzima sobre a mesma (ALVIRA et al., 2010; GONÇALVES, 2019; MONTAGNER, 2019).

A eficiência deste pré-tratamento está relacionada com as condições do processo, como temperatura, tamanho inicial da partícula, teor de umidade e tempo de tratamento. Seu rendimento pode ainda ser aumentado pelo uso de catalisadores, que geram, porém, produtos de degradação, tornando necessária a etapa de neutralização pós-tratamento (GONÇALVES, 2019; MONTAGNER, 2019). De acordo com Corrêa (2016), os dados da literatura mais utilizados para pressão variam de 13 a 17 kg<sub>f</sub>.cm<sup>-2</sup>, enquanto a temperatura pode ir de 190°C a 205°C. Dependendo do substrato e das condições operacionais utilizadas, este processo pode solubilizar de 75 a 90% da hemicelulose, oportunizando o acesso das enzimas à celulose.

### 2.3.1.2 Hidrotérmico

Conforme citado por Maione (2019), este pré-tratamento é um dos mais antigos aplicados industrialmente e não necessita de reagentes perigosos ou de alto custo, apenas de água à altas temperaturas (160 a 230 °C) e pressão, já que nessas condições a água se

comporta como um solvente. Reatores de alto custo também não são necessários, visto que o processo não opera a pressões tão elevadas e a liberação de vapor é lenta.

O processo tem ação de solubilização da hemicelulose, pois este elemento possui maior solubilidade em água quando comparada aos outros componentes do material. Conseqüentemente, é observada a quebra de cristalinidade da estrutura lignocelulósica. Dessa forma, o pré-tratamento hidrotérmico melhora a digestibilidade da enzima na biomassa e pode remover 80% da hemicelulose presente (MOSIER et al., 2005).

O trabalho de Souza (2016) avaliou o pré-tratamento na palha de cana-de-açúcar nas condições de 170 °C e 220 °C a 5 min e 15 min, e 195 °C a 10 min. O melhor resultado obtido foi da amostra pré-tratada à 195 °C por 10 min, apresentando a remoção de 85,58% de hemicelulose.

Santos et al. (2014b) analisaram a influência da temperatura (°C), tempo (min) e relação palha/água (%) no pré-tratamento, sendo estas de 170, 190 e 210 °C; 5, 10 e 15 minutos e 10, 12,5 e 15% de palha em 200 mL de água, valores definidos com base na literatura. A maior liberação de glicose foi verificada nos ensaios de 190 e 210 °C, apresentando valores próximos a 100%, o que comprova a eficiência e potencial do pré-tratamento.

### **2.3.1.3 Alcalino**

Quando comparado a outros métodos, o pré-tratamento alcalino exige temperaturas e pressões mais amenas. Apesar de poder ser realizado em condições ambientes, o processo teria duração de horas ou dias, exigindo um longo tempo de reação. Ainda que requeira um maior tempo, este método remove a lignina sem degradar outros componentes, se comparado ao pré-tratamento ácido, por exemplo (MOSIER et al., 2005; NASCIMENTO, 2011).

Neste pré-tratamento, a base age indiretamente como um agente de inchamento, enquanto a água é o reagente de quebra. A partir do inchamento, a superfície da biomassa é aumentada e proporciona maior abertura da estrutura, permitindo a transferência de água para dentro do material, que por sua vez, rompe a ligação de hidrogênio entre a hemicelulose e a lignina-carboidrato, causando a diminuição da cristalinidade e ruptura da lignina através da quebra das ligações aril-éter. Seu rendimento está diretamente ligado ao teor de lignina presente na biomassa (BALAT et al., 2008; NASCIMENTO, 2011).

Diversos agentes alcalinos podem ser utilizados para este tratamento, como o hidróxido de sódio (NaOH), de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>), de amônio (NH<sub>4</sub>OH) e de potássio (KOH).

Dentre eles, o hidróxido de sódio é o mais utilizado, porém, o hidróxido de cálcio, conhecido como cal, possui menor custo, é mais seguro, facilmente recuperado do hidrolisado por reação com CO<sub>2</sub> e tem se mostrado efetivo como um agente de pré-tratamento (ALVIRA et al., 2010; MOSIER et al., 2005; RODRIGUES et al., 2017).

#### **2.3.1.4 Moagem**

A moagem tem como objetivo aumentar a área de contato e o tamanho dos poros, reduzindo o tamanho da partícula e a cristalinidade do material lignocelulósico, melhorando a digestibilidade da enzima sem formar produtos de degradação. Diferentes processos de moagem podem ser utilizados para melhorar a hidrólise enzimática, dentre eles estão a moagem de bolas, moagem de rolos e a moagem de martelos, sendo que cada equipamento possui um diferente princípio de funcionamento (ALVIRA et al., 2010).

Silva et al. (2010) estudaram o efeito do tratamento mecânico do bagaço e da palha de cana-de-açúcar pelas técnicas de moagem de bolas e moagem a disco úmido, avaliando as propriedades físicas e suscetibilidade à hidrólise enzimática e fermentação após o tratamento. Foi observado que a moagem de bolas melhorou a hidrólise enzimática diminuindo a cristalinidade da biomassa, enquanto a moagem a disco úmido apontou um efeito de desfibrilação, que favoreceu a conversão enzimática.

Apesar de não utilizar produtos químicos e impactar positivamente nos processos subsequentes, a moagem possui um alto custo quando comparada a outras alternativas, já que exige um alto consumo energético relacionado a quantidade de passagens da biomassa pelo moinho, quantidade de ciclos e tempo de operação. Por outro lado, os pré-tratamentos físico-mecânicos associados a outros tipos de pré-tratamento podem favorecer a viabilidade do processo (MORAES, 2018).

#### **2.3.1.5 Ácido**

Este pré-tratamento químico pode ser realizado através da utilização de ácidos diluídos ou concentrados, e visa a solubilização da hemicelulose através da hidrólise deste polissacarídeo, a partir de ácidos inorgânicos que atuam como catalisadores. Diversos ácidos podem ser utilizados para este tratamento, como o sulfúrico, fosfórico e nítrico, no entanto, o ácido sulfúrico é o mais utilizado por ter elevada reatividade e baixo custo (CANILHA et al., 2012; CARLI, 2011; WYMAN et al., 2005).

Dos variados tipos de pré-tratamentos, o com ácido diluído é um dos mais estudados e amplamente utilizados, podendo chegar a 95% de recuperação dos açúcares hemicelulósicos, dependendo do substrato e condições operacionais utilizadas (BALAT et al., 2008). Ainda que tenha rendimentos satisfatórios e utilize menos reagente, este tratamento exige maiores temperaturas e pressões quando comparado ao ácido concentrado. O uso de ácidos concentrados, por sua vez, implica no alto gasto com o reagente, diminuição do tempo de vida dos equipamentos devido à corrosão, formação de compostos inibidores pela degradação dos carboidratos e necessidade da neutralização da biomassa antes da fermentação (CANILHA et al., 2012; WYMAN et al., 2005).

Moraes (2018) descreve alternativas para contornar as desvantagens do uso de ácidos concentrados na etapa de pré-tratamento da biomassa. Uma delas é a realização de um processo de duas etapas com o uso de ácido sulfúrico, na qual na primeira etapa é utilizado o ácido concentrado (70 %) em temperatura amena (40 °C) e tem o objetivo de hidrolisar a hemicelulose e diminuir a cristalinidade da celulose, enquanto na segunda etapa ocorre a adição de água quente (90 °C), diluindo o ácido até 30 %, e essa temperatura é mantida a fim de hidrolisar a celulose. O ácido utilizado no processo é recuperado a partir de uma coluna de troca iônica e reutilizado nos processos subsequentes. Ressalta-se que a viabilidade dos novos métodos ainda é estudada para a aplicação em biorrefinarias.

### **2.3.2 Hidrólise**

A estrutura morfológica da biomassa lignocelulósica é complexa e impacta diretamente na conversão deste material em etanol de segunda geração. Diante disso, é necessário modificar a disposição dos componentes lignocelulósicos, a fim de se obter um maior rendimento na etapa de fermentação da biomassa. Após o pré-tratamento, é realizada a hidrólise, que consiste na quebra dos polissacarídeos que constituem o material em açúcares fermentescíveis, na presença da água. O processo de hidrólise pode ocorrer via enzimática ou ácida, que por sua vez pode ocorrer através da utilização de ácido concentrado ou diluído (CORRÊA, 2016; CORTEZ et al., 2010).

#### **2.3.2.1 Hidrólise ácida**

A hidrólise ácida pode ser realizada a partir do ácido concentrado ou diluído, e hidrolisa as frações de celulose e hemicelulose presentes na biomassa. Normalmente o ácido

sulfúrico é utilizado, porém outras soluções de ácidos minerais fortes podem ser empregadas. Independente do ácido e concentração utilizados, a hidrólise ácida promove a formação de compostos tóxicos e inibidores para as seguintes etapas do processo (FURLONG, 2019; GONÇALVES, 2019).

O tratamento com ácido concentrado viabiliza uma rápida e completa conversão dos polissacarídeos em monômeros, com pouca formação de produtos de degradação e ocorre a baixas temperaturas e pressões, o que minimiza a degradação dos açúcares. Contudo, o processo com ácido concentrado apresenta um alto consumo de reagente e energia para a recuperação dos ácidos, além de deixar os equipamentos mais suscetíveis à corrosão (SOUSA, 2014).

A realização da hidrólise com ácido diluído ocorre em duas etapas a fim de maximizar as condições de hidrólise para a celulose e hemicelulose. No primeiro estágio, que ocorre a condições mais brandas, a hemicelulose é removida, enquanto no segundo estágio, que exige condições mais severas, a fração celulósica, mais resistente, é hidrolisada. O emprego de altas temperaturas na segunda etapa acarreta na degradação de uma expressiva quantidade de açúcares, resultando na inibição durante a etapa de fermentação (GONÇALVES, 2019).

### **2.3.2.2 Hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática é caracterizada pela adição de enzimas à biomassa pré-tratada e visa converter os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Este tipo de hidrólise é mais seletiva quando comparada à hidrólise ácida, devido à alta especificidade das enzimas e apesar de ser um processo relativamente lento, pela complexidade estrutural do substrato, apresenta um maior potencial para desenvolvimento, além de não apresentar problemas de corrosão dos equipamentos (CARLI, 2011; CARVALHO et al., 2020; GONÇALVES, 2019; PRATTO, 2015).

Alguns fatores afetam a eficiência da hidrólise enzimática, como o tipo de substrato e pré-tratamento utilizado; inibição da atividade enzimática pelo produto; temperatura e pH; concentração da enzima e do substrato; duração do processo e até mesmo a taxa de agitação. O tempo de duração desta etapa, por sua vez, está relacionado à eficiência de conversão das enzimas, deste modo, quanto maior o tempo da hidrólise, maior a taxa de conversão (CARLI, 2011; CARVALHO et al., 2020).

Mesmo que apresente vantagens e que o custo das enzimas tenha reduzido consideravelmente devido ao avanço da tecnologia, a hidrólise enzimática contribui

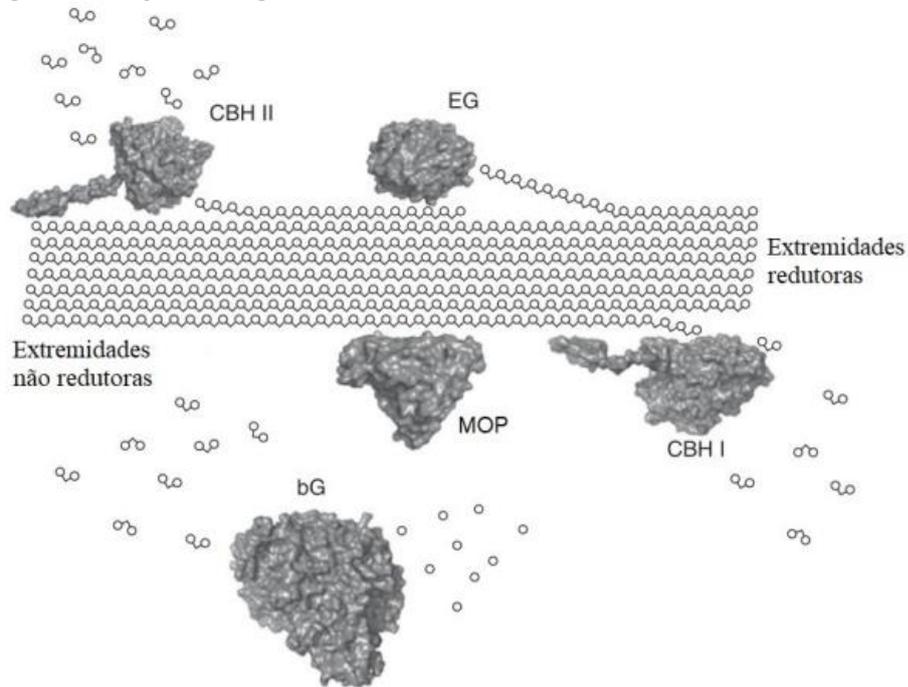
signitivamente para o custo de produção do etanol de segunda geração, de forma que sua aplicação em larga escala ainda apresenta dificuldades técnicas e econômicas. Além do alto custo da enzima, o processo demanda um alto consumo energético em virtude da necessidade de agitação e aquecimento do meio, por um longo período de tempo, e está sujeito à contaminação (GONÇALVES, 2019; GUPTA et al., 2012; NETO, 2016).

A hidrólise da celulose ocorre através da adição da enzima celulase, um complexo enzimático altamente específico, composto por três classes principais:

- Endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EG): agem no interior da cadeia de celulose, formando polissacarídeos de menor comprimento;
- Celobiohidrolases (CBH) ou exo-1,4- $\beta$ -glucanases: atuam no exterior da cadeia de celulose, liberando  $\beta$ -celobiose (dissacarídeos) por meio da degradação de oligômeros. Estas são subdivididas em celobiohidrolases I e II, sendo responsáveis, respectivamente, pela hidrólise dos terminais redutores e não redutores da celulose cristalina;
- $\beta$ -glicosidases (BGL): promovem a quebra de dissacarídeos, formando a glicose.

O complexo é adicionado ao meio reacional em condições amenas, com pH entre 4 e 5 e temperatura entre 40 e 50 °C, devido às enzimas serem organismos mesófilos. Deste modo, as enzimas agem em sinergia e atuam como um catalisador, hidrolisando as cadeias de celulose em monômeros de glicose (CORRÊA, 2016; GONÇALVES, 2019; NETO, 2016; PAULA, 2020; PRATTO, 2015). A Figura 4 exibe a representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose:

Figura 4 - Ação sinérgica das enzimas celulase na hidrólise da celulose.



Fonte: Paula (2020).

As monooxigenases de polissacarídeos (MOP), representadas na Figura 4, inserem oxigênio molecular nas ligações de carbono-hidrogênio adjacentes às ligações glicosídicas, enfraquecendo a ligação e levando à separação, porém, a adição deste grupo é nova e seu mecanismo de reação ainda é debatido (PAULA, 2020).

### 2.3.3 Fermentação

A fermentação é um processo biológico que visa a formação de produtos de interesse comercial, como o etanol de segunda geração. Após os polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica serem hidrolisados, os monossacarídeos ficam disponíveis para a fermentação por microrganismos. Este processo pode ser realizado sozinho ou simultaneamente com a hidrólise (CARLI, 2011; FURLONG, 2019).

O processo SHF (*Separated Enzymatic hydrolysis and fermentation*) divide a etapa da hidrólise da celulose da fermentação do hidrolisado em etapas separadas. Isso permite que cada etapa seja realizada nas condições ótimas de pH e temperatura, o que é uma grande vantagem. A hidrólise é conduzida a uma temperatura entre 40 e 50 °C e a fermentação entre 30 e 37 °C. No entanto, a principal desvantagem desta abordagem é a inibição causada pela celobiose (CARLI, 2011).

No processo SSF (*Saccharification with a simultaneous fermentation*), a hidrólise e a fermentação ocorrem simultaneamente, portanto, as enzimas produzem glicose e esta é rapidamente consumida pelo microrganismo encarregado pela fermentação. As vantagens deste método se dão pela minimização da inibição da celobiose e glicose, devido a baixa concentração desses componentes e pelo menor risco de contaminação apresentado, em virtude da presença de etanol no meio. Encontrar as condições ideais para este processo, principalmente de pH e temperatura, é a principal dificuldade para a viabilidade de sua aplicação (CARLI, 2011; GONÇALVES, 2019).

As leveduras são o tipo de microrganismo mais comumente utilizado no processo de fermentação, e dentre elas, a *Saccharomyces cerevisiae* é a preferida para a fermentação alcoólica. Esta levedura pode crescer tanto em açúcares simples, como a glicose, quanto no dissacarídeo sacarose. Além disso, a *S. cerevisiae* tem alta resistência ao etanol, é capaz de consumir grandes quantidades de substrato em condições adversas e é resistente aos inibidores presentes no meio, o que a torna o microrganismo mais desejado para a produção de etanol. Em contrapartida, esta levedura não é capaz de assimilar açúcares de pentoses, tornando necessário o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados para aumentar a eficiência e ampliar a utilização de substratos (CANILHA et al., 2012; GONÇALVES, 2019).

### **2.3.4 Destilação**

Após fermentação, o etanol produzido se encontra diluído no vinho fermentado, com concentração entre 7 a 10 °GL, portanto, o álcool deve ser recuperado através de algum mecanismo de separação. A destilação é o processo mais empregado nas indústrias, porém, o processo de separação convencional de destilação não é eficiente para a separação do etanol e da água, por estes não formarem uma mistura ideal. O processo de destilação se baseia na diferença de volatilidade dos componentes, e a existência de um azeótropo não permite que a mistura seja separada completamente em uma única coluna de destilação, por esse motivo, a purificação do etanol ocorre em três etapas: destilação, retificação e desidratação, dependendo do produto final desejado (CANILHA et al., 2012; GONÇALVES, 2019; LOPES, 2011).

A destilação e a retificação resultam em uma solução altamente concentrada de etanol, e dão origem ao etanol hidratado, com concentração de aproximadamente 96 °GL. Por fim, para a obtenção do etanol anidro, é necessário desidratar a mistura, em uma terceira etapa, que

pode ser realizada por diversos métodos, e possui a concentração final acima de 99% (CANILHA et al., 2012; LOPES, 2011).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

Para a execução dos experimentos, foram utilizados: o bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino; e o bagaço de malte com pré-tratamento físico (moagem) e alcalino.

O bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de explosão a vapor foi gentilmente concedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC – Piracicaba, SP).

O bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico foi doado *in natura* pela Usina Ipiranga – Descalvado, SP, e foi utilizado no trabalho de Corrêa (2016), onde recebeu o pré-tratamento citado.

O bagaço de malte foi fornecido pela Cervejaria Joia Mesquita, localizada no município de Lavras, MG, sem nenhum tipo de pré-tratamento.

O complexo enzimático comercial Cellic Ctec 2, utilizado nos ensaios de hidrólise enzimática, foi cedido pela Novozymes Latin America – Araucária, PR.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Pré-tratamento**

###### **3.2.1.1 Explosão a vapor**

Como mencionado, o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor foi cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira de Piracicaba, SP, e submetido à hidrólise enzimática no presente trabalho. O pré-tratamento foi realizado à pressão de  $17 \text{ kg}_f \cdot \text{cm}^{-2}$  e temperatura de  $205 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos (CORRÊA, 2016).

###### **3.2.1.2 Hidrotérmico**

O bagaço de cana-de-açúcar doado *in natura* pela Usina Ipiranga – Descalvado, SP, foi pré-tratado por Corrêa (2016) e submetido à hidrólise enzimática no presente trabalho. O material lignocelulósico, previamente moído em um micro moinho de facas (Willye, modelo SP - 30) de granulometria 2 mm, foi misturado com água na proporção de 1:10 (m/m) em um

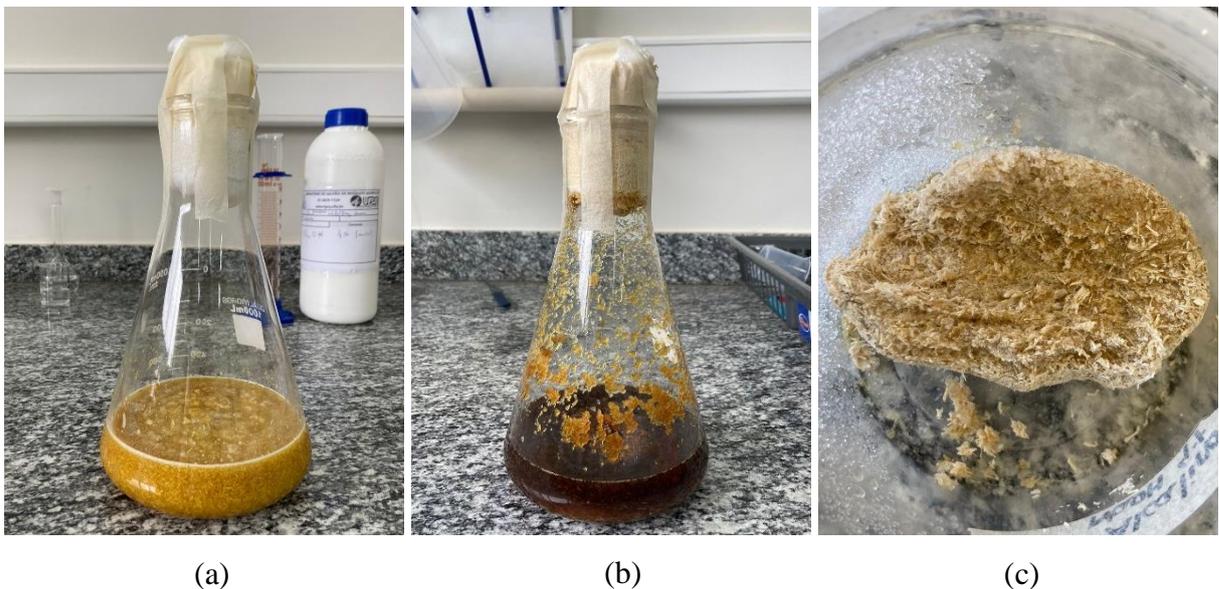
reator de aço inoxidável (Parr Instruments Company, modelo 4584), que conta com o controle de temperatura e agitação. O processo ocorreu à pressão máxima de aproximadamente  $12 \text{ kg}_f \cdot \text{cm}^{-2}$ , temperatura de  $195 \text{ }^\circ\text{C}$  e agitação constante de 200 rpm durante 10 minutos. Após este processo, o material foi filtrado e lavado com água para remover a hemicelulose residual até atingir o pH neutro, permitindo a separação da fração sólida, que foi armazenada em freezer para posterior utilização.

### 3.2.1.3 Alcalino

O pré-tratamento alcalino foi realizado no bagaço de cana-de-açúcar e no bagaço de malte. A biomassa foi misturada com o hidróxido de sódio, na proporção 1:10 (m/v), e mantida na autoclave (Prismatec, CS-A) a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 atm por 30 minutos.

Primeiramente, foram pesados 15g de bagaço seco em um Erlenmeyer de 1000 mL e 150 mL de hidróxido de sódio, de concentração 4%, foram adicionados ao meio. A solução foi homogeneizada, o Erlenmeyer foi tampado com gaze e colocado na autoclave. Após o pré-tratamento a solução foi lavada e filtrada, e a biomassa resultante foi armazenada em freezer até a realização da hidrólise enzimática.

Figura 5 - Pré-tratamento alcalino (a) Bagaço misturado ao NaOH (b) Bagaço após a autoclave (c) Bagaço após a filtração.



Fonte: Do autor (2023).

### 3.2.1.4 Físico (moagem)

O bagaço de malte foi moído no moinho de facas tipo Willey (DeLeo, EDB-5) e foi utilizada uma peneira de granulometria 2 mm para padronizar as dimensões do produto.

### 3.2.2 Atividade enzimática

A atividade do complexo enzimático foi determinada conforme a metodologia proposta por Ghose (1987) no trabalho de Corrêa (2016).

### 3.2.3 Determinação da umidade

A umidade da biomassa deve ser medida a fim de garantir que a carga de sólidos seja respeitada na hidrólise enzimática. No presente trabalho a carga de sólidos utilizada foi de 10 % (m/v) para o meio reacional de 50 mL, portanto, foram pesadas 5 g de bagaço em base seca para cada meio reacional preparado. A determinação da umidade dos bagaços de cana-de-açúcar e de malte foi realizada em uma balança de determinação de umidade no modo automático (Weblaborsp, i-Thermo 163L). Para isso, aproximadamente 1g de bagaço úmido foi colocado na balança e esperou-se até que a amostra fosse seca, ou seja, até a massa se manter constante, e sua umidade fosse determinada. Na Figura 6 é possível observar a balança de determinação de umidade automática utilizada (a), assim como a biomassa seca após o procedimento (b).

Figura 6 - Determinação da umidade dos bagaços (a) Balança de determinação de umidade (b) Bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico seco.



(a)



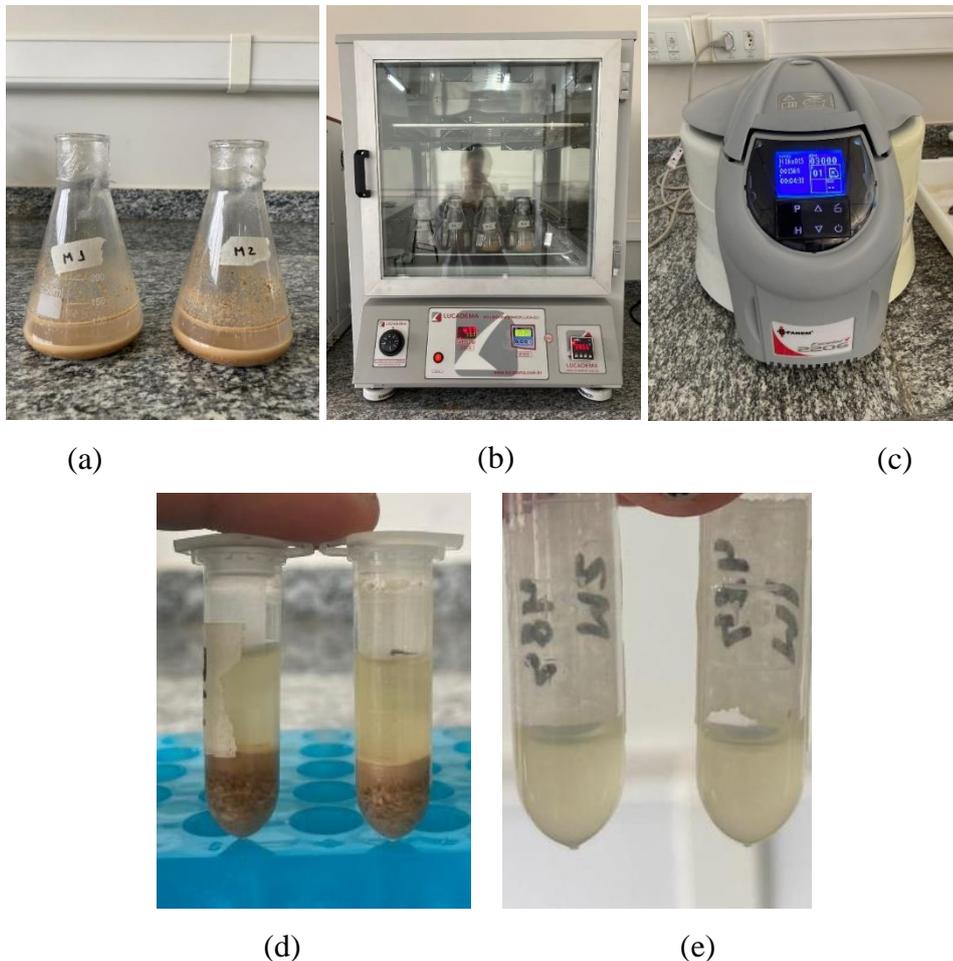
(b)

Fonte: Do autor (2023).

### 3.2.4 Hidrólise enzimática

Para a realização da hidrólise enzimática, o meio reacional, de volume 50 mL, foi preparado em um Erlenmeyer de 250 mL. Nele foram colocados 5g de bagaço seco (correspondente a 10% m/v), a quantidade de enzima correspondente a 10 FPU/g<sub>BAGAÇO</sub>, o equivalente a 0,20 mL, e o restante da solução foi completada com tampão citrato 0,05 mol/L, a fim de manter o pH do meio em 4,8. O Erlenmeyer foi então tampado com filme plástico e colocado na incubadora *shaker* (Lucadema, LUCA-223), à 50°C e 150 rpm durante 48h. Foram retiradas alíquotas de aproximadamente 1,5 mL do meio reacional nos tempos de 2, 4, 6, 8, 24, 30 e 48h. Essas alíquotas foram centrifugadas, em uma centrífuga (Excelsa®, i2206), a 3000 rpm por 5 minutos, e 0,5 mL do sobrenadante foram coletados e armazenados em freezer, com o objetivo de inativar a enzima até a quantificação de glicose ser realizada no espectrofotômetro. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 7 - Hidrólise enzimática (a) Meio reacional do bagaço de malte com pré-tratamento físico; (b) Meio reacional na incubadora shaker Lucadema; (c) Centrífuga Excelsa® (d) Amostra centrifugada; (e) Fase sobrenadante coletada.



Fonte: Do autor (2023).

### 3.2.5 Quantificação de açúcares redutores

O procedimento experimental utilizado para a quantificação de açúcares redutores seguiu o método DNS, proposto por Vasconcelos et al. (2013). O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reage com os açúcares redutores presentes no meio, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto colorido que pode ser detectado e quantificado por espectrofotometria. A leitura da glicose no espectrofotômetro ocorre por meio da medida da absorbância da solução na faixa de comprimento de onda de 540 nm. Quando esta solução é submetida à luz, alguns comprimentos de onda são absorvidos pelo composto, e a absorbância da solução é proporcional à concentração de glicose presente na amostra. Segundo Miller (1959), o método DNS tem alta sensibilidade e esta técnica é amplamente utilizada em estudos bioquímicos e em processos industriais.

Para relacionar a absorbância lida com a concentração de glicose, em g/L, torna-se necessário a utilização da curva padrão de glicose, construída através da medição da absorbância de diferentes soluções de glicose em diferentes concentrações.

A fase sobrenadante proveniente da hidrólise enzimática foi descongelada, homogeneizada no Agitador Vórtex VX-28 e adicionada, junto ao DNS na proporção 1:1 (v/v), a um tubo de ensaio. O tubo foi levado ao banho maria à 100°C por 5 minutos. O volume da alíquota coletado depende da diluição necessária para a leitura no espectrofotômetro, já que esta não pode extrapolar a unidade. A quantidade de DNS é fixada em 1000 µL, portanto, para uma diluição de 10x, por exemplo, deve-se adicionar ao tubo de ensaio 100 µL da amostra, 900 µL de água e 1000 µL do ácido.

Após o banho maria, o tubo de ensaio foi resfriado por 5 minutos e foram adicionados 10 mL de água destilada. A amostra foi levada ao espectrofotômetro (BEL Photonics, V-M5) e sua absorbância foi medida a um comprimento de onda de 540 nm. Por fim, a absorbância lida foi relacionada com a concentração de glicose através da equação da reta obtida pela curva padrão de glicose.

#### 3.2.5.1 Preparo do reagente 3,5-dinitrosalicílico (Método DNS)

O reagente DNS foi preparado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras seguindo a metodologia proposta por Vasconcelos et al. (2013). Foi preparado um volume final de 1 L de solução, para isso, 10 g do ácido 3,5-dinitrosalicílico foram adicionados à 200 mL de uma

solução de hidróxido de sódio de concentração 2 mol/L (solução A). Paralelamente, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 500 mL de água destilada (solução B) em constante aquecimento e agitação. Ainda nessas condições, as soluções A e B foram misturadas até a completa dissolução do DNS. Após o resfriamento, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e teve seu volume completado com água destilada. A solução foi armazenada em um frasco de vidro âmbar e mantida em um refrigerador.

### **3.2.5.2 Curva padrão de glicose**

A curva padrão relaciona os valores de absorvância com a concentração de glicose presente na solução analisada. Para a construção da curva, deve-se preparar soluções de glicose com diferentes concentrações e realizar o procedimento descrito pelo método do DNS, proposto por Vasconcelos et al. (2013), previamente detalhado no tópico acima. Após a obtenção dos dados de absorvância para cada solução, ajusta-se uma reta que permite relacionar a concentração de glicose de uma amostra mediante a leitura de sua absorvância no espectrofotômetro.

No presente trabalho, a curva padrão foi obtida a partir de dados coletados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica, onde cinco balões volumétricos de 100 mL foram separados e nomeados de acordo com sua respectiva concentração, sendo elas de 1, 0,8, 0,6, 0,4 e 0,2 gramas de glicose por litro de solução. Para isso, 0,1 g, 0,08 g, 0,06 g, 0,04 g e 0,02g de glicose foram pesadas e adicionadas aos seus respectivos balões volumétricos, que tiveram seus volumes completados com água destilada. Para a calibração do espectrofotômetro, futuramente utilizado, uma amostra de calibração (branco) foi preparada adicionando-se água destilada ao invés da solução de glicose.

Posteriormente, em tubos de ensaio foram adicionados a solução de glicose e o reagente DNS na proporção 1:1, sendo 1 mL da solução e 1 mL do reagente. Os tubos foram levados ao banho maria (modelo HH-S18, Warmnest) à 100 °C por 5 minutos e em seguida resfriados em água ambiente. Sequencialmente foram adicionados 10 mL de água destilada em cada tubo e as amostras tiveram sua absorvância medida em espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22) a 540 nm.

A partir dos dados de absorvância de cada amostra foi feito o ajuste da reta que relaciona a absorvância da amostra com a sua concentração de glicose.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos para as diferentes biomassas e pré-tratamentos utilizados estão apresentados a seguir. O aspecto avaliado foi a concentração final de glicose presente no hidrolisado para cada condição estudada.

### **4.1 Atividade enzimática**

A atividade do complexo enzimático obtida por Corrêa (2016) foi de 241 FPU/mL. Este resultado pode ser utilizado no presente trabalho pois foi utilizado um complexo enzimático do mesmo lote empregado pelo autor supramencionado.

### **4.2 Determinação da umidade**

O bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico apresentou uma umidade de 83,75%, enquanto o mesmo bagaço com pré-tratamento explosão a vapor, apresentou umidade de 49,51% e de 79,41% para o pré-tratamento alcalino.

O bagaço de malte com pré-tratamento físico, sendo este a moagem, apresentou uma umidade de 7,95% e de 79,96% para o pré-tratamento alcalino.

A umidade pode influenciar na eficiência da hidrólise. Segundo Pitarelo (2012), o rendimento desta etapa é afetado negativamente com o aumento da umidade da biomassa, sendo que quanto maior a umidade do substrato, mais severas são as condições do pré-tratamento para que a celulose seja totalmente hidrolisada pela ação das enzimas.

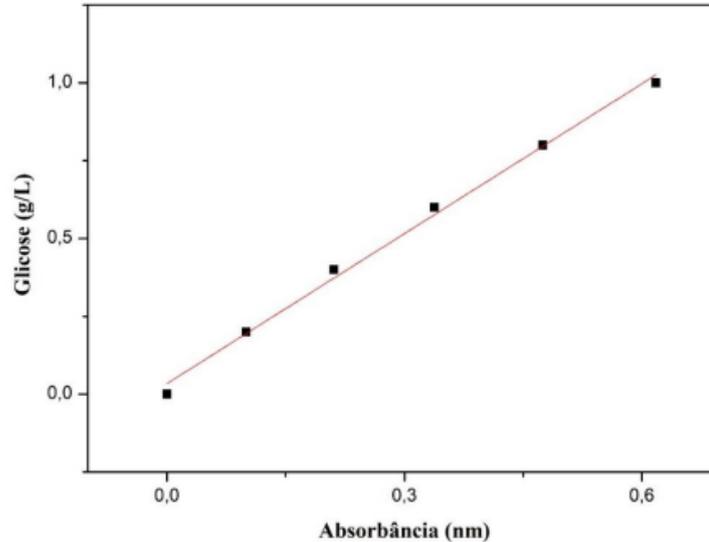
Além disso, quanto mais úmido é o material, menor é a quantidade de tampão adicionado (para manter o volume reacional em 50 mL), o que dificulta o transporte das enzimas no meio e conseqüentemente seu acesso uniforme à superfície do bagaço.

### **4.3 Curva padrão de glicose**

A partir das leituras de absorvância das soluções de glicose com diferentes concentrações, realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras, a curva característica de glicose experimental e a linearização dos dados foram feitas, obtendo-se assim a equação da

reta usada para calcular a concentração de glicose nas amostras. A Figura 8 apresenta a curva característica obtida utilizando-se o *software* OriginPro 8.

Figura 8 - Curva característica de glicose.



Fonte: Gonçalves (2019).

A Equação 1 obtida apresentou o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9943, sendo que quanto mais próximo da unidade é este valor, mais representativo é o ajuste dos dados.

$$[Glicose] = 1,6049 * ABS + 0,0341 \quad (1)$$

Sendo a concentração de glicose em g/L e *ABS* a absorvância lida.

#### 4.4 Quantificação de açúcares do hidrolisado

Os valores das concentrações de glicose encontrados durante a hidrólise, para os diferentes bagaços e pré-tratamentos estudados, estão apresentados a seguir. Todos os meios reacionais continham 10% (m/v) de carga de sólido e carga enzimática de 10 FPU/g<sub>BAGAÇO</sub>, essas condições de operação foram definidas com base no trabalho de Gonçalves (2019), que comparou os efeitos da carga de sólidos e de enzima no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor. A média e o desvio padrão relativo às medidas também estão indicados nas tabelas.

##### 4.4.1 Bagaço de cana-de-açúcar

As Tabelas 3, 4 e 5 expõe a quantificação de glicose para o bagaço de cana-de-açúcar com seus respectivos pré-tratamentos, sendo eles o hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino.

Tabela 3 - Concentração de glicose do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento hidrotérmico.

<b>Tempo (h)</b>	<b>[Glicose]<sub>1</sub> (g/L)</b>	<b>[Glicose]<sub>2</sub> (g/L)</b>	<b>Média (g/L)</b>	<b>Desvio</b>
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	8,333	9,312	8,823	0,692
4	11,543	12,618	12,081	0,760
6	14,047	14,512	14,280	0,329
8	15,475	14,785	15,130	0,488
24	23,985	26,842	25,414	2,020
30	27,741	27,741	27,741	0,000
48	29,346	29,346	29,346	0,000

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 4 - Concentração de glicose do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento explosão a vapor.

<b>Tempo (h)</b>	<b>[Glicose]<sub>1</sub> (g/L)</b>	<b>[Glicose]<sub>2</sub> (g/L)</b>	<b>Média (g/L)</b>	<b>Desvio</b>
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	37,334	41,426	39,380	2,894
4	43,753	43,914	43,834	0,113
6	46,482	48,006	47,244	1,078
8	48,969	46,482	47,726	1,759
24	65,179	65,420	65,299	0,170
30	64,697	66,703	65,700	1,419
48	70,314	69,191	69,753	0,794

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 5 - Concentração de glicose do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento alcalino.

<b>Tempo (h)</b>	<b>[Glicose]<sub>1</sub> (g/L)</b>	<b>[Glicose]<sub>2</sub> (g/L)</b>	<b>Média (g/L)</b>	<b>Desvio</b>
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	22,328	14,063	18,195	5,844
4	23,050	25,137	24,093	1,475
6	39,661	38,858	39,260	0,567
8	51,056	41,828	46,442	6,525
24	62,450	65,179	63,815	1,929
30	57,074	70,234	63,654	9,306
48	75,951	90,556	83,254	10,327

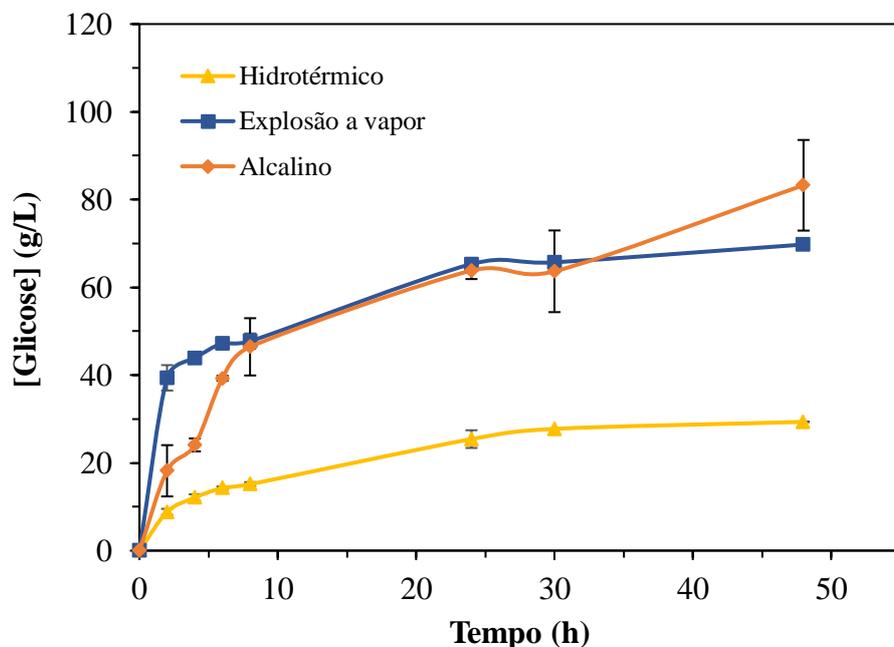
Fonte: Do autor (2023).

A determinação da concentração de glicose em cada ponto foi realizada utilizando a Equação 1, obtida a partir da curva padrão de glicose. Para que os valores de absorvância ficassem dentro da faixa estabelecida pela curva padrão de glicose, as amostras foram diluídas antes da leitura no espectrofotômetro e os valores de concentração encontrados através da Equação 1 foram corrigidos de acordo com a diluição utilizada.

Foram aplicadas as diluições de 10 vezes para o BCA (Bagaço de cana-de-açúcar) com pré-tratamento hidrotérmico e 50 vezes para as demais amostras (BCA com pré-tratamento explosão a vapor e alcalino). Mesmo que os ensaios tenham sido realizados em duplicata, a fim de reduzir os erros experimentais, alguns pontos apresentaram um alto desvio padrão, que pode ser justificado pela sensibilidade do método DNS, visto que foram trabalhados volumes muito pequenos, na ordem de 20 a 100  $\mu\text{L}$  de amostra, devido às diluições utilizadas. Ainda nesse contexto, pequenos erros experimentais, como a permanência de gotas de amostra ou água na parede dos tubos de ensaio, afetam a quantificação.

A partir da análise das Tabelas 3, 4 e 5 é possível inferir que todas as condições estudadas apresentaram o aumento da concentração de glicose ao longo do tempo de reação, sendo o crescimento mais expressivo observado nas primeiras 8 horas de hidrólise. Tal comportamento pode ser melhor observado na Figura 9, que exhibe os perfis de concentração de glicose em função do tempo de hidrólise para o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos. As barras nas curvas representam o desvio padrão associado a cada medida.

Figura 9 - Perfil de concentração de glicose (g/L) em função do tempo de hidrólise para o bagaço de cana-de-açúcar com os pré-tratamentos hidrotérmico, explosão a vapor e alcalino.



Fonte: Do autor (2023).

Após 48 horas de reação, o hidrolisado com pré-tratamento alcalino apresentou o melhor resultado quando comparado aos outros pré-tratamentos estudados, alcançando 83,245

$\pm 10,327$  g/L de glicose contra os  $29,346 \pm 0,000$  g/L e  $69,753 \pm 0,794$  g/L atingidos pelos pré-tratamentos hidrotérmico e explosão a vapor, respectivamente.

O trabalho de Nascimento (2011) avaliou a influência do tempo de pré-tratamento e a concentração de hidróxido de sódio na liberação de açúcares após a hidrólise. A concentração de glicose no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% por 30 minutos, após 72 horas de sacarificação enzimática, foi de 55,5 g/L, correspondendo a 77,1% de conversão de celulose em glicose para condições operacionais semelhantes às usadas no presente trabalho, porém com carga enzimática de 20 FPU/g<sub>BCAseco</sub>.

Resende et al. (2019) verificaram o efeito de diferentes pré-tratamentos na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar, e o melhor resultado obtido foi para o pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (4%) nas condições de temperatura e pressão de 121 °C e 1 atm, por 45 minutos.

Ambos os resultados demonstraram o aumento da concentração de glicose no meio após o pré-tratamento alcalino da biomassa.

Os pré-tratamentos hidrotérmico e explosão a vapor apresentaram um aumento lento e não significativo da concentração de glicose no meio após 24 horas de hidrólise, portanto, a reação poderia ser interrompida no tempo citado para ambos os pré-tratamentos. Para o pré-tratamento alcalino, a concentração de glicose no meio apresentou um salto no ponto de 48 horas. Tal comportamento não era esperado, visto que de acordo com a curva característica da hidrólise enzimática, o rápido aumento da concentração de glicose no meio ocorre nas primeiras horas de reação. Ainda que tenha apresentado este comportamento, a barra de desvio padrão mostra a sobreposição dos pontos de 30 e 48 horas, indicando que aparentemente estes dois pontos não se diferem.

Considerando o desvio padrão das amostras, os pré-tratamentos alcalino e explosão a vapor apresentaram concentrações finais de glicose mais próximas. Tendo isso em vista, o trabalho de Alvira et al. (2010) salienta que o processo de explosão a vapor oferece vários recursos atrativos quando comparado a outros pré-tratamentos, isso porque além de não utilizar produtos químicos, possui condições de processo menos perigosas e a recuperação completa do açúcar.

Um outro fator importante a ser abordado é o efeito da umidade da biomassa na recuperação da hidrólise. A pesquisa de Pitarello et al. (2012) aborda o efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar, e mostra que apesar do teor de umidade ter uma influência significativa na recuperação da celulose, hemicelulose e lignina no pré-tratamento, o aumento do teor de umidade apresenta

um efeito negativo nos rendimentos de hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados. No presente estudo, é possível notar que a biomassa com maior teor de umidade (que recebeu o pré-tratamento hidrotérmico) obteve a menor concentração final de glicose no hidrolisado.

#### 4.4.2 Bagaço de malte

Os resultados da quantificação de glicose para o hidrolisado de malte com os pré-tratamentos físico e alcalino estão indicados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 - Concentração de glicose do bagaço de malte com pré-tratamento físico (moagem) (Continua)

<b>Tempo (h)</b>	<b>[Glicose]<sub>1</sub> (g/L)</b>	<b>[Glicose]<sub>2</sub> (g/L)</b>	<b>Média (g/L)</b>	<b>Desvio</b>
0	0,000	0,000	0,000	0,000
2	18,306	17,744	18,025	0,397
4	19,469	20,232	19,851	0,539
6	20,312	21,074	20,693	0,539
8	21,997	22,077	22,037	0,057
24	19,590	19,068	19,329	0,369
30	20,192	21,355	20,773	0,823
48	18,627	19,550	19,088	0,653

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 7 - Concentração de glicose do bagaço de malte com pré-tratamento alcalino.

<b>Tempo (h)</b>	<b>[Glicose]<sub>1</sub> (g/L)</b>
0	0,000
2	9,810
4	9,489
6	12,137
8	8,927
24	13,501
30	11,896
48	12,057

Fonte: Do autor (2023).

A concentração de glicose dos hidrolisados do bagaço de malte também foi encontrada através da Equação 1, relativa à curva padrão de glicose. Foi necessário diluir as amostras antes da leitura no espectrofotômetro, a fim de manter os valores de absorvância dentro da faixa estabelecida pela curva padrão de glicose. Os valores de concentração obtidos pela Equação 1 foram ajustados de acordo com a diluição utilizada. Para o hidrolisado pré-tratado

fisicamente as amostras foram diluídas 25 vezes, enquanto para o pré-tratamento alcalino foi utilizada a diluição de 50 vezes.

Apenas a hidrólise do bagaço de malte com pré-tratamento físico foi realizada em duplicata devido à alta perda de material durante o pré-tratamento alcalino e ao aumento da umidade da biomassa, sendo necessária a pesagem de uma maior quantidade do material para atingir a massa necessária de bagaço em base seca.

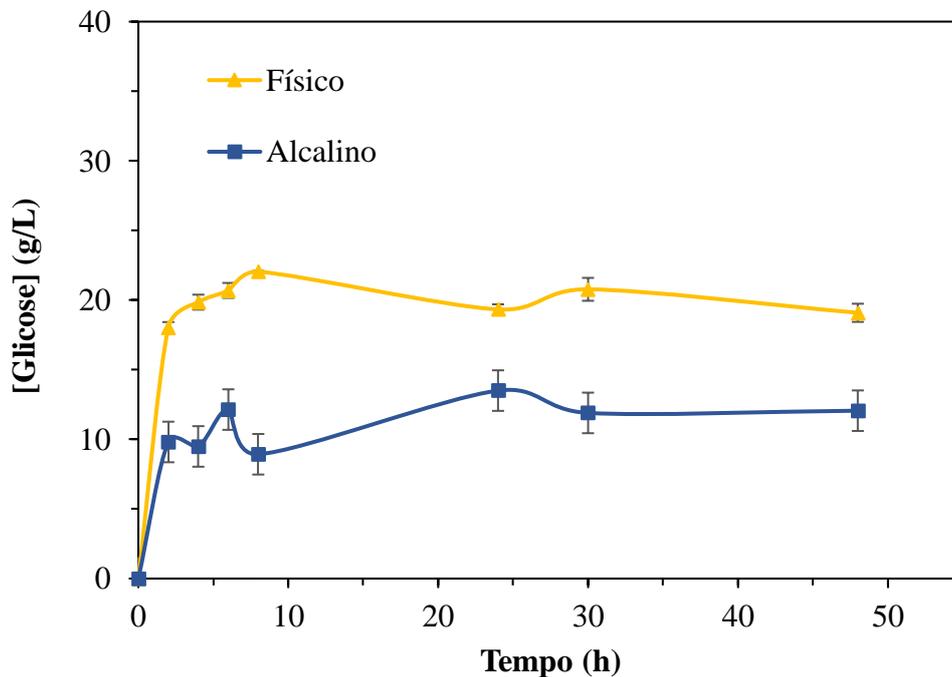
Os pontos relativos ao pré-tratamento físico apresentaram menores valores de desvio padrão quando comparados aos desvios obtidos para os ensaios do bagaço de cana-de-açúcar. Menores valores de desvio padrão indicam a proximidade dos valores medidos em duplicata, aumentando a confiabilidade dos dados. Ainda assim, pelo método DNS ser sensível e altas diluições terem sido usadas, pequenos erros experimentais podem influenciar de forma significativa a quantificação.

Após 48 h de hidrólise foram obtidas as concentrações de glicose de  $19,088 \pm 0,653$  g/L para o hidrolisado pré-tratado fisicamente, e de 12,057 g/L para o hidrolisado pré-tratado quimicamente com hidróxido de sódio. Dessa forma, o pré-tratamento alcalino não se mostrou eficiente em relação ao físico.

A Figura 10 permite a observação dos perfis de concentração de glicose em função do tempo para os hidrolisados de malte. O desvio padrão das amostras pré-tratadas fisicamente estão representados na curva relativa ao pré-tratamento citado. Para o pré-tratamento alcalino, a barra representa o intervalo de confiança a partir do teste t de Student, visto que este experimento foi realizado com uma única amostra devido ao pequeno rendimento de biomassa após o pré-tratamento e conseqüente falta de material, não sendo possível calcular o desvio padrão de cada ponto com relação à duplicata.

O intervalo de confiança é uma medida estatística que indica a faixa de valores prováveis que um parâmetro populacional pode assumir com um determinado nível de confiança, com base nas informações obtidas a partir da amostra. Quando se trata de um conjunto de dados sem duplicatas, a abordagem geralmente usada é calcular o intervalo de confiança para a média da população. Nesse contexto, o intervalo de confiança encontrado para o hidrolisado de malte com pré-tratamento alcalino, pelo teste t de Student e utilizando um nível de confiança de 95%, foi de 1,457.

Figura 10 - Perfil de concentração de glicose em g/L em função do tempo de hidrólise para o bagaço de malte com os pré-tratamentos físico (moagem) e alcalino.



Fonte: Do autor (2023).

O perfil de concentração obtido para o hidrolisado de malte com pré-tratamento físico é análogo aos perfis observados para os hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, onde a concentração de glicose aumenta rapidamente do início até aproximadamente 8 horas de reação. Após este tempo, a curva não apresenta um aumento da concentração de glicose no meio, apontando que a reação poderia ser interrompida no tempo de 8 horas.

O hidrolisado de malte com pré-tratamento alcalino apresentou um comportamento mais instável, devido ao experimento não ter sido realizado em duplicata. Ainda assim, é possível identificar o aumento da concentração de glicose no meio até 6 horas de reação. Por apresentar um aumento lento e não significativo da concentração de glicose dos tempos de 6 a 48 horas, a hidrólise poderia ser interrompida no tempo de 6h de reação.

Estudos mostram que o uso do pré-tratamento físico antes do pré-tratamento alcalino pode ser uma estratégia eficaz para melhorar os rendimentos do pré-tratamento e consequentemente aumentar o rendimento da produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de malte.

Visando a extração da polpa celulósica do bagaço de malte, Santos (2014a) realizou a análise da composição do bagaço antes e após o tratamento alcalino com NaOH 2% e proporção 1:20 (m/v). A moagem da biomassa foi realizada anteriormente ao tratamento

químico. Seus resultados indicaram que o tratamento foi capaz de remover seletivamente as frações de hemicelulose e lignina, e aumentar o teor de celulose de 22,36 para 64,43 %.

O trabalho de Abreu e Pereira (2021) estuda a obtenção do etanol de segunda geração a partir do bagaço de malte utilizando uma rota tecnológica composta pela hidrólise da fração hemicelulósica separada da hidrólise da fração celulósica. A moagem também é utilizada como pré-tratamento físico e precede a hidrólise ácida da hemicelulose, que tem como produto um líquido rico em hemicelulose e um sólido rico em celulose e lignina. Estas duas frações são separadas por prensagem e o sólido segue para a deslignificação através da hidrólise alcalina, que após uma segunda etapa de separação, segue para a hidrólise ácida que tem como objetivo reduzir os açúcares em glicose.

No caso do presente trabalho, o pré-tratamento alcalino resultou em um rendimento inferior de glicose em comparação com o pré-tratamento físico, o que não condiz com a literatura. É possível que o pré-tratamento alcalino tenha sido muito agressivo e tenha levado à degradação dos polímeros de celulose em açúcares não fermentescíveis ou que o mesmo não tenha sido suficientemente eficaz na remoção da lignina e hemicelulose do bagaço de malte.

Uma outra hipótese para este comportamento é a alta umidade da biomassa pré-tratada quimicamente. O bagaço de malte com pré-tratamento alcalino apresentou uma alta umidade (79,96%), o que, segundo Pitarelo et al. (2012), tem um impacto negativo nos rendimentos da hidrólise enzimática.

Tendo isso em vista, torna-se necessário avaliar os fatores determinantes na eficiência do pré-tratamento citado, como a concentração do agente alcalino, tempo de reação e temperatura utilizados.

#### **4.4.3 Análise estatística**

Ao realizar um ensaio experimental para comparar o hidrolisado de diferentes pré-tratamentos, é importante realizar uma análise estatística robusta que permita identificar diferenças significativas entre os grupos de dados. O teste de Tukey é uma ferramenta estatística que permite comparar vários grupos de dados e determinar quais são significativamente diferentes uns dos outros, a partir da comparação da média dos tratamentos empregados. Através deste teste é possível identificar qual pré-tratamento resultou no melhor hidrolisado, permitindo a otimização do processo de produção. Neste trabalho, o teste de Tukey foi realizado no *software* Sisvar, adotando um nível de significância de 5%.

A Tabela 8 expõe a média da concentração e glicose para cada tratamento e seu respectivo resultado de significância dentro do grupo avaliado.

Tabela 8 - Teste de Tukey para o bagaço de cana-de-açúcar.

Pré-tratamento	[Glicose] $\pm 6,045$ (g/L)	Resultado do teste
Hidrotérmico	18,974	a1
Alcalino	48,388	a2
Explosão a vapor	54,134	a2

Fonte: Do autor (2023).

O resultado do teste é interpretado de acordo com a classificação dada para cada tratamento. As letras iguais significam que os resultados não tem diferença significativa, portanto, os tratamentos alcalino e explosão a vapor tem o mesmo resultado estatístico, implicando na escolha de outros parâmetros para a diferenciação dos dois métodos, como fatores econômicos, por exemplo. Este resultado mostra que a visão estatística não enxerga apenas um resultado como o melhor, mas permite a escolha do pré-tratamento baseada na análise de outros fatores determinantes para o processo. Já o pré-tratamento hidrotérmico apresentou, de fato, o resultado menos satisfatório dentre os pré-tratamentos estudados para o bagaço de cana-de-açúcar.

Na Tabela 9 estão expostos a média da concentração de glicose e o resultado do teste de Tukey para os diferentes pré-tratamentos realizados no bagaço de malte.

Tabela 9 - Teste de Tukey para o bagaço de malte.

Pré-tratamento	[Glicose] $\pm 0,575$ (g/L)	Resultado do teste
Alcalino	11,117	a1
Físico	19,971	a2

Fonte: Do autor (2023).

A análise do resultado estatístico mostra que os pré-tratamentos realizados no bagaço de malte possuem uma diferença significativa e apontam o pré-tratamento físico como o melhor dentre os dois, reforçando que o pré-tratamento alcalino não foi eficiente para as condições analisadas.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o melhor pré-tratamento para diferentes biomassas, sendo elas o bagaço de cana-de-açúcar e o bagaço de malte, através da quantificação de glicose disponível para a fermentação após a hidrólise enzimática do material pré-tratado. As condições operacionais da hidrólise enzimática foram baseadas no trabalho de Gonçalves (2019), que estudou o efeito da carga de sólidos e enzima na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de explosão a vapor. As condições que obtiveram o melhor resultado nesta avaliação e que foram empregadas no presente trabalho são a carga enzimática de 10 FPU/g<sub>BAGAÇO</sub> e carga de sólido de 10 % (m/v).

Dentre os pré-tratamentos avaliados para o bagaço de cana-de-açúcar, apesar de o tratamento alcalino ter apresentado uma maior concentração de glicose no meio após 48 h de hidrólise, sendo esta de  $83,254 \pm 10,327$  g/L, este pré-tratamento não apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparado ao pré-tratamento explosão a vapor, que alcançou a concentração de  $69,753 \pm 0,794$  g/L. Neste caso, torna-se necessário um estudo mais detalhado do processo, levando em consideração os custos de cada pré-tratamento, assim como a viabilidade técnica de cada um.

O pré-tratamento hidrotérmico, por sua vez, apresentou o resultado menos satisfatório, chegando a  $29,346 \pm 0,000$  g/L de glicose. Esta concentração pode estar associada à alta umidade do bagaço, como estudado por Pitarelo et al. (2012).

Para o bagaço de malte, o pré-tratamento físico obteve a concentração final de  $19,088 \pm 0,653$  g/L de glicose, contra os 12,057 g/L alcançados pelo pré-tratamento alcalino. A quantidade de glicose liberada neste último processo não atingiu níveis satisfatórios para viabilizar o pré-tratamento alcalino do bagaço de malte como uma alternativa viável para a produção de etanol de segunda geração, visto que estudos recentes mostram a maior eficiência do pré-tratamento alcalino quando comparado ao pré-tratamento físico, devido à sua maior capacidade de quebrar ligações químicas mais complexas da biomassa. Fatores como a agressividade do pré-tratamento alcalino ou a insuficiência das condições operacionais empregadas podem estar relacionados com a menor concentração de glicose obtida.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biomassa lignocelulósica é uma fonte de matéria-prima renovável e abundante para a produção de etanol, biocombustível amplamente utilizado como alternativa aos combustíveis fósseis. No entanto, a produção de etanol a partir dos materiais lignocelulósicos apresenta desafios significativos, como a complexidade da estrutura lignocelulósica e a presença de compostos inibitórios que dificultam o processo de fermentação. Por isso, o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias para o pré-tratamento da biomassa e o aperfeiçoamento da hidrólise enzimática são fundamentais para tornar a produção do etanol de segunda geração uma opção viável e economicamente competitiva.

Nesse contexto, a avaliação de diferentes biomassas para a produção de E2G é importante devido à diversidade de recursos biológicos disponíveis e às variações nas características químicas e estruturais dessas biomassas. Além disso, fatores como a disponibilidade, acessibilidade e custo dos materiais são determinantes para a produção. Dessa forma, a avaliação de diferentes pré-tratamentos para diferentes biomassas é fundamental para a descoberta de alternativas viáveis para a produção do etanol celulósico e para a otimização de processos já estudados.

A partir dos resultados deste estudo, torna-se possível uma melhor compreensão acerca da influência dos diferentes pré-tratamentos na hidrólise enzimática e consequente concentração final de glicose disponível para a fermentação. Além disso, algumas biomassas podem ser abundantes em determinadas regiões, mas não em outras, e a composição química do material, que varia de acordo com a biomassa, região e outros fatores, é determinante na eficiência do pré-tratamento utilizado, reforçando a importância deste estudo.

Tendo em vista a importância dos estudos acerca das diferentes biomassas e pré-tratamentos estudados, sugere-se a avaliação de diferentes pré-tratamentos no bagaço de malte, como hidrotérmico, ácido diluído e concentrado, em diferentes condições operacionais. Com relação ao pré-tratamento alcalino, além da variação das configurações de operação, como a proporção biomassa/base, tempo de reação, temperatura e pressão, propõe-se também a secagem da biomassa pré-tratada antes da etapa de hidrólise, a fim de avaliar a influência da umidade nesta etapa. Para a avaliação dos diferentes pré-tratamentos, é sugerida a otimização a partir do planejamento estatístico e a caracterização química da biomassa antes e depois de cada procedimento.

A avaliação das cargas de sólido e enzima na hidrólise também é indicada, a fim de se encontrar as condições de disponibilização de glicose mais eficientes para esta biomassa. Por

fim, recomenda-se a realização da fermentação do melhor resultado de hidrólise obtido, a fim de quantificar o rendimento do bagaço de malte para a produção de etanol de segunda geração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. F. de.; PEREIRA, G. M. Análise da viabilidade econômica da utilização de bagaço de malte para produção de etanol 2G e querosene de aviação. 2021. 80 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

ALVIRA, P. et al. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production based on enzymatic hydrolysis: A review.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br>. Acesso em: 05 dez. 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DA CERVEJA – CERVBRAZIL. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br>. Acesso em: 02 fev. 2023.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in Bioethanol Processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. v. 34, p. 551-573, 2008.

BARBOSA, K. L. Produção de etanol 2g através de *Opuntia ficus-indica* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Energia da Biomassa) - Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Energia da Biomassa, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo. 2015.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL - BNDES; CENTRO DE GESTAO E ESTUDOS ESTRATEGICOS – CGEE. *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. 1. ed. Rio de Janeiro, 2008.

CAI, J., et al. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 76, p. 309–322, 2017.

CAMPOS, L. Combustível considerado “limpo”, etanol vira aposta das montadoras no Brasil. **A União**, João Pessoa, 09 jul. 2017. Disponível em: [https://auniao.pb.gov.br/noticias/caderno\\_diversidade/combustivel-considerado-limpo-etanol-vira-aposta-das-montadoras-no-br](https://auniao.pb.gov.br/noticias/caderno_diversidade/combustivel-considerado-limpo-etanol-vira-aposta-das-montadoras-no-br). Acesso em: 04 dez. de 2022.

CANILHA, L. et al. **Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, 15 p., 2012. DOI: 10.1155/2012/989572. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2012/989572.pdf>. Acesso em 15 dez. 2022.

CARLI, C. M. de. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G.** 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.

CARVALHO, D. J. et al. Assessment of the self-sustained energy generation of an integrated first and second generation ethanol production from sugarcane through the characterization of the hydrolysis process residues. *Energy Conversion and Management*, v. 203, 9 p., 2020.

DOI: 10.1016/j.enconman.2019.112267. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112267>. Acesso em: 23 jan. 2023.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 9, n. 3 dez. 2022.

CORRÊA, L. J. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. 2016. 131 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2016.

CORTEZ, L. A. B (Coord) et al. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2010. ISBN: 978-85-212-0531-9.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em: 27 jan. 2023.

FERNANDES, R. Avaliação da produção de etanol empregando milho como matéria-prima. 2019. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2019.

FREITAS, Y. R. de. O futuro sustentável da matriz energética brasileira: a importância e viabilidade do etanol de segunda geração no período de transição com ênfase no setor de transportes. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2022.

FURLONG, V. B. Design and automation of a new reactor for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass at high solids loading. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11542>. Acesso em: 27 jan. 2023.

GARCIA, D. Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. 2012. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo. Lorena. 2012.

GHOSE, T.K - Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59(2):257- 268, 1987.

GONÇALVES, R. Avaliação de diferentes condições operacionais na hidrólise enzimática para produção de etanol. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2019.

GUPTA, R. et al. Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, p. 16, 20 dez. 2012.

JAMBO, S. A. et al. A Review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 65, p. 756-769, 2016.

JÚNIOR, C. L. Potencial do aproveitamento energético de fontes de biomassa na região Nordeste do Brasil. 2013. 74 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Tecnologia e Geociências - Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2013.

LOPES, C. H. (Org). Tecnologia de produção de açúcar de cana. São Carlos: EdUFSCAR, 2011. 183 p. – (Coleção UAB-UFSCar).

MAIONE, N. R. Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte (bsg) visando a produção de etanol de segunda geração. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2019.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Site oficial do MAPA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/orgaos/ministerio-da-agricultura-pecuaria-e-abastecimento>. Acesso em: 02 fev. 2023.

MARTINS, C. Z. **Avaliação da produção de etanol de segunda geração**. 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2018.

MASSARDI, M. M. et al. Caracterização Química Do Bagaço De Malte E Avaliação Do Seu Potencial Para Obtenção De Produtos De Valor Agregado. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 6, n. 1, p. 0083–0091, 27 fev. 2020.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTAGNER, L. F. Explosão a vapor como pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas para produção de bioetanol. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Santa Maria. Cachoeira do Sul. 2019.

MORAIS, P. P.; PASCOAL, P. V.; ROCHA, E. S.; MARTINS, E. C. A. Etanol de 2 geração: atual produção e perspectivas. *Bioenergia em Revista: Diálogos*. v. 7, n. 1, p. 45-57, 2017.

MORAES, V. P. Uma revisão da literatura sobre as diferentes tecnologias empregadas para o pré-tratamento da biomassa vegetal visando à produção de etanol de segunda geração. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo. Lorena. 2018.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, abr. 2005.

NASCIMENTO, V. M. Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-deaçúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2011.

NEVES, M. F. et al. **Etanol de Milho: Cenário Atual e Perspectivas para a Cadeia no Brasil**. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: UNEM, 2021. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/wp->

content/uploads/2021/05/Etanol-de-Milho-no-Brasil-Fava-Neves-et-al-2021\_compressed.pdf. Acesso em: 8 nov. 2022.

NETO, J. M. Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2016.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2013.

PAULA, A. R. de. Monitoramento da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar por métodos espectrofotométricos. 2020. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/12786>. Acesso em: 24 jan. 2023.

PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

PRATTO, B. Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística. 2015. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo. 2015.

RAÍZEN. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

RESENDE, J. F. et al. Estudo de pré-tratamentos para disponibilização de açúcares redutores a partir do bagaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Journal of Development*. v. 5, n. 10, p. 19219-19227, 2019.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - RFA. Annual ethanol production: U.S. and world ethanol production. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 07 de dez. de 2022.

ROCHA, M. S. R. S. Estudo integrado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/9545>. Acesso em: 20 jan. 2023.

RODRIGUES, C. et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*, v. 4, p. 283-314, São Paulo: Editora Blucher, 2017. DOI 10.5151/9788521211150-08.

ROSA, S. E. S. da.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *Revista do BNDES*, n. 32, p. 117-156, 2009.

SAAD, M. B. W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 138 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Lorena. 2010.

SANTOS, D. M. Aproveitamento do bagaço de malte na produção de polpa celulósica e carboximetilcelulose. 2014. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2014a.

SANTOS, F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Química Nova*, v. 37, n.1, p. 56-62, 2014b.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SILVA, P. H. F. Fracionamento da biomassa lignocelulósica pelo processo *organosolv*. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Química e Biológica) – Instituto de Química - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SILVA, A. S. da. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 7402-7409, 2010.

SOUSA, V. M. Z. de. Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico. 2014. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Energia) - Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SOUZA, R. B. A. de. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

STEVANOVIĆ, Simo; STEVANOVIĆ, Snežana. *Biomass as a renewable energy source*. *Thermal Science*, v. 26, n. 1, p. 637-646, 2022. DOI: 10.5937/ekoPolj2201195S. Disponível em: <https://doi.org/10.5937/ekoPolj2201195S>. Acesso em: 19 dez. 2022.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA. Disponível em: <https://unica.com.br>. Acesso em: 21 dez. 2022.

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

VENCESLAU, H. M. B. B. Diversificação das aplicações do bagaço de cana de açúcar. 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira) – Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

VIDAL, M. F. Agroindústria - Etanol. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 7, n.237, set. 2022. (Caderno Setorial ETENE). Disponível em: [https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1409/3/2022\\_CDS\\_237.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1409/3/2022_CDS_237.pdf). Acesso em: 05 de dez. de 2022.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1959–1966, 2005.