

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise  
enzimática do capim-elefante

**Andréia Toscan**

Caxias do Sul, 2013.

ANDRÉIA TOSCAN

Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise  
enzimática do capim-elefante

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Marli Camassola

Caxias do Sul, 2013.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

T713e Toscan, Andréia, 1987-  
Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no rendimento da hidrólise  
enzimática do capim-elefante / Andréia Toscan - 2013.  
146 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.  
Apresenta bibliografia.  
“Orientação: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, Co-orientação: Prof.  
Dr<sup>a</sup>. Marli Camassola.”

1. Pennisetum purpureum - Biotecnologia. Título.

CDU 2.ed.: 633.2:57.08

Índice para o catálogo sistemático:

1. Pennisetum purpureum – Biotecnologia 633.2:57.08

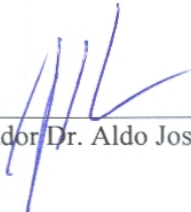
Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário  
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/ 1974

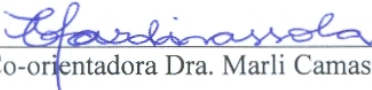
**ANDRÉIA TOSCAN**

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NO  
RENDIMENTO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAPIM-  
ELEFANTE**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de  
Mestre em Biotecnologia.**

Dissertação aprovada em vinte de novembro de 2013.

  
Orientador Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

  
Co-orientadora Dra. Marli Camassola

  
Dra. Eloane Malvessi

  
Dr. Adilson Roberto Gonçalves

  
Dr. Henrique Macedo Baudel

**“Os sonhos não determinam o lugar aonde vamos chegar, mas produzem a força necessária para nos tirar do lugar onde estamos. Liberta-nos da condição de espectadores e nos tornam atores sociais.”**

Augusto Cury

Dedico este trabalho aos meus pais, Inês e Arlindo, a minha irmã Jéssica e ao meu namorado Jean, pelo apoio, incentivo e amor dedicados a mim.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por a cada dia me dar a oportunidade de recomeçar, por ser a base de segurança que me faz confiar que sempre tudo dará certo e por me acompanhar e iluminar em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, e a minha co-orientadora, Dra. Marli Camassola, pelos ensinamentos passados ao longo de todo curso, pela atenção e empenho em me orientar e pela confiança depositada em mim.

Aos professores da banca de acompanhamento, Dra. Eloane Malvessi, Dra. Aline Dettmer e Dr. Maurício Moura da Silveira, pelas colaborações para a melhoria deste trabalho.

A técnica do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul, Dra. Roselei C. Fontana, pela colaboração e contribuições a esse trabalho.

Ao Dr. Luis Antônio Rezende Muniz, com o qual este trabalho foi iniciado, pela colaboração para a realização e continuidade deste trabalho.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os funcionários do Instituto de Biotecnologia.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul que tornaram minha vida muito mais alegre nesse período.

A minha mãe, Inês, pela educação e os princípios ensinados, por confiar na minha capacidade, fazer o possível para que minhas preocupações fossem apenas meus estudos, por orar por mim todos os dias e me amar incondicionalmente.

Ao meu pai, Arlindo, por trabalhar para garantir que eu não passasse nenhuma necessidade.

A minha irmã, Jéssica, meu maior presente, que sempre acreditou na minha capacidade, me ajudou a ter animo nos piores momentos, me fez acreditar que tudo daria certo, e principalmente por estar sempre ao meu lado dedicando seu amor.

Ao meu namorado, Jean, que antes mesmo de se tornar meu namorado sempre me incentivou e deu forças para acreditar no sucesso do meu trabalho, e por me dar o carinho e amor que preciso para acalmar a mente e contentar o coração.

Aos amigos e familiares que me acompanham desde meus primeiros passos e contribuem na formação da minha personalidade e caráter, sendo fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao apoio estrutural e financeiro da UCS, FAPERGS, FINEP, CNPq e da Secretaria de Ciência, Inovação e Desenvolvimento Tecnológico do Estado do Rio Grande do Sul.





## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE QUADROS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Histórico de utilização de combustíveis .....	5
2.2 Biocombustíveis e biomassa.....	6
2.3 Etanol: características e produção.....	7
2.4 Biomassa lignocelulósica.....	10
2.4.1 Celulose .....	12
2.4.2 Hemicelulose .....	14
2.4.3 5-hidroximetilfurfural e furfural.....	15
2.4.4 Lignina.....	17
2.5 Capim-elefante: propriedades e potencial como fonte de energia alternativa .....	18
2.6 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	25
2.6.1 Pré-tratamento hidrotérmico.....	30
2.7 Hidrólise.....	33
2.7.1 Hidrólise enzimática: celulasas .....	34
2.8 Fermentação alcoólica .....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Matéria-prima .....	41
3.2 Pré-tratamento do capim-elefante .....	41
3.3 Hidrólise enzimática .....	44
3.4 Fermentação do hidrolisado enzimático .....	45

3.5	Métodos analíticos .....	46
3.5.1	Matéria seca.....	46
3.5.2	Perda de massa .....	47
3.5.3	Caracterização da composição do capim-elefante .....	47
3.5.3.1	Determinação de componentes pelo método Van Soest .....	48
3.5.3.2	Metodologia NREL.....	51
3.5.4	Caracterização dos efluentes de pré-tratamento .....	52
3.5.5	Caracterização dos hidrolisados enzimáticos do capim-elefante .....	53
3.6	Análise estatística .....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1	Comparação de métodos de caracterização da composição do capim-elefante.....	55
4.2	Caracterização do capim-elefante <i>in natura</i> .....	64
4.3	Pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso .....	65
4.3.1	Perda de massa do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso	67
4.3.2	Perda dos principais constituintes do capim-elefante durante o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso.....	70
4.3.3	Composição dos efluentes resultantes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso .....	73
4.3.4	Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada hidrotermicamente utilizando água no estado gasoso .....	74
4.4	Pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido.....	84
4.4.1	Perda de massa do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido	86
4.4.2	Perda dos principais constituintes do capim-elefante durante o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido .....	89
4.4.3	Composição dos efluentes resultantes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido .....	93

4.4.4	Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada hidrotermicamente utilizando água no estado líquido.....	95
4.5	Fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso e líquido .....	105
4.5.1	Fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos hidrolisados dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso.....	105
4.5.2	Fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos hidrolisados dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido .....	108
5	CONCLUSÕES .....	111
6	PERSPECTIVAS .....	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas tecnológicas para conversão da biomassa (BNDES & CGEE, 2008).....	7
Figura 2. Vias de produção de etanol de primeira e segunda geração (BNDES & CGEE, 2008).....	9
Figura 3. Estrutura da parede celular vegetal (Canilha <i>et al.</i> , 2010). ....	11
Figura 4. Representação da molécula de celulose (adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2012).....	12
Figura 5. Ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose (Santos <i>et al.</i> , 2012). .	13
Figura 6. Produtos obtidos a partir da celulose (Schuchardt <i>et al.</i> , 2001).....	13
Figura 7. Monossacarídeos constituintes da hemicelulose: (1) glicose, (2) galactose, (3) arabinose, (4) xilose, (5) manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico, (7) ramnose (Pitarelo, 2013). .....	14
Figura 8. Produtos que podem ser obtidos da hemicelulose (Schuchardt <i>et al.</i> , 2001).....	15
Figura 9. Formação de 5-HMF e dos ácidos levulínico e fórmico (Larsson <i>et al.</i> , 1999).....	16
Figura 10. Formação do furfural a partir da xilose (Marabezi, 2009). ....	16
Figura 11. Álcoois precursores da lignina (Toor <i>et al.</i> , 2011).....	17
Figura 12. Potencial do capim-elefante para a produção de energia elétrica quando comparado com o potencial da cana-de-açúcar e do eucalipto (Salgado, 2010).....	19
Figura 13. Plantas de capim-elefante (Ferreira, 2008). ....	20
Figura 14. Alterações estruturais na microfibrila celulósica ocasionadas pelo pré-tratamento, seguidas pela hidrólise enzimática (Canilha <i>et al.</i> , 2009). ....	25
Figura 15. Reação de hidrólise de polissacarídeo (Balat <i>et al.</i> , 2008; Arredondo, 2009). ....	33
Figura 16. Atuação das enzimas celulasas sobre a matriz celulósica (Silva, 2012).....	35
Figura 17. Reação de fermentação de hexoses (a) e reação de fermentação de pentoses (b) (Hamelinck <i>et al.</i> , 2005; Balat <i>et al.</i> , 2008). ....	37
Figura 18. Detalhamento da unidade de pré-tratamento hidrotérmico (Silva, 2012).....	42
Figura 19. Esquema do método de determinação de FDN do capim-elefante. ....	48
Figura 20. Método de determinação de FDA, lignina, celulose e cinzas do capim-elefante, segundo Van Soest. ....	50
Figura 21. Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de celulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado gasoso. ....	56
Figura 22. Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de celulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado líquido.....	57

Figura 23. Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de hemicelulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado gasoso..	59
Figura 24. Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de hemicelulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado líquido.....	60
Figura 25. Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de lignina de cada biomassa pré-tratada com água no estado gasoso. ....	61
Figura 26. Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de lignina de cada biomassa pré-tratada com água no estado líquido.....	62
Figura 27. Aparência das biomassas após pré-tratamento com água no estado gasoso, sendo A (1V), B (2V), C (3V), D (4V), E (5V), F (6V), G (7V), H (8V), I (9V), J (10V), K (11V) e L do capim-elefante <i>in natura</i> .....	65
Figura 28. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de massa nos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.....	69
Figura 29. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de hemicelulose nos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. ....	72
Figura 30. Rendimento de AR (mg de AR. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) variando conforme o tempo de hidrólise enzimática para o capim-elefante <i>in natura</i> e as biomassas pré-tratadas com vapor d'água. ....	75
Figura 31. Concentração de AR (mg de AR. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) variando conforme o tempo de hidrólise enzimática para as biomassas pré-tratadas com vapor d'água nos pontos centrais do planejamento experimental..	76
Figura 32. Rendimento de glicose (mg de glicose.g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) variando conforme o tempo de hidrólise enzimática para o capim-elefante <i>in natura</i> e as biomassas pré-tratadas com vapor d'água..	77
Figura 33. Rendimento de glicose (mg de glicose. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) após 48 h de hidrólise enzimática para o capim-elefante <i>in natura</i> e as biomassas pré-tratadas com vapor d'água.....	78
Figura 34. Rendimento da hidrólise enzimática (glicose liberada.glicose esperada <sup>-1</sup> ) em relação à severidade de cada pré-tratamento hidrotérmico utilizando água em estado gasoso..	79
Figura 35. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para concentração de glicose das hidrólises enzimáticas dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. ....	81

Figura 36. Perfis para avaliação da desejabilidade e do ponto otimizado para o pré-tratamento hidrotérmico utilizando vapor d'água, considerando a perda de massa como fator negativo e a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática como fator positivo.....	82
Figura 37. Aparência das biomassas após pré-tratamento hidrotérmico com água no estado gasoso, sendo A (1L), B (2L), C (3L), D (4L), E (5L), F (6L), G (7L), H (8L), I (9L), J (10L), K (11L) e L do capim-elefante <i>in natura</i> . ....	84
Figura 38. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de massa nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	88
Figura 39. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de lignina nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	91
Figura 40. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de hemicelulose nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.....	93
Figura 41. Rendimento de AR (mg de AR. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) durante a hidrólise enzimática para o capim-elefante <i>in natura</i> e o capim-elefante pré-tratado hidrotérmicamente com água no estado líquido. ....	96
Figura 42. Rendimento de AR (mg de AR. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) durante a hidrólise enzimática de capim-elefante pré-tratado hidrotérmicamente com água no estado líquido, nos pontos centrais do planejamento experimental.....	97
Figura 43. Rendimento de glicose (mg de glicose. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) durante a hidrólise enzimática de capim-elefante pré-tratado hidrotérmicamente com água no estado líquido.....	98
Figura 44. Rendimento de glicose (mg de glicose. g <sup>-1</sup> de capim-elefante <i>in natura</i> ) após 48 h de hidrólise enzimática para o capim-elefante <i>in natura</i> e as biomassas pré-tratadas com água no estado líquido.....	99
Figura 45. Rendimento da hidrólise enzimática (glicose liberada.glicose esperada <sup>-1</sup> ) em relação à severidade do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água em estado líquido.....	100
Figura 46. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para concentração de glicose das hidrólises enzimáticas dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	102
Figura 47. Perfis para avaliação dos pontos desejáveis e otimizado para o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido, considerando a perda de massa como fator negativo e a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática como fator positivo. ....	103
Figura 48. Consumo de AR (mg.mL <sup>-1</sup> ) em relação ao tempo de fermentação por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dos hidrolisados enzimáticos de capim-elefante após pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso.....	105

Figura 49. Consumo de AR ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pontos centrais dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso.. .....	106
Figura 50. Consumo de AR ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido .....	108
Figura 51. Consumo de AR ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pontos centrais dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido.....	109



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Vantagens e desvantagens de diferentes pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica (adaptada de Mosier <i>et al.</i> , 2005; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Santos <i>et al.</i> , 2012).....	26
--	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de etanol do Brasil e EUA (bilhões de litros) (RFA, 2013). .....	9
Tabela 2A. Composição do capim-elefante descrita na literatura. ....	22
Tabela 3. Parâmetros do pré-tratamento hidrotérmico. ....	42
Tabela 4. Planejamento experimental para o pré-tratamento hidrotérmico repetidos para água quente líquida e como vapor. ....	42
Tabela 5. Severidade de cada pré-tratamento realizado. ....	43
Tabela 6. Composição de polissacarídeos, lignina e cinzas de capim-elefante <i>in natura</i> pelas metodologias de Van Soest e NREL. ....	55
Tabela 7. Perdas de hemicelulose, lignina e celulose, provenientes do balanço de massa, utilizando o método NREL, nas biomassas pré-tratadas com água no estado gasoso. ....	63
Tabela 8. Perdas de hemicelulose, lignina e celulose, provenientes do balanço de massa, utilizando o método NREL, nas biomassas pré-tratadas com água no estado líquido. ....	63
Tabela 9. Determinação da matéria seca do capim-elefante <i>in natura</i> . ....	64
Tabela 10. Composição química da biomassa pré-tratada hidrotermicamente com água em estado gasoso. ....	66
Tabela 11. Perda de massa das biomassas pré-tratadas utilizando água no estado gasoso. Composição química da biomassa pré-tratada hidrotermicamente com água em estado gasoso. ....	68
Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para perda de massa dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. ....	68
Tabela 13. Perda de hemicelulose, lignina e celulose nos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso. ....	70
Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) para perda de lignina dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. ....	71
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para perda de hemicelulose dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. ....	71
Tabela 16. Composição dos efluentes dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso. ....	73
Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose da hidrólise enzimática dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. ....	80

Tabela 18. Composição química da biomassa pré-tratada hidrotêrmicamente com água em estado líquido.....	85
Tabela 19. Perda de massa das biomassas pré-tratadas utilizando água no estado líquido.....	86
Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) para perda de massa dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	87
Tabela 21. Perda de hemicelulose, lignina e celulose nos pré-tratamentos hidrotêrmicos utilizando água no estado líquido.....	89
Tabela 22. Análise de variância (ANOVA) para perda de lignina dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	90
Tabela 23. Análise de variância (ANOVA) para perda de hemicelulose dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	92
Tabela 24. Composição dos efluentes dos pré-tratamentos hidrotêrmicos utilizando água no estado líquido.....	94
Tabela 25. Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose da hidrólise enzimática dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. ....	101
Tabela 26. Substrato inicial ( $S_0$ ), fator de conversão de produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $P_v$ ) e rendimento total ( $\rho$ ) do processo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pré-tratamentos hidrotêrmicos com água no estado gasoso.....	107
Tabela 27. Substrato inicial ( $S_0$ ), fator de conversão em etanol ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $P_v$ ) e rendimento total ( $\rho$ ) do processo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos após pré-tratamentos hidrotêrmicos com água no estado líquido. ....	109

## RESUMO

Considerando a redução da disponibilidade de petróleo e as mudanças climáticas causadas, entre outras razões, pelas emissões resultantes do uso de combustíveis fósseis, torna-se indispensável a busca por novas fontes de energia. O etanol, obtido a partir de materiais lignocelulósicos, é uma das principais promessas para a substituição dos combustíveis fósseis utilizados para os meios de transporte, porém tornam-se necessárias etapas de pré-tratamento e hidrólise do material antes da fermentação. Os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizam água quente líquida ou vapor e se apresentam como uma opção ao pré-tratamento ácido, por não necessitarem de reatores resistentes a corrosão e formarem menos produtos inibidores da fermentação. Dentre os materiais lignocelulósicos, o capim-elefante se destaca pelo seu elevado potencial produtivo e características como qualidade, vigor e persistência, apresentando, em sua estrutura morfológica, teor de fibras favorável ao estudo da produção de etanol. Neste contexto, o presente trabalho estudou os efeitos do pré-tratamento hidrotérmico (água quente na forma líquida e gasosa) sobre capim-elefante e o seu efeito no rendimento da hidrólise enzimática da biomassa. Como resultados de análises das amostras de hidrólise enzimática, os pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso, durante 6,5 min a 220°C, levaram a obtenção de liberação no meio de até 232 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante. Já para os pré-tratamentos utilizando água no estado líquido, durante 6,5 min a 220 °C e 12 min a 195 °C, a máxima liberação foi de 198 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante, sendo esses valores significativamente (p<0,05) maiores que a liberação de glicose na ausência de pré-tratamento, na qual foi observada uma liberação de 101 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante. Foi detectada reduzida formação de compostos inibitórios como furfural, hidroximetilfurfural durante os pré-tratamentos hidrotérmicos. Entretanto, quando a glicose, liberada das biomassas pré-tratadas hidrotérmicamente e hidrolisadas enzimaticamente, foi fermentada a etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, ocorreu diferença entre os rendimentos, sugerindo que houve inibição da fermentação pelos compostos presentes nos hidrolisados. Estes dados indicam que os pré-tratamentos hidrotérmicos apresentam potencial de uso como pré-tratamentos de biomassa de capim-elefante.

**Palavras-chave:** etanol, material lignocelulósico, capim-elefante, pré-tratamento hidrotérmico.

## ABSTRACT

The reduction of oil resources and the expansion of climate change negative effects, a consequence of fossil fuel consumption, have prompted the search for alternative energy sources. Ethanol from lignocellulosic materials is a promising alternative to fossil fuels, but its production requires pretreatment and hydrolysis of the material prior to fermentation. Unlike acid pretreatments, hydrothermal pretreatments use hot water or steam, do not require corrosion resistant reactors and generate less inhibitors. Among the lignocellulosic materials, elephant grass stands out for its high yield and characteristics such as quality, vigor and persistence, as well as a fiber content that is favorable to ethanol production. In this context, the present study shows the effects of hydrothermal pretreatment (hot water and steam) on elephant grass and its effect on the yield of enzymatic hydrolysis. For the analysis of high performance liquid chromatography on enzymatic hydrolysis samples, pretreatments using steam for 6.5 min at 220 °C released up to 232 mg glucose/ g of elephant grass. The pretreatments with hot water carried out for 6.5 min at 220 °C and 12 min at 195 °C released up to 198 mg glucose/ g of elephant grass, such value being significantly ( $p < 0.05$ ) higher than that related to the untreated elephant grass (101 mg of glucose/ g of elephant grass). A reduced production of fermentation inhibitory compounds, such as furfural and hydroxymethylfurfural, was observed during the hydrothermal pretreatment. However, when glucose released, biomasses hydrothermally pretreated and enzymatically hydrolyzed, was fermented to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, difference was observed between the yields, suggesting inhibition of fermentation. These data indicate that the hydrothermal pretreatments can be potentially used to elephant grass biomass for bioethanol production.

**Key words:** ethanol, lignocellulosic materials, elephant grass, hydrothermal pretreatment.

# 1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 70, quando houve um aumento abusivo do preço do petróleo, o mundo despertou para a necessidade de cada país ser autossuficiente na produção de combustíveis. O etanol, desde então, é considerado um dos combustíveis líquidos mais promissores, tendo em vista sua produção utilizando matérias-primas renováveis. O etanol contribui para o aumento da octanagem da gasolina, melhorando o desempenho dos motores, além de possibilitar uma combustão mais limpa, o que contribui para reduzir as emissões poluidoras, mesmo quando misturado à gasolina. No Brasil, onde juntamente à crise do petróleo, vivenciou-se um colapso dos preços do açúcar no mercado mundial, houve um incentivo à utilização do excedente de cana-de-açúcar para a produção de etanol, pelo Programa Nacional do Alcool, o Proálcool (década de 70).

Nos últimos anos, está em discussão os problemas ambientais causados pelo uso de combustíveis de fontes fósseis, entre eles o aquecimento global. Além disso, discute-se a concorrência da produção de combustíveis utilizando matérias-primas que poderiam ser utilizadas para a alimentação humana como é o caso do milho nos EUA.

Considerando os problemas expostos, e ainda os prazos para o esgotamento das fontes fósseis de combustíveis, que estão cada vez menores, a utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de combustíveis, principalmente o etanol, ganha espaço nas pesquisas mundiais. Os materiais lignocelulósicos têm como compostos principais a celulose, a hemicelulose e a lignina em diferentes proporções. Essas substâncias estão presentes nas plantas, em subprodutos de processamento de vegetais, em algas marinhas, em excrementos de ruminantes, em resíduos municipais e industriais, entre outros.

Entre as biomassas lignocelulósicas, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) tem sido destaque como combustível sólido para a produção de bioeletricidade. Estudos recentes têm mostrado que essa biomassa é promissora também para a produção de etanol de segunda geração, principalmente devido a sua alta produtividade, baixo custo de produção e a menor exigência de clima e solo, podendo ser cultivado em locais que não seriam propícios para a produção de cana-de-açúcar, como é o caso do estado do Rio Grande do Sul.

A parede celular vegetal da biomassa lignocelulósica é uma estrutura recalcitrante difícil de ser desestruturada, onde a lignina encontra-se ligada a celulose e a hemicelulose, protegendo a parede celular da degradação química e biológica, inviabilizando a realização de hidrólise enzimática da biomassa *in natura*. A necessidade de realização de um pré-tratamento para a desestruturação da microfibrila lignocelulósica, deixando assim a celulose mais acessível às enzimas durante a hidrólise enzimática, ainda é um dos principais gargalos para a produção de etanol lignocelulósico ou de segunda geração. Os estudos para tornar a produção desse biocombustível economicamente viável devem focar principalmente a otimização dos pré-tratamentos e da hidrólise enzimática e a redução de custos de ambos os processos. Uma vez que cada biomassa possui uma composição diferente, é fundamental estudar qual pré-tratamento seria mais adequado para cada biomassa.

O pré-tratamento deve ser eficiente para o aumento dos rendimentos da liberação de açúcares no meio, para a posterior fermentação e ao mesmo tempo em que não produza substâncias que possam inibir as etapas seguintes (hidrólise enzimática e fermentação). Também se deve considerar que o pré-tratamento não utilize grandes quantidades de insumos químicos, uma vez que esses, além de aumentarem os custos do processo, podem causar danos aos equipamentos e ao meio ambiente.

O pré-tratamento hidrotérmico é um processo promissor que tem sido alvo de um número cada vez maior de estudos, por se tratar de um método onde apenas se utiliza a água como agente a promover a desestruturação da biomassa lignocelulósica. A água pode ser utilizada na sua forma líquida ou como vapor e, em altas temperaturas, assume um caráter ácido, ajudando a promover a quebra das ligações existentes na microfibrila lignocelulósica, principalmente na hidrólise da hemicelulose. Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico tem a vantagem de gerar pouco ou nenhum composto que possa vir a inibir as etapas seguintes do processo de produção de etanol.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o pré-tratamento hidrotérmico como alternativa tecnológica para intensificar a liberação de açúcares fermentescíveis na hidrólise enzimática do capim-elefante, visando à produção de etanol. Para alcançar esse objetivo os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- avaliar os métodos de caracterização da composição do capim-elefante *in natura* e pré-tratado, propostos pelo “National Renewable Energy Laboratory” (NREL) e por Van Soest (1968);



- otimizar as condições de temperatura e tempo do pré-tratamento hidrotérmico no capim-elefante, utilizando água quente no estado líquido e gasoso;
- avaliar a digestibilidade enzimática do capim-elefante *in natura* e pré-tratado;
- determinar as condições operacionais mais apropriadas de pré-tratamento hidrotérmico do capim-elefante com base nos resultados da hidrólise;
- avaliar o efeito de possíveis inibidores na fermentação alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae*, com base no fator de conversão de produto, na produtividade volumétrica e no rendimento global do processo.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico de utilização de combustíveis

Um pré-requisito fundamental para a segurança de uma nação é a autossuficiência energética. A década de 70, quando os modelos de desenvolvimento econômico já eram baseados na dependência do petróleo, foi marcada por prejuízos a economia mundial devido à formação de cartéis entre os países do Oriente Médio, que são até hoje os principais exportadores de petróleo do globo, concentrando, em seu território, cerca de 48% das reservas mundiais (BP, 2013). Desde então, diversas nações deram início a programas de pesquisa e desenvolvimento com o objetivo de se tornarem independentes de importação de fontes de energia (Canilha *et al.*, 2010).

O consumo de energia em todo o mundo aumentou mais de vinte vezes no século passado e, atualmente, a maior parte dessas necessidades energéticas continua sendo suprida pela utilização de fontes petroquímicas, carvão mineral e gás natural (Jegannathan *et al.*, 2009). Porém esses combustíveis fósseis estão se aproximando da exaustão e isso tem contribuído para o aumento dos seus preços. No período entre 2004 e 2008, o preço mundial do petróleo aumentou da faixa dos 25 para mais de 140 dólares por barril (Azadi *et al.*, 2012).

Com o aumento da demanda energética, os problemas ambientais associados a queima dos combustíveis fósseis também aumentam. As emissões de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO<sub>x</sub> provenientes da combustão desses combustíveis são as principais causas da poluição atmosférica (Jegannathan *et al.*, 2009). Um dos problemas mais críticos certamente é o efeito estufa, causado pelo acúmulo de alguns gases na atmosfera, sendo esses chamados de gases do efeito estufa. Esse acúmulo faz com que parte do calor vindo do sol, que seria devolvido ao espaço, permaneça na Terra provocando o aquecimento global (Lima *et al.*, 2006).

O setor de transportes é responsável por mais de 60% do consumo mundial de petróleo (IEA, 2012). Além disso, esse setor é responsável por mais de 70% das emissões globais de monóxido de carbono (CO) e 19% das emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Balat & Balat, 2009; Balat, 2011). Em todo o mundo, havia cerca de 806 milhões de carros e caminhões leves em 2007. Esses números devem aumentar para 1,3 bilhões de veículos em 2030 e para mais de 2 bilhões até 2050 (Balat, 2011). Esse crescimento vai afetar ainda mais a

estabilidade dos ecossistemas e do clima global, assim como as reservas mundiais de petróleo. Essa realidade torna fundamental a busca de novas fontes de energia para alimentar os veículos movidos a motor de combustão. Um combustível alternativo deve ser tecnicamente viável, economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e prontamente disponível (Balat, 2011).

## 2.2 Biocombustíveis e biomassa

Combustíveis produzidos à base de biomassa oferecem muitas vantagens sobre os combustíveis derivados do petróleo, pois podem ser facilmente obtidos a partir de fontes de biomassa abundantes, considerados ambientalmente corretos, podendo trazer benefícios para a economia, aos consumidores e, como são biodegradáveis, contribuem para a sustentabilidade (Balat, 2011). O vocábulo biocombustível se refere a combustíveis líquidos e gasosos predominantemente produzidos da biomassa (Jegannathan *et al.*, 2009), mas que podem ter qualquer origem biológica que seja diferente da origem fóssil (Arredondo, 2009). Os principais combustíveis que podem ser produzidos a partir desses recursos naturais são o etanol e biodiesel (combustíveis líquidos) e o hidrogênio e o metano (combustíveis gasosos).

A biomassa pode ser definida como "qualquer material, excluindo o combustível fóssil, que era um organismo vivo e que pode ser utilizado como um combustível, diretamente ou após um processo de conversão" (Agbor *et al.*, 2011). A biomassa é produzida através da fotossíntese, que converte energia luminosa em energia química e armazena, principalmente, como carboidratos (Zhang, 2008). Uma grande variedade de recursos de biomassa está disponível no planeta para conversão não só em biocombustíveis mas também em diversos bioprodutos. Entre esses recursos, incluem-se todas as plantas e suas partes e constituintes (por exemplo, caule, sementes, amido, lipídios, proteínas e fibras), subprodutos de processamento (grãos de destilaria, solúveis do milho), materiais de origem marinha e subprodutos de origem animal, resíduos municipais e industriais, que muitas vezes são considerados lixo (Galbe & Zacchi, 2002; Zaldivar *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2003; Reddy & Yang, 2005; Zheng *et al.*, 2009).

A biomassa pode ser convertida em biocombustíveis e calor útil através de processos termoquímicos e bioquímicos. Entre os processos termoquímicos estão inclusos a combustão, a pirólise e a gaseificação, já entre os bioquímicos estão a digestão e a fermentação, sendo que

desse último se obtém o etanol. Tem-se ainda como rota tecnológica para conversão da biomassa a operação de extração, da qual é obtido o biodiesel (BNDES & CGEE, 2008). A Figura 1 apresenta as rotas de conversão e seus produtos resultantes.

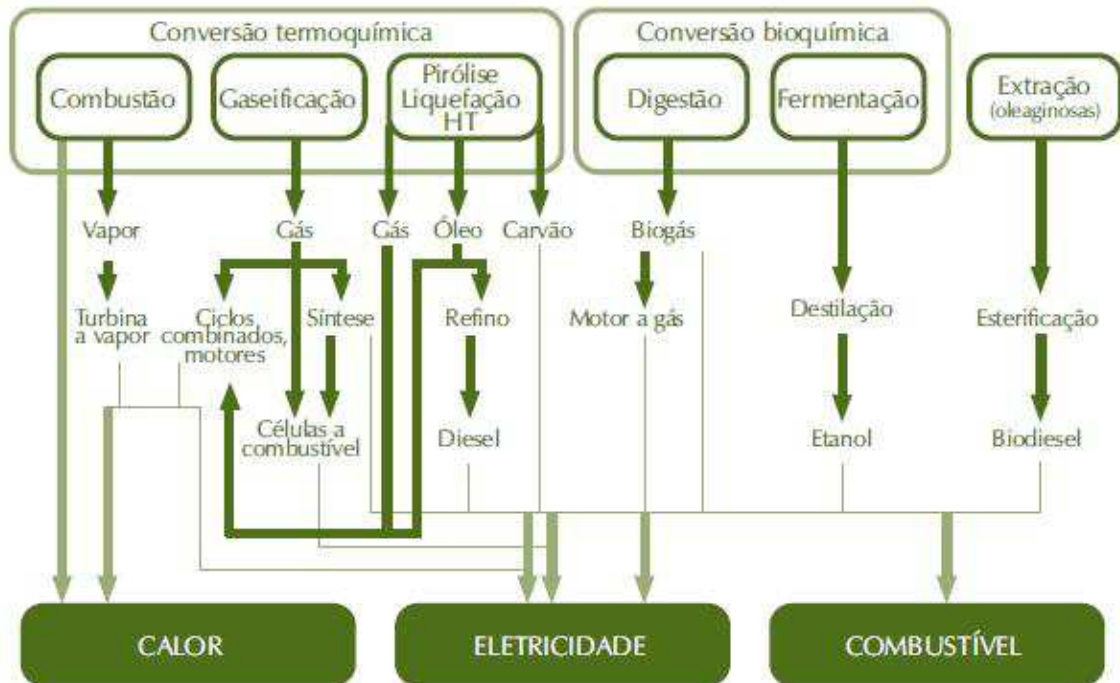


Figura 1. Rotas tecnológicas para conversão da biomassa (BNDES & CGEE, 2008).

### 2.3 Etanol: características e produção

O etanol, ou álcool etílico, é um combustível líquido com fórmula molecular  $C_2H_6O$ , que pode ser utilizado em motores de combustão interna com ignição por centelha (ciclo Otto) de duas maneiras, basicamente: 1) em misturas de gasolina e etanol anidro; ou 2) como etanol puro, geralmente hidratado (BNDES & CGEE, 2008; Balat *et al.*, 2008). O etanol aumenta a octanagem da gasolina melhorando o desempenho dos motores e possibilita uma combustão mais limpa, o que contribui para reduzir as emissões poluidoras, mesmo quando misturado à gasolina. Nesses casos, comporta-se como um verdadeiro aditivo para o combustível normal, melhorando suas propriedades (Galbe & Zacchi, 2002; BNDES & CGEE, 2008; Sukumaran *et al.*, 2009).

O uso de etanol como combustível começou com a invenção dos motores de combustão interna, por Nikolas Otto, em 1897 (Balat *et al.*, 2008) e, tem sido utilizado desde

o início da indústria do automóvel. As misturas de etanol combustível são usadas com sucesso em todos os tipos de veículos e motores que exijam gasolina (Balat *et al.*, 2008).

No Brasil a utilização em larga escala do etanol como combustível para os meios de transporte foi uma resposta a crise do petróleo e o colapso dos preços do açúcar no mercado mundial (Lehtonen, 2011). Em 1975, foi criado no Brasil o Proálcool (Programa Nacional do Álcool), que fomentou o uso de etanol produzido a partir de cana-de-açúcar como combustível veicular (Balat & Balat, 2009; Canilha *et al.*, 2010). Desde os anos 1980, além do Brasil, o etanol tem sido considerado uma possível alternativa de combustível em diversos países (Balat *et al.*, 2008).

Com a intensa utilização da eletrônica embarcada em sistemas avançados de controle de mistura e de ignição, a partir de 2003, foram lançados comercialmente, no Brasil, veículos com os motores flexíveis (*flex-fuel*), capazes de utilizar, sem qualquer interferência do motorista, gasolina (com 20% a 25% de etanol), etanol hidratado puro ou ainda misturas desses dois combustíveis em qualquer proporção, de acordo com os requisitos de eficiência e dirigibilidade e atendendo aos limites legais de emissões de gases de escapamento (BNDES & CGEE, 2008). Este tipo de veículo levou a um rápido crescimento na produção de cana-de-açúcar e de etanol (Balat & Balat, 2009). Mais de 80% da atual produção de automóveis do Brasil é do tipo flexível, enquanto que em 2004 apenas 30% tinham essa capacidade (Balat & Balat, 2009; ANFAVEA, 2013). Com o etanol disponível em praticamente todos os mais de 32.000 postos de combustível do Brasil, o consumidor brasileiro pode escolher entre abastecer com 100% etanol hidratado ou com uma mistura de gasolina contendo 20% a 25% de etanol (BNDES & CGEE, 2008; Balat & Balat, 2009).

A via de obtenção do etanol mais conhecida é a fermentativa, que devido à extensão de terras para cultivo da cana-de-açúcar (matéria-prima), no Brasil é a mais importante e viável economicamente, porém existe ainda a via destilatória e a via sintética, sendo essa última através de hidrocarbonetos e gases de petróleo (Silva, 2009). Mediante rotas biológicas, o etanol pode ser produzido com base em qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de açúcar ou outro carboidrato (Figura 2). O etanol produzido com biomassas açucaradas ou amiláceas é conhecido como etanol de primeira geração e tem seus processos de produção definidos e sendo utilizados em grande escala. Os materiais amiláceos precisam, após a moagem, ser convertidos a açúcares por meio de um processo enzimático a altas temperaturas. Já a conversão de produtos com base açucarada, como por exemplo, a

cana-de-açúcar e a beterraba, a fermentação ocorre imediatamente após a moagem ou difusão (BNDES & CGEE, 2008).

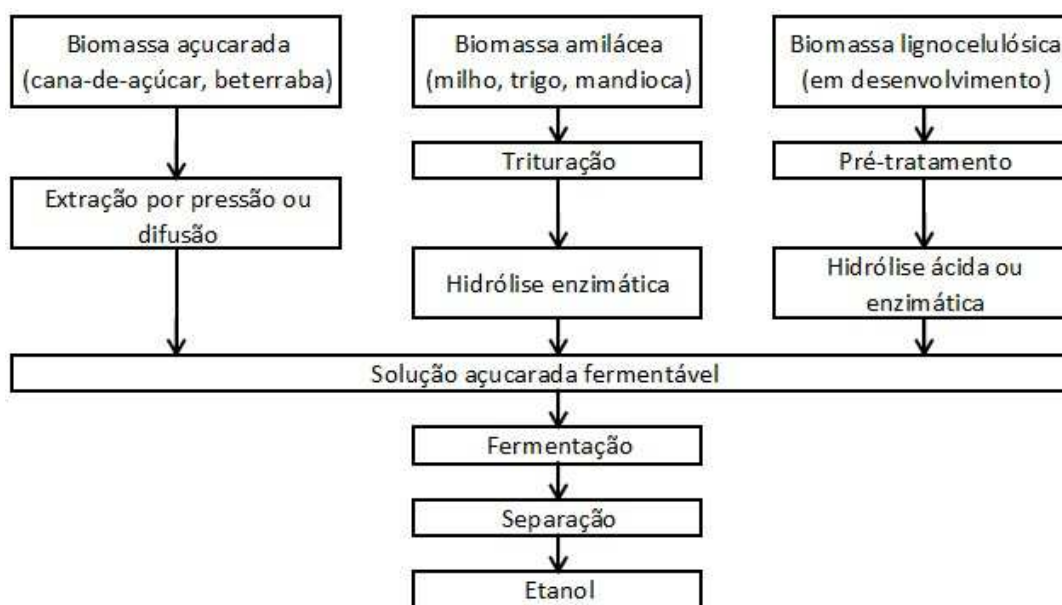


Figura 2. Vias de produção de etanol de primeira e segunda geração (BNDES & CGEE, 2008).

No cenário mundial, Brasil e Estados Unidos (EUA) se destacam como os maiores produtores de etanol, sendo que no Brasil o etanol é produzido fundamentalmente a partir da fermentação da sacarose da cana-de-açúcar, enquanto que nos EUA a produção se dá principalmente pela fermentação da glicose liberada do amido do milho (Balat *et al.*, 2008). O milho é um produto alimentício, o que acaba gerando uma competição entre a produção de alimentos e a de combustíveis. Desde 2005 os EUA vêm superando quantitativamente a produção de etanol do Brasil (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de etanol do Brasil e EUA (bilhões de litros) (RFA, 2013).

País	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Brasil	15,10	16,01	16,99	19,00	24,49	24,90	26,19	21,08	21,12
EUA	13,40	16,12	18,36	24,60	34,06	40,12	50,34	52,80	50,34

O novo conceito de etanol está ligado a sua produção utilizando materiais lignocelulósicos (Figura 2), sendo este conhecido como etanol de segunda geração. Essa tecnologia está emergindo como uma das mais importantes para o desenvolvimento sustentável da produção de combustíveis renováveis para o transporte (Sukumaran *et al.*, 2009).

Para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos precisa-se reduzir a celulose contida nesses materiais à sua unidade formadora, a glicose, que então pode ser fermentada a etanol. Porém, a bioconversão da biomassa lignocelulósica a etanol é difícil devido principalmente a natureza da biomassa que é resistente ao desarranjo de sua estrutura, à variedade de açúcares que são liberados quando os polímeros de hemicelulose e celulose são quebrados, à necessidade de identificar organismos geneticamente eficientes para fermentar esses açúcares, e, finalmente, aos custos da colheita e armazenamento das matérias-primas lignocelulósicas que na maioria das vezes possuem baixa densidade (Zaldivar *et al.*, 2001; Balat & Balat, 2009). Para tornar possível a utilização da biomassa lignocelulósica para produção de etanol são necessárias quatro operações principais, sendo a primeira o pré-tratamento que visa atuar na estrutura da biomassa facilitando o acesso de enzimas para a hidrólise da celulose, que é a segunda etapa. Após, os açúcares hidrolisados devem ser fermentados, e por último é realizada a separação/destilação dos produtos (Mosier *et al.*, 2005; Balat *et al.*, 2008; Balat & Balat, 2009).

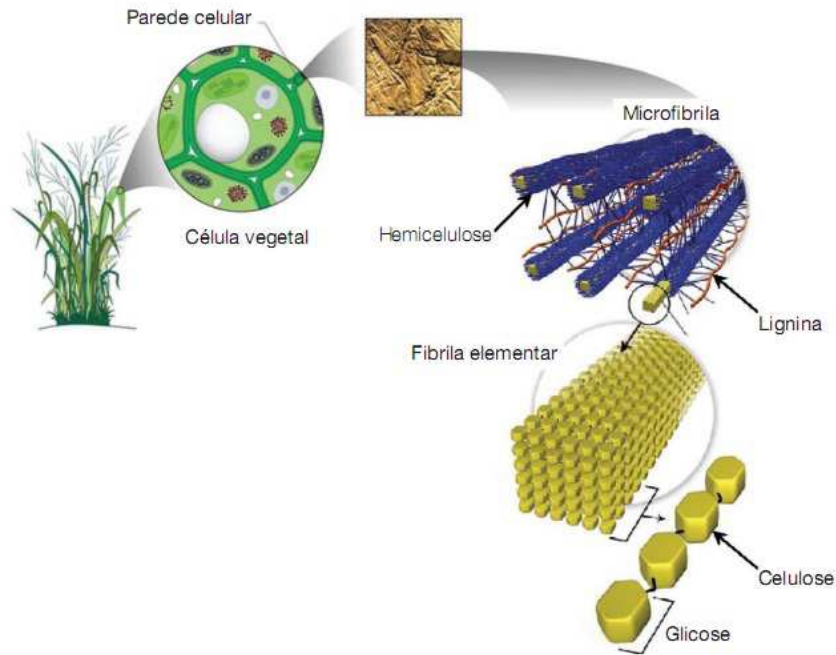
## **2.4 Biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica é o recurso biológico renovável mais abundante na Terra (Zhang, 2008; Alvira *et al.*, 2010). Celulose, hemicelulose e lignina são os três principais constituintes de qualquer material lignocelulósico. A proporção destes componentes numa fibra depende do tempo de cultivo e da origem da fibra e das condições de extração utilizadas para a obtenção das fibras (Reddy & Yang, 2005; Balat & Balat, 2009).

A celulose isolada é composta apenas de unidades de glicose, e naturalmente, procura-se reduzir essa macromolécula ao seu monômero, para aproveitá-lo como matéria-prima, de modo semelhante ao que é feito com o amido (Reguly, 1996). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo complexo composto por diferentes carboidratos como a glicose, a galactose, a manose, ácidos urônicos e no caso das gramíneas, composto principalmente pela xilose e a arabinose (Zheng *et al.*, 2009; Cassales *et al.*, 2011). Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos nas frações celulósica e hemicelulósica representam os substratos que podem ser utilizados para a produção de etanol por via fermentativa (Canilha *et al.*, 2010). Porém, a celulose natural nunca se apresenta de forma isolada na natureza, estando sempre associada à lignina, às hemiceluloses e, em alguns substratos, às pectinas (Reguly, 1996),



formando a microfibrila celulósica, que por sua vez, constitui a parede celular vegetal (Figura 3). A parede celular vegetal é uma estrutura recalcitrante difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (Canilha *et al.*, 2010).

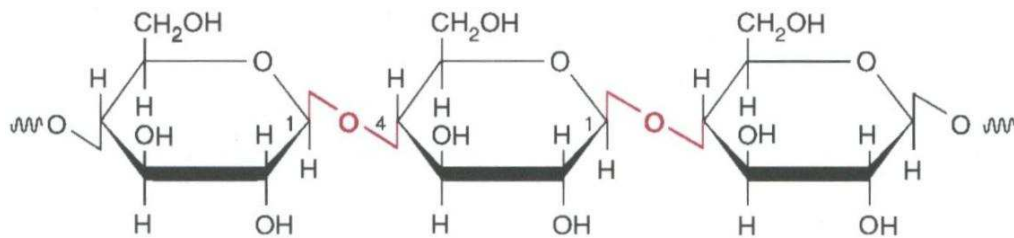


**Figura 3. Estrutura da parede celular vegetal (Canilha *et al.*, 2010).**

Biomassas lignocelulósicas possuem diversas aplicações, tais como materiais de construção, painéis de isolamento, alimentação animal, cosméticos, medicamentos e para outros biopolímeros e química fina. Produtos químicos, tais como o amoníaco, o carbono, metanol, etanol, carvão vegetal, ácido acético, acetona e óleos de hidrocarbonetos também são produzidos a partir de lignocelulose, por hidrólise e fermentação (Reddy & Yang, 2005). Esses materiais são particularmente atraentes como matérias-primas para a produção de biocombustíveis devido ao seu custo relativamente baixo, grande abundância e a oferta sustentável (Agbor *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012). Além das características citadas, a produção de energia a partir de materiais lignocelulósicos tem concorrência limitada com a produção de alimentos, assim, não comprometem a segurança alimentar (Dias *et al.*, 2012).

### 2.4.1 Celulose

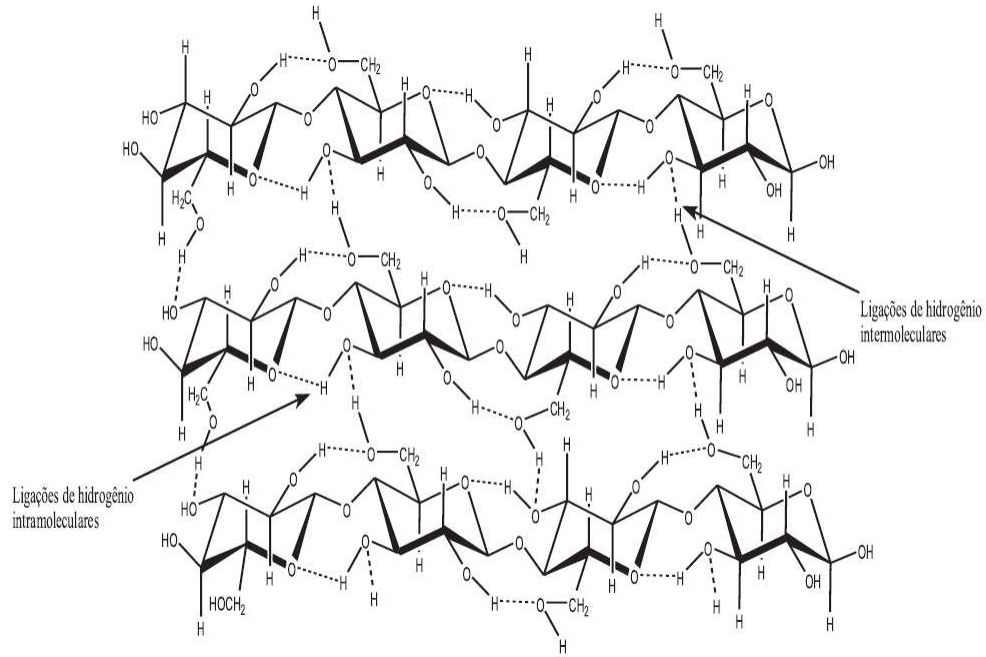
A celulose é um polímero linear composto por unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosídeos unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1 \rightarrow 4)$  (Figura 4) e com fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Howard *et al.*, 2003; Zhang, 2008; Santos *et al.*, 2012). A celulose é a biomolécula orgânica mais abundante na natureza e o principal constituinte da parede celular vegetal, tendo como características a rigidez, elevada resistência a tensão e insolubilidade em água e em um grande número de outros solventes (Arredondo, 2009; Agbor *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).



**Figura 4. Representação da molécula de celulose (adaptado de Santos *et al.*, 2012).**

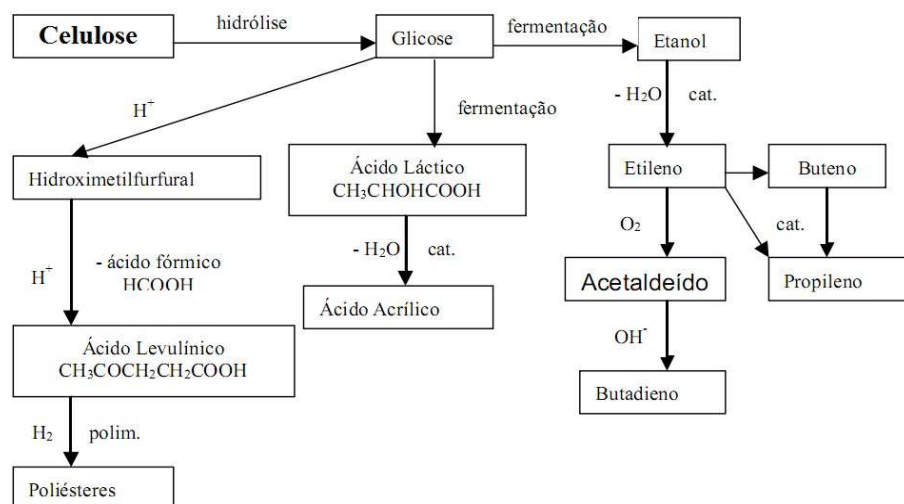
O tamanho da molécula de celulose é normalmente dado em termos de grau de polimerização, isto é, o número de unidades de anidroglicose presentes numa única cadeia (Ramos, 2003). O grau de polimerização médio da celulose é de cerca de 10.000 unidades, porém pode ser de apenas 15 unidades (Howard *et al.*, 2003).

As cadeias de celulose são agrupadas em forma de microfibrilas, que se ligam entre si formando fibras (macrofibrilas). A estrutura de fibras da celulose é mantida devido à presença de ligações covalentes, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (Agbor *et al.*, 2011; Hamelinck *et al.*, 2005). As ligações de hidrogênio (Figura 5) entre as microfibrilas de celulose determina a linearidade da cadeia, estas ligações inter e intramoleculares também são responsáveis pela cristalinidade e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (Agbor *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012). A cristalinidade da celulose diminui a acessibilidade da enzima dificultando a hidrólise da cadeia (Zhang, 2008). De modo geral, 60 a 70% da estrutura da celulose é cristalina e 30 a 40% se encontra sob a forma amorfa (Reguly, 1996).



**Figura 5. Ligações de hidrogênio inter e intramoleculares da celulose (Santos *et al.*, 2012).**

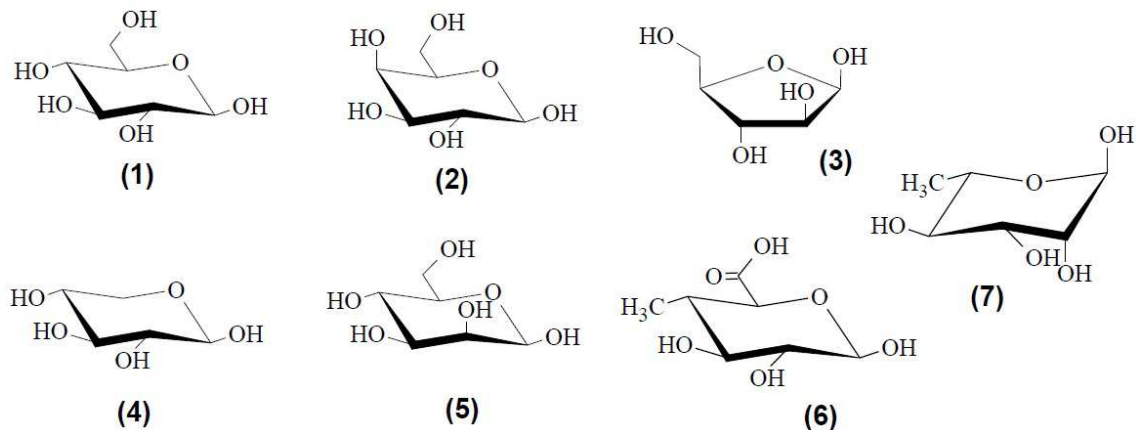
A glicose obtida através da hidrólise da celulose pode ser fermentada a etanol, o qual pode ser transformado em diversos insumos químicos, tais como: etileno, buteno, propileno, butadieno, ácido acrílico, etc. A hidrólise da glicose leva ainda a formação de 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), que pode ser clivado em ácido levulínico e ácido fórmico (Schuchardt *et al.*, 2001). A Figura 6 representa, de forma esquemática, alguns produtos que podem ser obtidos a partir da celulose.



**Figura 6. Produtos obtidos a partir da celulose (Schuchardt *et al.*, 2001).**

### 2.4.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos cuja natureza química varia de tecido para tecido e de espécie para espécie. Estes polissacarídeos são formados por cadeias de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (Figura 7) (Ramos, 2003; Gírio *et al.*, 2010; Pitarelo, 2013). Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (Santos *et al.*, 2012). A hemicelulose tem baixa massa molecular e menor grau de polimerização e orientação em relação à celulose e é mais facilmente hidrolisada (Reddy & Yang, 2005; Agbor *et al.*, 2011).



**Figura 7. Monossacarídeos constituintes da hemicelulose: (1) glicose, (2) galactose, (3) arabinose, (4) xilose, (5) manose, (6) 4-O-metil-D-glucurônico, (7) ramnose (Pitarelo, 2013).**

A hemicelulose está situada entre a lignina e as fibras de celulose (Reddy & Yang, 2005; Zhang, 2008). Possui estrutura química consistente com grupos de substituição laterais, tendo xilanas não só intercaladas entre os tecidos, e formando ligações éster em vários pontos com a lignina, mas também formando um revestimento as fibras de celulose por meio de ligações de hidrogênio (Zhang, 2008; Mosier *et al.*, 2005). A xilana, com suas ligações covalentes com a lignina e a suas interações não covalentes com a celulose, é importante na manutenção da integridade da parede celular da planta *in situ*, ajudando a proteger as fibras contra a degradação por enzimas (Zhang, 2008). Devido a esse revestimento que a hemicelulose proporciona às fibras de celulose, tem sido proposto que pelo menos 50% da hemicelulose deve ser removida para aumentar a digestibilidade de celulose (Agbor *et al.*, 2011).

Em condições amenas, a hemicelulose pode ser hidrolisada em seus açúcares constituintes, sendo que esses podem ser fermentados a etanol. No entanto, a severidade dos parâmetros devem ser cuidadosamente otimizados para evitar a formação de produtos de degradação, tais como ácido acético, furfural e 5-HMF que são inibidores do processo de fermentação (Petersen *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Agbor *et al.*, 2011). Alguns desses açúcares, além de poderem ser convertidos a etanol, podem ser fontes de outras matérias-primas, como, por exemplo, a conversão da xilose a xilitol (Schuchardt *et al.*, 2001). Os produtos que podem ser obtidos da hemicelulose estão apresentados na Figura 8.

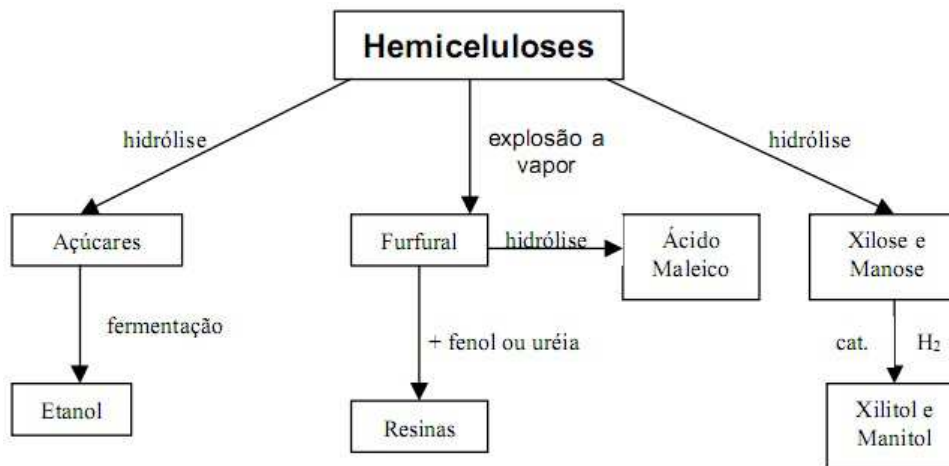


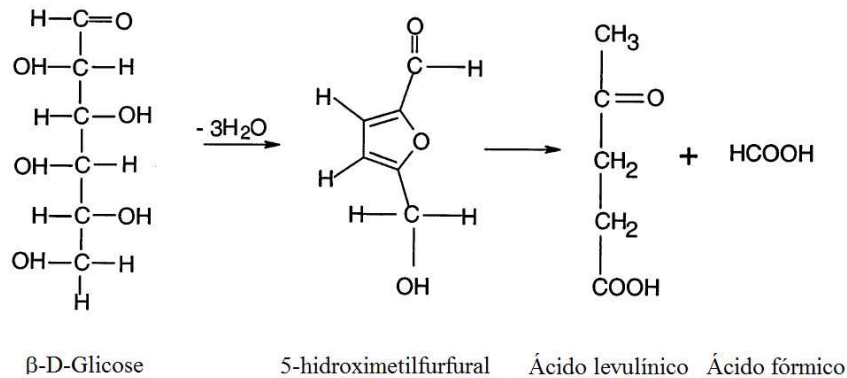
Figura 8. Produtos que podem ser obtidos da hemicelulose (Schuchardt *et al.*, 2001).

### 2.4.3 5-hidroximetilfurfural e furfural

O 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) é um furaldeído originado de reações de desidratação de hexoses (Figura 9) (Larsson *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004; Sehnem *et al.*, 2013). A toxicidade do 5-HMF está associada a danos em células de leveduras, já que a presença do grupo hidroximetil confere ao composto a característica de baixa hidrofobicidade e de permeabilidade à membrana, que acarreta em baixas velocidades de conversão do composto (Sehnem *et al.*, 2013).

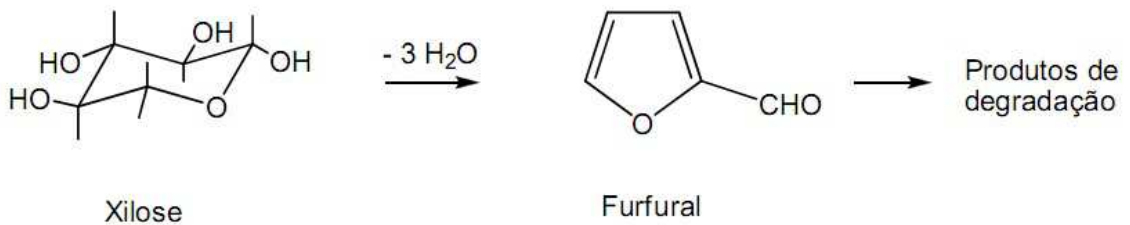
Segundo Gírio *et al.* (2010) o aumento do tempo e da temperatura de tratamento da biomassa aumenta a quantidade de monômeros hidrolisados e também acelera o processo de degradação dos açúcares de modo significativo. Em temperaturas elevadas, a molécula de 5-

HMF pode se decompor em ácido levulínico e ácido fórmico (Larsson *et al.*, 1999; Schuchardt *et al.*, 2001).



**Figura 9. Formação de 5-HMF e dos ácidos levulínico e fórmico (Larsson *et al.*, 1999)**

O furfural é formado a partir de pentoses e ácidos urônicos. Nos tratamentos de hidrólise da hemicelulose, o furfural se forma a partir da desidratação da xilose presente na hemicelulose, como apresentado na Figura 10. A degradação do 5-HMF também pode originar furfural, porém a quantidade de furfural a ser formada é muito pequena em relação a quantidade formada pela xilose (Gandini & Belgacem, 1997).



**Figura 10. Formação do furfural a partir da xilose (Marabezi, 2009).**

O furfural causa efeitos imediatos sobre o crescimento de microrganismos. A adição desse composto a um cultivo de leveduras tem um efeito imediato sobre o comportamento fisiológico dessas, pois na tentativa de diminuir os efeitos tóxicos do furfural ocorre a diminuição da produção de biomassa, do consumo de glicose e da produção de etanol e glicerol (Sehnem, 2013).

## 2.4.4 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, tridimensional, amorfa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 11), unidos por diferentes ligações, como carbono-carbono, ligações éter e ligações éster, todas elas covalentes, sendo que um monômero pode conter um ou vários tipos de ligação (Reguly, 1996; Canilha *et al.*, 2010; Agbor *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012). A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (Santos *et al.*, 2012). A lignina das coníferas (madeira mole) são polímeros de resíduos derivados do álcool coniferílico, a lignina das angiospermas são polímeros de resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico, já a lignina das gramíneas e herbáceas são formadas pelos três álcoois precursores (Reguly, 1996; Ramos, 2003). As gramíneas apresentam os menores teores de lignina, já as coníferas são as mais ricas (Canilha *et al.*, 2010).

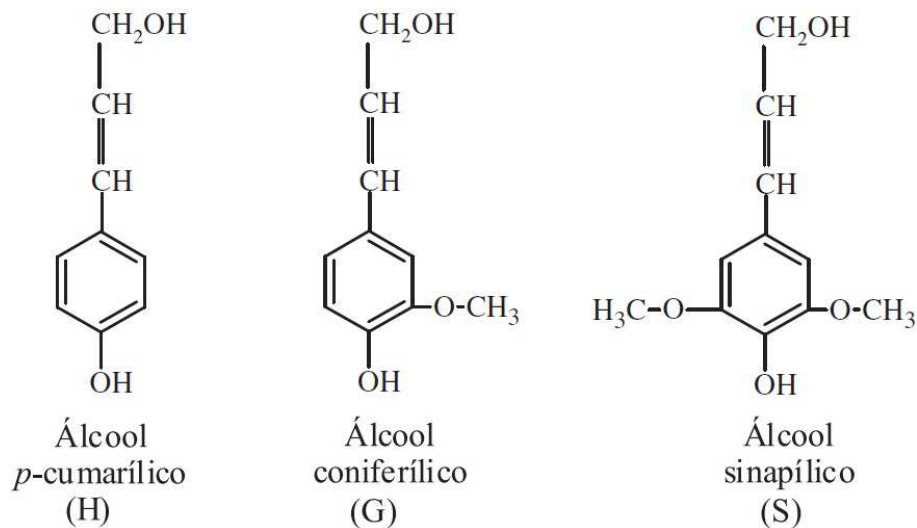


Figura 11. Álcoois precursores da lignina (Toor *et al.*, 2011).

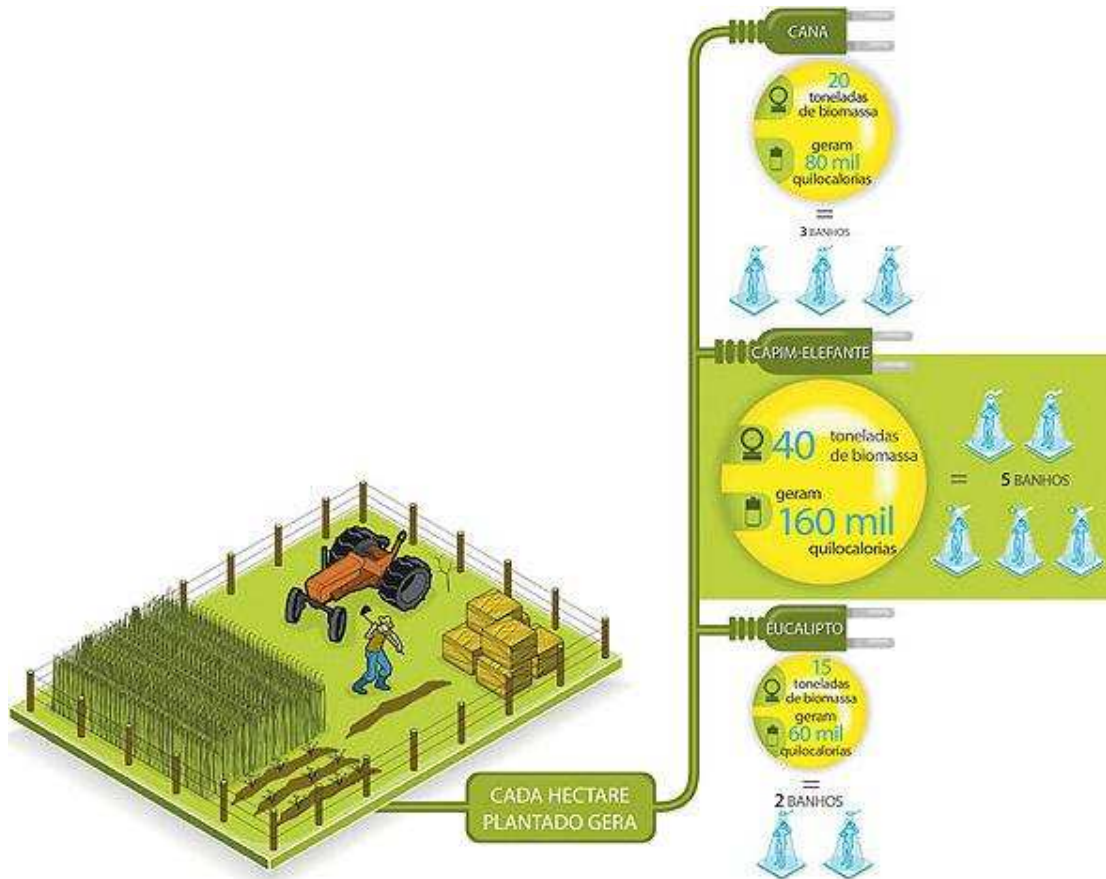
A lignina, nas paredes celulares das plantas, envolve as microfibrilas celulósicas, ligando-se a hemicelulose e celulose, protegendo da degradação química e biológica, devido a impermeabilidade ao ataque microbiano e ao estresse oxidativo. Também confere rigidez e resistência (Canilha *et al.*, 2010; Agbor *et al.*, 2011). Devido à sua associação com microfibrilas de celulose, a lignina foi identificada como a principal barreira à hidrólise enzimática e microbiana da biomassa lignocelulósica (Agbor *et al.*, 2011).

Quanto às ligações da lignina, Reguly (1996) relata que “a biossíntese dos precursores da lignina e dos próprios carboidratos dá origem à associação entre eles”. As ligações responsáveis pela associação são de dois tipos distintos: a) de natureza covalente, quando a lignina atua como elemento de ligação (*crosslink*) entre cadeias de carboidrato, sendo predominantemente glicosídicas, as quais existem também entre a lignina e hemiceluloses; b) de natureza adsortiva, quando ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals atuam como ligações entre a lignina e os açúcares.

## **2.5 Capim-elefante: propriedades e potencial como fonte de energia alternativa**

Estudos com diversas gramíneas perenes usadas como culturas energéticas vêm sendo realizados em diversos países, sendo que tais plantas diferem quanto ao potencial produtivo, às propriedades físico-químicas da biomassa, às demandas ambientais e às necessidades de manejo. Dentre as mais estudadas nos Estados Unidos e na Europa têm-se *Panicum virgatum* (“Switchgrass”), *Miscanthus* spp., *Phalaris arundinacea* (capim-amarelo) e *Arundo donax* (cana-do-reino). No Brasil, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) tem sido alvo deste tipo de estudo (Marafon *et al.*, 2012). Devido a quantidade de lignina presente na composição do capim-elefante a maior parte desses estudos tem foco na sua utilização como combustível sólido, principalmente para produção de pellets e bioeletricidade (Xie *et al.*, 2011). A Figura 12 mostra o potencial do capim-elefante para a produção de energia elétrica quando comparado com o potencial da cana-de-açúcar e do eucalipto. No entanto, estudos laboratoriais e em escala piloto também têm constatado as potencialidades da biomassa de capim-elefante para a produção de etanol de segunda geração (Toscan, 2010; Soares *et al.*, 2011; Marafon *et al.*, 2012). Estas plantas são culturas perenes consideradas adequadas como matéria-prima para a produção de etanol lignocelulósico por causa de seus altos rendimentos, baixo custo, podem ser cultivadas em terras inférteis, e causam menores impactos ambientais. As gramíneas são apontadas como culturas energéticas em potencial por causa da alta produtividade por hectare, abundância, disponibilidade e a possibilidade de utilização de toda a planta (Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012).





**Figura 12. Potencial do capim-elefante para a produção de energia elétrica quando comparado com o potencial da cana-de-açúcar e do eucalipto (Salgado, 2010).**

O capim-elefante (*P. purpureum* Schum.) (Figura 13) é uma das gramíneas mais importantes e mais difundidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É originária da África, onde ocorre naturalmente em vários países. Após seu reconhecimento como forrageira de alto valor para a alimentação animal, principalmente bovinos, o capim-elefante foi introduzido em vários países, sendo atualmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, em altitudes que variam do nível do mar até 2200 metros (Quesada, 2005). A cultura chegou ao Brasil nos anos de 1920 e se encontra hoje adaptada às cinco regiões do país (Quéno, 2009).



**Figura 13. Plantas de capim-elefante (Ferreira, 2008).**

Entre as biomassas lignocelulósicas, o capim-elefante (*P. purpureum* Schum.) se destaca pelo seu elevado potencial produtivo e características como resistência considerável à seca e ao frio. O capim-elefante pode ser descrito com uma gramínea perene, de hábito de crescimento cespitoso, atingindo de 3 a 5 m de altura, com colmos eretos, dispostos em touceiras abertas ou não. Desenvolve-se bem em temperaturas entre 18 e 30 °C e vivendo em áreas com precipitação de 800 a 4000 mm, entretanto, o melhor desenvolvimento se dá em altitudes de até 1500 m e com temperaturas de 24 °C (Quesada, 2005; Morais, 2008). Sua estrutura morfológica é semelhante à do bagaço de cana-de-açúcar, apresentando em sua composição 65 % de fibras e 35 % de material não fibroso (Azevedo, 2003; Morais, 2008), sendo que plantas que apresentam teor de fibras acima de 30 % podem ser adaptadas para produção de energia (Morais, 2008).

Sendo o capim-elefante uma espécie de alta eficiência fotossintética (metabolismo C<sub>4</sub>), ou seja, com maior eficiência no aproveitamento da luz e altamente eficiente na fixação de CO<sub>2</sub> atmosférico, tem-se como resultado uma maior capacidade de produção de matéria seca (Quesada, 2005; Morais, 2008; Xie *et al.*, 2011). Esta característica está ligada ao rápido crescimento da massa vegetal em um curto período de tempo das gramíneas forrageiras, que também otimizam o uso da água do solo e da energia solar. O ganho primário da utilização do capim-elefante e de outras gramíneas como fonte de energia alternativa é a própria potencialidade de acumulação de biomassa que estas espécies apresentam (Morais, 2008).

Outros fatores favoráveis ao cultivo de gramíneas perenes, como o capim-elefante, são que a necessidade de preparo de solo está limitada ao ano em que essas culturas são

plantadas e propiciam menor risco de erosão do solo. E finalmente, uma vez que essas plantas possuem poucas pragas naturais, elas podem ser produzidas com pouca ou nenhuma utilização de pesticidas (Xie *et al.*, 2011).

A caracterização da biomassa é uma etapa fundamental para sua utilização nos diferentes processos de conversão em energia e biocombustíveis, pois possibilita detectar variabilidade na matéria-prima, estabelecer parâmetros de qualidade, otimizar processos, entre outras vantagens (Chies, 2013). Apesar de inúmeros trabalhos utilizarem a metodologia NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008a), proposta pelo “National Renewable Energy Laboratory”, para determinação de monossacarídeos e da lignina de Klason (Gouveia *et al.*, 2009; Pitarelo, 2013), a maior parte dos trabalhos que estudam a composição do capim-elefante realiza a análise pelo método descrito por Van Soest & Wine (1968), como pode ser observado na Tabela 2.

Em seu trabalho Quesada (2005) avalia diferentes genótipos de capim-elefante e ao avaliar sua composição pelo método de Van Soest encontrou valores de fibra em detergente ácido (FDA), parte essa composta pela celulose, lignina e cinzas do capim, que variam de 45% a 58%. Ainda segundo Quesada (2005) a quantidade de celulose variou entre 41% e 45% e para a lignina de 9% a 13%. Na Tabela 2 (A, B e C) são apresentadas as composições de capim-elefante descritas por diversos autores.

Da análise dos dados apresentados na Tabela 2 (A, B e C), verifica-se que a celulose determinada pelo método de Van Soest varia de 19,8 % a 50,5 %, porém a maior parte dos resultados tem valores de celulose superior a 30,0 %. Ainda pelo mesmo método a hemicelulose varia de 20,7 % a 39,9 %, a lignina de 3,6 % a 12,9 % e as cinzas de 0,1 % a 9,3 %. Para as normas NREL/TP-510-42618 os poucos resultados apresentados indicam a lignina variando de 8,8 % a 20,8 %. Para os demais componentes avaliados por esta metodologia, apenas os resultados de Menegol (2012) são apresentados, apresentando cerca de 36,0 % de celulose, 20,5 % de hemicelulose e 8,5 % de cinzas.

Tabela 2A. Composição do capim-elefante descrita na literatura.

Genótipos Capim-elefante	FDN (% MS)	FDA (% MS)	Celulose (% MS)	Hemicelulose (% MS)	Lignina (% MS)	Cinzas (% MS)	Método Utilizado	Autor
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Napier (N-51)	75,3	46,2	36,5	29,1	9,1	-	Van Soest	Sladden <i>et al.</i> , 1991
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier (PI 300086)	74,6	46,2	36,7	28,4	9,1	-	Van Soest	Sladden <i>et al.</i> , 1991
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Texto (folha)	71,1	-	-	-	13,7	-	Van Soest e Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Deschamps, 1999
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Texto (colmo)	64,6	-	-	-	9,3	-	Van Soest e Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Deschamps, 1999
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Areia (folha)	58,6	-	-	-	11,9	-	Van Soest e Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Deschamps, 1999
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Areia (colmo)	58,4	-	-	-	8,8	-	Van Soest e Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Deschamps, 1999
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Roxo (folha)	60,3	-	-	-	13,8	-	Van Soest e Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Deschamps, 1999
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Roxo (colmo)	59,9	-	-	-	10,2	-	Van Soest e Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Deschamps, 1999
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	87,1	47,1	40,7	39,9	6,4	-	Van Soest	Almeida <i>et al.</i> , 1999
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Roxo	72,3	41,9	30,9	30,7	8,5	2,7	Van Soest	Santos <i>et al.</i> , 2001
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Gramafante+N (folha)	-	45,9	31,5	-	10,0	4,5	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Gramafante+N (colmo)	-	52,9	39,3	-	11,6	2,0	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Gramafante+leg (colmo)	-	52,6	38,5	-	12,0	2,3	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Gramafante (folha)	-	43,3	27,2	-	8,0	8,0	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P.purpureum</i> , Schum. Cv. Gramafante (colmo)	-	53,2	39,2	-	12,1	1,8	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004

Tabela 2B. Composição do capim-elefante descrita na literatura.

Genótipos Capim-elefante	FDN (% MS)	FDA (% MS)	Celulose (% MS)	Hemicelulose (% MS)	Lignina (% MS)	Cinzas (% MS)	Método Utilizado	Referência
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Gramafante+leg (folha)	-	42,2	27,6	-	6,5	8,1	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Camerron+N (folha)	-	45,0	31,2	-	8,6	5,3	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Camerron+N (colmo)	-	53,1	39,0	-	12,8	1,2	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Camerron+leg (folha)	-	43,1	30,1	-	8,5	4,6	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Camerron+leg (colmo)	-	53,5	41,2	-	11,3	1,0	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Camerron (folha)	-	46,3	30,2	-	8,7	3,2	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Camerron (colmo)	-	52,9	40,1	-	10,7	0,9	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. BAG 02+N (folha)	-	41,9	27,5	-	8,9	5,5	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. BAG 02+N (colmo)	-	53,6	41,1	-	10,9	1,6	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. BAG 02+leg (folha)	-	45,9	29,5	-	9,6	6,8	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. BAG 02+leg (colmo)	-	55,5	39,7	-	12,9	3,0	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. BAG 02 (colmo)	-	53,1	40,6	-	10,9	1,6	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Roxo (folha)	-	43,3	27,8	-	8,3	7,1	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Roxo (colmo)	-	54,0	38,9	-	12,8	2,3	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. BAG 02 (folha)	-	43,9	29,4	-	8,8	5,8	Van Soest	Quesada <i>et al.</i> , 2004
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	61,6	32,6	19,8	28,9	3,6	9,3	Van Soest	Tessema & Baars, 2004

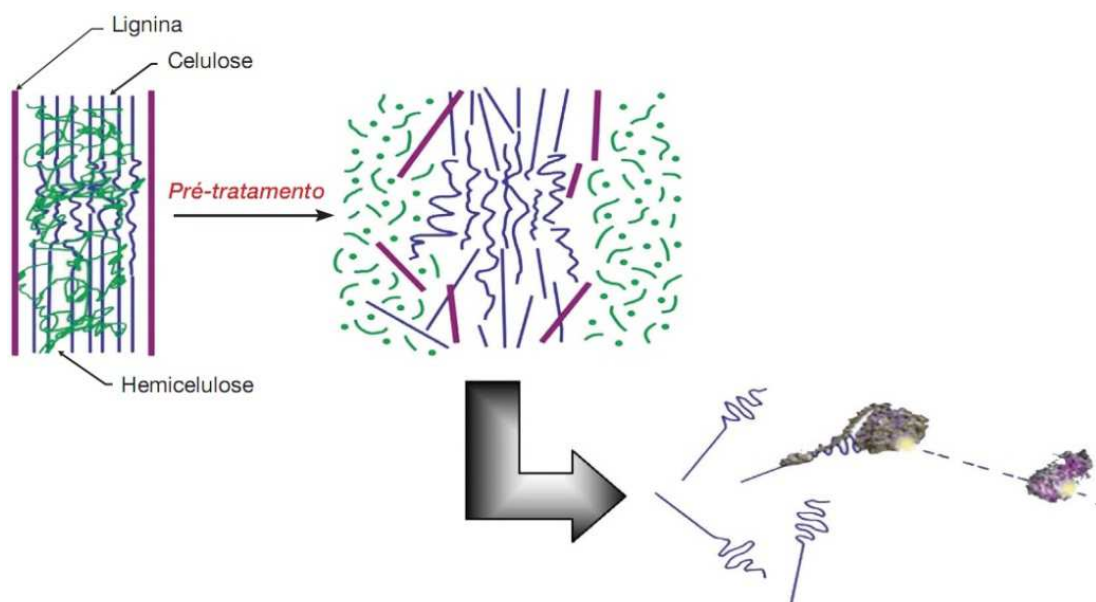
Tabela 2C. Composição do capim-elefante descrita na literatura.

Genótipos Capim-elefante	FDN (% MS)	FDA (% MS)	Celulose (% MS)	Hemicelulose (% MS)	Lignina (% MS)	Cinzas (% MS)	Método Utilizado	Referência
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	76,9	56,2	47,3	20,7	7,6	-	Van Soest	Benedetti <i>et al.</i> , 2008
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	84,8	62,7	50,5	22,1	10,7	5,2	Van Soest	Lopes <i>et al.</i> , 2009
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Bermuda	69,7	38,0	35,0	31,7	3,0	-	Van Soest	Brandon <i>et al.</i> , 2011
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	67,4	41,6	39,2	25,8	2,4	-	Van Soest	Brandon <i>et al.</i> , 2011
<i>P. purpureum</i> , Schum.	-	-	36,0	20,5	20,8	8,5	Lignina de Klason (NREL/TP-510-42618)	Menegol, 2012
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	64,7	39,0	34,4	25,7	4,6	-	Van Soest	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	73,6	40,6	33,1	-	3,1	-	Van Soest	Singh <i>et al.</i> , 2012
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Napier	-	-	32,9	36,5	3,6	0,3	Van Soest	Wongwatanapaiboon <i>et al.</i> , 2012
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. Mott	-	-	35,6	34,2	3,7	0,1	Van Soest	Wongwatanapaiboon <i>et al.</i> , 2012
<i>P. purpureum</i> , Schum. Cv. King Napier	-	-	32,0	31,1	3,1	1,7	Van Soest	Wongwatanapaiboon <i>et al.</i> , 2012
<i>P. purpureum</i> X <i>P. americanum</i>	-	-	33,9	35,1	3,6	0,2	Van Soest	Wongwatanapaiboon <i>et al.</i> , 2012

A elevada quantidade de celulose apresentada pelo capim-elefante aparece como fator primordial para o incentivo a produção de etanol utilizando essa matéria-prima como fonte de biomassa. Outra característica importante é o fato do capim-elefante poder ser cultivado em áreas que não seriam propícias para a produção de cana-de-açúcar, assim como a boa integração com a produção de alimentos e a sua alta produtividade quando comparada a cana-de-açúcar, sendo que enquanto a cana-de-açúcar tem uma produtividade de 27 ton de massa seca por hectare em um ano, o capim-elefante chega a produzir acima de 40 ton de massa seca por hectare, o que corresponde também ao dobro da biomassa produzida pelo eucalipto (Marafon *et al.*, 2012).

## 2.6 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é essencial para a bioconversão, pois esses materiais apresentam diversas barreiras físicas e químicas que inibem consideravelmente os processos de hidrólise e fermentação (Ramos, 2003). Considerando essas barreiras, os pré-tratamentos objetivam aumentar a área superficial, reduzir a polimerização e cristalização da celulose, modificar ou remover a hemicelulose e lignina, facilitando assim a atividade química das enzimas ou ácidos na hidrólise, resultando em um maior rendimento da conversão de açúcares fermentescíveis (Figura 14) (Cassales, 2010; Kumar *et al.*, 2011).



**Figura 14.** Alterações estruturais na microfibrila celulósica ocasionadas pelo pré-tratamento, seguidas pela hidrólise enzimática (Canilha *et al.*, 2009).

Tendo em vista que as concentrações de hemicelulose e lignina variam conforme a fonte de origem da biomassa e os diversos outros fatores que contribuem para isso, torna-se difícil obter um método de pré-tratamento que seja adequado para todos os tipos de materiais lignocelulósicos (Hamelinck *et al.*, 2005; Silva, 2009; Alvira *et al.*, 2010; Menon & Rao, 2012). O pré-tratamento consiste numa das etapas mais relevantes em termos de custos diretos, influenciando consideravelmente também os custos das etapas que precedem e sucedem o processo, bem como os custos de matéria-prima e de capital (Mosier *et al.*, 2005; Balat *et al.*, 2008). Deste modo, o pré-tratamento deve ser bastante eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade, simplicidade operacional, segurança e higiene

industrial e atributos ambientais, ter um reduzido consumo de insumos químicos, energia e utilidades, evitar a formação de subprodutos, requerer baixo investimento e custo operacional (Alvira *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012; Menon & Rao, 2012).

Durante as últimas décadas, várias abordagens têm sido utilizadas para o desenvolvimento de pré-tratamentos de baixo custo para a liberação dos açúcares da celulose e hemicelulose. Estudos de diferentes pré-tratamentos publicados na literatura são descritos em termos dos mecanismos envolvidos, vantagens e desvantagens (Quadro 1) e avaliação econômica (Menon & Rao, 2012).

**Quadro 1. Vantagens e desvantagens de diferentes pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica (adaptada de Mosier *et al.*, 2005; Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Santos *et al.*, 2012).**

<b>Pré-tratamento</b>	<b>Classificação</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Mecânico (moinho)	Físico	Redução de cristalinidade da celulose	Alto consumo de energia
Ácido Diluído	Químico	Hidrólise da hemicelulose a xilose e outros açúcares, alteração da estrutura da lignina	Difícil recuperação do ácido, corrosivo, alto custo, formação de substâncias tóxicas (inibidores)
Alcalino	Químico	Remoção da hemicelulose e lignina, aumento da área superficial	Longos tempos de residência, não se pode recuperar os sais
Ozonólise	Químico	Redução do teor de lignina, não produz substâncias tóxicas	Alto custo, necessidade de grande quantidade de ozônio
Organosolv	Químico	Hidrólise da hemicelulose a xilose, efetiva deslignificação	Alto custo, necessidade de recuperação do solvente
Biológico	Biológico	Baixo consumo de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa velocidade de hidrólise
Explosão a Vapor	Físico-Químico	Aumento da área superficial, degradação da hemicelulose, alteração da estrutura da lignina, custo-benefício	Perda de parte da xilose, rompimento incompleto da matriz carboidrato-lignina, geração de compostos tóxicos (inibidores)
AFEX (ammonia fibre explosion)	Físico-Químico	Aumento da área superficial, remoção parcial de lignina e hemicelulose, não produz compostos inibidores	Recuperação da amônia, não é efetivo para biomassas com alta concentração de lignina
Hidrotérmico (água)	Físico-Químico	Remoção da hemicelulose, aumento da área superficial	Menor remoção de lignina

Em geral, os pré-tratamentos podem ser divididos em processos químicos, físicos, biológicos e ainda uma combinação desses processos (Agbor *et al.*, 2011; Menon & Rao, 2012). Entre os pré-tratamentos físicos pode-se citar a moagem, a variação de temperatura (altas temperaturas, congelamento, descongelamento), variação de pressão, extrusão, secagem e a irradiação (raios gama, feixe de elétrons, micro-ondas, etc.) sendo que para cada um deve-



se avaliar sua real efetividade (Knauf & Moniruzzaman, 2004; Menon & Rao, 2012). Os pré-tratamentos físicos aumentam a área superficial específica e diminuem tanto o grau de polimerização quanto a cristalinidade da celulose (Agbor *et al.*, 2011). Porém estes pré-tratamentos exigem, normalmente, grande quantidade de energia, são de elevado custo e empregam meios puramente mecânicos para reduzir o tamanho das partículas da matéria-prima, aumentando assim sua área superficial (Laser *et al.*, 2002).

Os pré-tratamentos biológicos resultam em uma deslignificação parcial da biomassa lignocelulósica usando microrganismos específicos para a degradação da lignina e hemicelulose, tais como fungos e bactérias (Ramos, 2003; Alvira *et al.*, 2010). Esses são vantajosos por não necessitarem de adição de produtos químicos poluentes, não gerarem resíduos causadores de poluição ambiental e demandarem baixas quantidades de energia (Camassola, 2007). A degradação da lignina por fungos de podridão branca é a mais eficaz para o pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos e ocorre através da ação de enzimas que degradam a lignina como as peroxidases e lacases (Pan *et al.*, 2005; Okano *et al.*, 2005; Camassola & Dillon, 2009; Alvira *et al.*, 2010). Resultados promissores da redução do teor de lignina já foram relatados, porém a biodegradação da lignina é um processo muito lento, sendo considerado viável apenas se for aplicado em conjunto com outros métodos físicos e químicos (Ramos, 2003).

Os pré-tratamentos químicos tem se baseado em métodos que têm sido amplamente utilizados na indústria do papel para a deslignificação de materiais lignocelulósicos para produzir produtos de papel de alta qualidade (Menon & Rao, 2012). Os pré-tratamentos químicos utilizando ácidos, peróxidos, solventes orgânicos, líquido iônicos, etc., atuam no material lignocelulósico possibilitando o aumento do tamanho dos poros, solubilizando a lignina, a hemicelulose e também a celulose, e aumentando a área superficial (Weil *et al.*, 1994; Menon & Rao, 2012). A base e o ácido mais utilizados em pré-tratamentos são hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), respectivamente (Mosier *et al.*, 2005).

De modo geral, a combinação dos processos físicos e químicos geram os resultados mais promissores (Ramos, 2003). Para Canilha *et al.* (2009) o pré-tratamento ideal deveria maximizar a digestibilidade enzimática, gerar uma perda de açúcares mínima, otimizar a produção de subprodutos, não necessitar da adição de reagentes que pudessem inibir as enzimas e microrganismos na hidrólise e fermentação, respectivamente, minimizar o uso de

energia, reagentes e equipamentos, e por fim, um dos pontos mais importantes, permitir a transposição para a escala industrial. Entre os processos de pré-tratamento, cabe destacar a utilização de ácidos diluídos, a explosão a vapor, explosão da fibra com amônia (AFEX) e o hidrotérmico.

O pré-tratamento utilizando ácidos muitas vezes é chamado apenas de tratamento uma vez que já realiza também a hidrólise do material (Galbe & Zacchi, 2002). O pré-tratamento com ácidos pode ser feito utilizando ácidos concentrados ou diluídos, sendo conduzido a elevadas temperaturas quando o ácido é diluído e em baixas temperaturas em processo com ácidos concentrados (Balat, 2011). Porém, ácidos concentrados são tóxicos, perigosos, corrosivos, requerendo assim reatores resistentes à corrosão. Além disso, após a hidrólise, os ácidos concentrados devem ser recuperados a fim de tornar o processo viável economicamente. Sendo largamente utilizado para resíduos agrícolas, este tratamento faz uso de ácidos diluídos como o clorídrico, nítrico, fosfórico e principalmente o sulfúrico (Ramos, 2003; Mosier *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2011). No pré-tratamento o ácido diluído é misturado ou posto em contato com a biomassa e a mistura é mantida à temperatura de 140-220 °C por períodos que variam de segundos a minutos (Mosier *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2011).

O pré-tratamento com ácido diluído libera oligômeros e monossacarídeos afetando a reatividade dos polímeros de carboidratos da biomassa (Mosier *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2011). Dependendo da severidade do pré-tratamento, os açúcares podem ser convertidos em aldeídos, tais como furfural e 5-HMF (Agbor *et al.*, 2011). Entre as vantagens do uso de ácidos diluídos em pré-tratamentos podem-se citar as elevadas velocidades de reação e a melhora significativa da hidrólise da hemicelulose e da celulose, em função da variação da severidade do pré-tratamento (Agbor *et al.*, 2011). Entre as desvantagens, estão os problemas da fermentação devido à presença de inibidores, alto custo em relação a outros métodos de pré-tratamento físico-químicos, tais como explosão a vapor e AFEX, a corrosão causada pelo ácido sendo necessária a utilização de materiais mais resistentes, que também são mais caros, na construção dos equipamentos (Mosier *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2011; Banerjee *et al.*, 2011).

A explosão a vapor é um dos pré-tratamentos mais estudados (Ramos *et al.*, 1992; Galbe & Zacchi, 2002) e, em seu princípio, é um método de pré-tratamento que pode causar desintegração do material, criando assim uma grande superfície em que o complexo de enzimas que hidrolisam a celulose pode agir. Simultaneamente, a hemicelulose é separada

durante o processo de explosão a vapor, facilitando a acessibilidade para as enzimas e valorizando a degradação da lignocelulose (Singh *et al.*, 2009). Nesse pré-tratamento, a biomassa fica exposta ao vapor de água pressurizado e é rapidamente despressurizado. Essa rápida despressurização rompe a estrutura da biomassa e hidrolisa os grupos acetil da hemicelulose, solubilizando a hemicelulose (El-Zawawy *et al.*, 2011). A biomassa é tratada com vapor saturado com temperatura entre 140 °C e 240 °C e pressão de 5,9 a 33,6 atm durante um período que varia de 1 a 15 min. Nessas condições fibras reativas são obtidas, podendo chegar a 90 % de conversão, havendo, porém, baixa recuperação de pentosanas e produção de componentes que inibem os processos de hidrólise enzimática e fermentação (como furfural e 5-HMF), sendo necessária uma “desintoxicação” para aumentar a fermentabilidade dos hidrolisados lignocelulósicos em combustíveis e outros produtos químicos (Laser *et al.*, 2002; Ramos, 2003).

O pré-tratamento de explosão a vapor pode ser realizado com ou sem adição de um catalisador ácido. Se nenhum catalisador ácido exógeno é adicionado à biomassa, o pré-tratamento com vapor é conhecido como auto-hidrólise e o catalisador ácido responsável pela quebra das ligações glicosídicas depende principalmente dos ácidos que são formados a partir da própria biomassa. Embora o ácido acético formado a partir de hemiceluloses acetiladas tem sido considerado o catalisador ácido da auto-hidrólise, outros ácidos, tais como o ácido fórmico e ácido levulínico também são produzidos e podem desempenhar um papel importante na eficácia do pré-tratamento (Ramos, 2003).

A explosão da fibra com amônia (AFEX) é um pré-tratamento que envolve a utilização de amônia líquida e a explosão a vapor (Hamelinck *et al.*, 2005; Balat *et al.*, 2008), onde o material lignocelulósico é submetido ao tratamento com amônia líquida em alta temperatura (entre 70 °C e 200 °C) e pressão (entre 6,8 atm e 27,2 atm), com uma subsequente descompressão rápida, semelhante à explosão de vapor, o que causa uma rápida sacarificação do material (Bals *et al.*, 2010; Balat, 2011). Este processo descrystaliza a celulose, hidrolisa a hemicelulose, remove e despolimeriza a lignina, e aumenta o tamanho e o número de microporos na parede celular, aumentando significativamente a velocidade da hidrólise enzimática (Bals *et al.*, 2010). Entre as principais desvantagens do AFEX está o alto custo associado, a formação de compostos de inibição (como furfural e 5-HMF) pela degradação dos carboidratos, a baixa eficiência em biomassas com altas concentrações de lignina e as preocupações ambientais com a evaporação da amônia (Mosier *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2011).

### 2.6.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O método hidrotérmico utiliza como princípio o uso de água, no estado líquido ou gasoso ou ambos (Laser *et al.*, 2002), em temperaturas e pressões elevadas. Nessas condições a água tem suas propriedades químicas modificadas: a) o  $pK_a$  da água é afetado pela temperatura de modo que o pH da água pura a 200 °C é cerca de 5,0; b) a água tem uma constante dielétrica anormalmente elevada que permite que as substâncias iônicas dissociem (Mosier *et al.*, 2005). Com essas alterações, a água é capaz de penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e clivar as ligações éter e éster favorecendo a hidrólise da hemicelulose e sua remoção (Silva, 2009; Demirbas & Gupta, 2011; Silva, 2012).

A água remove a hemicelulose do material lignocelulósico através de uma combinação de dissolução e auto-hidrólise em temperaturas variando de 120 °C a 200 °C (Weil *et al.*, 1994), sendo que essa remoção de hemicelulose pode chegar a ser de 100 % (Mosier *et al.*, 2005). Nas temperaturas na faixa de 180 a 220 °C, em curtos períodos de reação, além da dissolução da hemicelulose em água, diferentes quantidades de lignina podem ser extraídas (de 35 a 60 % do total de lignina) (Mosier *et al.*, 2005; Silva, 2009). Em meio aquoso, a lignina sofre tanto degradação quanto repolimerização, sendo a fração de lignina solubilizada dependente das condições operacionais e da matéria-prima. Esta solubilização envolve tanto a quebra da ligação lignina-carboidrato quanto a reação de despolimerização (Garrote *et al.*, 1999; Wörmeyer *et al.*, 2011; Silva, 2012). Ainda, com o aumento do tempo e da temperatura de reação, o grau de polimerização da celulose pode diminuir, podendo-se ter uma perda de até 22 % do total de celulose presente (Mosier *et al.*, 2005; Silva, 2009).

Os pré-tratamentos hidrotérmicos são tanto favorecidos quanto prejudicados pela clivagem das ligações *O*-acetil e de ácido urônico da hemicelulose gerando assim ácido acético e outros ácidos orgânicos. A liberação destes ácidos contribui para catalisar a formação e a remoção de oligossacarídeos. No entanto, os polissacarídeos e especialmente a hemicelulose podem ser hidrolisados a açúcares monoméricos, que após são parcialmente degradados a aldeídos pela ação desses ácidos. Estes aldeídos, principalmente furfural e o 5-HMF, são inibitórios para a fermentação microbiana (Mosier *et al.*, 2005).

Este pré-tratamento é considerado por alguns autores um processo puramente físico por não ser adicionado nenhum tipo de reagente químico além da própria água (Hamelinck *et al.*, 2005; Mosier *et al.*, 2005), enquanto que outros autores, considerando as características

alteradas da própria água assim como os produtos formados durante o processo, classificam esse processo como físico-químico (Balat, 2011; Menon & Rao, 2012).

Esse processo mostra ter potencial para produzir fibras reativas, recuperar boa parte das pentosanas e ainda produz pouco ou nenhum componente que possa vir a inibir as etapas seguintes (Silva, 2009; Agbor *et al.*, 2011). Para Homrich *et al.* (2010), que iniciaram estudos sobre o pré-tratamento hidrotérmico no capim-elefante, outra vantagem deste pré-tratamento é que não há a necessidade de separação posterior de reagentes, o que ocorre em outros tipos de pré-tratamento. A não utilização de reagentes ácidos ou alcalinos implica ainda em não haver necessidade de trabalhar com reatores altamente resistentes à corrosão e elimina a necessidade de lavar ou neutralizar a biomassa pré-tratada, tendo em vista a utilização exclusiva de água, o que diminui os custos do processo como um todo (Agbor *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).

Em seu trabalho Homrich *et al.* (2010) estudaram os efeitos da variação de temperatura, tempo, granulometria e meio de pré-tratamento, variando cada um em dois níveis. Entre as conclusões observaram que a granulometria da biomassa é o fator que menos interfere em sua conversão a etanol.

Toscan (2010) realizou testes em duas condições de tempo e temperatura de pré-tratamento hidrotérmicos no capim-elefante, sendo estas 5 e 30 min e 120 e 220 °C, respectivamente. Verificou-se que os resultados mais promissores foram obtidos na temperatura máxima e no menor período de tempo.

Kuhnel *et al.* (2011) testaram o pré-tratamento hidrotérmico utilizando como biomassa a polpa de beterraba. Os testes foram realizados nas temperaturas de 120 °C, 140 °C e 170 °C. Paralelamente aos pré-tratamentos hidrotérmicos, a polpa de beterraba foi submetida a pré-tratamentos utilizando ácido sulfúrico diluído nas mesmas temperaturas de operação do hidrotérmico. Foi concluído a partir desses testes que a 140 °C o pré-tratamento hidrotérmico seguido de digestão enzimática permitiu uma hidrólise rápida e eficiente da polpa de beterraba, onde mais de 90 % da celulose foi hidrolisa em 24 h, mesmo utilizando menores concentrações de enzimas que outros trabalhos apresentam. Verificou-se ainda que o processo não resultou em perda de biomassa e nem em produção de compostos inibidores.

Uma pesquisa de otimização do pré-tratamento hidrotérmico em palha de trigo para uma planta piloto foi realizado por Petersen *et al.* (2009). Os autores testaram as temperaturas de 185, 195 e 205 °C em tempos variados de 6 a 12 min, e para a comparação entre as

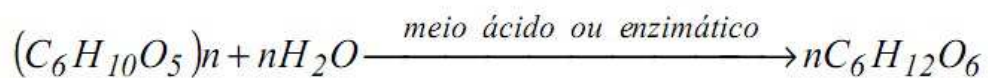
diferentes condições de pré-tratamento utilizaram a severidade, conforme descrita por Overend e Chornet (1987), como parâmetro. Levando em consideração a recuperação da hemicelulose, da celulose nas fibras, e a conversão a etanol e comparando os resultados de cada pré-tratamentos, os autores relatam que os parâmetros ótimos de pré-tratamento para este conjunto foram a 195 °C por 6 e 12 min. Nessas condições, aproximadamente 70% das hemiceluloses foram recuperadas, 93-94 % da celulose foi recuperada nas fibras e aproximadamente 89 % da celulose nas fibras pode ser convertida em etanol por misturas comerciais de celulasas - aumentando para aproximadamente 92 % quando foi feita a adição de uma xilanase comercial (Petersen *et al.*, 2009).

Laser *et al.* (2002) realizaram um estudo comparando o pré-tratamento hidrotérmico em bagaço de cana-de-açúcar utilizando vapor de água saturado e água no estado líquido também saturada. Os pré-tratamentos foram realizados em reator de batelada de 25 litros, em temperaturas variando de 170 a 230 °C e tempos de 1 a 46 min. A concentração de sólidos durante o pré-tratamento variou de 1 a 8 % para o processo com água no estado líquido e foi maior de 50 % nos pré-tratamentos com vapor da água. Após o pré-tratamento foi realizado sacarificação e fermentação simultânea (SSF), utilizando celulasas de *Trichoderma reesei* suplementado com  $\beta$ -glucosidade e *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observado que a conversão do SSF, a dissolução da xilana, a concentração de furfural e a inibição do hidrolisado aumentam, enquanto a recuperação de xilana e o pH diminuem, em função do aumento da concentração de sólidos na utilização de água saturada no estado líquido. Observou-se ainda que a inibição da fermentação aumenta com o aumento da concentração de furfural tanto para a utilização de água no estado líquido quanto no estado gasoso, sendo a inibição maior de 89 % quando a concentração de furfural é maior que 0,15 g.L<sup>-1</sup>. Os autores relatam que utilização de água saturada no estado líquido foi pré-tratamento mais promissor, isso porque, ambos os métodos apresentaram potencial para produzir fibras reativas, mas a utilização de água no estado líquido proporcionou uma melhor recuperação de xilana.

Xu *et al.* (2010) investigaram o pré-tratamento hidrotérmico em palha de milho em um reator de circulação na temperatura de 195 °C em tempos variando de 10 a 30 min. Após o pré-tratamento, a fase sólida insolúvel foi separada da fase líquida, sendo que glucana e xilana foram encontradas em ambas as fases. Além de 5-HMF e furfural, ácidos acético, lático e fórmico também foram encontrados na fase líquida, porém os compostos detectados não apresentaram efeito inibidor na atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A melhor condição de pré-tratamento foi determinada em 195 °C por 15 min.

## 2.7 Hidrólise

A reação de hidrólise pode ser catalisada por ácidos (via química), diluído ou concentrado, e por enzimas (via bioquímica) (Balat *et al.*, 2008). A variação de eficiências desses dois métodos depende das condições de tratamento, o tipo de biomassa e as propriedades dos agentes hidrolíticos (Sukumaran *et al.*, 2009). A Figura 15 representa a reação de hidrólise em um polissacarídeo.



**Figura 15. Reação de hidrólise de polissacarídeo (Balat *et al.*, 2008; Arredondo, 2009).**

A hidrólise ácida é uma das tecnologias mais antigas e mais aplicada para a conversão de lignocelulose em açúcares fermentescíveis. Na hidrólise ácida, o ácido mais utilizado é o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade (Arredondo, 2009), porém a mesma pode ser realizada com outros ácidos como o clorídrico, sulfuroso, fluorídrico e nítrico. Existem dois tipos básicos dos processos de hidrólise ácida comumente utilizados, a hidrólise com ácido diluído e com ácido concentrado (Balat & Balat, 2009). As temperaturas do processo variam, sendo utilizadas temperaturas baixas para os ácidos concentrados e temperaturas altas (200 – 240 °C) para os ácidos diluídos (El-Zawawy *et al.*, 2011). A conversão da hidrólise ácida varia entre 50 e 90 % (Jones & Semrau, 1984; Wyman, 1996).

Em muitos processos as enzimas são preferíveis aos ácidos, uma vez que são biocatalisadores específicos, podem operar sob condições de reação muito mais suave, não exigindo equipamentos resistentes a corrosão; não produzem produtos indesejáveis, como furfural e 5-HMF, que inibem a fermentação e são ambientalmente corretas (Howard *et al.*, 2003; Camassola, 2007).

No processo enzimático a hidrólise da celulose é catalisada por enzimas específicas denominadas enzimas celulolíticas ou celulases (Silva, 2009; El-Zawawy *et al.*, 2011). A hidrólise enzimática aparece como uma opção promissora principalmente em termos de diminuição dos custos totais devido às condições de temperatura (entre 45 e 50 °C) do processo, economizando assim energia para o aquecimento e, também por não haver problemas com corrosão (Balat *et al.*, 2008). O principal custo da hidrólise enzimática ainda

são as enzimas. Para resolver este problema diversos estudos estão sendo realizados buscando o entendimento de enzimas e proporções de aplicação para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos eficientes e econômicos. A solução deste problema torna-se ainda mais difícil ao se considerar a grande variação de composição dos diferentes materiais lignocelulósicos existentes e que cada um desses responde de forma particular a utilização de cada pré-tratamento, sendo então necessárias enzimas que se adéquem as diferenças (Banerjee *et al.*, 2010). Uma solução possível, proposta por Banerjee *et al.* (2010), é o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos de aplicação a uma determinada combinação de pré-tratamento/biomassa e para isso, estudam o desenvolvimento de um processo capaz de otimizar rapidamente a obtenção de coquetéis de enzimas multicomponentes para liberação de glicose e xilose de uma variedade de diferentes combinações pré-tratamento/biomassa. Outro fator que afeta a produtividade e a velocidade inicial de hidrólise enzimática da celulose é a concentração do substrato. Aumento na concentração de substrato, normalmente resulta em aumento do rendimento e da velocidade de reação da hidrólise. No entanto, uma alta concentração de substrato pode causar a inibição, reduzindo substancialmente a velocidade de hidrólise. A dimensão da inibição do substrato depende da relação do total de substrato e do total de enzima. Um aumento na concentração de enzimas no processo resolveria este problema, porém isto aumentaria significativamente os custos do processo (Gregg & Saddler, 1996).

### **2.7.1 Hidrólise enzimática: celulasas**

As celulasas são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise e são consideradas como uma ferramenta em potencial para sacarificação industrial de biomassa (Singh *et al.*, 2009; Castro, 2010). Essas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro, 2010). As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas. Devido a sua ação hidrolítica, as celulasas atacam diretamente a estrutura da celulose, causando perda de massa e diminuindo seu grau de polimerização. As celulasas são proteínas sensíveis a mudanças de pH e de temperatura. Especialmente em pH alcalino e a temperaturas acima de 80° C, elas desnaturam e perdem a



sua atividade catalítica (Andreas, 2001).

A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endo- $\beta$ -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4); exo- $\beta$ -1,4-glucanases (EC 3.2.1.91); e  $\beta$ -1,4-glucosidases (EC 3.2.1.21) (Figura 16) (Medve, 1997; Dillon *et al.*, 2008; Castro, 2010). As endoglucanases são propostas para iniciar o ataque aleatoriamente em vários locais internos nas regiões amorfas da fibra de celulose abrindo esses locais para o ataque subsequente pelas exoglucanases. As exoglucanases são o principal componente do sistema de celulasas de fungos contabilizando de 40-70 % das proteínas totais capazes de hidrolisar a celulose altamente cristalina. As exoglucanases removem os monossacarídeos e dissacarídeos do final da cadeia de glicose. A  $\beta$ -glucosidase hidrolisa a celobiose e oligossacarídeos solúveis à glicose (Howard *et al.*, 2003).

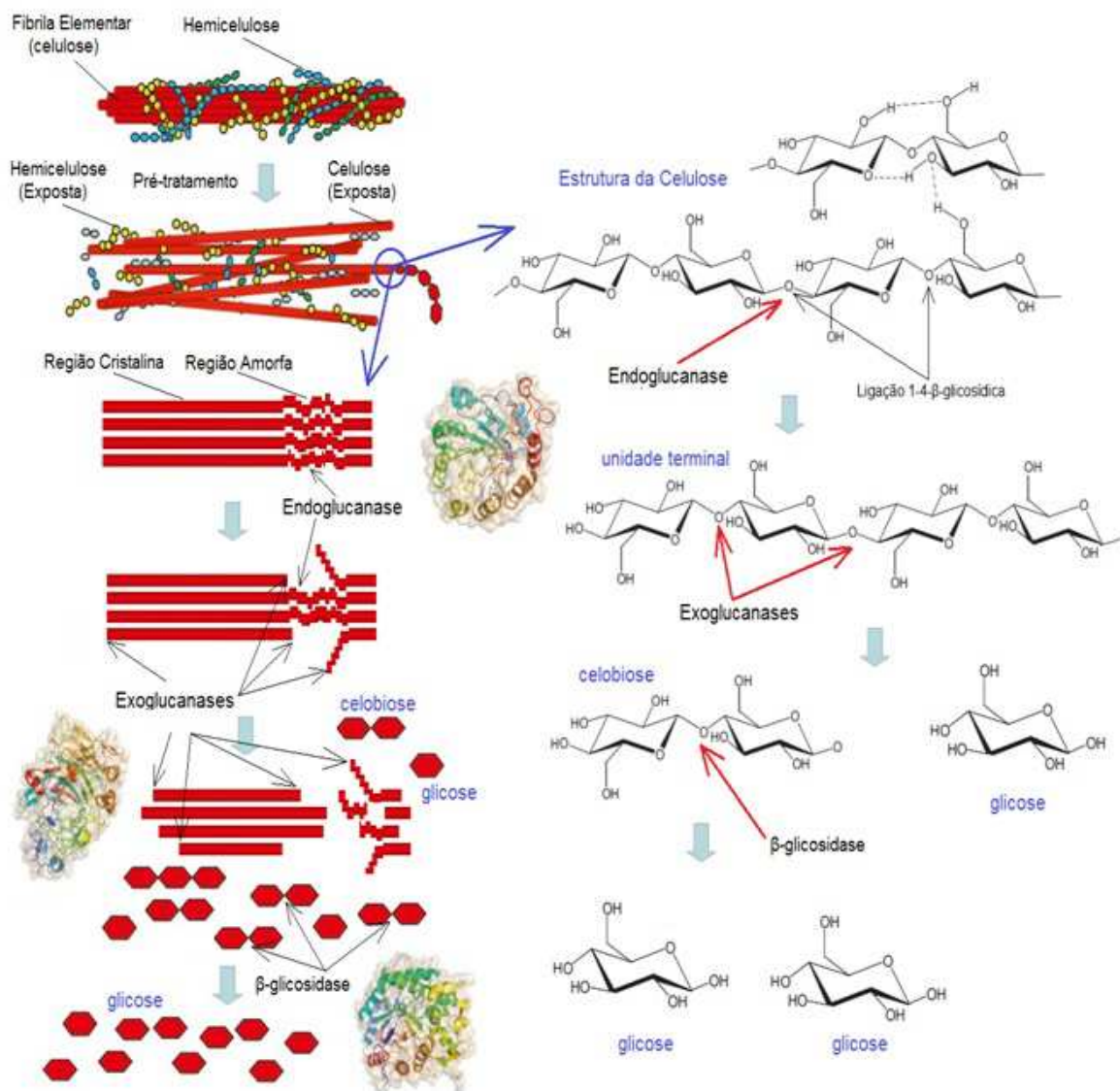


Figura 16. Atuação das enzimas celulasas sobre a matriz celulósica (Silva, 2012).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é definido como sinergia.

As celulases são encontradas em secreções de microrganismos, como fungos e bactérias, e estão presentes também no sistema digestório de algumas espécies de gastrópodes (Kubicek *et al.*, 1993; Rolle, 1998). Já em 1976 uma coleção de mais de 14 000 fungos, que foram ativos contra a celulose e outras fibras insolúveis, foram coletados. Apesar da impressionante coleção de microrganismos lignocelulolíticos apenas alguns foram estudados e principalmente o *Trichoderma reesei* e seus mutantes são amplamente utilizados para a produção comercial de celulases e hemicelulases. Isto se dá, em parte porque o *T. reesei* foi um dos primeiros organismos celulolíticos isolados, ainda na década de 1950, e que serviu de organismo modelo para os estudos de celulases e de certa forma influenciou que os processos de produção industrial de celulase tenham sido desenvolvidos com este organismo ao longo dos anos em vários países (Howard *et al.*, 2003). Este sistema contém grande quantidade de endoglucanases e exoglucanases que correspondem a aproximadamente 80% do total de proteína secretada, porém sua atividade de  $\beta$ -glucosidase é muito baixa. No entanto, os complexos de celulases secretadas por fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos por exibir as atividades relativamente elevadas de  $\beta$ -glucosidase (Martins *et al.*, 2008).

Singh *et al.* (2009), após a triagem para um grande número de culturas, selecionou uma linhagem *Penicillium* como uma fonte de celulases com alta atividade de  $\beta$ -glucosidase. Os autores relatam uma comparação do desempenho da hidrólise utilizando celulases de *Penicillium* e uma celulase comercial (Accellerase™ 1000®) a partir do *Trichoderma reesei* geneticamente modificado. Em virtude da atividade de  $\beta$ -glucosidase alta no complexo de celulases de *Penicillium*, a hidrólise rendeu maior proporção de glicose como o principal produto final.

No gênero *Penicillium*, o *P. echinulatum* tem sido identificado como um candidato em potencial para a produção de celulase porque a sua capacidade secretora é quase equivalente as melhores estirpes de fungos reportados na literatura (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006; Camassola & Dillon, 2010; Dillon *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013). O complexo enzimático celulases apresenta maior atividade em pH ácido, estabilidade de 50°C (Camassola *et al.*, 2004), maior proporção de  $\beta$ -glucosidase e FPA que o *T. reesei* (Martins *et al.*, 2008); além disso, *P. echinulatum* apresenta produção simultânea de celulases e xilanases

(Camassola & Dillon, 2010) – condições que favorecem a hidrólise enzimática de lignocelulósicos.

## 2.8 Fermentação alcoólica

Uma grande variedade de microrganismos como bactérias e fungos, podem fermentar carboidratos a etanol em condições anaeróbias. Eles fazem isso para obter energia e crescer (Hamelinck *et al.*, 2005).

Métodos para fermentação de hexoses já são conhecidos há mais de 6000 anos, quando os sumérios, babilônios e egípcios começaram a aperfeiçoar e descrever o processo de produção de cerveja a partir de grãos (amido). No final do século XIX tornou-se possível liberar os açúcares dos materiais lignocelulósicos, e, a partir disso, a conversão das pentoses também passou a ser alvo de pesquisa, pois elas representam uma percentagem elevada dos açúcares disponíveis nesse material. Assim sendo, a capacidade de recuperar e fermentar as pentoses a etanol é importante para a eficiência e economia do processo (Hamelinck *et al.*, 2005). De acordo com as reações (Figura 17), o máximo rendimento teórico é de 0,51 kg de etanol e de 0,49 kg de dióxido de carbono por kg de açúcar (Hamelinck *et al.*, 2005, Balat *et al.*, 2008).



**Figura 17. Reação de fermentação de hexoses (a) e reação de fermentação de pentoses (b) (Hamelinck *et al.*, 2005; Balat *et al.*, 2008).**

Os parâmetros importantes para uma fermentação são a temperatura, o pH, a tolerância ao produto (etanol), velocidade de crescimento, produtividade, tolerância osmótica, especificidade, rendimento, estabilidade genética e tolerância ao inibidor (Balat, 2011).

O microrganismo mais utilizado para a fermentação de etanol em processos industriais é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que provou ser muito robusta e adequada também para a fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos. As fermentações com *S. cerevisiae* são normalmente realizadas a pH 5,0 e a 30 °C (Zaldivar *et al.*, 2001). *S. cerevisiae* pode facilmente fermentar hexoses, mas é incapaz de fermentar xilose, pois não possui

enzimas que convertem xilose em xilulose. Leveduras naturalmente fermentadoras de xilose tais como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Candida parapsilosis*, podem metabolizar xilose através da ação da xilose redutase que converte xilose em xilitol, e a xilitol desidrogenase que converte o xilitol a xilulose (Zaldivar *et al.*, 2001; Balat, 2011).

Bactérias tal como *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca*, têm atraído particular interesse devido à sua rápida fermentação, que pode ser de minutos em comparação com horas para leveduras e fungos (Hamelinck *et al.*, 2005; Balat, 2011). *Z. mobilis*, uma bactéria Gram-negativa, é bem conhecida pela sua capacidade de produzir de forma eficiente altas taxas de etanol a partir de glicose, frutose e sacarose. Quando *Z. mobilis* e *S. cerevisiae* são comparadas em termos de eficiência para a produção de etanol a partir de glicose e amido hidrolisado, um maior rendimento é observado para *Z. mobilis*, que tem um rendimento teórico de 97% (Zaldivar *et al.*, 2001; Balat, 2011).

Os microrganismos responsáveis pela fermentação podem ser inibidos por compostos derivados do hidrolisado como o furfural e 5-HMF, originados da degradação dos açúcares, pentoses e hexoses, respectivamente; ácido acético e ácido fórmico que são liberados durante o pré-tratamento; alcoóis fenólicos, ácidos e aldeídos liberados pela degradação da lignina; compostos inorgânicos, originados a partir de biomassa lenhosa e do próprio reator de pré-tratamento. Esses inibidores afetam a fisiologia celular em geral e, muitas vezes, resultam na diminuição da viabilidade, produtividade e rendimento de etanol. Em *S. cerevisiae*, a inibição da fermentação por furanos, ácidos alifáticos e compostos aromáticos já foi estudada (Larsson *et al.*, 1999; Zaldivar *et al.*, 2001; Sehnem *et al.*, 2013), enquanto que em *Z. mobilis* vários compostos alifáticos e aromáticos foram estudados (Zaldivar *et al.*, 2001).

Os mecanismos de inibição são diferentes conforme a estrutura química do inibidor (Zaldivar *et al.*, 2001). Por exemplo, em leveduras, a toxicidade dos furaldeídos é detectada sobre o metabolismo, aumentando a fase lag de crescimento, e também sobre a produção de metabólitos. Esses efeitos aumentam de acordo com o aumento da concentração do furaldeído (Sehnem *et al.*, 2013). As maiores concentrações de furaldeídos já observadas são de 5 g.L<sup>-1</sup> de furfural na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar em trabalho de Aguilar *et al.*(2002), enquanto que 5-HMF pode ser acumulado em até 6 g.L<sup>-1</sup> em hidrolisados de madeira lascada de *Picea abies* (Larsson *et al.*, 1999).

Em curto prazo a fermentação utilizando fungos ou bactérias geneticamente modificados pode vir a utilizar todos os cinco principais açúcares da biomassa, a glicose,

xilose, manose, galactose e arabinose. Em médio e em longo prazo, espera-se que a tecnologia melhore a eficiência da fermentação dos organismos (produzindo mais etanol em menos tempo), bem como a sua resistência, necessitando menos desintoxicação do hidrolisado (Hamelinck *et al*, 2005; Menon & Rao, 2012).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Matéria-prima

Para fins experimentais foi utilizado capim-elefante (*P. purpureum* Schum.) proveniente do Município de Nova Petrópolis no Estado do Rio Grande do Sul. O corte da planta foi realizado 6 meses após o plantio. Após o corte o material foi previamente seco e triturado, acondicionado em sacas onde foram misturados o colmo e as folhas. Antes de ser utilizado, o capim-elefante foi moído novamente, em moinho de facas, e após foi separado por granulometria com a utilização de peneiras da escala Tyler. O tamanho da partícula de capim-elefante utilizado foi o retido pela peneira de malha de 20 *mesh*, que corresponde a um tamanho médio de 1 mm. O capim-elefante foi estocado em sacos plásticos, em temperatura ambiente, até a condução dos testes de pré-tratamento hidrotérmico.

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

Os pré-tratamentos hidrotérmicos foram conduzidos em reator de aço inoxidável 316 (Figura 18) com volume útil de 2,5 L, no qual o capim-elefante foi tratado com água quente, no estado líquido e gasoso. O reator está acoplado a um tanque de aquecimento também de aço inoxidável 316 com volume útil de aproximadamente 6 L onde a água foi aquecida até a temperatura desejada. Tanto o reator como o tanque de aquecimento possuem sensores de temperatura Resistec e transmissor de pressão MGI modelo TRP-42. O equipamento de pré-tratamento hidrotérmico foi desenvolvido em parceria da Universidade de Caxias do Sul com a empresa UpControl. No processo, utilizou-se água deionizada a fim de minimizar a interferência de outros compostos presentes na água da torneira.

A otimização do pré-tratamento hidrotérmico foi realizada variando dois parâmetros, a temperatura (°C) e o tempo de residência (min) (Tabela 3), conforme planejamento experimental por delineamento composto central rotacional (DCCR), apresentado na Tabela 4. A escolha das temperaturas e tempos levou em consideração principalmente os trabalhos realizados por Silva (2009), Petersen *et al.* (2009) e Toscan (2010).

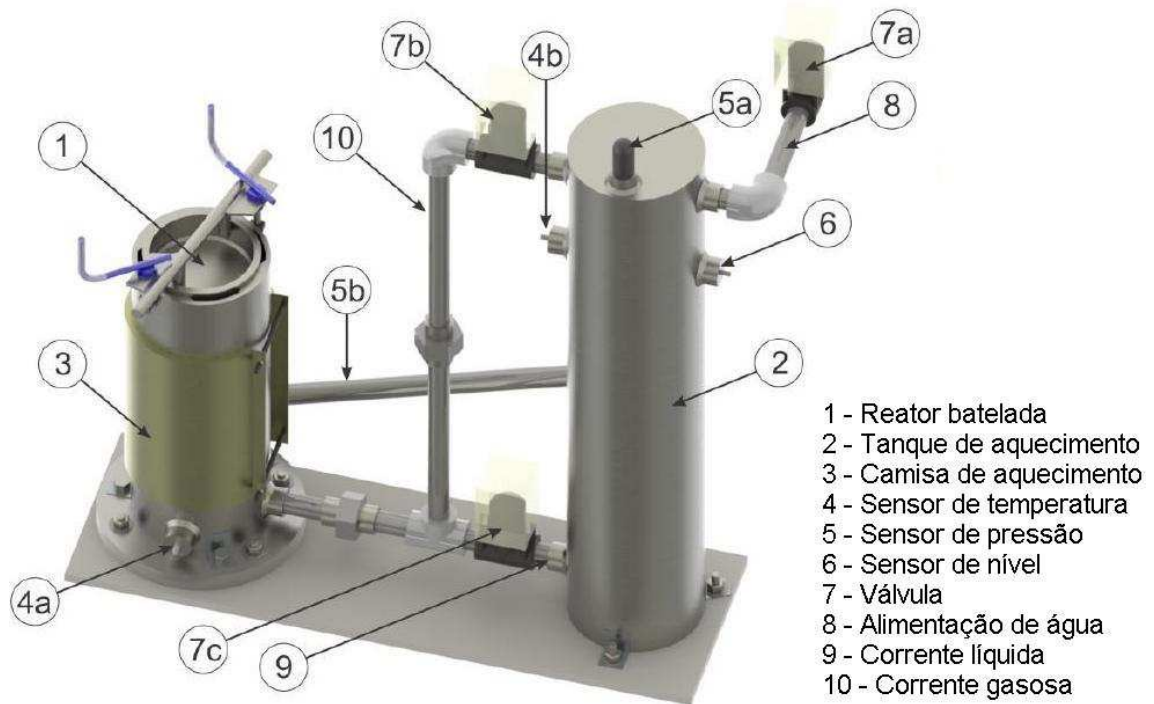


Figura 18. Detalhamento da unidade de pré-tratamento hidrotérmico (Silva, 2012).

Tabela 3. Parâmetros do pré-tratamento hidrotérmico.

Parâmetro	Unidades	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura	°C	170	178	195	212	220
Tempo de Residência	min	1	3	6,5	10	12

Tabela 4. Planejamento experimental para o pré-tratamento hidrotérmico repetidos para água quente líquida e como vapor.

Ensaio	Tempo de Residência (min)	Temperatura (°C)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	-1,41
6	0	1,41
7	-1,41	0
8	1,41	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0



Os ensaios descritos na Tabela 4 foram variados para dois tipos de pré-tratamento hidrotérmico, um utilizando água no estado líquido e outro utilizando vapor d'água (estado gasoso), diferenciados, no decorrer do trabalho, pela utilização das letras L e V respectivamente, totalizando 22 ensaios.

Para avaliar a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico foi empregado o fator de severidade, o qual é definido por Overend e Chornet (1987) pela Equação 1:

$$\log(r_o) = \log\left[t \times e^{\left(\frac{T-100}{14,75}\right)}\right] \quad \text{Equação 1}$$

onde t é o tempo de residência em minutos (min) e T é a temperatura em graus Celsius (°C). Os resultados são apresentados como uma função de log(r<sub>o</sub>) (Tabela 5), sendo os valores obtidos indiferentes a utilização de água no estado líquido ou gasoso. Uma vez que o fator de severidade (log(r<sub>o</sub>)) depende da temperatura e do tempo, esse fator pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis do pré-tratamento e tem sido utilizado por diversos pesquisadores (Larsson *et al.*, 1999; Silva, 2009; Petersen *et al.*, 2009)

**Tabela 5. Severidade de cada pré-tratamento realizado.**

<b>Ensaio</b>	<b>Tempo de residência (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Severidade (log r<sub>o</sub>)</b>
1	3	178	2,77
2	10	178	3,30
3	3	212	3,77
4	10	212	4,30
5	6,5	170	2,87
6	6,5	220	4,35
7	1	195	2,80
8	12	195	3,88
9	6,5	195	3,61
10	6,5	195	3,61
11	6,5	195	3,61

O procedimento para a realização do pré-tratamento foi iniciado com a adição de 6 litros de água deionizada (pH 5) ao tanque de aquecimento, sendo precedido pelo fechamento de todas as válvulas e acionamento do sistema de aquecimento tanto do tanque de aquecimento quanto do reator, para que ambos atingissem a temperatura desejada. O aquecimento do reator de pré-tratamento da biomassa foi realizado sem o capim-elefante estar

presente dentro deste, por esse motivo a rampa de aquecimento do reator não foi considerada. Somente após estabilizada a temperatura do reator e do tanque de aquecimento, foi feita a pesagem da matéria-prima a ser tratada (60 g de capim-elefante *in natura*) em um cesto feito de tela de aço inoxidável 304 com tampa. Antes de ser levado ao reator, o cesto contendo o capim-elefante a ser tratado foi imerso por 5 min em água deionizada e após deixou-se escorrer o excesso de água por outros 5 min. Com a amostra devidamente acomodada e fechada dentro do reator, foi aberta a válvula de liberação da água em estado líquido (válvula inferior) ou a válvula de liberação da água em estado gasoso (válvula superior), e a partir de então contado o tempo de residência desejado. Passado o tempo, a válvula aberta foi completamente fechada e lentamente foi feita a despressurização do reator, sendo coletado o efluente resultante do pré-tratamento. Foram coletados cerca de 2 mL do líquido efluente resultante de cada pré-tratamento para posteriores análises de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, 5-HMF e furfural. Após a completa despressurização, o reator foi aberto e o cesto com a amostra foi retirado para armazenamento e posteriores análises. As amostras pré-tratadas foram armazenadas em sacos plásticos com fechamento hermético por zíper e mantidas a -20 °C até o momento das análises. Os pré-tratamentos foram realizados de modo aleatório proposto pelo programa Statistica 8.0, obedecendo a seguinte ordem de ensaio: 3; 2; 6; 9; 7; 4; 1; 5; 11; 8 e 10. Essa ordem aleatória foi estabelecida a fim de serem minimizadas possíveis interferências do meio externo nos resultados. Inicialmente foram realizados todos os pré-tratamentos utilizando vapor d'água e, em seguida, todos os com água no estado líquido.

### 3.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática do capim-elefante, *in natura* e pré-tratado, foi realizada de acordo com Adsul *et al.* (2005), com modificações. A hidrólise foi realizada em frascos Duran<sup>®</sup> de 50 mL. Para cada hidrólise foi utilizado 1 g (em base seca) de matéria-prima, pré-tratada e *in natura*, 0,01 % (m/v) de azida sódica, o volume de caldo enzimático correspondente a 15 FPA de atividade enzimática e completou-se o volume para 50 mL com solução tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mM). A utilização de 2 % de concentração de sólidos na hidrólise enzimática foi feita devido a necessidade de avaliar o potencial do pré-tratamento hidrotérmico em produzir fibras reativas. Nas hidrólises realizadas para posterior

fermentação não foi acrescentado azida sódica ao meio. A temperatura foi mantida em 50 °C e frequência do agitador em 150 rpm. A hidrólise foi realizada em triplicata para cada condição de pré-tratamento e também para a matéria-prima *in natura*, pelo período de 72 h. O complexo enzimático utilizado foi o de *Penicillium echinulatum*.

Foram coletadas amostras de 1 mL no início da hidrólise (tempo zero), de 3 em 3 h durante as primeiras 12 h de processo e, posteriormente, as amostras foram coletadas de 12 em 12 h até 72 h. As amostras foram coletadas para posterior análise de açúcares redutores, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e 5-HMF.

### 3.4 Fermentação do hidrolisado enzimático

Para a fermentação foi utilizada uma cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, da marca Fleischmann®. A fermentação de todos os hidrolisados foi feita em placas de 96 poços, em volumes de 2 mL, com concentração de células igual a 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, em condições de anaerobiose. A temperatura da fermentação foi mantida em 28 °C pelo período de 48 h. Amostras de 100 µL foram coletadas nos tempo de 6, 12 e 24 h de fermentação, para avaliação de açúcares redutores. Ao término de 48 h de processo, as amostras foram congeladas para análises de açúcares redutores, pelo método de DNS (Miller, 1959), e glicose, xilose, arabinose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sendo utilizada uma coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm de diâmetro interno), operada a 60 °C e tendo como eluente uma solução 5 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Os açúcares eluídos foram quantificados utilizando um detector modelo RID10A para índice de refração. O fator de conversão de produto, sendo o produto etanol, a produtividade volumétrica e o rendimento total do processo de fermentação foram calculados pelas Equações 2, 3 e 4, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{M_{EF} - M_{E0}}{M_{S,cons}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $Y_{P/S}$  é o fator de conversão de substrato em produto em g de etanol.g<sup>-1</sup> de substrato consumido,  $M_{EF}$  é a massa (g) de etanol no final da fermentação,  $M_{E0}$  é a massa (g) de etanol no início da fermentação e  $M_{S,cons}$  é a massa (g) de glicose (substrato) consumida durante a fermentação.

$$P_V = \frac{P_F - P_0}{t} \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $P_V$  é a produtividade volumétrica de etanol em g de etanol.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>,  $P_F$  é a concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>) no final da fermentação,  $P_0$  é a concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>) no início da fermentação e  $t$  é o tempo de processo em horas.

$$\rho = \frac{Y_{P/S}}{f} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $\rho$  é o rendimento total do processo de fermentação (%),  $Y_{P/S}$  é o fator de conversão de produto em g de etanol.g<sup>-1</sup> de substrato consumido, e  $f$  é o fator estequiométrico, que nesse caso é igual a 0,511 g de etanol.g<sup>-1</sup> de glicose.

### 3.5 Métodos analíticos

#### 3.5.1 Matéria seca

A análise do teor de matéria seca foi realizada no capim-elefante *in natura* e pré-tratado segundo metodologia proposta por Embrapa (2010), em triplicata para cada amostra. Inicialmente realizou-se uma pré-secagem do material em estufa a 60 °C ( $\pm 5$  °C) por 48 h. Transcorrido esse tempo o material foi deixado esfriar em temperatura ambiente por 1 h e pesado para a determinação da amostra seca ao ar (ASA). O teor de ASA foi calculado pela Equação 5.

$$\%ASA = \frac{\text{Massa do material pré-seco}}{\text{Massa do material in natura}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

O material obtido após a pré-secagem foi utilizado para a determinação da matéria seca definitiva (matéria seca 105 °C), para isto, uma massa conhecida desse material foi levada a estufa, em cadinhos de porcelana tarados, a temperatura de 105 °C pelo período de 4 h. Os cadinhos contendo a amostra foram então retirados da estufa e acomodados em um dessecador para esfriar durante 1 h e após foram novamente pesados. A matéria seca definitiva ( $MS_{def}$ ) foi calculada utilizando a massa de amostra seca após o processo de secagem a 105 °C (Equação 6). A matéria seca total ( $MS_{tot}$ ) foi calculada levando em consideração o teor de ASA (Equação 7).

$$\%MS_{\text{def}} = \frac{\text{Massa(amostraseca)}}{\text{Massa(amostrasecaoar)}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

$$\%MS_{\text{tot}} = \frac{\%ASA \times \%MS_{\text{def}}}{100} \quad \text{Equação 7}$$

### 3.5.2 Perda de massa

O percentual de perda de massa foi calculado utilizando os dados de matéria seca total da amostra, sendo calculado pela Equação 8:

$$PM(\%) = \frac{(M_{SPT} \times MS_{TCEIN}) - (M_{APT} \times MS_{TA})}{(M_{SPT} \times MS_{TCEIN})} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde  $M_{SPT}$  corresponde a massa de amostra submetida ao pré-tratamento,  $MS_{TCEIN}$  é a matéria seca total do capim-elefante *in natura*,  $M_{APT}$  é a massa total de amostra após o pré-tratamento e  $MS_{TA}$  corresponde a matéria seca total da amostra após o pré-tratamento.

### 3.5.3 Caracterização da composição do capim-elefante

A caracterização da composição do capim-elefante foi realizada com a utilização de dois métodos, que foram comparados. Um dos métodos foi o de Van Soest (1968), adaptado do documento de referência da Embrapa (2010), determinando-se as quantidades de fibras em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) e de celulose, hemicelulose, lignina e cinza. Já a outra metodologia seguiu as normas do NREL (National Renewable Energy Laboratory), sendo NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008a) para a determinação de lignina de Klason, NREL/TP-510-42622 (Sluiter *et al.*, 2008b) para a determinação das cinzas e NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.*, 2008c) para a determinação dos extrativos. Todos os experimentos de caracterização do capim-elefante foram realizados em triplicata e estão descritos detalhadamente a seguir.

### 3.5.3.1 Determinação de componentes pelo método Van Soest

O método proposto por Van Soest (1968) foi utilizado para a determinação da composição do capim-elefante por permitir um melhor fracionamento dos diversos componentes da fração fibrosa. Este método é baseado na separação das diversas frações constituintes das forrageiras, por meio de reagentes específicos denominados detergentes (Embrapa, 2010). Foram avaliadas as quantidades de fibras em detergente neutro (FDN), que são constituídas basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, as fibras em detergente ácido (FDA), constituídas principalmente por lignina e celulose, assim como os componentes em separado: celulose, hemicelulose, lignina e as cinzas.

Para a determinação das FDN 0,300 g de amostra que passaram por um processo de digestão em contato com 35 mL de solução de fibra de detergente neutro (preparada com EDTA, 18,61 g.L<sup>-1</sup>; borato de sódio, 6,81 g.L<sup>-1</sup>; lauril sulfato de sódio, 30 g.L<sup>-1</sup>; fosfato ácido de sódio, 4,56 g.L<sup>-1</sup>; e éter monometílico do etilenoglicol, 10 mL.L<sup>-1</sup>). Para que não haja a formação de espuma durante a digestão foi adicionado 1 mL de decalina – antiespumante. O processo de digestão teve duração de 60 min à temperatura de 120 °C a 125 °C. Terminada a digestão, a amostra foi filtrada utilizando uma bomba de vácuo e lavou-se por duas vezes com água quente (90 a 100 °C), aproximadamente 80 mL no total, e outras duas vezes com acetona (aproximadamente 25 mL por lavagem), até que as fibras se tornem incolor em toda a amostra. A amostra foi seca em estufa *overnight* a 105 °C e esfriada em dessecador por 1 h antes de ser pesada. O teor de FDN foi determinado pela Equação 9.

$$\%FDN = \frac{\text{Massa de amostra tratada}}{\text{Massa de amostra inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Um esquema resumido da determinação de FDN pelo método de Van Soest é apresentado na Figura 19:



Figura 19. Esquema do método de determinação de FDN do capim-elefante.

Para a análise das fibras em detergente ácido 1,0 g de amostra de capim-elefante passou pelo processo de digestão por 60 min, a uma temperatura entre 120 e 125 °C, em 100 mL de solução de detergente ácido (preparada com 20 g de brometo de cetil trimetilamônio em volume suficiente para completar 1 litro de solução de ácido sulfúrico com concentração de 0,5 mol.L<sup>-1</sup>) e 2 mL de antiespumante. Terminado este processo, a amostra foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo e lavada primeiramente com água quente (90 a 100 °C) duas vezes, utilizando aproximadamente 80 mL no total da lavagem, e após com acetona outras duas vezes (utilizando aproximadamente 25 mL por lavagem). A amostra foi levada a uma estufa para secar *overnight* a 105 °C. Depois foi esfriada em um dessecador para que fosse feita a pesagem. O teor de FDA da amostra foi determinado pela Equação 10.

$$\%FDA = \frac{\text{Massa de amostra tratada}}{\text{Massa de amostrainicial}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

A quantidade de hemicelulose existente no material é determinada pela diferença dos valores obtidos para FDN e FDA (Saito, 2005), conforme a Equação 11.

$$\%Hemicelulose = \%FDN - \%FDA \quad \text{Equação 11}$$

A lignina foi determinada pelo método do permanganato proposto por Van Soest. Para este método utilizou-se a quantidade resultante de fibras em detergente ácido, devidamente pesadas, do processo anteriormente descrito, com a adição 30 mL de uma solução combinada composta por permanganato de potássio e solução tampão (preparada com nitrato férrico, 6,0 g.L<sup>-1</sup>; nitrato de prata, 0,15 g.L<sup>-1</sup>; acetato de potássio, 5,0 g.L<sup>-1</sup>; ácido acético glacial, 500 mL.L<sup>-1</sup>; e álcool butílico terciário, 400 mL.L<sup>-1</sup>). As fibras ficaram inicialmente em contato com essa solução por 15 min e foram filtradas. A solução combinada de permanganato foi renovada e deixada em contato com as fibras por mais 90 min. Decorrido este tempo, as fibras foram novamente filtradas e misturadas com cerca de 30 mL de solução de desmineralização (preparada com ácido oxálico diidratado, 50 g.L<sup>-1</sup>; etanol 95 %, 700 mL.L<sup>-1</sup>; ácido clorídrico, 250 mL.L<sup>-1</sup>; e água destilada, 250 mL.L<sup>-1</sup>) e deixadas em contato por 10 min, quando foram filtradas e colocadas com contato com 30 mL de uma nova solução, por mais 10 min. Passado o tempo da desmineralização, as fibras foram filtradas e lavadas com etanol 80 % por duas vezes (aproximadamente 50 mL) e depois com acetona por mais duas vezes (aproximadamente 25 mL cada lavagem). Os cadinhos contendo as amostras foram então levados à estufa a 100 °C *overnight*. Após os cadinhos foram deixados esfriar em dessecador e após foram pesados. O teor de lignina foi calculado pela Equação 12.

$$\%Lignina = \frac{\text{Massa de amostra FDA} - \text{Massa de amostra pós mét.perm.}}{\text{Massa de amostrainicial}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

A amostra, após passar pelo processo de determinação de lignina, foi levada a mufla por 2 h a temperatura de 500 °C e depois deixada esfriar em dessecador antes da pesagem. Após esta etapa pode-se então determinar os teores de celulose e de cinzas, calculados, respectivamente, pelas Equações 13 e 14.

$$\%Celulose = \frac{\text{Massa de amostra pós mét.perm.} - \text{Massa de cinzas}}{\text{Massa de amostrainicial}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

$$\%Cinzas = \frac{\text{Massa de cinzas}}{\text{Massa de amostrainicial}} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

Um esquema resumido da determinação de FDA, lignina, celulose e cinzas pelo método de Van Soest é apresentado na Figura 20.

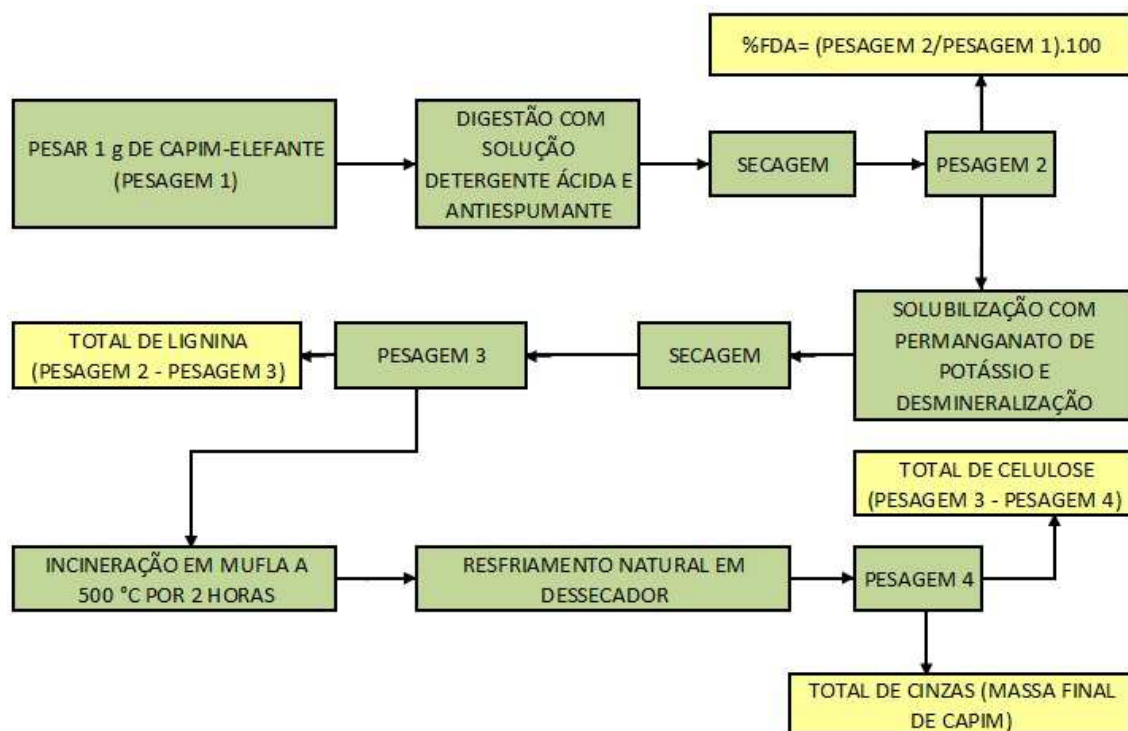


Figura 20. Método de determinação de FDA, lignina, celulose e cinzas do capim-elefante, segundo Van Soest.



### 3.5.3.2 Metodologia NREL

A composição química do capim-elefante também foi analisada pelas normas NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008a), que determina a lignina de Klason, sendo determinado com emprego desse método a lignina solúvel e insolúvel, e os monossacarídeos presentes.

Uma massa de cerca de 100 mg de amostra seca e triturada foi tratada com ácido sulfúrico 72% (v/v) a 25°C por um período de 1 h sob agitação constante. Após este tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave, a temperatura de 118°C, por 1 h para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Depois, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch porosidade 2 (30 mL) previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até massa constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido foi determinada em relação à massa seca de amostra. O filtrado foi recolhido e aferido com água destilada em balão volumétrico de 100 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectrofotometria no ultravioleta, com emprego da Equação 15:

$$C \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{4,53 \times (A_l - A_c)}{300} \quad \text{Equação 15}$$

onde  $A_l$  e  $A_c$  corresponde à absorbância em 210 e 280 nm, respectivamente (Menegol, 2012). Os resultados de lignina foram expressos na forma de lignina total, sendo esta a soma da lignina solúvel e da lignina insolúvel.

Para o conhecimento da composição dos monossacarídeos presentes, amostras dos hidrolisados foram filtradas em filtros de membranas de 0,2 µm e analisadas em CLAE, utilizando coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm de diâmetro interno), operada a 60 °C e tendo como eluente uma solução 5 mmol/L de ácido sulfúrico com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, com detector modelo RID10A para índice de refração. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado – celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural – levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glicose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidro. Os fatores referentes ao hidroximetilfurfural e furfural, que

foram de 0,70 e 0,64, respectivamente, serviram para converter estes compostos em seus respectivos carboidratos de origem (glicose e xilose e arabinose, respectivamente). Os resultados obtidos para anidroglicose (computados glicose, celobiose e hidroximetilfurfural nesta operação), anidroxilose, anidroarabinose (computados 50% do valor correspondente ao furfural para cada anidroaçúcar) e grupo acetil foram, então, expressos em relação ao peso seco do material original (Menegol, 2012), e apresentados como anidroglicose sendo equivalente ao percentual presente de celulose, os percentuais de anidroxilose e anidroarabinose somados representando o total de hemicelulose presente.

Para a determinação das cinzas, segundo a norma NREL/TP-510-42622 (Sluiter *et al.*, 2008b), 300 mg de amostra foi acondicionada em um cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinada em mufla a uma temperatura de 575 °C por 2 h. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

A determinação dos extrativos foi realizada no capim-elefante *in natura*. Para tal, foi adaptada a norma NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.*, 2008c), onde uma massa conhecida, de cerca de 1,0 grama de amostra *in natura* foi submetida a um processo de extração em aparelho Soxhlet, utilizando como solvente etanol 95%. Após a extração, o recipiente, previamente seco e tarado, contendo a amostra foi levado à estufa para secar por 48 horas e após foi pesado. Por diferença de massas, pode-se obter o percentual do extrato em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio (Menegol, 2012).

### 3.5.4 Caracterização dos efluentes de pré-tratamento

A cada pré-tratamento hidrotérmico, parte dos polissacarídeos presentes foram hidrolisados e solubilizados na corrente de água líquida/vapor utilizada durante o pré-tratamento (Toscan, 2010). Com base nessa informação, após o término de cada pré-tratamento foi coletado uma amostra do efluente de cada ensaio. Esses efluentes do pré-tratamento foram analisados por CLAE para avaliação da presença de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (5-HMF). Para essas análises foi utilizada uma coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8 mm de diâmetro interno), operada a 60 °C e tendo como eluente uma solução 5 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico

com fluxo de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os açúcares eluídos foram quantificados utilizando um detector modelo RID10A para índice de refração.

### 3.5.5 Caracterização dos hidrolisados enzimáticos do capim-elefante

A avaliação da concentração de açúcares redutores (AR) formados durante a hidrólise enzimática foi realizada pelo método DNS (ácido 3,5 di-nitrosalicílico) (Miller, 1959).

A cinética da glicose liberada durante a hidrólise foi analisada utilizando kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup>, com  $2 \mu\text{L}$  de amostra e  $200 \mu\text{L}$  de reagente (Menegol, 2012). Foi construída uma curva padrão com soluções 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de glicose para a quantificação dos açúcares liberados.

As amostras coletadas no tempo de 48 h de hidrólise enzimática foram avaliadas por CLAE para análise das concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e 5-HMF. As concentrações de açúcares obtidas por CLAE foram corrigidas por um fator correspondente à labilidade ácida de cada um dos carboidratos quantificados. Para a análise cromatográfica isocrática dos açúcares liberados por hidrólise ácida, foi utilizada uma coluna cromatográfica Aminex HPX-87H (Bio-Rad,  $300 \times 7,8 \text{ mm}$  de diâmetro interno), operada a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  e tendo como eluente uma solução  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido sulfúrico com fluxo de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os açúcares eluídos foram quantificados utilizando um detector modelo RID10A para índice de refração.

Os rendimentos de AR e glicose foram calculados conforme apresentado nas Equações 16, 17 e 18.

$$\text{Rendimento de AR} = \frac{C_{ARb}}{M_{bh} + \left(\frac{M_{bh} \times P_{mp}}{100}\right)} \quad \text{Equação 16}$$

Onde o rendimento de AR é dado em  $\text{mg}$  de  $\text{AR}\cdot\text{g}^{-1}$  de capim-elefante *in natura*,  $C_{ARb}$  é a concentração de AR na biomassa submetida a hidrólise em base seca ( $\text{mg}$  de  $\text{AR}\cdot\text{g}^{-1}$  de biomassa),  $M_{bh}$  é a massa de biomassa (em base seca) submetida a hidrólise ( $\text{g}$ ),  $P_{mp}$  é a perda de massa durante o pré-tratamento (%).

$$\text{Rendimento de Glicose} = \frac{C_{Gb}}{M_{bh} + \left(\frac{M_{bh} \times Pmp}{100}\right)} \quad \text{Equação 17}$$

Onde o rendimento de glicose é dado em mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, C<sub>Gb</sub> é a concentração de glicose na biomassa submetida a hidrólise em base seca (mg de glicose.g<sup>-1</sup> de biomassa).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Rendimento de Glicose}}{C_{cc}} \times 90 \quad \text{Equação 18}$$

Onde C<sub>cc</sub> é a concentração de celulose presente no capim-elefante *in natura*, dado em mg de celulose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*.

### 3.6 Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente avaliados por análises de variâncias empregando o software PrismGraphPad 5.01 (Graph Pad, San Diego, CA) e Statistica 8.0 (StatSoft Inc.,USA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Comparação de métodos de caracterização da composição do capim-elefante

Dois diferentes métodos foram avaliados e comparados para determinar a composição do capim-elefante *in natura* (Tabela 6) e pré-tratado. A metodologia NREL (Sluiter *et al.*, 2008a), descrita na seção 3.5.3.2, é um conjunto de normas largamente utilizadas em trabalhos para a caracterização da composição de biomassas e o método de Van Soest (1968), descrito na seção 3.5.3.1, é o mais utilizado para avaliação da composição de gramíneas forrageiras, como é o caso do capim-elefante.

**Tabela 6. Composição de polissacarídeos, lignina e cinzas de capim-elefante *in natura* pelas metodologias de Van Soest e NREL.**

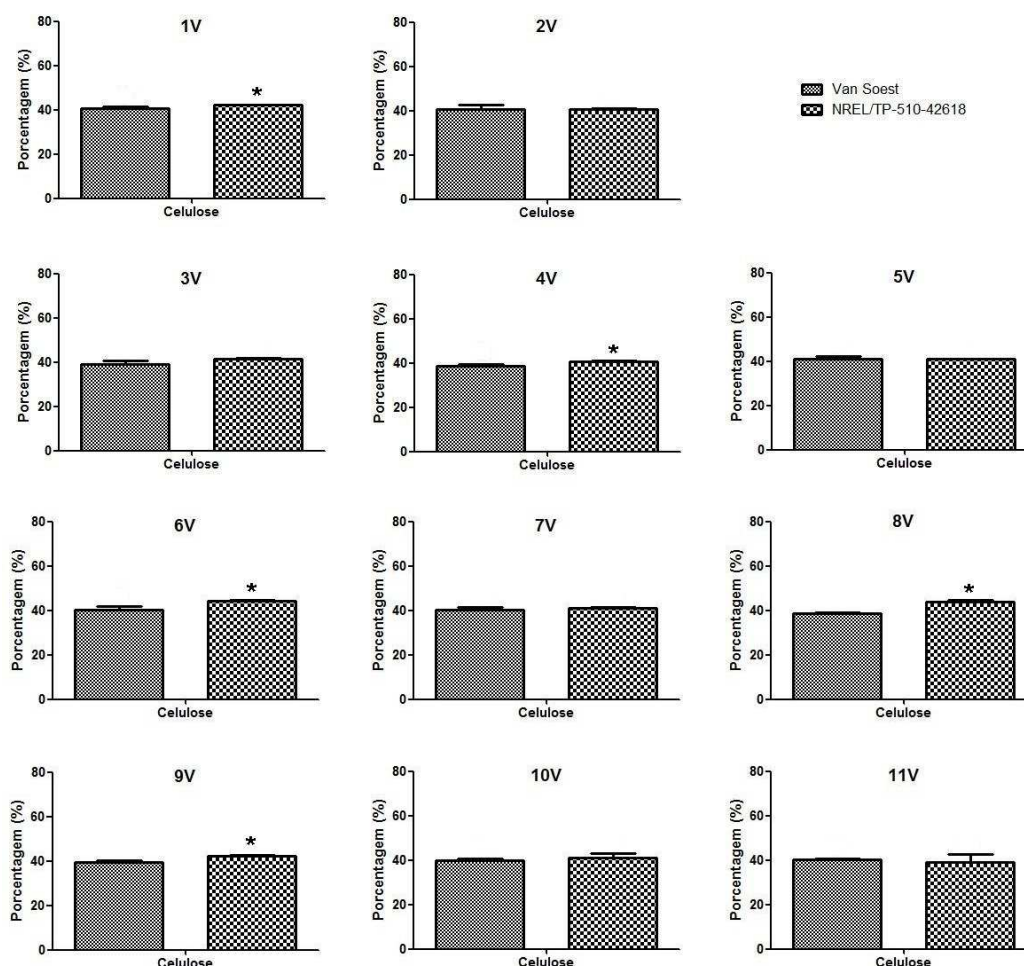
	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Cinza (%)</b>	<b>Total (%)</b>
<b>Van Soest</b>	34,54 ±2,26	38,06 ±4,15	13,55 ±0,82	4,88 ±0,36	91,03
<b>NREL*</b>	37,82 ±0,53	20,94 ±0,56	23,06 ±3,44	9,76 ±0,96	91,57

**\*Pelo método NREL o percentual de extrativos presentes foi de 9,40% ±1,45 e pode estar contabilizado no percentual de lignina, visto que não houve extração prévia.**

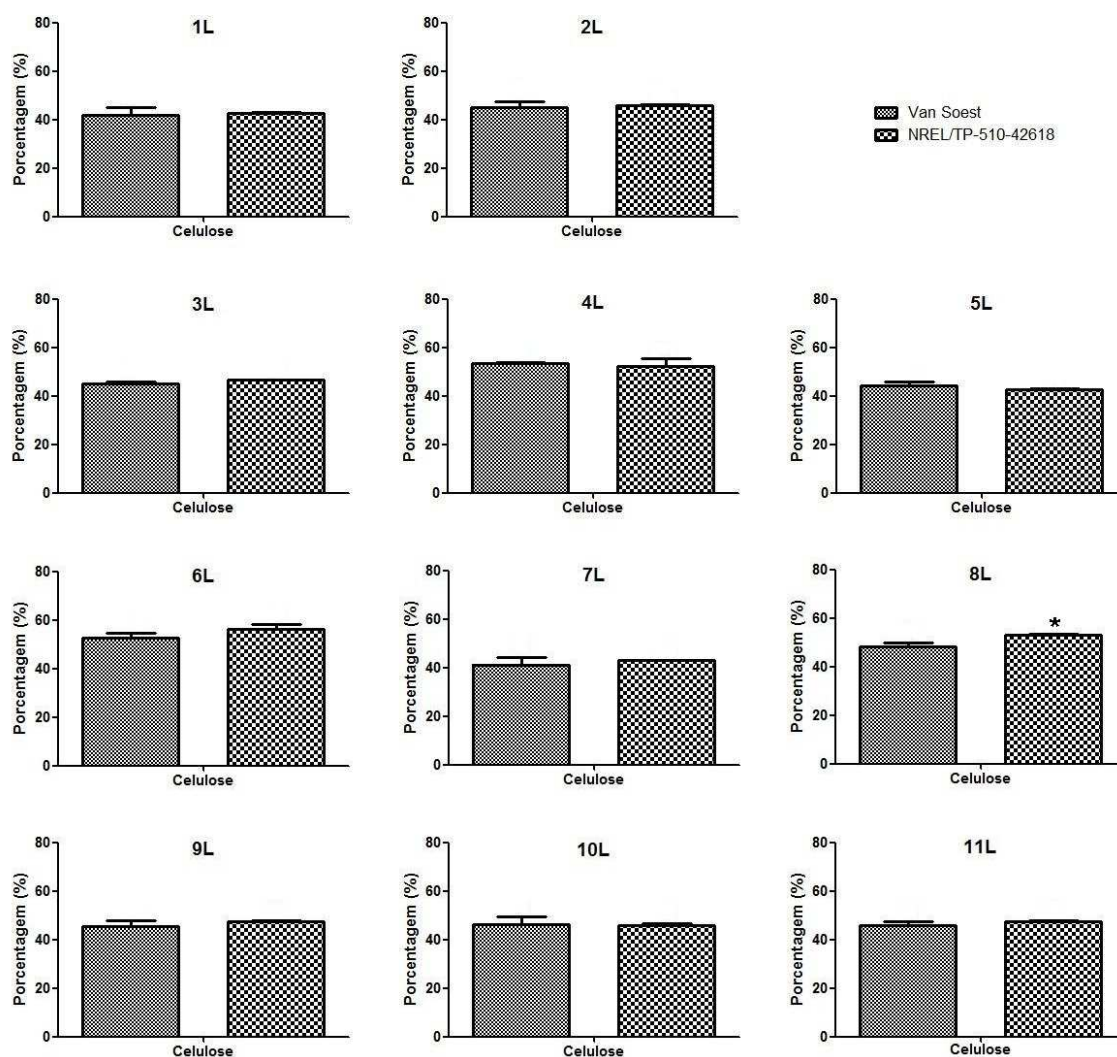
Tanto os dados obtidos pelo método de Van Soest, quanto os obtidos seguindo as normas NREL estão de acordo com a literatura específica de cada metodologia para o capim-elefante (Sladden *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001; Quesada *et al.*, 2004; Tessema & Baars, 2004; Benedetti *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2009; Brandon *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012; Wongwatanapaiboon *et al.*, 2012; Deschamps, 1999; Menegol, 2012). Apenas os valores encontrados para lignina estão superiores, mas considerando o desvio padrão apresentado, estes se enquadram aos valores anteriormente verificados. Pode-se observar que as diferenças mais significativas entre os dois métodos encontram-se nas quantidades de hemicelulose e lignina, sendo que a hemicelulose no método Van Soest é praticamente o dobro a encontrada pelo método NREL, enquanto que para a lignina é observado o inverso. Com relação à hemicelulose, a diferença pode ser explicada pela metodologia NREL estar considerando como hemicelulose apenas a soma de anidroxilose e anidroarabinose, por serem seus principais constituintes, sendo assim glicose,

demais carboidratos e constituintes foram desconsiderados. A diferença nos valores da lignina, avaliada pelos métodos de NREL e Van Soest, pode ser explicada pelo valor de extrativos identificados pelo método do NREL. Uma vez que para a avaliação da lignina de Klason foi utilizado o capim-elefante *in natura*, sem a extração prévia dos compostos solúveis, os extrativos da amostra podem ter sido contabilizados pelo método como lignina. Na metodologia NREL ainda, foi considerado que toda a anidroglicose encontrada é constituinte da celulose. A soma total dos constituintes apresentados na Tabela 6 para cada método indica que, em geral, as diferenças entre um método e outro se compensam, resultando num total de compostos solúveis e proteínas variando de 8,43 % a 8,97 %.

A diferença da composição de cada biomassa pré-tratada em ambos os métodos é observada nas Figuras 21 e 22 para celulose, 23 e 24 para hemicelulose e 25 e 26 para lignina.



**Figura 21.** Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de celulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado gasoso. Valores com asterisco em um mesmo ensaio diferem a 0,05 pelo teste *t*. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).



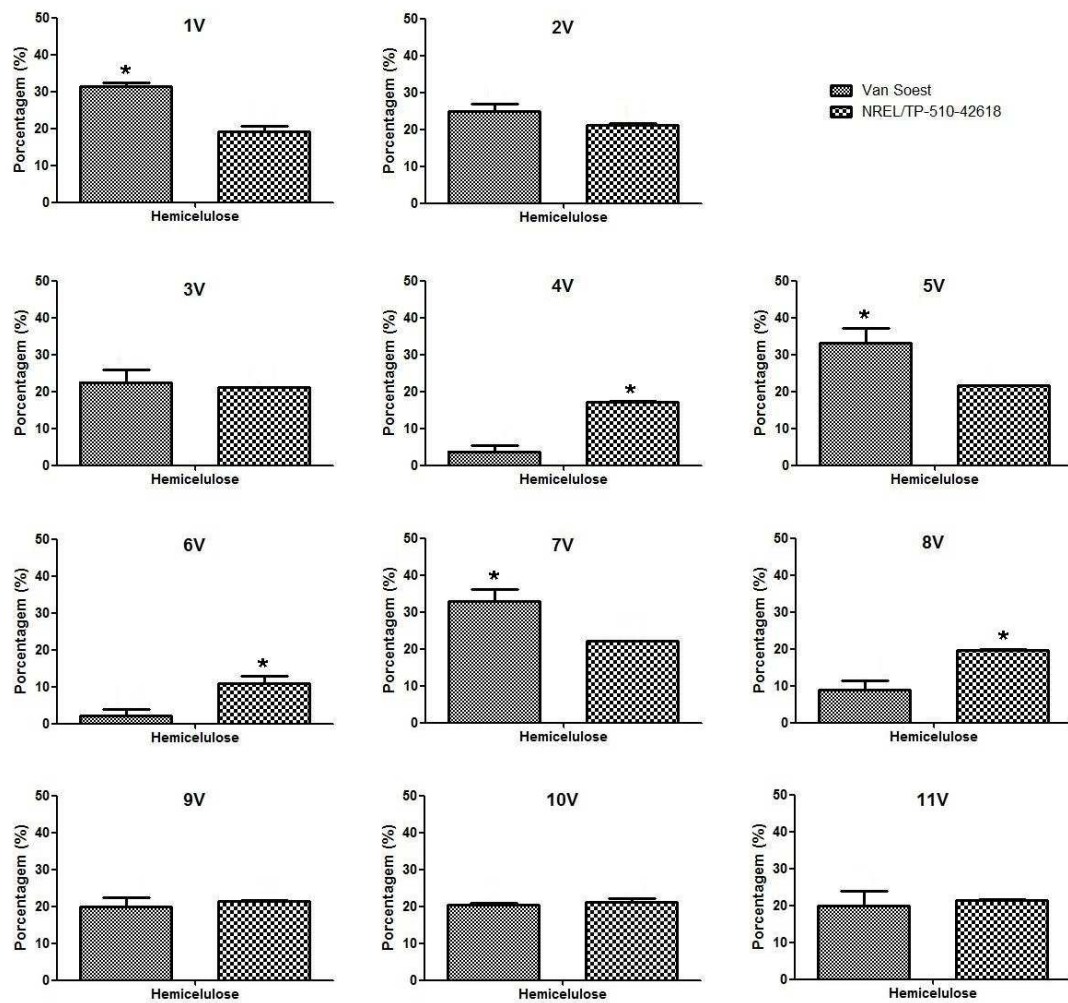
**Figura 22.** Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de celulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado líquido. Valores com asterisco em um mesmo ensaio diferem a 0,05 pelo teste *t*. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Para a porcentagem de celulose pode-se observar que existe pouca diferença significativa entre os resultados de cada método, sendo que diferenças foram observadas em alguns pré-tratamentos de maior fator de severidade. Observa-se ainda que os pré-tratamentos conduzidos com vapor d'água resultaram em diferenças significativas nas porcentagens de celulose em 5 dos 11 pré-tratamentos, enquanto que na utilização da água em estado líquido para o pré-tratamento apenas 1 dos 11 pré-tratamentos existe diferença significativa em seus resultados. Essas diferenças apresentadas nas análises dos pré-tratamentos conduzidos com

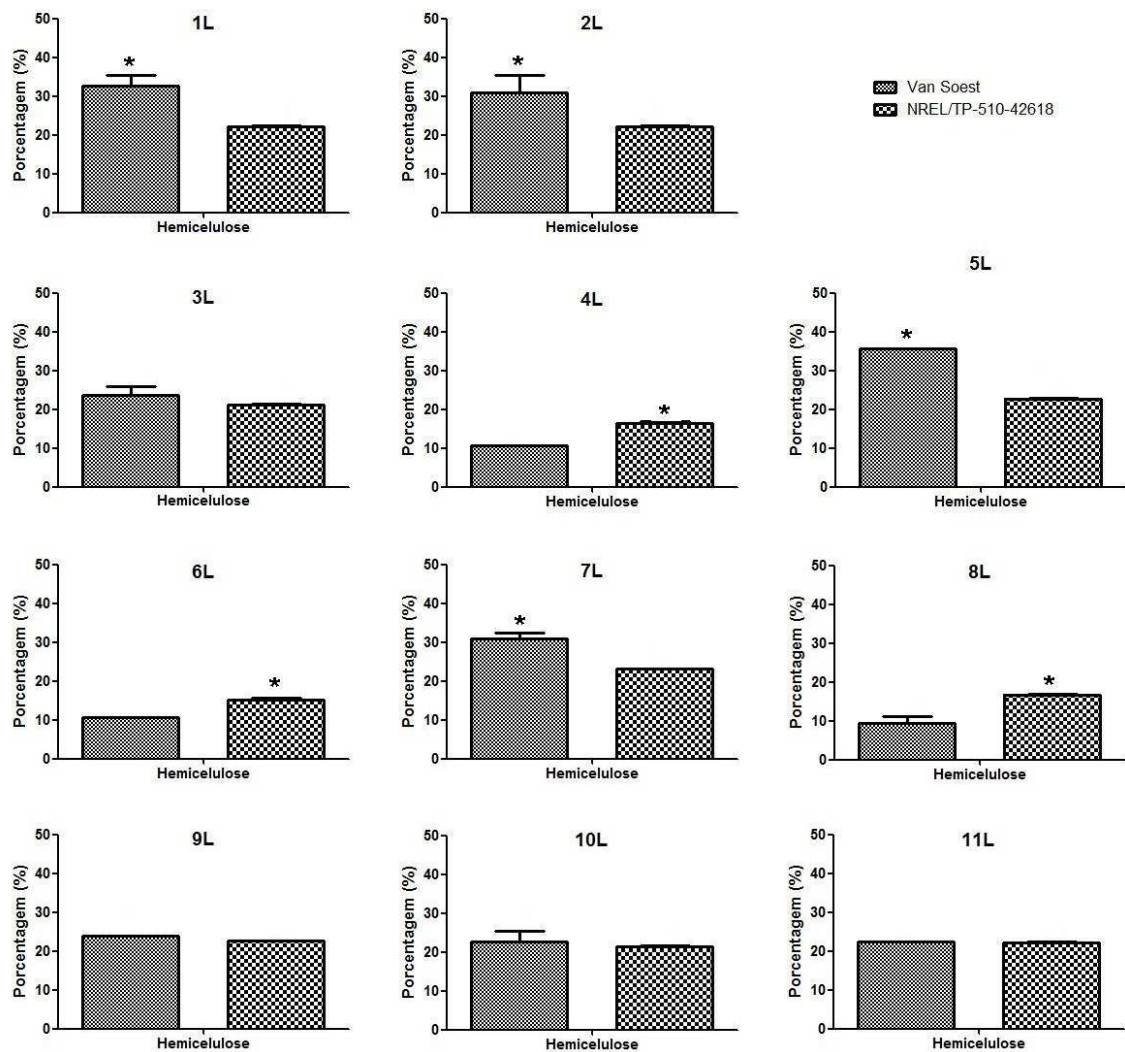
vapor d'água e com líquido podem estar associadas a diferença de ação de cada pré-tratamento sobre a biomassa. Assim sendo, pode-se concluir que para a avaliação da celulose os métodos são similares quanto aos resultados apresentados. Esse resultado pode ser útil à pequenas usinas e laboratórios que não dispõem dos equipamentos necessários para a realização do método proposto pelo NREL, como é o caso do cromatógrafo líquido de alta eficiência, uma vez que, em termos de aparelhagem, o método de Van Soest faz uso de equipamentos mais usuais e baratos.

A porcentagem de hemicelulose avaliada pelo método de Van Soest apresentou uma variação uniforme conforme a severidade do pré-tratamento. Para os pré-tratamentos utilizando vapor d'água (Figura 23) a porcentagem de hemicelulose encontrada pelo método de Van Soest foi menor do que pelo método NREL nos ensaios 8V, 4V e 6V, sendo estes os ensaios de maior severidade, respectivamente 3,88; 4,30 e 4,35. Para os ensaios com severidade variando de 3,30 até 3,77 (ensaios 2V, 3V, 9V, 10V e 11V), não houve diferença significativa ( $>0,05$ ) entre as porcentagens de hemicelulose encontradas. Já para os ensaios de severidade igual e menor que 2,87 (ensaios 1V, 5V e 7V) a porcentagem de hemicelulose é significativamente maior nas análises pelo método de Van Soest. As mesmas observações são feitas para os pré-tratamentos hidrotérmicos conduzidos com água no estado líquido (Figura 24), apenas diferindo que severidades iguais e menores de 3,30 (ensaios 1L, 2L, 5L e 7L) têm as porcentagens de hemicelulose significativamente maiores nas análises pelo método de Van Soest. De modo geral, observa-se que pelo método de Van Soest há maior variação da porcentagem de hemicelulose na biomassa, sendo essa porcentagem menor conforme o aumento da severidade. Esse resultado do método de Van Soest corresponde a um resultado esperado, uma vez que a principal ação do pré-tratamento hidrotérmico é a remoção da hemicelulose, espera-se que com o aumento de tempo e temperatura de processo haja maior perda de hemicelulose.



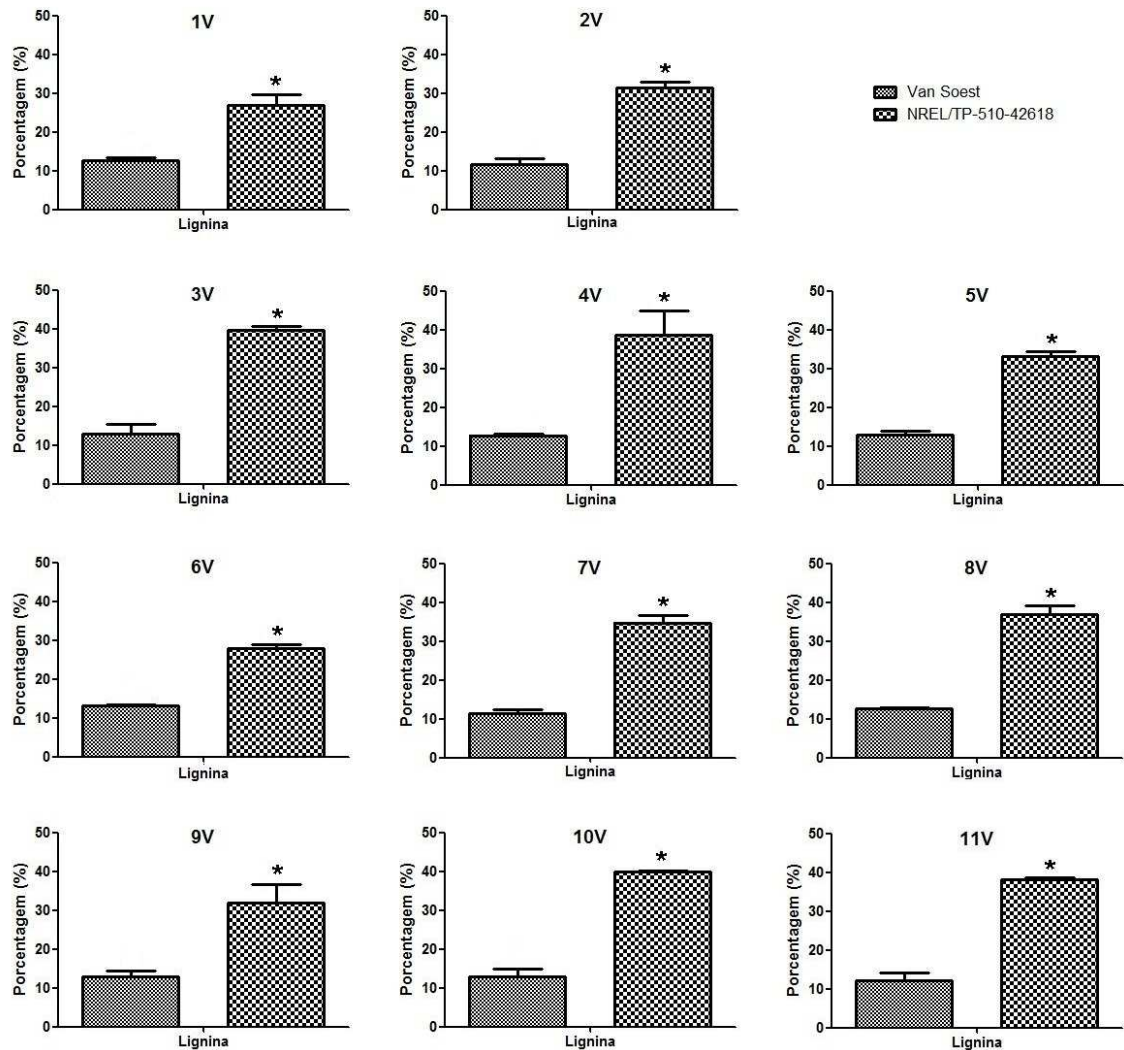


**Figura 23.** Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de hemicelulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado gasoso. Valores com asterisco em um mesmo ensaio diferem a 0,05 pelo teste *t*. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

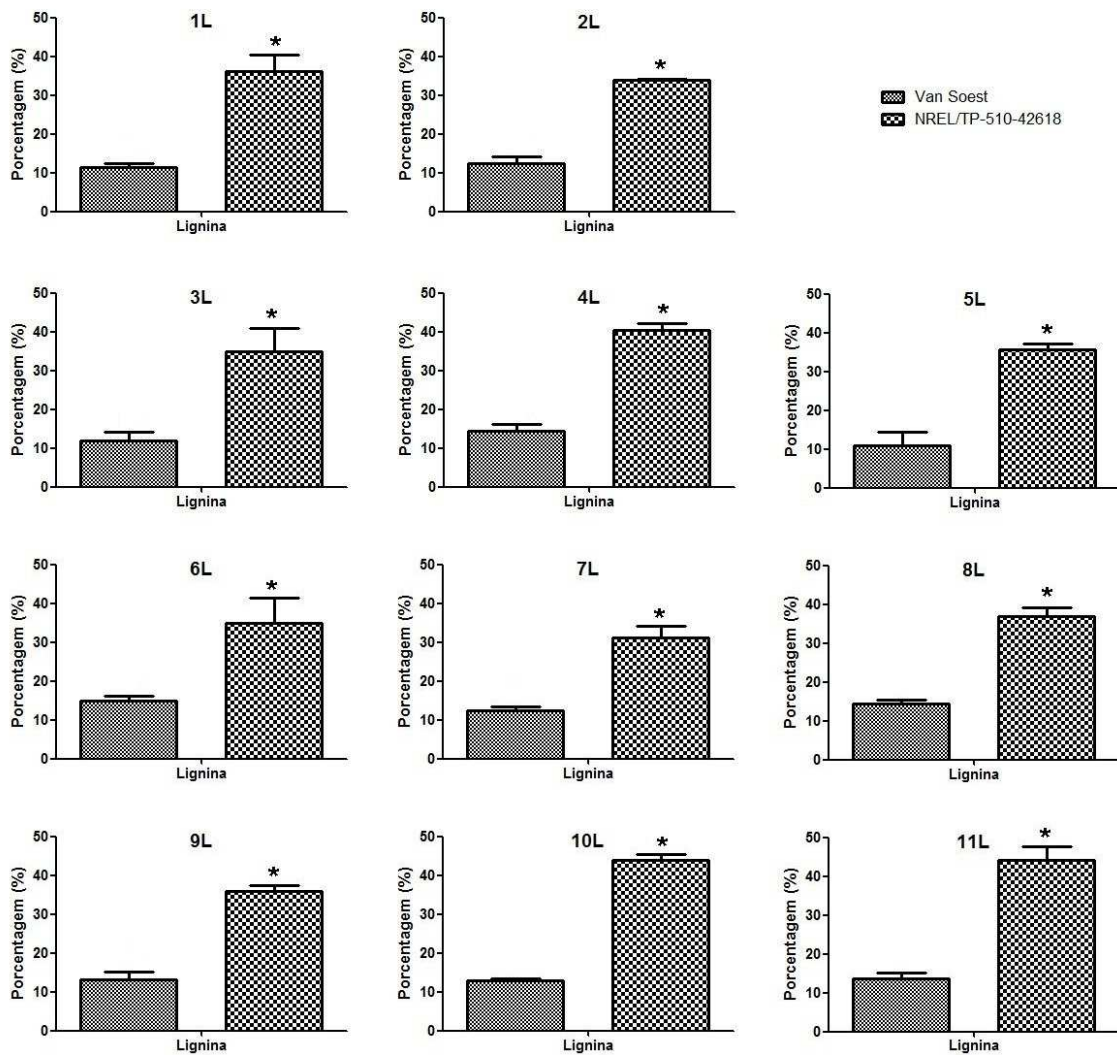


**Figura 24.** Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de hemicelulose de cada biomassa pré-tratada com água no estado líquido. Valores com asterisco em um mesmo ensaio diferem a 0,05 pelo teste *t*. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

A porcentagem de lignina teve diferença significativa ( $>0,05$ ) em todos os casos, sendo esta sempre menor na análise pelo método de Van Soest (Figuras 25 e 26). Os maiores valores de lignina, observados pelo método do NREL, podem estar associados à possível quantificação de parte dos estraíveis da amostra junto com a lignina.



**Figura 25.** Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de lignina de cada biomassa pré-tratada com água no estado gasoso. Valores com asterisco em um mesmo ensaio diferem a 0,05 pelo teste *t*. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).



**Figura 26.** Diferenças entre os métodos de Van Soest e NREL na quantificação de lignina de cada biomassa pré-tratada com água no estado líquido. Valores com asterisco em um mesmo ensaio diferem a 0,05 pelo teste *t*. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Com relação ao balanço de massa e o cálculo das perdas dos três componentes de maior interesse, celulose, hemicelulose e lignina, para o método de Van Soest o erro se apresenta de forma clara para as perdas de celulose (ver Tabela 13, seção 4.3.2, e Tabela 21, seção 4.4.2), indicando que ao invés de perdas o processo estaria formando celulose, o que na prática não acontece. Já na metodologia NREL esse erro se estendem para a lignina também, como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8. As perdas de celulose, hemicelulose e lignina foram calculadas considerando a quantidade mássica de cada componente antes do pré-tratamento, na massa de capim-elefante introduzida no reator, e a quantidade mássica desse mesmo componente após o pré-tratamento, na biomassa retirada do reator.

Novamente, os erros observados em relação aos valores da perda de lignina podem ter sido ocasionados pela possível identificação de parte dos extrativos da amostra como lignina. Para solução de tal problema, sugere-se que o método proposto pelo NREL seja adaptado, realizando a extração dos extrativos da amostra, antes que essa seja utilizada para a quantificação de lignina.

**Tabela 7.** Perdas de hemicelulose, lignina e celulose, provenientes do balanço de massa, utilizando o método NREL, nas biomassas pré-tratadas com água no estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

Ensaio	Severidade (log r <sub>o</sub> )	Perda Hemicelulose (%)	Perda Lignina (%)	Perda Celulose (%)
1V	2,77	13,22	-9,67	-6,08
2V	3,30	4,07	-28,30	-2,28
3V	3,77	3,14	-63,60	-5,42
4V	4,30	28,74	-43,98	6,36
5V	2,87	1,47	-34,91	-3,01
6V	4,35	60,29	7,49	9,77
7V	2,80	-0,41	-42,26	-3,36
8V	3,88	15,03	-43,70	-4,57
9V	3,61	5,42	-26,97	-3,12
10V	3,61	5,33	-60,18	-1,74
11V	3,61	4,35	-53,27	3,70

**Tabela 8.** Perdas de hemicelulose, lignina e celulose, provenientes do balanço de massa, utilizando o método NREL, nas biomassas pré-tratadas com água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Ensaio	Severidade (log r <sub>o</sub> )	Perda Hemicelulose (%)	Perda Lignina (%)	Perda Celulose (%)
1L	2,77	5,72	-38,60	-0,31
2L	3,30	12,94	-19,76	0,54
3L	3,77	18,98	-20,55	1,39
4L	4,30	49,32	-13,05	10,05
5L	2,87	2,97	-36,87	-0,84
6L	4,35	55,20	6,57	7,38
7L	2,80	0,08	-21,68	-3,45
8L	3,88	44,86	-9,18	3,69
9L	3,61	13,66	-23,18	-0,40
10L	3,61	19,94	-47,70	4,81
11L	3,61	16,17	-50,76	0,32

Uma avaliação estatística mais detalhada da perda da hemicelulose foi feita, considerando ser esse o principal efeito do pré-tratamento hidrotérmico. Com auxílio do *software* Statistica 8.0, realizou-se a análise pela ANOVA para o planejamento experimental apresentado na seção 3.2 considerando como variável dependente a perda de hemicelulose calculada pelos resultados de caracterização tanto do método de Van Soest como pelo proposto pelo NREL. Considerando apenas os parâmetros significativos para cada caso, para o método de Van Soest a avaliação estatística da perda de hemicelulose gerou uma equação da curva, onde os ajustes de  $r^2$  para a utilização de água no estado gasoso e no estado líquido foram respectivamente 96,7 e 93,6 %, e os  $r$  ajustados nessa mesma ordem foram 95,3 e 92,0 %. Estes valores são considerados bons ajustes do modelo matemático. Já para a metodologia NREL os valores dos ajustes encontrados foram menores, principalmente no ajuste do modelo matemático para utilização de água no estado gasoso. Os  $r^2$  encontrados para os dados obtidos pelas normas NREL foram 37,6 e 86,4% e os valores de  $r$  ajustado foram 30,7 e 83,0% respectivamente para pré-tratamento hidrotérmicos com água no estado gasoso e água no estado líquido.

Considerando que, pelos valores obtidos para composição do capim-elefante, na realização da metodologia proposta por Van Soest (1968), foi possível fazer uma melhor avaliação dos resultados, o capim-elefante *in natura* e pré-tratado será analisado com esta metodologia.

## 4.2 Caracterização do capim-elefante *in natura*

O capim-elefante *in natura* foi caracterizado quanto sua composição química através do método de Van Soest (1968), descrito na seção 3.5.3.1, e a determinação da matéria seca por método Embrapa (2010), descrito na seção 3.5.1. Os resultados obtidos para matéria seca estão apresentados na Tabela 9.

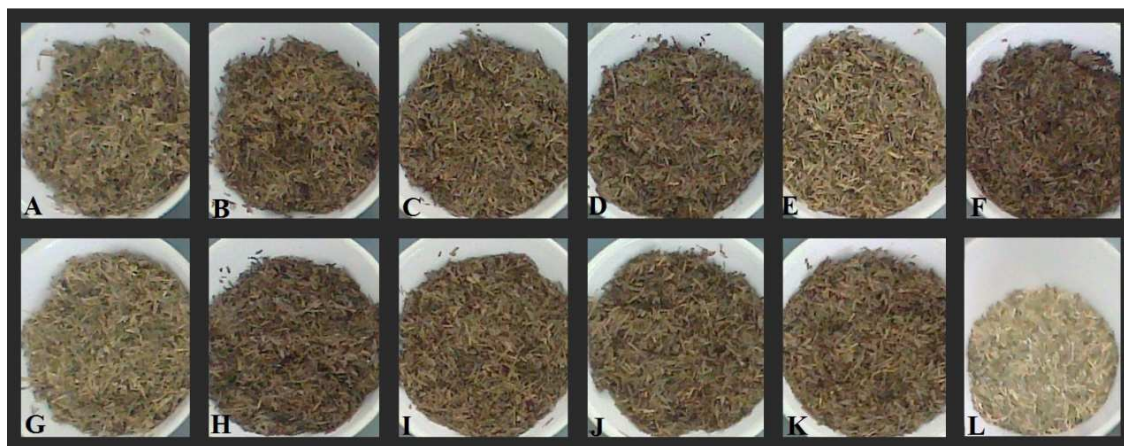
**Tabela 9. Determinação da matéria seca do capim-elefante *in natura*.**

Matéria Seca	Quantitativo (%)
Amostra Seca ao Ar (ASA)	93,22 ±0,56
Matéria Seca Definitiva (MS <sub>def</sub> )	96,30 ±0,27
Matéria Seca Total (MS <sub>tot</sub> )	89,77 ±0,33

A composição química foi avaliada em base seca e foi apresentada na Tabela 6 da seção 4.1 para o método de Van Soest (1968), contendo 34,54 % de celulose, 38,06 % de hemicelulose, 13,55 % de lignina, 8,97 % de conteúdo celular e 4,88 % de cinzas. A composição química está de acordo com a literatura encontrada que também utilizou o método de Van Soest (1968) (Embrapa, 2010). A matéria-prima utilizada nos pré-tratamentos apresentava no início de cada processo umidade total de 10,23 %.

### 4.3 Pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso

Os pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso foram realizados conforme descrito na Seção 3.2, obedecendo o planejamento experimental DCCR. A primeira observação feita, imediatamente após a secagem de parte do capim-elefante pré-tratado para posteriores análises, foi a do escurecimento de todas as amostras quando comparadas com o capim-elefante *in natura* seco (Figura 27). Esse escurecimento já havia sido observado por Toscan (2010) e também por Silva (2009).



**Figura 27.** Aparência das biomassas após pré-tratamento com água no estado gasoso, sendo A (1V), B (2V), C (3V), D (4V), E (5V), F (6V), G (7V), H (8V), I (9V), J (10V), K (11V) e L do capim-elefante *in natura*.

Conforme relatado por Toscan (2010) e Silva (2009), esse escurecimento se deve a catálise ácida das ligações lignina-carboidrato e ocorre com maior intensidade nos pré-tratamentos realizados em temperaturas mais altas. Com o aumento da temperatura da água há a diminuição do pH com geração de uma força ácida. Em meio ácido podem ocorrer reações de caramelização (Haminiuk *et al.*, 2005) onde inicialmente o açúcar redutor isomeriza e

enoliza, passando após por uma etapa de desidratação com formação de 5-HMF e, em uma última etapa, formam-se polímeros que são as melanoidinas, compostos de coloração marrom e alta massa molecular. As reações de caramelização são autocatalizadas pelo desprendimento de água, aceleradas pelo calor e umidade. Outra possibilidade é a ocorrência de reações de Maillard. Nas reações de Maillard, inicialmente, ocorre a condensação da carbonila de um açúcar redutor, por exemplo, com um grupamento amina proveniente de aminoácidos livres ou de proteínas, levando a formação de glicosil/frutosilaminas N-substituídas (produto de Amadori). Na etapa seguinte, prolongando-se o aquecimento ou armazenamento, os produtos de Amadori dão origem a uma série de reações, resultando em compostos dicarbonílicos, redutonas e derivados do furfural, ou ainda em produtos da degradação de Strecker. No último estágio das reações de Maillard, os produtos intermediários (dicarbonílicos), muito reativos, podem reagir com, por exemplo, resíduos de lisina ou arginina em proteínas, formando composto estáveis. Nessa fase ocorrem reações de fragmentação e polimerização, com geração de melanoidinas e de compostos fluorescentes (Shibao & Bastos, 2011).

O método de Van Soest (1968) foi utilizado para avaliar a composição química de cada amostra de capim-elefante pré-tratado. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10. Composição química da biomassa pré-tratada hidrotermicamente com água em estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).**

Ensaio	Severidade (log r <sub>o</sub> )	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinza (%)	Conteúdo Celular (%)	Total (%)
1V	2,77	40,68 ±0,77	31,40±1,11	12,67 ±0,82	5,77 ±0,10	9,48 ±1,29	100,00
2V	3,30	40,58 ±2,08	25,00±2,04	11,60 ±1,54	6,04 ±0,41	16,78 ±2,87	100,00
3V	3,77	39,11 ±1,57	22,54±3,49	12,92 ±2,39	5,42 ±0,05	20,02 ±3,37	100,00
4V	4,30	38,81 ±0,53	3,76±1,75	12,78 ±0,44	5,99 ±0,33	38,66 ±0,94	100,00
5V	2,87	40,95 ±1,14	33,10±4,18	12,82 ±1,20	5,11 ±0,26	8,02 ±4,71	100,00
6V	4,35	40,26 ±1,57	2,05±1,77	13,24 ±0,25	5,74 ±0,14	38,71 ±0,70	100,00
7V	2,80	40,21 ±1,29	32,95±3,15	11,38 ±0,99	5,08 ±0,61	10,38 ±1,60	100,00
8V	3,88	38,50 ±0,55	8,85±2,46	12,73 ±0,24	5,82 ±0,45	34,10 ±1,59	100,00
9V	3,61	39,55 ±0,54	20,00±2,31	12,82 ±1,60	5,89 ±0,43	21,74 ±0,71	100,00
10V	3,61	40,01 ±0,55	20,42±0,61	12,81 ±2,08	5,88 ±0,37	20,88 ±1,73	100,00
11V	3,61	40,20 ±0,35	19,86±4,07	12,26 ±1,83	5,75 ±0,23	21,93 ±3,06	100,00



Comparando os resultados apresentados na Tabela 10 com os resultados da Tabela 6 para o capim-elefante *in natura* pelo método de Van Soest (1968) pode-se observar principalmente um considerável incremento no conteúdo celular presente nas amostras. Esse incremento se deve a hidrólise de parte dos carboidratos presentes principalmente na hemicelulose da amostra *in natura* durante os pré-tratamentos, deixando-os na forma de carboidratos solúveis (despolimerizados) no detergente neutro. A maior redução percentual na composição de hemicelulose ocorreu no ensaio 6V, que também foi o ensaio que apresentou maior porcentagem de conteúdo celular. A celulose também apresentou incremento na porcentagem, o que se deve principalmente a significativa perda de hemicelulose ocasionada pelo processo.

#### **4.3.1 Perda de massa do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso**

A perda de massa das amostras submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso, foi determinado em percentual e em base seca, através da determinação de matéria seca total, conforme metodologias descritas nas seções 3.5.2 e 3.5.3. Considerando que as amostras foram utilizadas com a umidade natural proporcionada pelo pré-tratamento nas etapas seguintes, como a hidrólise, é importante conhecer a umidade da amostra para que seja utilizada uma mesma quantidade mássica de amostra em base seca para cada processo. O percentual de perda de massa foi calculado pela equação 8 e é apresentado na Tabela 11, juntamente com seu desvio padrão.

Os valores de perda de massa são significativos em um processo e foram mais acentuados nos pré-tratamentos com maior severidade, tendo o ensaio 6V chegado a uma perda de massa de 26,46 %.

**Tabela 11. Perda de massa das biomassas pré-tratadas utilizando água no estado gasoso. Composição química da biomassa pré-tratada hidrotermicamente com água em estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).**

Ensaio	Severidade (log r <sub>0</sub> )	Perda de Massa (%)
1V	2,77	9,03 ±1,13
2V	3,30	9,49 ±1,04
3V	3,77	8,30 ±0,76
4V	4,30	17,15 ±0,47
5V	2,87	9,25 ±1,03
6V	4,35	26,46 ±1,36
7V	2,80	9,02 ±2,26
8V	3,88	13,43 ±0,89
9V	3,61	11,63 ±3,28
10V	3,61	10,78 ±1,34
11V	3,61	10,67 ±0,20

Os dados percentuais de perda de massa do pré-tratamento utilizando água no estado gasoso foram avaliados pelo *software* Statistica 8.0, conforme planejamento experimental proposto, considerando os tempos e temperaturas de cada pré-tratamento e gerando dados estatísticos com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ( $p < 0,05$ ).

O resultado da análise de variância (ANOVA) para a perda de massa está apresentado na Tabela 12. Entre os fatores estudados apenas a temperatura (°C) linear apresentou efeito significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12. Análise de variância (ANOVA) para perda de massa dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.**

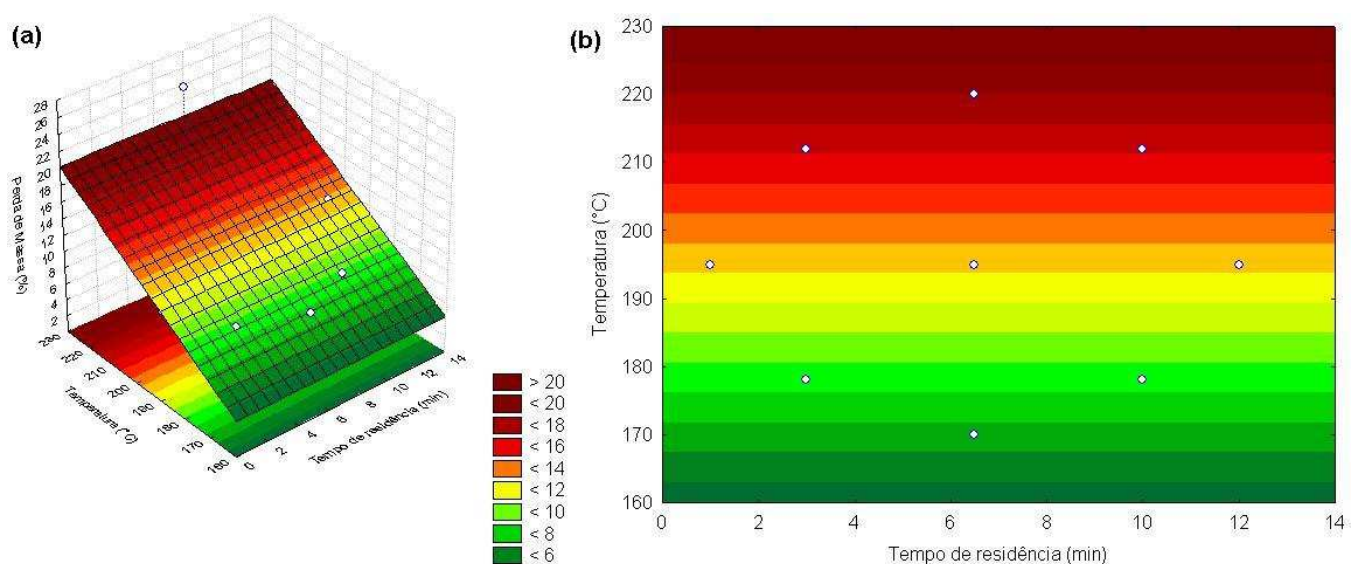
Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	P
(1) Tempo de residência (min) (L)	29,524	1	29,524	0,183
Tempo de residência (min) (Q)	1,201	1	1,201	0,768
(2) Temperatura (°C) (L)	124,913	1	124,913	0,025
Temperatura (°C) (Q)	39,331	1	39,331	0,134
1L por 2L	17,610	1	17,610	0,286
Erro	61,777	5	12,355	
Total	285,407	10		

Considerando apenas o parâmetro estatisticamente significativo, a temperatura linear (T), a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a perda de massa é apresentado na Equação 19 e tem como ajustes  $r^2$  igual a 43,8 % e  $r$  ajustado igual a 37,5 %, que são considerados valores baixos de ajustes. A temperatura linear (°C) (T) apresenta efeito positivo na perda de massa, ou seja, quanto maior a temperatura dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso maior a perda de massa de capim-elefante.

$$PM(\%) = -32,14 + 0,23T$$

**Equação 19**

A superfície de resposta e a curva de contorno considerando apenas o parâmetro estatisticamente significativo, a temperatura linear (°C), são apresentadas na Figura 28.



**Figura 28. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de massa nos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.**

Considerando que a perda de massa não é um efeito desejado, ou seja, quanto menor a perda de massa melhor, os melhores resultados são observados nas menores temperaturas. Temperaturas de pré-tratamento abaixo de 185 °C resultam em perdas de massa menores de 10 % da massa total.

### 4.3.2 Perda dos principais constituintes do capim-elefante durante o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso

O pré-tratamento hidrotérmico em seu processo de desestruturação do material lignocelulósico promove a remoção da hemicelulose e, em menor quantidade, da lignina. Porém, conforme a severidade do processo, parte da celulose também pode ser perdida. Para os cálculos de perda de cada constituinte, a quantidade mássica introduzida no reator em base seca foi comparada a quantidade mássica retirada do reator, em base seca, levando-se em conta as percentagens de cada componente obtidas pelo método de Van Soest, para o capim-elefante *in natura* e para as amostras pré-tratadas. A Tabela 13 apresenta os resultados para as perdas dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

**Tabela 13.** Perda de hemicelulose, lignina e celulose nos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

Ensaio	Severidade (log r <sub>0</sub> )	Perda Hemicelulose (%)	Perda Lignina (%)	Perda Celulose (%)
1V	2,77	24,96	14,92	-7,13
2V	3,30	40,56	22,48	-6,34
3V	3,77	45,70	12,56	-3,82
4V	4,30	91,81	21,86	6,92
5V	2,87	21,09	14,14	-7,59
6V	4,35	96,04	28,13	14,28
7V	2,80	21,25	23,58	-5,92
8V	3,88	79,86	18,66	3,52
9V	3,61	53,57	16,42	-1,18
10V	3,61	52,13	15,65	-3,34
11V	3,61	53,38	19,18	-3,96

Observa-se que, conforme já era esperado, a principal ação do pré-tratamento hidrotérmico é a remoção da hemicelulose, sendo que nos pré-tratamentos de maior severidade (6V e 4V) a perda de hemicelulose se aproxima de 100 %. O pré-tratamento de menor remoção de hemicelulose foi o correspondente ao ensaio 5V, onde a perda de hemicelulose foi de apenas 21,09%. Também ocorreu remoção da lignina, mas em menor

proporção, sendo máxima no ensaio 6V onde a perda supera 28 % e mínima no ensaio 3V onde a perda não atinge 13 %. Quanto as perdas de celulose, é possível observar um valor significativo apenas nos ensaios 4V, 6V e 8V, sendo estes os ensaios de maior severidade. Nos demais ensaios os valores negativos representariam um ganho mássico de celulose durante o processo, o que não ocorre na prática, sendo assim apenas representam erro experimental.

Para a remoção de lignina durante o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso, um estudo estatístico dos dados pela análise da variância (ANOVA) não gerou nenhum resultado significativo ( $p < 0,05$ ) dos fatores envolvidos (Tabela 14).

**Tabela 14. Análise de variância (ANOVA) para perda de lignina dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.**

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	9,308	1	9,308	0,612
Tempo de residência (min) (Q)	12,344	1	12,344	0,561
(2) Temperatura (°C) (L)	37,135	1	37,135	0,330
Temperatura (°C) (Q)	11,491	1	11,491	0,574
1L por 2L	0,753	1	0,753	0,884
Erro	159,284	5	31,857	
Total	224,163	10		

A perda de hemicelulose foi analisada estatisticamente com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ( $p < 0,05$ ). Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a perda de hemicelulose estão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) para perda de hemicelulose dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.**

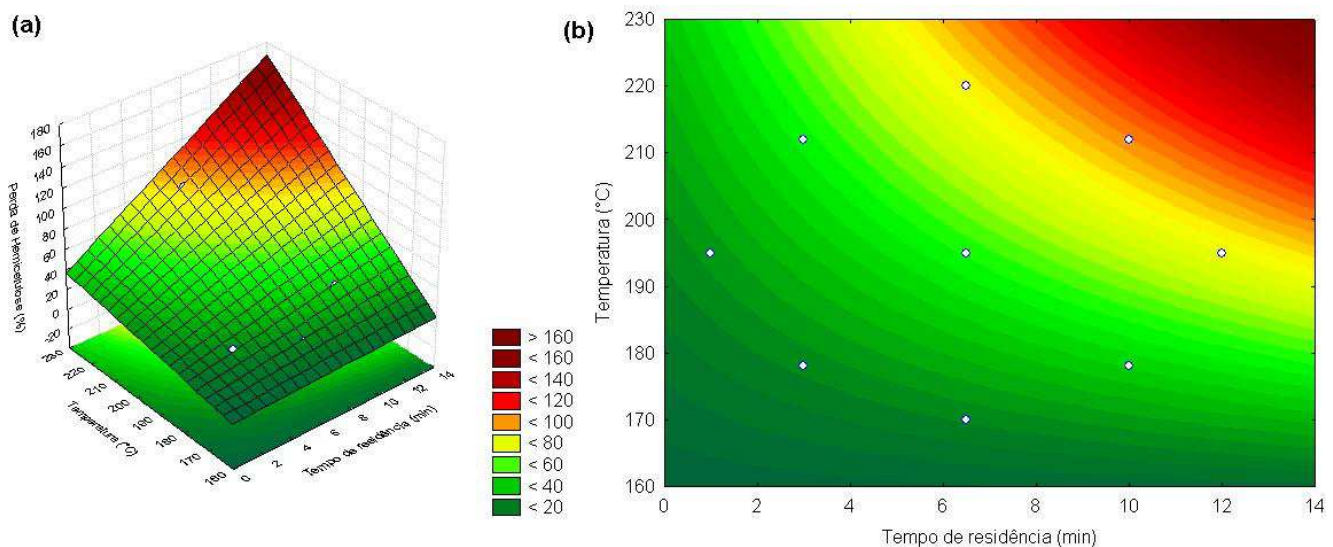
Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	2646,6727	1	2646,6727	0,0003
Tempo de residência (min) (Q)	18,8906	1	18,8906	0,4939
(2) Temperatura (°C) (L)	3987,9271	1	3987,9271	0,0001
Temperatura (°C) (Q)	20,4409	1	20,4409	0,4776
1L por 2L	232,6906	1	232,6906	0,0489
Erro	173,6145	5	34,7229	
Total	7101,2538	10		

Entre os fatores estudados a temperatura linear (°C), o tempo linear (min) e a interação entre tempo e temperatura apresentaram efeito significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativos, a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a perda de hemicelulose é apresentado na Equação 20 (sendo  $t$  igual a tempo de residência em min e  $T$  temperatura em graus Celsius) e tem como ajustes  $r^2$  igual a 96,7 % e  $r$  ajustado igual a 95,3 %, que são considerados bons ajustes.

$$PH(\%) = -67,77 - 20,08t + 0,45T + 0,13tT \quad \text{Equação 20}$$

A superfície de resposta e a curva de contorno considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativos são apresentadas na Figura 29.



**Figura 29.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de hemicelulose nos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.

Considerando que a perda de hemicelulose é um efeito esperado como resposta da ação do pré-tratamento hidrotérmico, pode-se observar que tanto temperatura de operação quanto tempo de processo, são importantes para o desempenho do pré-tratamento. Observa-se ainda pela curva de contorno que os resultados mais promissores são obtidos em temperatura superiores a 195 °C em tempos de residência superiores a 6,5 min.

### 4.3.3 Composição dos efluentes resultantes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso

Após o término de cada pré-tratamento, durante a despressurização do reator, o fluido de pré-tratamento foi coletado em vidros âmbar para análise de sua composição por CLAE. A composição desses efluentes resultantes dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso é apresentado na Tabela 16.

**Tabela 16. Composição dos efluentes dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).**

Ensaio	Severidade (log r <sub>o</sub> )	Volume (mL)	Celobiose (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Xilose (mg/mL)	Arabinose (mg/mL)	Ácido Acético (mg/mL)	5-HMF (mg/mL)	Furfural (mg/mL)
1V	2,77	192	0,0416	0,1655	0,1640	0,0355	< 0,0008	-	-
2V	3,30	260	0,0428	0,1853	0,1663	0,0485	< 0,0008	-	0,0093
3V	3,77	280	0,0423	0,1644	0,1694	0,0521	< 0,0008	-	0,0127
4V	4,30	310	0,0381	0,1230	0,1961	0,1380	0,3009	-	0,1027
5V	2,87	200	0,0420	0,1564	0,1556	0,0299	< 0,0008	-	0,0089
6V	4,35	360	0,0367	0,0978	0,2845	0,1391	0,3726	0,0138	0,0629
7V	2,80	166	0,0454	0,2039	0,2072	0,0317	< 0,0008	-	-
8V	3,88	295	0,0380	0,1347	0,1859	0,1087	0,0842	-	0,0462
9V	3,61	232	0,0416	0,1702	0,1786	0,0655	0,0067	-	0,0195
10V	3,61	225	0,0412	0,1708	0,1879	0,0798	< 0,0008	-	-
11V	3,61	230	0,0395	0,1335	0,1414	0,0575	< 0,0008	-	-

Conforme já era esperado, o principal constituinte do efluente dos pré-tratamentos foi a xilose, que é o principal constituinte da hemicelulose, componente que sofre maior ação do pré-tratamento hidrotérmico. O ensaio 6V, que foi o que apresentou maiores perdas de hemicelulose, também apresentou maior concentração de xilose, arabinose e ácido acético em seu hidrolisado. O ensaio 6V foi ainda o único ensaio que apresentou o produto de degradação da glicose, o 5-HMF, o que explica porque apesar ser o ensaio com maior perda de celulose o seu efluente apresentou a menor concentração de glicose. O furfural foi detectado em sete dos onze ensaios, indicando que nesses ensaios as perdas de xilose e arabinose foram superiores ao que é apresentado na composição do efluente. O ensaio 4V foi o ensaio que apresentou maior concentração de furfural. Apesar do aparecimento tanto de furfural quanto de 5-HMF

nos efluentes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água em estado gasoso, a concentração detectada ainda é mais de quarenta e cinco vezes menor que a detectada por Aguilar *et al.* (2002) para furfural no tratamento com ácido sulfúrico para o bagaço de cana-de-açúcar, e mais de trezentas vezes menor que a concentração de 5-HMF detectada por Larsson *et al.* (1999) em hidrolisados de madeira lascada de *Picea abies*, tratados com vapor saturado com adição de ácido sulfúrico. Além disso, as concentrações de furfural descritas são comparáveis e, em sua maioria, menores que as concentrações obtidas por Laser *et al.* (2002), que pré-tratou hidrotermicamente o bagaço de cana-de-açúcar.

#### **4.3.4 Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada hidrotermicamente utilizando água no estado gasoso**

A hidrólise enzimática com uma carga de 15 FPA/g foi realizada conforme descrito na seção 3.3.

Inicialmente foram avaliados os açúcares redutores (AR), determinados pelo método de DNS conforme descrito na seção 3.5.5, e a glicose, determinada por kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup> conforme também descrito na seção 3.5.5, liberados após a hidrólise enzimática, para avaliação da cinética do processo e a sua reprodutibilidade nos pontos centrais.

A cinética de liberação dos açúcares redutores é apresentada na Figura 30. De modo geral, todas as biomassas pré-tratadas tiveram maior liberação de AR quando comparadas com a hidrólise do capim-elefante *in natura*. O ensaio 6V resultou, na maioria dos tempos de coleta de amostra, no maior rendimento de AR, sendo que o maior incremento no rendimento foi observado até o tempo de 48 h de processo. O máximo rendimento de AR foi atingido após 60 h de hidrólise do ensaio 11V e foi de aproximadamente 576 mg de AR.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*.

As reduções de rendimento para AR podem ser explicadas pela existência de contaminações, visto que a azida sódica tem pouco efeito em bactérias Gram positivas (Winter *et al.*, 2012).



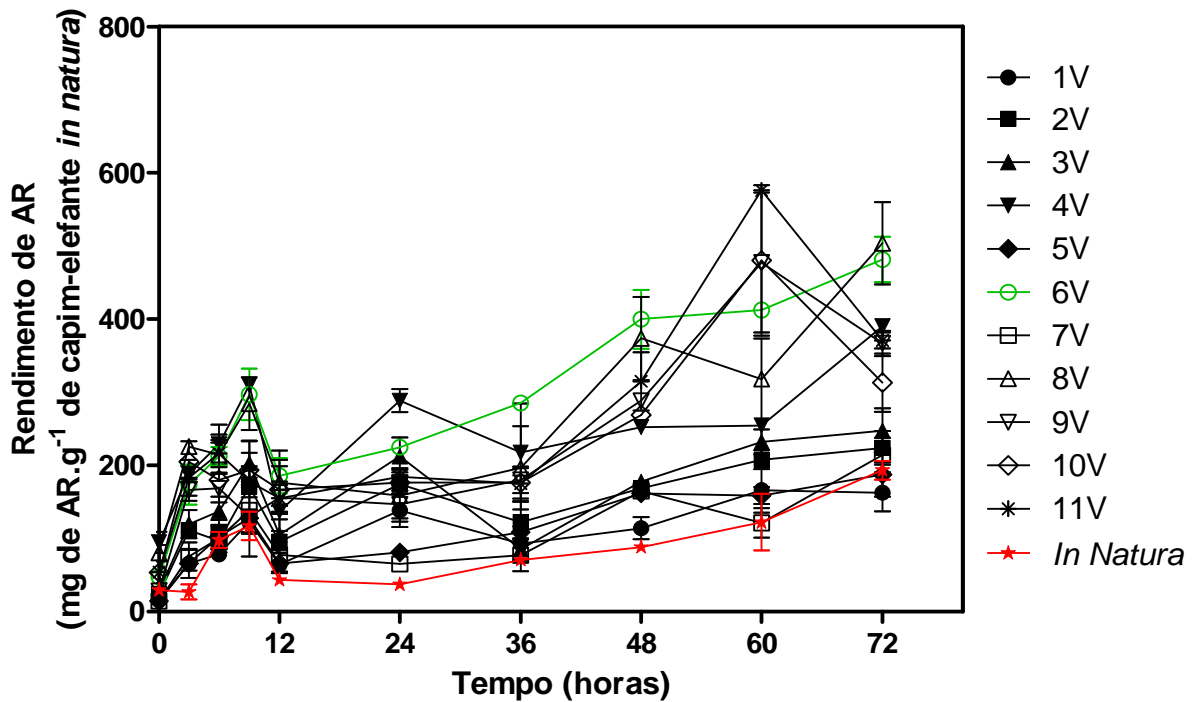


Figura 30. Rendimento de AR ( $\text{mg de AR} \cdot \text{g}^{-1}$  de capim-elefante *in natura*) variando conforme o tempo de hidrólise enzimática para o capim-elefante *in natura* e as biomassas pré-tratadas com vapor d'água. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

A Figura 31 apresenta o comportamento dos pontos centrais do planejamento experimental para a concentração de AR. A análise de rendimento de AR por grama de capim-elefante nos pontos centrais permite afirmar que há reprodutibilidade dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso. Para os pontos centrais o pico de concentração de AR foi observado em 60 h de processo.

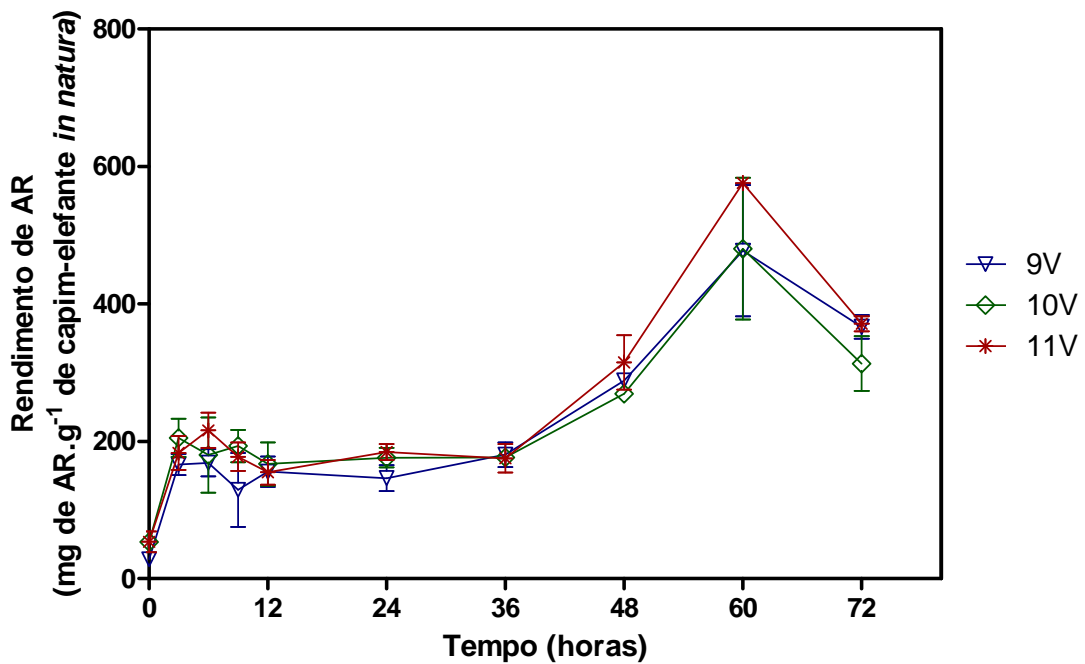


Figura 31. Concentração de AR (mg de AR. g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*) variando conforme o tempo de hidrólise enzimática para as biomassas pré-tratadas com vapor d'água nos pontos centrais do planejamento experimental. 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

A cinética da hidrólise enzimática para a liberação de glicose (utilizando kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup>) é apresentada na Figura 32.

Quanto a liberação de glicose no decorrer da hidrólise enzimática, como para AR, o ensaio 6V manteve o rendimento de glicose liberada acima dos demais ensaios, sendo seguido pelo ensaio 4V. Porém em alguns tempos o ensaio 1V se mostrou menos eficiente na liberação de glicose do que o próprio capim-elefante *in natura*. O máximo rendimento de glicose no meio se deu no ensaio 6V no tempo de 60 h, sendo esse rendimento de 341 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*. Apesar de o ensaio 6V ter seu pico de rendimento de glicose em 60 h de hidrólise, ensaios como o 4V e 3V, que também proporcionaram a obtenção de altos rendimentos de glicose liberada, tiveram seus picos de liberação em 48 h de processo, o que representa 12 h a menos de processo. Por esse motivo o tempo ideal de processo foi estabelecido em 48 h e as amostras dos hidrolisados nesse tempo foram avaliadas por CLAE.

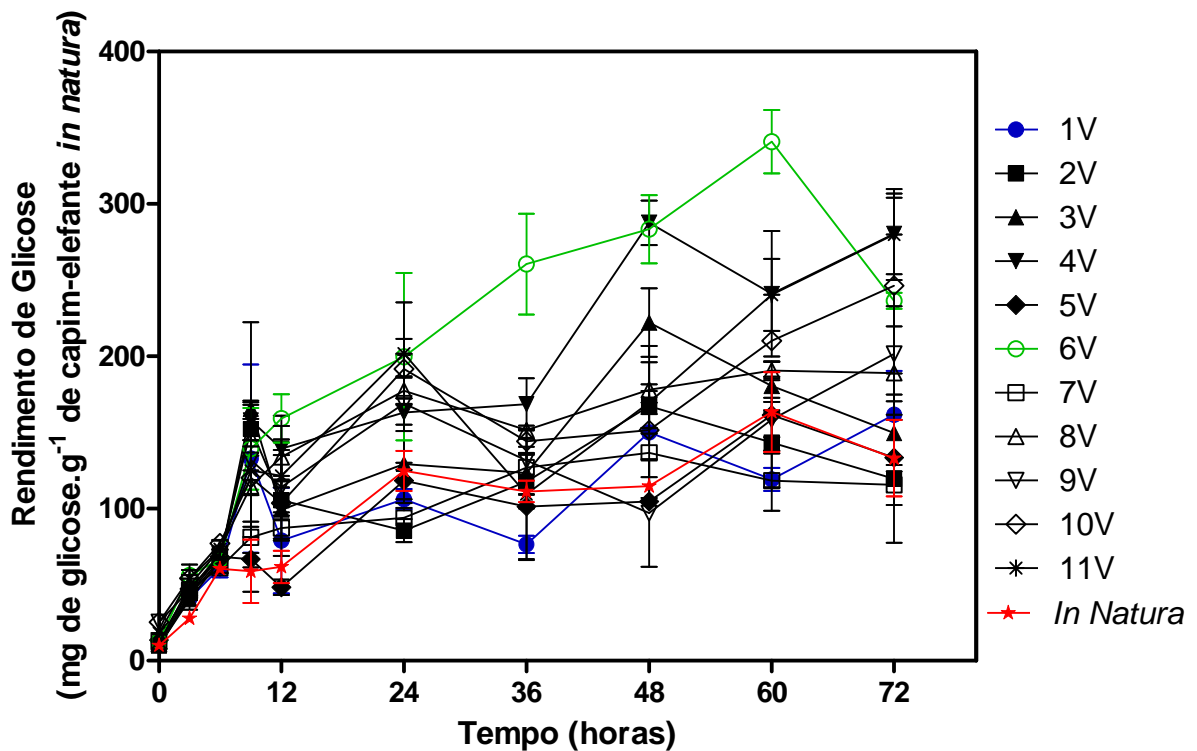


Figura 32. Rendimento de glicose ( $\text{mg de glicose.g}^{-1}$  de capim-elefante *in natura*) variando conforme o tempo de hidrólise enzimática para o capim-elefante *in natura* e as biomassas pré-tratadas com vapor d'água. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

O emprego de CLAE proporcionou a determinação da concentração de glicose e das concentrações de outros compostos, como xilose, arabinose, ácido acético, 5-HMF e furfural. Para melhor comparação dos dados o rendimento da glicose liberada em 48 h de hidrólise enzimática é apresentado na Figura 33, onde os rendimentos de glicose foram calculados utilizando os dados obtidos através de CLAE.

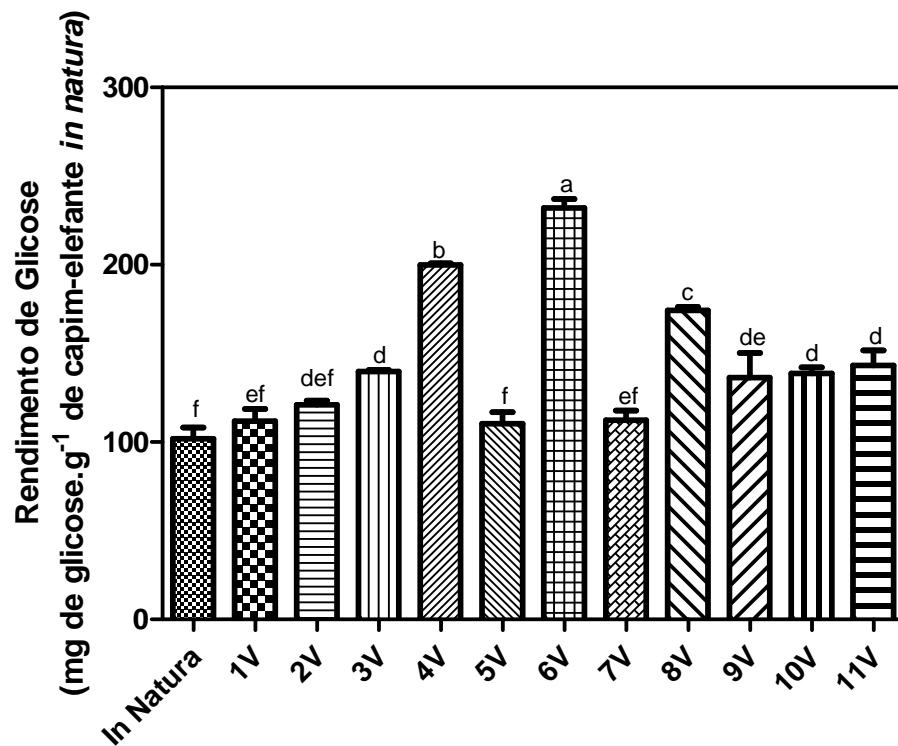
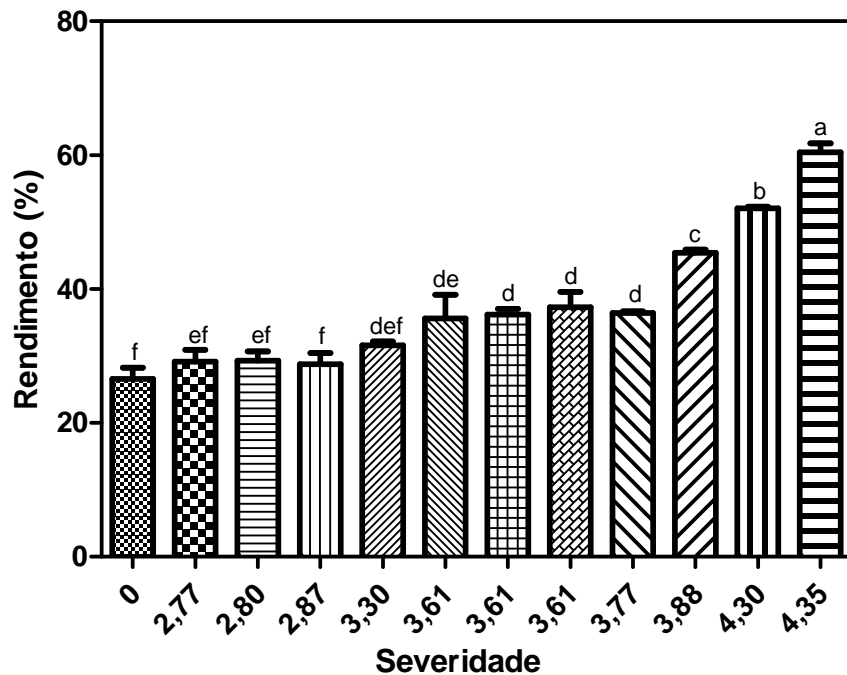


Figura 33. Rendimento de glicose (mg de glicose. g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*) após 48 h de hidrólise enzimática para o capim-elefante *in natura* e as biomassas pré-tratadas com vapor d'água. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

Pela Figura 33 é possível observar que os melhores resultados foram obtidos com o ensaio 6V, com cerca de 232 mg de glicose. g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura* e apresentando diferenças significativas de todos os demais. Também apresentaram alta concentração de glicose liberada os ensaios 4V e 8V, liberando no meio cerca de 199,91 e 174,31 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, respectivamente. Os três ensaios que apresentaram maior rendimento de glicose liberada no meio também são os três ensaios de maior severidade de seus fatores, por este motivo a avaliação do rendimento de glicose liberada pela glicose esperada também foi feita comparando diretamente as severidades de cada pré-tratamento (Figura 34).



**Figura 34.** Rendimento da hidrólise enzimática (glicose liberada.glicose esperada<sup>-1</sup>) em relação à severidade de cada pré-tratamento hidrotérmico utilizando água em estado gasoso. 2,77 - 1V (3 min, 178 °C); 3,30 - 2V (10 min, 178 °C); 3,77 - 3V (3 min, 212 °C); 4,30 - 4V (10 min, 212 °C); 2,87 - 5V (6,5 min, 170 °C); 4,35 - 6V (6,5 min, 220 °C); 2,80 - 7V (1 min, 195 °C); 3,88 - 8V (12 min, 195 °C); 3,61 (1°) - 9V (6,5 min, 195 °C); 3,61 (2°) - 10V (6,5 min, 195 °C); 3,61 (3°) - 11V (6,5 min, 195 °C).

Como observado na Figura 34, houve incremento no rendimento do processo conforme o aumento da severidade do pré-tratamento. O maior rendimento atingido pelo ensaio de maior severidade corresponde ao ensaio 6V, chegando a 60,44 % de conversão, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação as demais condições. As severidades 3,88 e 4,30 correspondem respectivamente aos ensaios 8V e 4V, e obtiveram como rendimentos 45,42 % e 52,09 %. O menor rendimento, conforme esperado, coube a hidrólise enzimática do capim-elefante *in natura* (severidade igual a zero), alcançando rendimento de 26,53 %. O rendimento do capim-elefante *in natura* não apresentou diferença significativa, dos quatro ensaios de menor severidade, sendo estes 2,77 (1V); 2,80 (7V); 2,87 (5V) e 3,30 (2V).

A Equação 21 descreve a correlação entre a severidade (representada pela letra  $x$ ) e o rendimento da hidrólise enzimática (Figura 34) para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso (representado pela letra  $y$ ). Observa-se que o ajuste dessa correlação se dá na forma de polinômio de segundo grau e tem  $r^2$  igual a 0,96.

$$y = 13,08 x^2 - 75,21x + 137,10$$

**Equação 21**

A concentração de glicose ( $\text{mg de glicose.g}^{-1}$  capim-elefante *in natura*) após 48 h de hidrólise foi analisada estatisticamente com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ( $p < 0,05$ ). Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose da hidrólise enzimática dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.**

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	3108,25	1	3108,25	0,008
Tempo de residência (min) (Q)	0,50	1	0,50	0,958
(2) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (L)	9772,35	1	9772,35	0,001
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Q)	925,66	1	925,66	0,065
1L por 2L	647,34	1	647,34	0,106
Erro	833,65	5	166,73	
Total	15432,74	10		

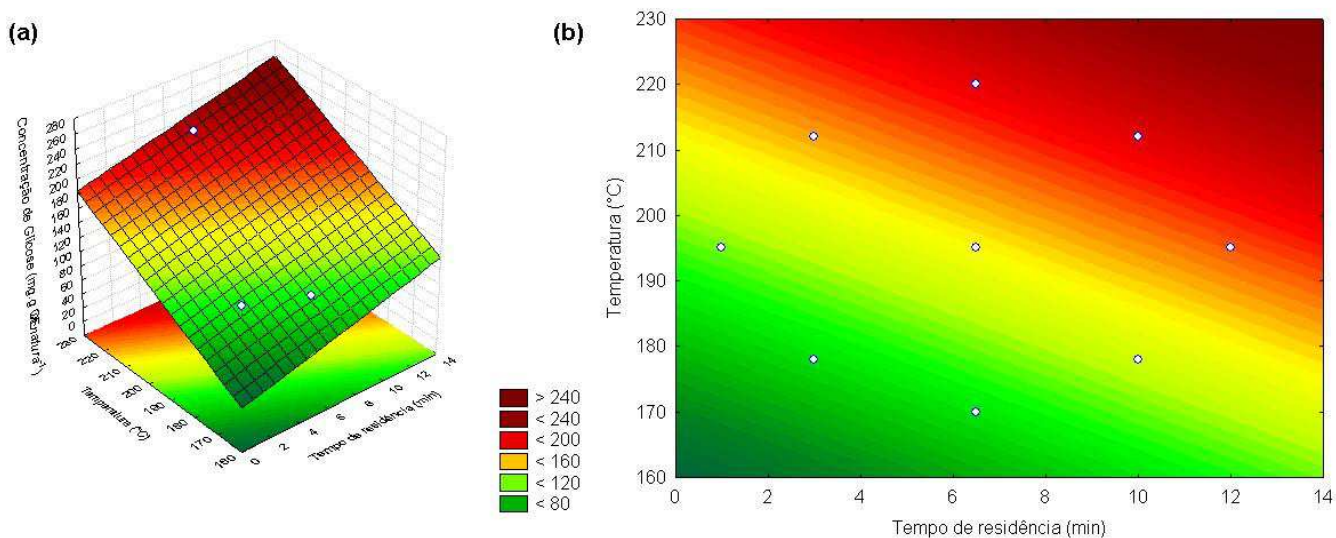
Entre os fatores estudados tanto temperatura linear ( $^{\circ}\text{C}$ ) quanto o tempo linear (min) apresentaram efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

Considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativo, a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a perda de hemicelulose é apresentado na Equação 22 (sendo  $t$  igual a tempo de residência em min e  $T$  temperatura em graus Celsius) e tem como ajustes  $r^2$  igual a 83,5 % e  $r$  ajustado igual a 79,3 %.

$$Gli(\text{mg.g}^{-1}) = -280,32 + 5,33t + 2,02T \quad \text{Equação 22}$$

Pelo modelo matemático observa-se que tanto a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) linear quanto o tempo de residência (min) linear apresentaram efeito positivo, ou seja, quanto maior a temperatura e o tempo dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso maior a liberação de glicose após a hidrólise enzimática do capim-elefante.

A superfície de resposta e a curva de contorno para o modelo matemático proposto para a concentração de glicose considerando os parâmetros estatisticamente significativo são apresentadas na Figura 35.



**Figura 35. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para concentração de glicose das hidrólises enzimáticas dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso.**

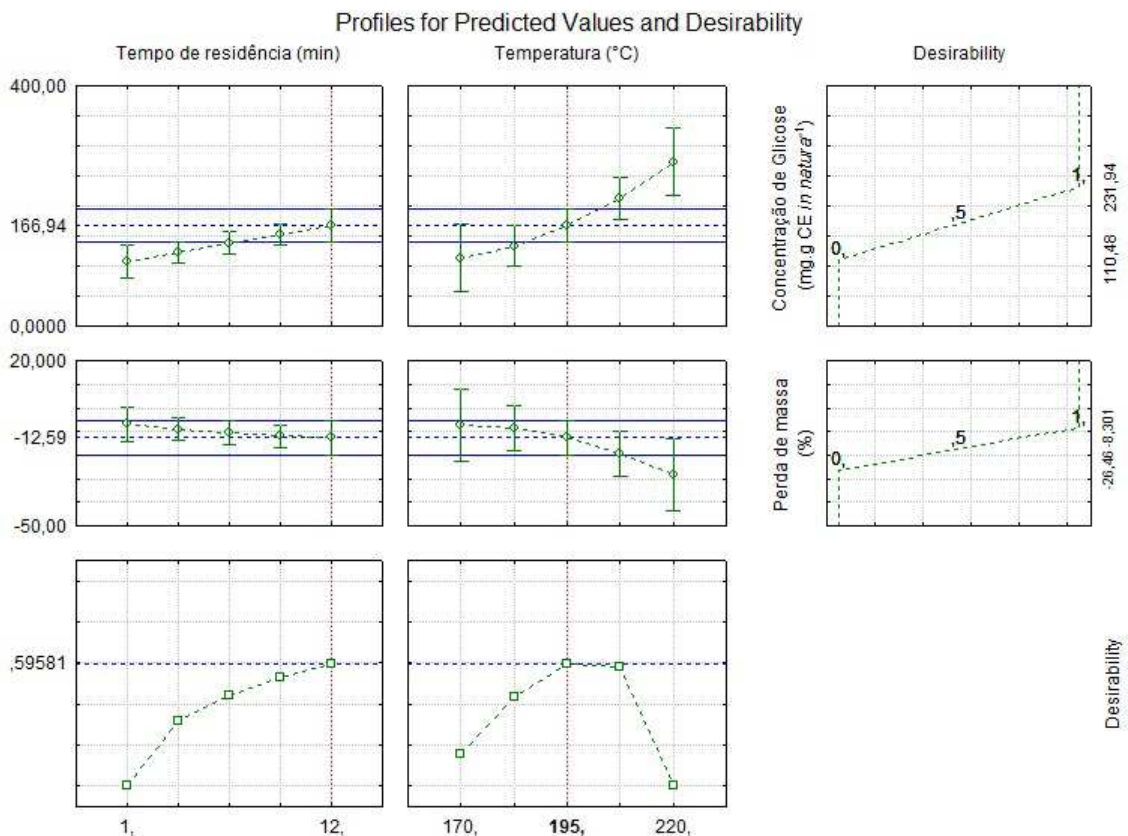
A superfície de resposta e a curva de contorno complementam os dados discutidos até então onde fica evidenciado que tanto o aumento da temperatura quanto o aumento do tempo, aumentam a liberação de glicose para o meio. Os melhores resultados de liberação de glicose são obtidos em temperaturas maiores que 195 °C em tempos de pré-tratamento maiores que 6,5 min. Considerando que a hidrólise do capim-elefante *in natura* liberou 101,83 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, os pontos da curva de contorno que estão abaixo do ponto 178 °C e 3 min de processo correspondem a pontos que não apresentam vantagem em se fazer o pré-tratamento, sendo mais viável a hidrólise do capim-elefante *in natura*.

Pela análise de CLAE das amostras de 48 h de hidrólise foi possível identificar uma considerável liberação de xilose em todos os ensaios, atingindo a concentração de 2,78 mg.mL<sup>-1</sup> no ensaio 8V. 5-HMF e furfural foram identificados em dois dos onze ensaios, 6V e 8V. A concentração máxima de 5-HMF observada foi de 0,022 mg.mL<sup>-1</sup> e a de furfural foi de 0,019 mg.mL<sup>-1</sup>, ambas as concentrações identificadas no ensaio 6V. As máximas concentrações de 5-HMF e furfural detectadas são inferiores as concentrações encontradas por Xu *et al.* (2010), após pré-tratamento hidrotérmico em palha de milho, os quais concluíram que as concentrações encontradas de 5-HMF e furfural não apresentaram efeito inibidor. As concentrações encontradas são inferiores também as encontradas por Laser *et al.* (2002), após pré-tratamento hidrotérmico em bagaço de cana-de-açúcar. Considerando que as concentrações de 5-HMF e furfural encontradas nos hidrolisados enzimáticos são menores que as detectadas nos efluentes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado

gasoso, conclui-se que a maior parte do 5-HMF e furfural formados durante o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso ficaram solubilizados no fluido de pré-tratamento que foi descartado.

A análise dos valores das variáveis independentes que maximizam a produção de glicose e minimizam a perda de massa foi feita através da função de desejabilidade. Tal técnica consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas ou, então, as mantenha em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-lineares (Montipó, 2012)

Considerando os dados de concentração de glicose liberada no meio de hidrólise enzimática detectada por CLAE como efeito positivo e os dados de perda de massa apresentados na seção 4.3.1 como efeito negativo do processo, avaliou-se a função de desejabilidade e o valor otimizado das duas variáveis independentes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso (Figura 36).



**Figura 36.** Perfis para avaliação da desejabilidade e do ponto otimizado para o pré-tratamento hidrotérmico utilizando vapor d'água, considerando a perda de massa como fator negativo e a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática como fator positivo.

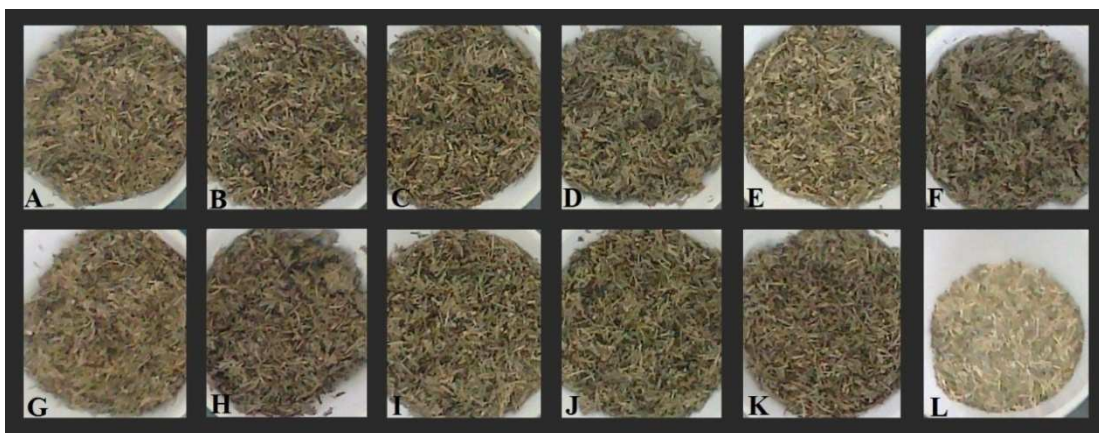


Apesar da perda mássica de hemicelulose ser uma ação esperada do pré-tratamento hidrotérmico, o ideal de pré-tratamento seria que as macrofibrilas lignocelulósicas apenas fossem desestruturadas de forma a deixar a celulose exposta ao ataque das enzimas durante a hidrólise. A maior a desestruturação das macrofibrilas lignocelulósicas, associada a uma baixa perda de massa, tanto de hemicelulose quanto de lignina, e principalmente da celulose, permite que estes compostos sejam utilizados como matéria-prima em outros processos, aumentando assim a viabilidade econômica do processo. Por esse motivo a perda de massa foi utilizada no cálculo da desejabilidade como efeito não desejado.

Verifica-se que os dois primeiros perfis são relativos à resposta da glicose com cada uma das variáveis independentes, mantendo-se fixa a outra variável no ponto central. O terceiro perfil mostra a desejabilidade da concentração de glicose, sendo que o valor 0 diz respeito à mínima concentração de glicose ( $110,48 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e o valor 1 corresponde à máxima concentração de glicose para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso ( $231,94 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Os perfis intermediários são relativos à resposta para a perda de massa, sendo que essa foi utilizada com sinal negativo para indicar que seu efeito não é desejado, ou seja, quanto maior a perda de massa pior o resultado. Dos perfis intermediários, os dois primeiros são relativos à resposta da perda de massa com cada uma das variáveis independentes, mantendo-se fixa a outra variável no ponto central. O terceiro perfil mostra a desejabilidade da perda de massa, sendo que o valor 0 diz respeito à máxima perda de massa (26,46 %) e o valor 1 corresponde à mínima perda de massa para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso (8,30 %). Quanto maior o valor da desejabilidade, mais conveniente é a resposta do sistema, isto é, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo da desejabilidade é a condição otimizada do sistema. Os dois últimos perfis mostram a desejabilidade individual para cada fator e a desejabilidade global que é aproximadamente igual a 0,60. As linhas verticais destacadas no gráfico correspondem ao valor ótimo dos parâmetros estudado. Assim sendo, a otimização dos dados apresentou como melhores parâmetros a serem utilizados o tempo de residência de 12 min e uma temperatura de  $195 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , que é equivalente ao ensaio 8V.

#### 4.4 Pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido

Os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido foram realizados conforme descrito na Seção 3.2, obedecendo o planejamento experimental DCCR. Assim como nos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso, a primeira observação feita, imediatamente após a secagem de parte do capim-elefante pré-tratado para posteriores análises, foi a do escurecimento de todas as amostras quando comparadas com o capim-elefante *in natura* seco (Figura 38). Conforme já relatado anteriormente esse escurecimento se deve a catálise ácida das ligações lignina-carboidrato e ocorre com maior intensidade nos pré-tratamentos realizados em temperaturas mais altas. Com a liberação dos carboidratos ocorrem, provavelmente, as reações de caramelização e Maillard, que produzem, entre outros compostos, as melanoidinas, que são compostos de coloração marrom e alta massa molecular (Shibao & Bastos, 2011). Porém o escurecimento das amostras pré-tratadas com água no estado líquido mantiveram uma tonalidade de cor verde nas amostras, enquanto que as amostras tratadas com vapor d'água assumiram uma cor tendendo ao marrom.



**Figura 37.** Aparência das biomassas após pré-tratamento hidrotérmico com água no estado gasoso, sendo A (1L), B (2L), C (3L), D (4L), E (5L), F (6L), G (7L), H (8L), I (9L), J (10L), K (11L) e L do capim-elefante *in natura*.

O método de Van Soest (1968) foi utilizado para avaliar a composição química de cada amostra de capim-elefante pré-tratado. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Composição química da biomassa pré-tratada hidrotermicamente com água em estado líquido.

Ensaio	Severidade (log r <sub>0</sub> )	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinza (%)	Conteúdo Celular (%)	Total (%)
1L	2,77	41,91 ±3,04	32,59±2,70	11,38 ±0,94	5,32 ±0,65	8,80 ±2,34	100,00
2L	3,30	45,25 ±2,08	30,97 ±4,33	12,32 ±1,91	4,52 ±0,68	6,94 ±2,50	100,00
3L	3,77	44,95 ±0,93	23,72±02,17	11,83 ±2,29	5,20 ±0,83	14,30 ±2,63	100,00
4L	4,30	53,27 ±0,51	10,56	14,46 ±1,68	5,32 ±0,25	16,39	100,00
5L	2,87	44,24 ±1,75	35,62	11,03 ±3,41	4,78 ±0,31	4,33	100,00
6L	4,35	52,64 ±1,88	10,64	14,85 ±1,39	5,78 ±0,31	16,09	100,00
7L	2,80	41,21 ±3,03	30,99±1,42	12,38 ±1,12	5,37 ±0,19	10,05 ±1,78	100,00
8L	3,88	48,42 ±1,43	9,50±1,58	14,38 ±1,06	5,58 ±0,53	22,12 ±1,56	100,00
9L	3,61	45,55 ±2,26	23,84	13,2 ±1,84	4,85 ±0,55	12,56	100,00
10L	3,61	46,11 ±3,27	22,67 ±2,63	13,01 ±0,38	4,92 ±0,23	13,29 ±1,83	100,00
11L	3,61	46,00 ±1,38	22,43	13,55 ±1,64	4,65 ±0,58	13,37	100,00

Comparando a Tabela 18 com a Tabela 6 (composição química do capim-elefante *in natura* pelo método de Van Soest) é possível verificar que o principal incremento na composição se deu na porcentagem de celulose. Já comparando a Tabela 18 com a Tabela 10 (composição dos capim-elefante pré-tratados hidrotermicamente com água no estado gasoso), nota-se que poucas amostras apresentaram um aumento na porcentagem de conteúdo celular, sendo que em algumas houve a diminuição da porcentagem do mesmo. Esse fato provavelmente se deve a dissolução de alguns componentes solúveis do conteúdo celular no meio líquido, durante o pré-tratamento hidrotérmico nas temperaturas testadas, sendo que este meio líquido foi separado da biomassa pré-tratada no final do pré-tratamento hidrotérmico. Outra comparação a ser feita com a Tabela 10 é que o percentual de hemicelulose na biomassa pré-tratada hidrotermicamente no meio líquido se manteve mais alta que quando o capim-elefante é tratado com água no estado gasoso. O ensaio 5L teve a sua porcentagem mássica de hemicelulose praticamente mantida quando comparado com o capim-elefante *in natura*, enquanto que o percentual de conteúdo celular reduziu de 8,97 % do capim *in natura* para 4,33 % no capim pré-tratado nessa condição.

#### 4.4.1 Perda de massa do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido

A perda de massa percentual das amostras submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido, foi determinado em base seca, através da determinação de matéria seca total, conforme metodologias descritas nas seções 3.5.2 e 3.5.3. Novamente as amostras foram mantidas com a umidade natural proporcionada pelo pré-tratamento para serem utilizadas nas etapas seguintes, como a hidrólise, porém parte do material passou pelo processo de secagem para se analisar a umidade da amostra para que seja utilizada uma quantidade mássica igual de amostra em base seca para cada processo. O percentual de perda de massa foi calculado pela equação 8 e é apresentado na Tabela 19, juntamente com seu desvio padrão.

**Tabela 19.** Perda de massa das biomassas pré-tratadas utilizando água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Ensaio	Severidade (log r <sub>0</sub> )	Perda de Massa (%)
1L	2,77	14,67 ±5,36
2L	3,30	21,49 ±0,46
3L	3,77	23,42 ±4,02
4L	4,30	37,80 ±0,47
5L	2,87	14,68 ±1,06
6L	4,35	40,38 ±1,22
7L	2,80	13,34 ±1,48
8L	3,88	34,20 ±1,71
9L	3,61	23,47 ±0,82
10L	3,61	25,03 ±1,55
11L	3,61	24,19 ±1,17

Observa-se que as maiores perdas de massas estão relacionadas aos pré-tratamentos de maior severidade, assim como foi constatado para os ensaios utilizando vapor d'água. O ensaio 6L apresentou a maior perda de massa sendo esta superior a 40 %. Observa-se ainda que as perdas de massa para os pré-tratamentos realizados com água no estado líquido foram superiores as perdas de massa apresentadas pelos pré-tratamentos conduzidos utilizando água

no estado gasoso, o que se deve, provavelmente, a maior solubilização e posterior escoamento de compostos solúveis junto ao efluente resultante do pré-tratamento na utilização da água em estado líquido.

Os dados percentuais de perda de massa do pré-tratamento utilizando água no estado líquido foram avaliados pelo *software* Statistica 8.0, conforme planejamento experimental proposto, considerando os tempos e temperaturas de cada pré-tratamento e gerando dados estatísticos com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ( $p < 0,05$ ).

O resultado da análise de variância (ANOVA) para a perda de massa está apresentado na Tabela 20. Entre os fatores estudados tanto a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) quanto o tempo de residência lineares apresentaram efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) para perda de massa dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.**

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	325,970	1	325,970	0,0003
Tempo de residência (min) (Q)	1,025	1	1,025	0,6443
(2) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (L)	474,338	1	474,338	0,0001
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Q)	10,274	1	10,274	0,1808
1L por 2L	14,273	1	14,273	0,1265
Erro	21,265	5	4,253	
Total	851,280	10		

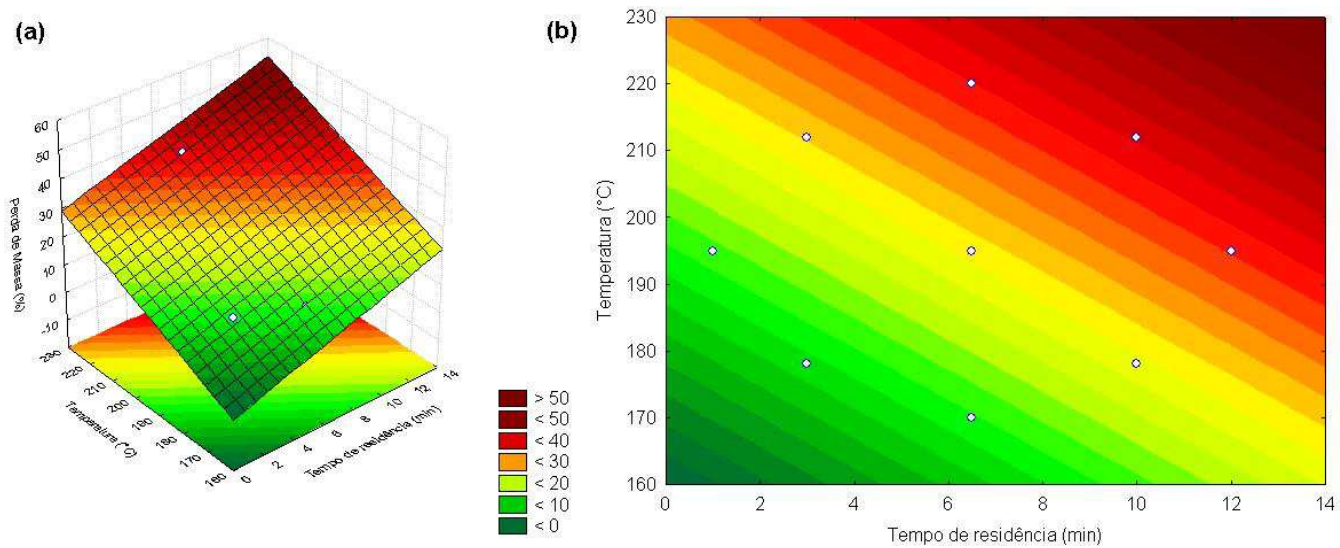
Considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativo, a temperatura linear ( $^{\circ}\text{C}$ ) (T) e o tempo de residência linear (min) (t), a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a perda de massa é apresentado na Equação 23 e tem como ajustes  $r^2$  igual a 94,0 % e r ajustado igual a 92,5 %, que são considerados bons valores de ajustes.

$$PM(\%) = -73,01 + 1,73t + 0,44T \quad \text{Equação 23}$$

Tanto a temperatura linear ( $^{\circ}\text{C}$ ) (T) quanto o tempo de residência (min) (t) apresentam efeito positivo na perda de massa, ou seja, quanto maior a temperatura e o tempo dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido maior a perda de massa de capim-elefante.

Comparando a análise estatística para perda de massa dos pré-tratamentos com água no estado líquido com a análise estatística para os pré-tratamentos com água no estado gasoso, observa-se que o modelo matemático para perda de massa dos pré-tratamentos no estado líquido é aproximadamente 50 % melhor explicado e ajustado aos dados que o modelo proposto para os pré-tratamentos com água no estado gasoso.

Na Figura 38 são apresentadas a superfície de resposta e a curva de contorno considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Tanto a superfície de resposta quanto a curva de contorno colaboram com o resultado apresentado pelo modelo matemático, indicando que com o aumento do tempo e da temperatura de pré-tratamento há um aumento também na perda de massa de capim-elefante, sendo essa perda mais intensa em tempos de residência superiores a 6,5 min e em temperaturas superiores a 195 °C, sendo então, os melhores resultados para perda de massa, os pontos compreendidos abaixo desse tempo e temperatura.



**Figura 38. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de massa nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.**

#### 4.4.2 Perda dos principais constituintes do capim-elefante durante o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido

Considerando que durante o pré-tratamento parte dos constituintes da biomassa lignocelulósica são removidos do material insolúvel, foi realizado um balanço de massa para os três principais constituintes (hemicelulose, lignina e celulose) para determinar a perda mássica de cada componente. Para os cálculos de perda de cada constituinte, a quantidade mássica introduzida no reator em base seca foi comparada a quantidade mássica retirada do reator de cada componente, em base seca, levando-se em conta as percentagens de cada componente obtidas pelo método de Van Soest, para o capim-elefante *in natura* e para as amostras pré-tratadas. A Tabela 21 apresenta os resultados para as perdas dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

**Tabela 21.** Perda de hemicelulose, lignina e celulose nos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Ensaio	Severidade (log r <sub>0</sub> )	Perda Hemicelulose (%)	Perda Lignina (%)	Perda Celulose (%)
1L	2,77	26,94	28,36	-3,55
2L	3,30	36,12	28,63	-2,86
3L	3,77	52,28	33,12	0,35
4L	4,30	82,74	33,63	4,06
5L	2,87	20,15	30,59	-9,29
6L	4,35	83,33	34,67	9,13
7L	2,80	29,46	20,85	-3,39
8L	3,88	83,58	30,17	7,76
9L	3,61	52,06	25,46	-0,92
10L	3,61	55,34	28,03	-0,08
11L	3,61	55,32	24,19	-0,96

Observando a Tabela 21 nota-se que na maioria dos casos a maior perda foi de hemicelulose conforme o esperado por esse ser o principal efeito do pré-tratamento hidrotérmico, sendo que a máxima perda de hemicelulose alcançada foi de mais de 83,58 % pelo ensaio 8L, sendo seguido com perdas de hemicelulose aproximadamente iguais pelos ensaios 6L e 4L. A menor perda de hemicelulose em meio líquido ocorreu no ensaio 5L,

sendo esta de 20,15 %, correspondendo ao ensaio de menor temperatura utilizada nos pré-tratamentos. De modo geral, a perda de hemicelulose foi menor nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido do que ao se utilizar água no estado gasoso. A maior perda de lignina foi observada no ensaio 6L que atingiu 34,67 % de perda desse componente. Diferentes de todos os demais ensaios, os ensaios 1L e 5L apresentaram perda de lignina superior a perda de hemicelulose. A perda de celulose resultante apresentou resultado positivo apenas nos quatro ensaios de maior severidade (6L, 4L, 8L e 3L), sendo considerado significativa (superior a 4 % de perda) apenas nos ensaios 6L, 8L e 4L. Os demais ensaios apresentaram valores negativos de perda de celulose, sendo considerado nesses casos que a perda desse componente não foi significativa.

Para melhor avaliação da influência do tempo de residência e da temperatura sobre as perdas de hemicelulose e lignina, foi realizado um estudo estatístico de ambas as perdas com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a perda de lignina estão apresentados na Tabela 22. Entre os fatores estudados apenas a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) quadrática apresentou efeito significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 22. Análise de variância (ANOVA) para perda de lignina dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.**

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	26,691	1	26,691	0,115
Tempo de residência (min) (Q)	0,163	1	0,163	0,887
(2) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (L)	29,857	1	29,857	0,100
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Q)	76,758	1	76,758	0,023
1L por 2L	0,015	1	0,015	0,966
Erro	36,637	5	7,327	
Total	177,945	10		

Considerando apenas o parâmetro estatisticamente significativo, a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (T) quadrática, a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a perda de lignina é apresentado na Equação 24 e tem como ajustes  $r^2$  igual a 19,1 % e  $r$  ajustado igual a 10,1 %, que são considerados valores de ajustes inadequados.

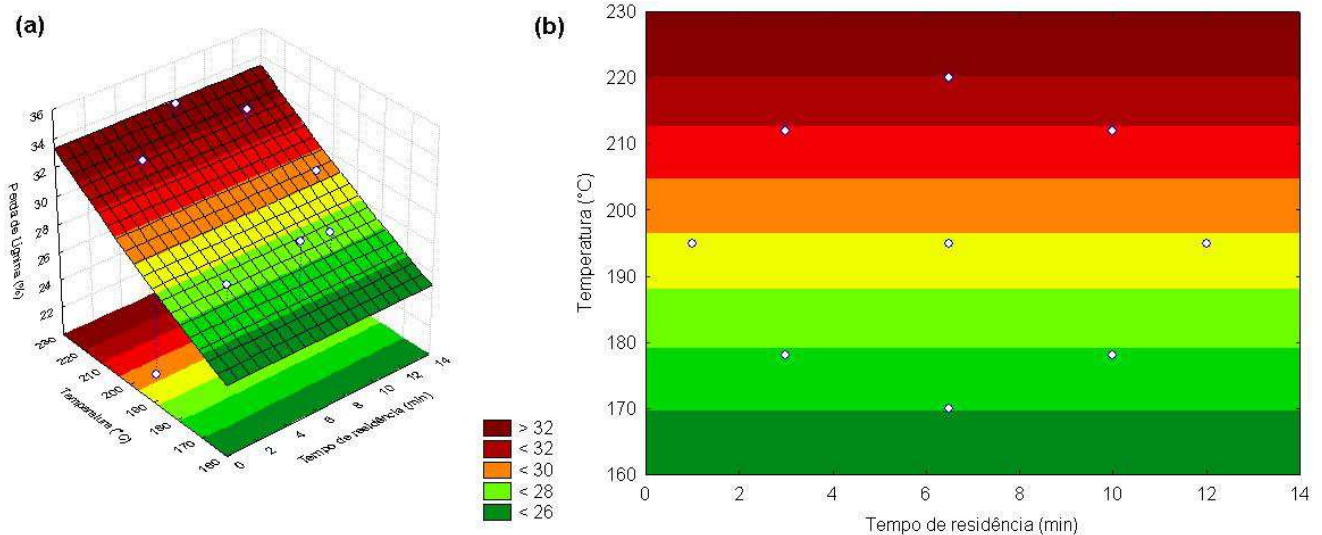


$$PL(\%) = 17,24 + 0,0003T^2$$

Equação 24

Conforme indicado pelo baixo valor de  $r^2$  do modelo matemático o resultado não expressa perfeitamente os valores obtidos na prática, uma vez que a menor perda de lignina se deu no ensaio 7L que é realizado a uma temperatura considerável (195 °C), porém em baixo tempo de residência, comprovando que o tempo também interfere nos resultados de perda de lignina.

Na Figura 39 é apresentada a superfície de resposta e a curva de contorno para o modelo matemático proposto para a perda de lignina considerando apenas o parâmetro estatisticamente significativo.



**Figura 39. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de lignina nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.**

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a perda de hemicelulose estão apresentados na Tabela 23. Entre os fatores estudados tanto a temperatura (°C) linear quanto o tempo linear (min) apresentaram efeito significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 23. Análise de variância (ANOVA) para perda de hemicelulose dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.**

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	1739,223	1	1739,223	0,0011
Tempo de residência (min) (Q)	0,596	1	0,596	0,9066
(2) Temperatura (°C) (L)	3264,834	1	3264,834	0,0003
Temperatura (°C) (Q)	25,529	1	25,529	0,4562
1L por 2L	113,302	1	113,302	0,1497
Erro	195,869	5	39,174	
Total	5346,056	10		

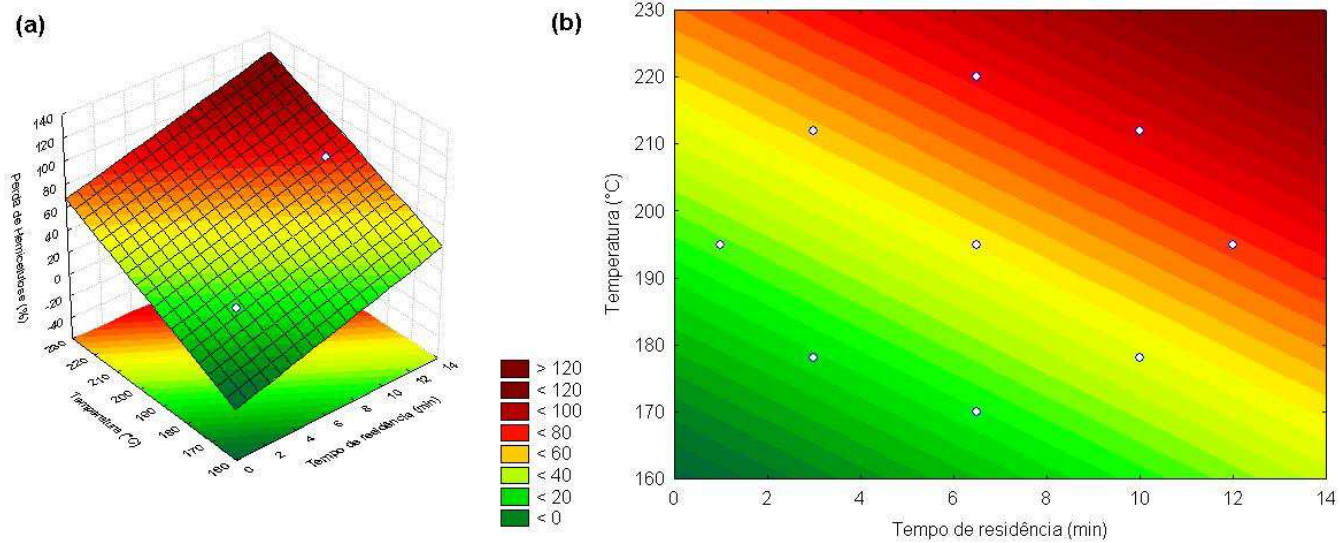
Considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativo, a temperatura linear (°C) (T) e o tempo de residência linear (min) (t), a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a perda de hemicelulose é apresentado na Equação 25 e tem como ajustes  $r^2$  igual a 93,6 % e  $r$  ajustado igual a 92,0 %, que são considerados valores de ajustes adequados.

$$PH(\%) = -200,57 + 3,98t + 1,16T \quad \text{Equação 25}$$

Ambas as variáveis significativas tiveram efeito positivo, ou seja, quanto maior a temperatura e o tempo dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido maior a perda de hemicelulose de capim-elefante.

A superfície de resposta e a curva de contorno para o modelo matemático proposto para a perda de hemicelulose considerando apenas os fatores estatisticamente significativos são apresentadas na Figura 40.

Considerando que a perda de hemicelulose é um efeito esperado como resposta da ação do pré-tratamento hidrotérmico, pode-se observar que tanto temperatura de operação quanto tempo de processo, são importantes para o bom desempenho do pré-tratamento. Observa-se ainda, pelas curvas de contorno, da mesma forma que foi comentado para os pré-tratamentos utilizando vapor d'água, que os melhores resultados são obtidos em temperatura superiores a 195 °C em tempos de residência superiores a 6,5 min.



**Figura 40. Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para perda de hemicelulose nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido**

#### 4.4.3 Composição dos efluentes resultantes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido

Analisou-se a composição dos efluentes coletados, após o término de cada pré-tratamento, durante a depressurização do reator, por CLAE. A composição desses efluentes resultantes dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido é apresentado na Tabela 24.

Devido as perdas de hemicelulose durante os pré-tratamentos, xilose e arabinose se apresentam em maior concentração que os demais componentes no efluente resultante do pré-tratamento. O ensaio 6L apresentou a maior concentração de xilose e o ensaio 8L a maior concentração de arabinose. Quando comparados os dados da Tabela 24 com os da Tabela 16 para os pré-tratamentos realizados com água no estado gasoso, observa-se que tanto xilose quanto glicose aparecem em menor concentração nos efluentes dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido, porém é preciso considerar que a quantidade de efluente gerado no pré-tratamento líquido é de 4 a 10 vezes, conforme as condições de ensaio, maior em volume que o efluente gerado no pré-tratamento utilizando água no estado gasoso, o que significa que os componentes observados nesse efluente estão apenas mais diluídos que os do efluente dos pré-tratamentos utilizando vapor d'água.

**Tabela 24.** Composição dos efluentes dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Ensaio	Severidade (log r <sub>o</sub> )	Volume (mL)	Celobiose (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Xilose (mg/mL)	Arabinose (mg/mL)	Ácido Acético (mg/mL)	5-HMF (mg/mL)	Furfural (mg/mL)
1L	2,77	1430	0,0357	0,0782	0,0920	0,0573	< 0,0008	-	-
2L	3,30	1950	0,0360	0,0956	0,0941	0,0821	< 0,0008	-	-
3L	3,77	1850	0,0349	0,0877	0,1011	0,1583	< 0,0008	-	0,0099
4L	4,30	2085	-	0,0774	0,1382	0,1844	< 0,0008	-	-
5L	2,87	1890	0,0361	0,0962	0,0944	0,0525	< 0,0008	-	-
6L	4,35	1985	0,0339	0,0801	0,1744	0,1897	< 0,0008	-	-
7L	2,80	1495	0,0352	0,0843	0,0817	0,0555	< 0,0008	-	-
8L	3,88	1695	0,0557	0,0846	0,1672	0,2548	0,0828	-	0,0288
9L	3,61	1945	0,0346	0,0968	0,1356	0,1521	< 0,0008	-	-
10L	3,61	2080	0,0341	0,0741	0,0829	0,1361	< 0,0008	-	0,0093
11L	3,61	1970	0,0354	0,0792	0,0686	0,0621	< 0,0008	-	-

De modo geral, considerando os volumes dos efluentes, as perdas de glicose, xilose e arabinose são maiores nos pré-tratamentos utilizando a água no estado líquido. Outra comparação a ser feita com a Tabela 16, é a concentração dos inibidores, 5-HMF e furfural, na Tabela 24, para os pré-tratamentos utilizando água no estado líquido é identificada apenas a presença de furfural, em 3 dos 11 ensaios, e em menores concentrações em relação as apresentadas pela Tabela 16, porém novamente ressalta-se a maior diluição desse efluente, o que leva a maior quantidade total de furfural formado nos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido. O ensaio 8L apresentou a maior concentração de furfural no seu efluente de pré-tratamento, indicando que a concentração de pentoses eliminadas foi maior do que aparecem nas concentrações da Tabela 24. A concentração de ácido acético foi detectada apenas no ensaio 8L, sendo que para os demais ensaios não foi detectado.

#### **4.4.4 Hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada hidrotermicamente utilizando água no estado líquido**

A hidrólise enzimática foi realizada conforme descrito na seção 3.3 para avaliação do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido no capim-elefante *in natura* e análise de sua melhora na eficiência de liberação de glicose para o meio, para posterior fermentação.

Inicialmente foram avaliados os açúcares redutores (AR), determinados pelo método de DNS conforme descrito na seção 3.5.5, e a glicose, determinada enzimaticamente por kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup> conforme também descrito na seção 3.5.5, liberados após a hidrólise enzimática, para avaliação da cinética do processo e a sua reprodutibilidade nos pontos centrais.

A cinética de liberação dos açúcares redutores para a biomassa pré-tratada com água no estado líquido é apresentada na Figura 41.

O ensaio 8L levou à maior liberação de açúcares redutores no meio durante praticamente todo o processo de hidrólise enzimática, tendo seu pico máximo de liberação de AR no tempo de 48 h, liberando aproximadamente 596 mg de AR.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, sendo esse valor 20 mg superior ao máximo valor de AR liberado nas hidrólises enzimáticas da biomassa pré-tratada com água no estado gasoso. Assim como aconteceu na hidrólise das biomassas pré-tratadas com vapor d'água, o pré-tratamento com água líquida também fez com que as biomassas pré-tratadas liberassem maior quantidade de AR do que a biomassa não tratada em todos os momentos do processo.

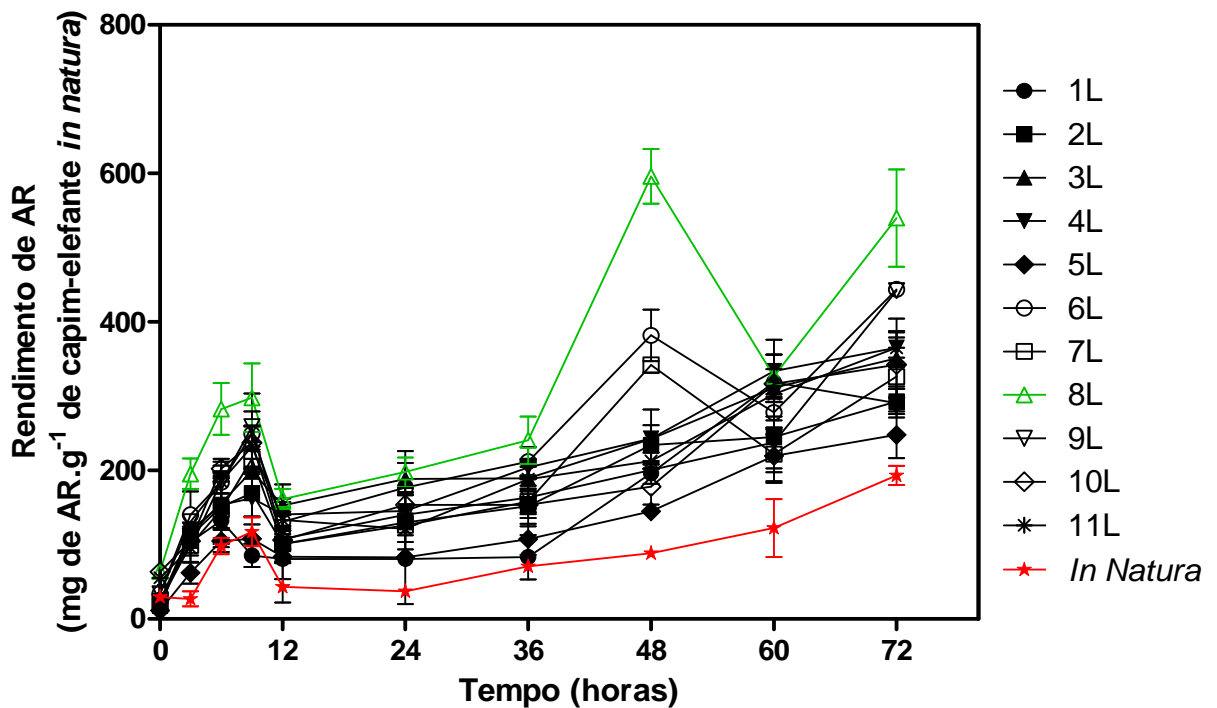


Figura 41. Rendimento de AR (mg de AR. g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*) durante a hidrólise enzimática para o capim-elefante *in natura* e o capim-elefante pré-tratado hidrotêrmicamente com água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

A Figura 42 apresenta o comportamento dos pontos centrais do planejamento experimental para o rendimento de AR.

O gráfico apresentado na Figura 42 mostra que existe reprodutibilidade nos dados de AR liberados por hidrólise enzimática em capim-elefante pré-tratados hidrotêrmicamente com água no estado líquido, tal como identificado para os pré-tratamentos hidrotêrmicos, utilizando água no estado gasoso. Para os pontos centrais a maior concentração de AR liberados no período em que a hidrólise enzimática foi acompanhada ocorreu no tempo de 72 h.

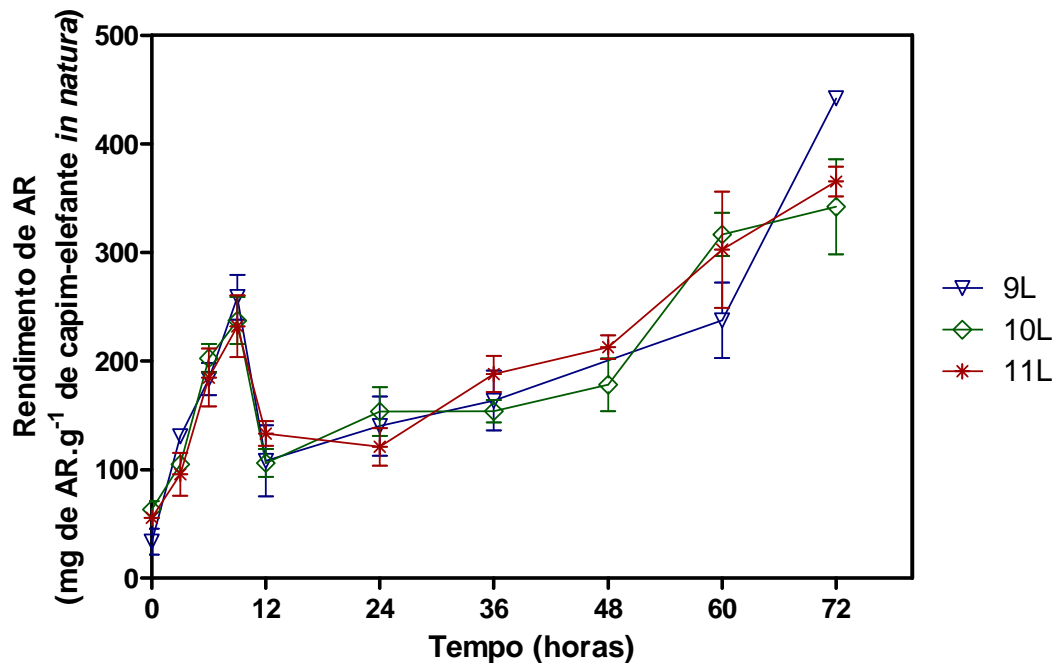


Figura 42. Rendimento de AR (mg de AR. g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*) durante a hidrólise enzimática de capim-elefante pré-tratado hidrotérmicamente com água no estado líquido, nos pontos centrais do planejamento experimental. 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

A cinética da hidrólise enzimática para a liberação de glicose determinada utilizando o kit de glicose PAP Liquiform, Labtest<sup>®</sup> é apresentada na Figura 43.

Quanto a cinética de liberação de glicose pela hidrólise enzimática nas biomassas pré-tratadas com água no estado líquido e na biomassa *in natura*, observa-se que os ensaios 4L e 8L mantiveram altos rendimentos de glicose no meio desde 12 h de processo, sendo que as maiores liberações de glicose nesses dois ensaios considerando o tempo de processo foram de aproximadamente 244 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, para o ensaio 4L a 48 h, e de aproximadamente 315 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, para o ensaio 8L a 60 h de processo. Apesar de não manter uma alta liberação de glicose durante todo o processo, o ensaio 6L foi o que proporcionou a obtenção do pico máximo de liberação de glicose, sendo esse superior a 338 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*, em 60 h de processo. Apesar de diversos experimentos mostrarem seus picos máximos em 60 h de processo de hidrólise, muitos experimentos apresentaram seus picos de liberação de glicose em 48 h, com uma queda brusca no rendimento de glicose no tempo de 60 h. Esse comportamento se destaca no ensaio 4L, no qual, no tempo de 60 h de hidrólise enzimática, o

rendimento de glicose é inferior ao rendimento de glicose no ensaio de hidrólise realizado com o capim-elefante *in natura*. Com base nisso as amostras do tempo de 48 h foram as escolhidas para as análises por CLAE. Cabe ainda destacar que os ensaios 1L, 5L e 7L em alguns pontos da curva apresentaram rendimento de glicose liberada inferiores ao rendimento de glicose liberada pela hidrólise enzimática do capim-elefante *in natura*.

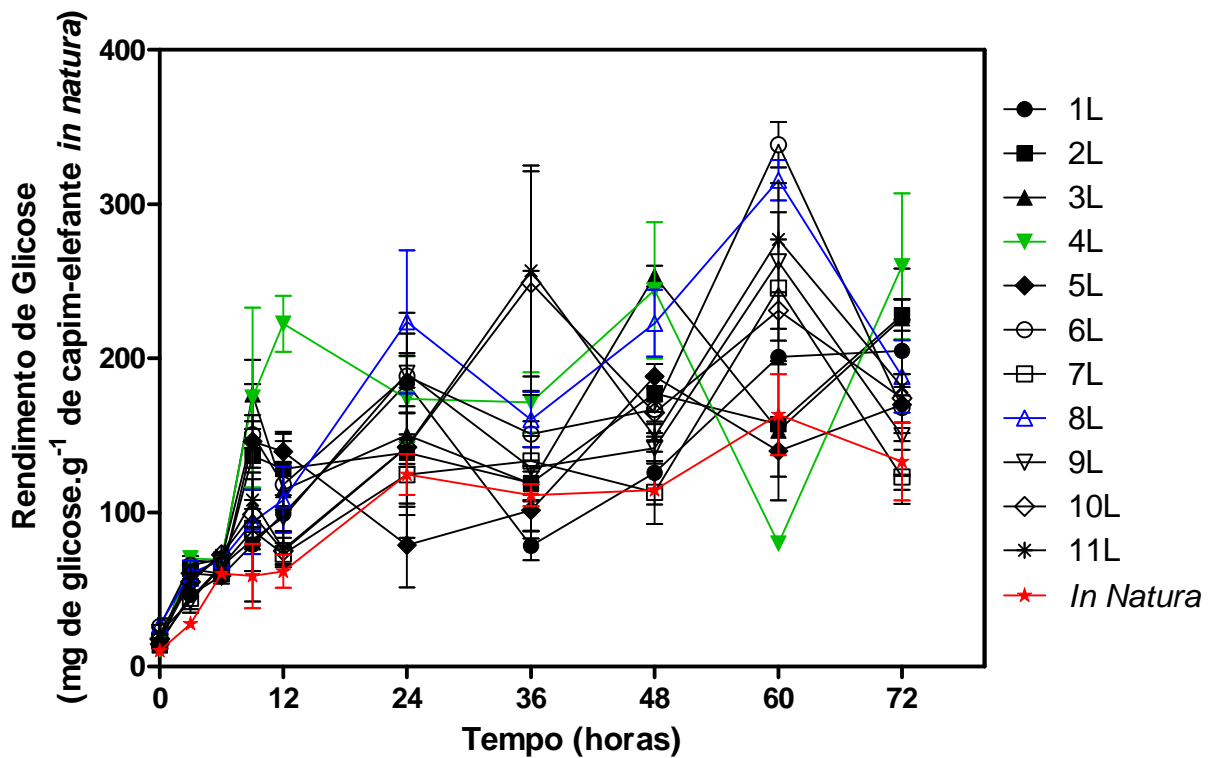


Figura 43. Rendimento de glicose ( $\text{mg de glicose} \cdot \text{g}^{-1}$  de capim-elefante *in natura*) durante a hidrólise enzimática de capim-elefante pré-tratado hidrotêrmicamente com água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

A concentração de glicose liberada em 48 h de hidrólise enzimática é apresentada na Figura 44.



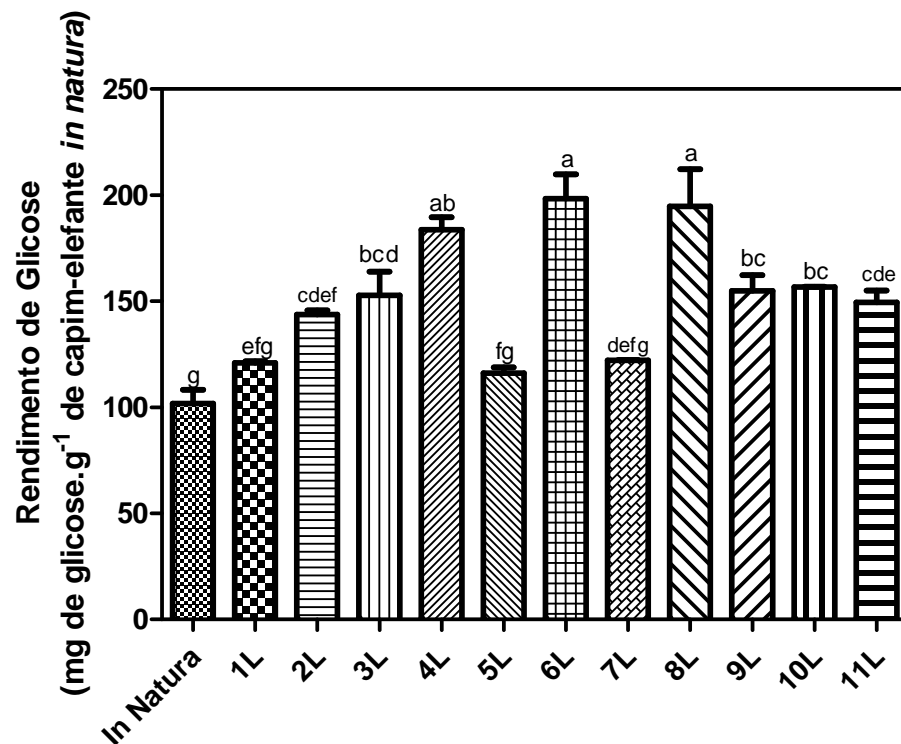


Figura 44. Rendimento de glicose (mg de glicose. g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*) após 48 h de hidrólise enzimática para o capim-elefante *in natura* e as biomassas pré-tratadas com água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Nas amostras de 48 h de hidrólise enzimática observa-se que os ensaios 6L e 8L apresentaram os maiores rendimentos de glicose liberadas no meio, respectivamente quantidades superiores a 198 e 194 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*. Estes dois ensaios não se diferenciaram estatisticamente, para um  $p < 0,05$ , do ensaio 4L, sendo esses três ensaios os de maior fator de severidade. O menor rendimento de glicose liberada coube a hidrólise enzimática realizada com capim-elefante *in natura*, sendo essa de 101,83 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de capim-elefante *in natura*. O ensaio com capim-elefante *in natura* não se diferenciou estatisticamente dos ensaios 1L, 5L e 7L, sendo estes os três ensaios de menor fator de severidade. Considerando essa variação de resultados conforme a severidade de seus fatores a avaliação do rendimento (glicose liberada.glicose esperada<sup>-1</sup>) foi feita comparando diretamente as severidades de cada pré-tratamento (Figura 45).

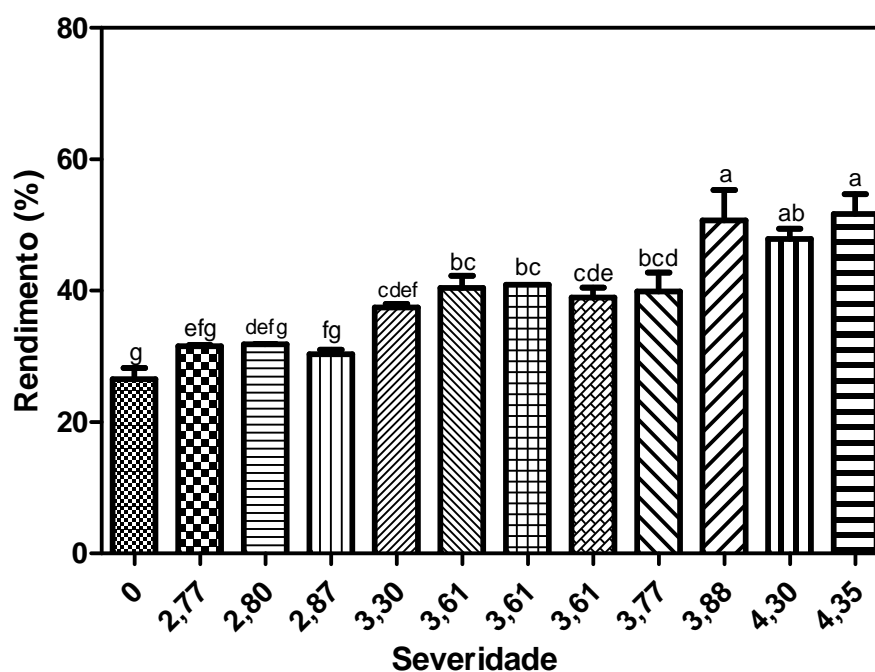


Figura 45. Rendimento da hidrólise enzimática (glicose liberada.glicose esperada<sup>-1</sup>) em relação à severidade do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água em estado líquido. 2,77 – 1L (3 min, 178 °C); 3,30 – 2L (10 min, 178 °C); 3,77 – 3L (3 min, 212 °C); 4,30 – 4L (10 min, 212 °C); 2,87 – 5L (6,5 min, 170 °C); 4,35 – 6L (6,5 min, 220 °C); 2,80 – 7L (1 min, 195 °C); 3,88 – 8L (12 min, 195 °C); 3,61 (1°) – 9L (6,5 min, 195 °C); 3,61 (2°) – 10L (6,5 min, 195 °C); 3,61 (3°) – 11L (6,5 min, 195 °C).

Observando a Figura 45, nota-se que o rendimento se dá da mesma forma que observado para os rendimentos de glicose na Figura 44, sendo os ensaios 6L e 8L os que alcançam maiores rendimentos, sendo esses respectivamente de 51,69 e 50,73 %. Porém no gráfico da Figura 45, observa-se que o rendimento da hidrólise enzimática em termos de glicose liberada aumenta conforme a ordem crescente de severidade do processo, tendo o menor rendimento sido observado na hidrólise do capim-elefante *in natura* (26,53 %) e aumentado até a hidrólise do capim-elefante pré-tratado pelas condições do ensaio 6L, que apresenta máxima severidade, assim como ocorreu com os rendimentos dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso.

A Equação 26 descreve a correlação entre a severidade (representada pela letra x) e o rendimento da hidrólise enzimática (Figura 45) para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido (representado pela letra y). O ajuste dessa correlação se dá na forma de polinômio de segundo grau e tem  $r^2$  igual a 0,88.

$$y = 0,959 x^2 - 5,905x + 7,024$$

Equação 26

Com base nos resultados discutidos até aqui, a concentração de glicose ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  capim-elefante *in natura*) foi analisada estatisticamente com intervalo de confiança pré-estabelecido de 95 % ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose estão apresentados na Tabela 25. Entre os fatores estudados tanto a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) linear quanto o tempo de residência (min) linear apresentaram efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 25. Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose da hidrólise enzimática dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.**

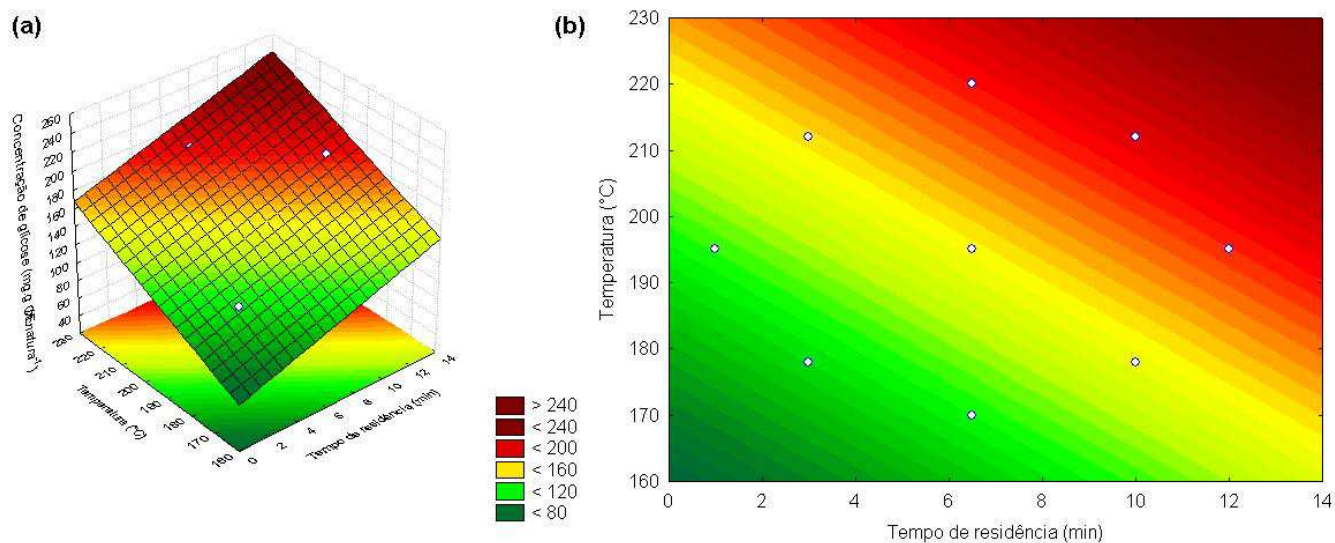
Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	p
(1) Tempo de residência (min) (L)	3141,807	1	3141,807	0,003
Tempo de residência (min) (Q)	6,215	1	6,215	0,821
(2) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (L)	4457,089	1	4457,089	0,001
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Q)	0,487	1	0,487	0,949
1L por 2L	16,476	1	16,476	0,714
Erro	548,601	5	109,720	
Total	8170,222	10		

Considerando apenas os parâmetros estatisticamente significativo, a temperatura linear ( $^{\circ}\text{C}$ ) (T) e o tempo de residência linear (min) (t), a análise de variância (ANOVA) foi refeita para o equacionamento do modelo matemático e a construção da superfície de resposta e curvas de contorno. O modelo matemático proposto para a concentração de glicose é apresentado na Equação 27 e tem como ajustes  $r^2$  igual a 93,0 % e  $r$  ajustado igual a 91,3 %, que são considerados valores de ajustes adequados.

$$Gli(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = -146,19 + 5,36t + 1,36T \quad \text{Equação 27}$$

Ambas as variáveis significativas tiveram efeito positivo, ou seja, quanto maior a temperatura e o tempo dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido maior a concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática.

A superfície de resposta e a curva de contorno para o modelo matemático proposto para a concentração de glicose considerando apenas os fatores estatisticamente significativos são apresentadas na Figura 46.



**Figura 46.** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para concentração de glicose das hidrólises enzimáticas dos pré-tratamentos utilizando água no estado líquido.

A superfície de resposta e as curvas de contorno complementam os dados discutidos até então onde fica evidenciado tanto o efeito da temperatura quanto o efeito do tempo. Resumidamente, pode-se dizer que o aumento de ambos os fatores (tempo e temperatura lineares) aumenta a liberação de glicose para o meio, sendo esta liberação maior a partir do tempo de residência de 6,5 min e da temperatura de 195 °C.

Com a análise de CLAE foi possível identificar uma considerável liberação de xilose em todos os ensaios, atingindo a concentração de 2,21 mg.mL<sup>-1</sup> no ensaio 8L. 5-HMF e furfural foram identificados em apenas um dos onze ensaios, 8L. A concentração de 5-HMF observada foi de 0,012 mg.mL<sup>-1</sup> e a de furfural foi de 0,009 mg.mL<sup>-1</sup>, ambas as concentrações menores do que as identificadas no hidrolisado enzimático dos pré-tratamentos utilizando água no estado gasoso. As concentrações de 5-HMF e furfural detectadas nos hidrolisados enzimáticos do capim-elefante pré-tratado com água no estado líquido são ambas 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> menores que as máximas detectadas nos hidrolisados enzimáticos do capim-elefante pré-tratado com água no estado gasoso. Sendo assim, ambas as concentrações também são inferiores as concentrações encontradas por Xu *et al.* (2010), após pré-tratamento hidrotérmico em palha de milho, os quais concluíram que as concentrações encontradas de 5-HMF e furfural não apresentaram efeito inibidor.

A análise dos valores das variáveis independentes que maximizam a produção de glicose e minimizam a perda de massa foi feita através da função de desejabilidade. Tal técnica consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas ou,

então, as mantenha em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-lineares (Montipó, 2012)

Considerando os dados de concentração de glicose liberada no meio de hidrólise enzimática detectada por CLAE como efeito positivo e os dados de perda de massa apresentados na seção 4.4.1 como efeito negativo do processo, avaliou-se a função de desejabilidade e o valor otimizado das duas variáveis independentes do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido (Figura 47). Novamente, a utilização dos valores de perda de massa como efeito negativo no processo se deve a necessidade de utilização da hemicelulose e lignina, que não são de interesse nesse trabalho, como matéria-prima em outros processos, para tornar mais viável economicamente o processo.

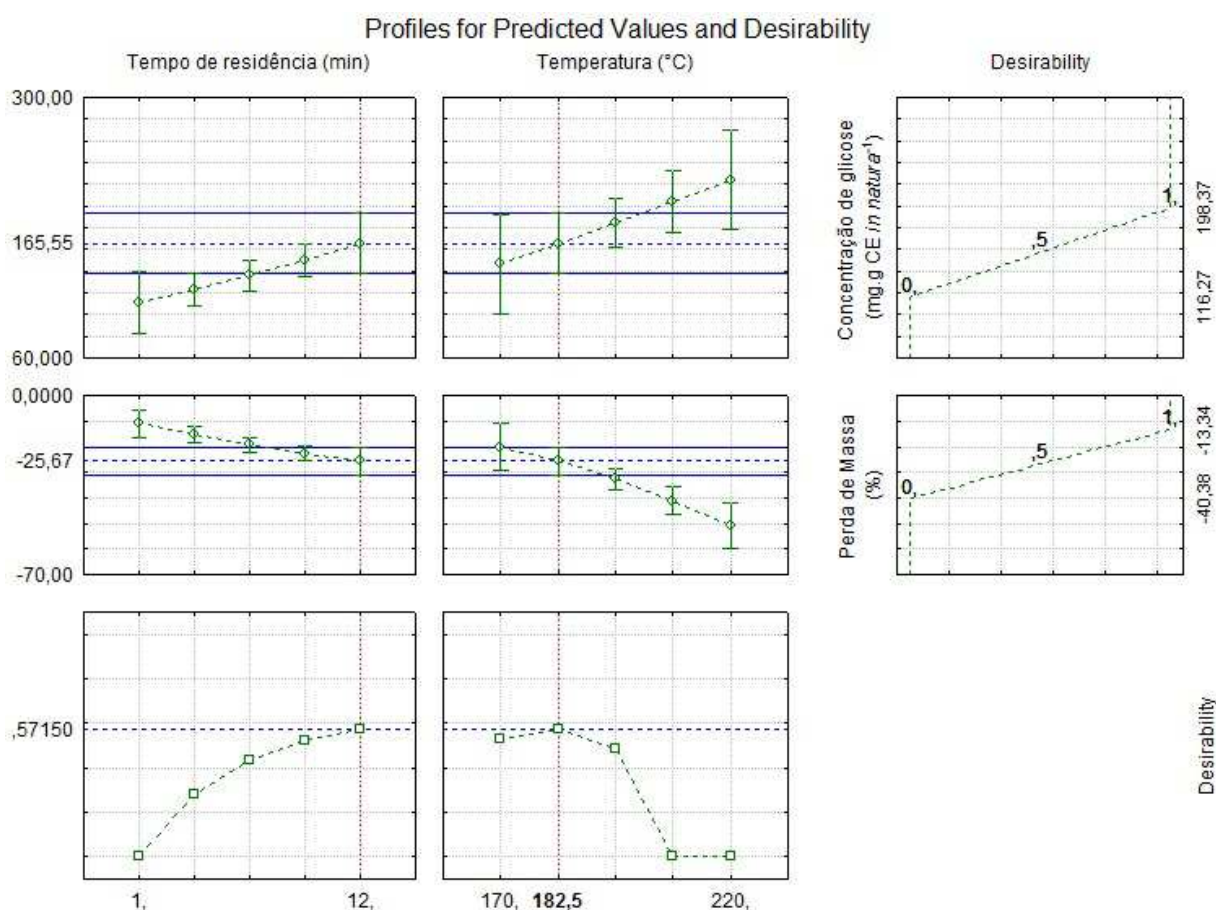


Figura 47. Perfis para avaliação dos pontos desejáveis e otimizado para o pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido, considerando a perda de massa como fator negativo e a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática como fator positivo.

Verifica-se que os dois primeiros perfis são relativos à resposta da glicose com cada uma das variáveis independentes, mantendo-se fixa a outra variável no ponto central. O terceiro perfil mostra a desejabilidade da concentração de glicose, sendo que o valor 0 diz respeito à mínima concentração de glicose ( $116,27 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e o valor 1 corresponde à máxima concentração de glicose para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido ( $198,37 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Os perfis intermediários são relativos à resposta para a perda de massa, sendo que essa foi utilizada com sinal negativo para indicar que seu efeito não é desejado, ou seja, quanto maior a perda de massa pior o resultado. Dos perfis intermediários, os dois primeiros são relativos à resposta da perda de massa com cada uma das variáveis independentes, mantendo-se fixa a outra variável no ponto central. O terceiro perfil mostra a desejabilidade da perda de massa, sendo que o valor 0 diz respeito à máxima perda de massa (40,38 %) e o valor 1 corresponde à mínima perda de massa para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido (13,34 %). Quanto maior o valor da desejabilidade, mais conveniente é a resposta do sistema, isto é, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo da desejabilidade é a condição otimizada do sistema. Os dois últimos perfis mostram a desejabilidade individual para cada fator e a desejabilidade global que é igual a 0,57. As linhas verticais destacadas no gráfico correspondem ao valor ótimo dos parâmetros estudado. Assim sendo, a otimização dos dados apresentou com melhores parâmetros a serem utilizados o tempo de residência de 12 min e uma temperatura de  $182,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Comparando os parâmetros otimizados para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido com os parâmetros otimizados para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso, observa-se que em ambos os casos o tempo de residência ótimo para trabalho é o máximo valor testado para este, ou seja, 12 min, porém, observando a otimização da temperatura nota-se que para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido o ponto ótimo é  $12,5 \text{ }^\circ\text{C}$  menor do que para os pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso, o que se deve principalmente a grande perda de massa apresentada pelos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido.

## 4.5 Fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso e líquido

### 4.5.1 Fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* dos hidrolisados dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado gasoso

Embora as concentrações de capim-elefante utilizadas na hidrólise enzimática tenham sido baixas, em um nível suficiente para uma avaliação potencial do efeito do pré-tratamento hidrotérmico, estudos de fermentação já podem apontar valores de rendimento e produtividade de etanol, além da ocorrência de efeitos inibitórios dos metabólitos, como o furfural e 5-HMF, dentre outros, formados durante o pré-tratamento hidrotérmico.

A fermentação das amostras hidrolisadas das biomassas pré-tratadas utilizando água no estado gasoso e *in natura* foi realizada conforme descrito na seção 3.4. A cinética de consumo de AR foi acompanhada e está representada na Figura 48.

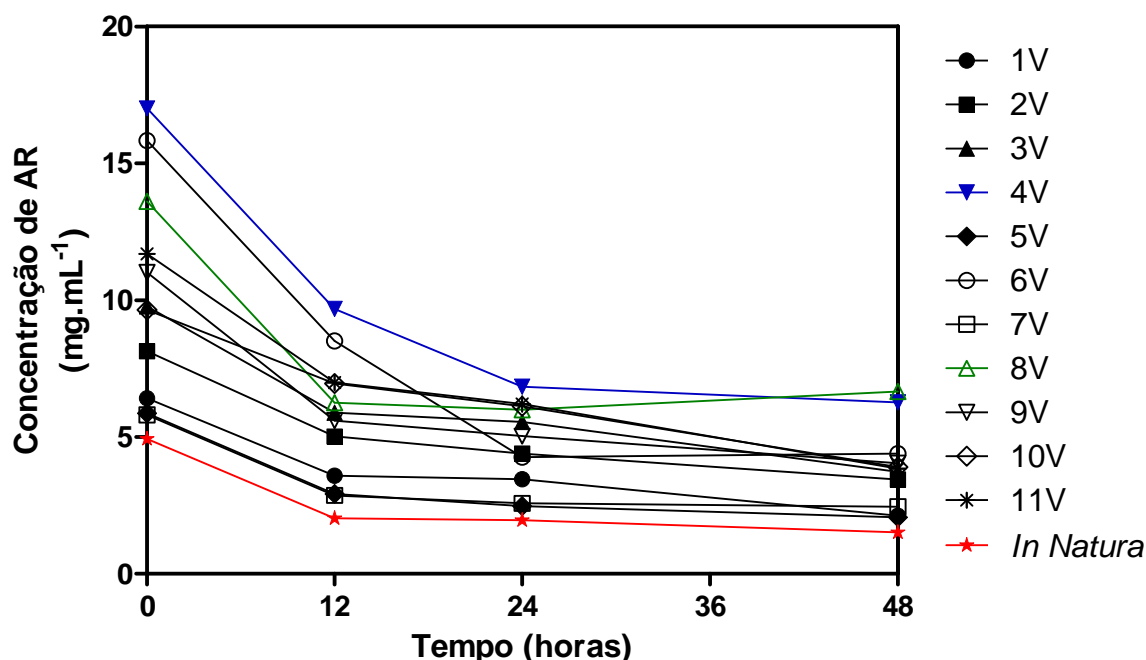
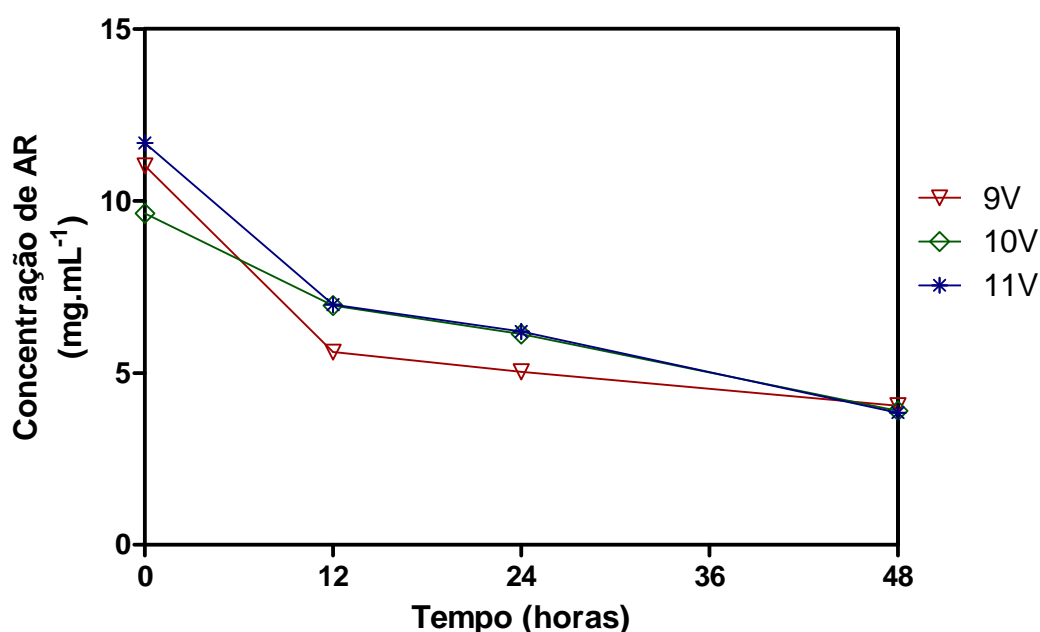


Figura 48. Consumo de AR (mg.mL<sup>-1</sup>) em relação ao tempo de fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* dos hidrolisados enzimáticos de capim-elefante após pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

De modo geral, na maioria dos ensaios cerca de dois terços dos AR disponíveis no início da fermentação foram consumidos, com exceção do ensaio 8V onde apenas metade dos AR foram consumidos. Em todos os ensaios o máximo consumo de AR ocorre até as primeiras 24 h de fermentação, indicando o consumo de glicose. Os açúcares redutores residuais provavelmente referem-se a substâncias não fermentescíveis pela linhagem de levedura empregada, tais como xilose e arabinose. A Figura 49 mostra os consumos de AR nos pontos centrais de ensaio, indicando que há reprodutibilidade no pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado gasoso.



**Figura 49.** Consumo de AR ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pontos centrais dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso. 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).

A Tabela 26 mostra os resultados da fermentação, apresentando a quantidade de substrato inicial ( $S_0$ ) – glicose – disponível no meio, o fator de conversão de produto ( $Y_{P/S}$ ), a produtividade volumétrica ( $P_v$ ) e o rendimento total do processo ( $\rho$ ).

A maior conversão da glicose consumida se deu no ensaio 5V, assim como o maior rendimento, tendo a conversão chegado a  $0,392 \text{ g.g}^{-1}$  enquanto que o rendimento foi de 76,726 %. Porém, o ensaio 5V, assim como os demais ensaios de baixa severidade tiveram baixa produtividade, sendo essas comparáveis a do capim-elefante *in natura*. A maior produtividade de etanol da fermentação foi de  $0,027 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e foi observada no ensaio 6V.



Com base nos baixos valores de rendimentos obtidos, e pela variação desses valores, sugere-se que os compostos presentes nos hidrolisados enzimáticos pré-tratados hidrotermicamente com água no estado gasoso causaram inibição no microrganismo utilizado para fermentação. Esta inibição pode ter sido causada não apenas pelas concentrações de 5-HMF e furfural presentes nas amostras, uma vez que nem todas as amostras apresentaram esses compostos em sua composição, mas por uma combinação de compostos presente que não chegaram a ser verificados, podendo haver compostos oriundos da própria composição do capim-elefante.

**Tabela 26. Substrato inicial ( $S_o$ ), fator de conversão de produto ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $P_v$ ) e rendimento total ( $\rho$ ) do processo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado gasoso. 1V (3 min, 178 °C); 2V (10 min, 178 °C); 3V (3 min, 212 °C); 4V (10 min, 212 °C); 5V (6,5 min, 170 °C); 6V (6,5 min, 220 °C); 7V (1 min, 195 °C); 8V (12 min, 195 °C); 9V (6,5 min, 195 °C); 10V (6,5 min, 195 °C); 11V (6,5 min, 195 °C).**

Amostra	$S_o$ (g.L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	$P_v$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\rho$ (%)
1V	2,318	0,305	0,013	59,708
2V	2,520	0,318	0,014	62,231
3V	2,876	0,293	0,015	57,278
4V	4,450	0,230	0,020	44,998
5V	2,293	0,392	0,014	76,726
6V	5,573	0,244	0,027	47,658
7V	2,328	0,366	0,014	71,543
8V	3,757	0,265	0,019	51,919
9V	2,896	0,348	0,018	68,013
10V	2,922	0,389	0,020	76,208
11V	3,010	0,350	0,020	68,564
<i>In Natura</i>	1,935	0,336	0,013	65,729

As análises de CLAE das amostras do início e do final da fermentação mostraram ainda que, conforme o previsto devido a fermentação ter sido realizada com uma *Saccharomyces cerevisiae* comercial, nenhuma pentose presente foi metabolizada.

#### 4.5.2 Fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* dos hidrolisados dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido

A fermentação das amostras hidrolisadas das biomassas pré-tratadas utilizando água no estado líquido e *in natura* foi realizada conforme descrito na seção 3.4. A cinética de consumo de AR foi acompanhada e está representada na Figura 50.

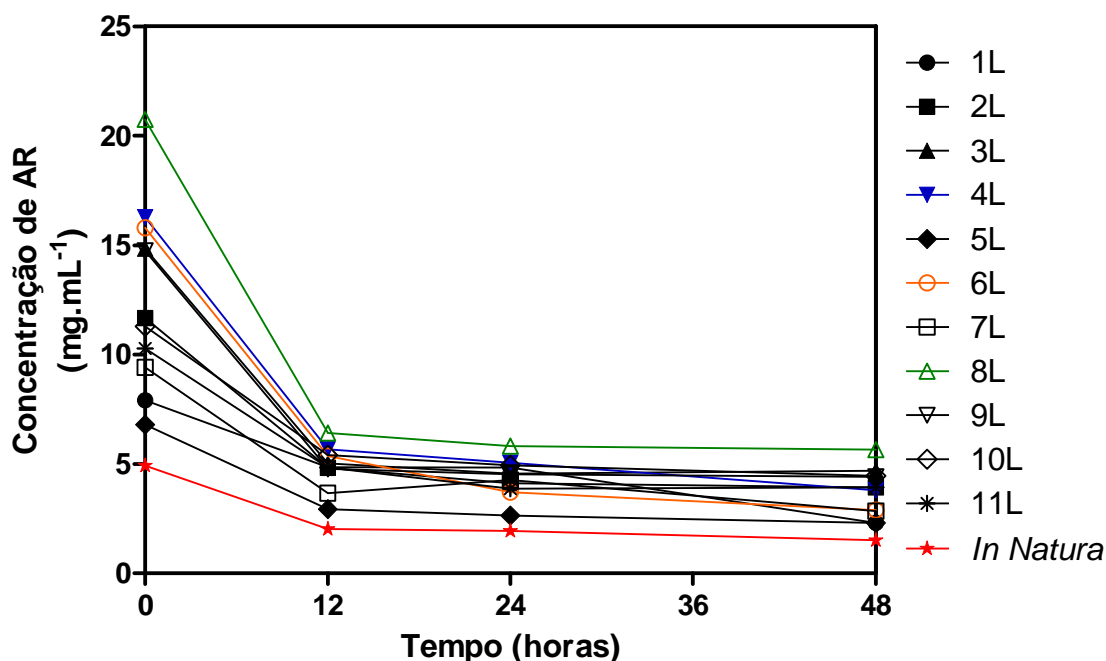


Figura 50. Consumo de AR ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

De modo geral observa-se que o máximo consumo de açúcar se deu nas primeiras 12 h para todos os experimentos. Os maiores consumos de AR se deram na fermentação dos ensaios 4L, 6L e 8L, sendo que o consumo desses ensaios chegou a ser de 75 % dos AR presentes.

A Figura 51 mostra os consumos de AR nos pontos centrais de ensaio, comprovando que há reprodutibilidade do pré-tratamento hidrotérmico utilizando água no estado líquido.

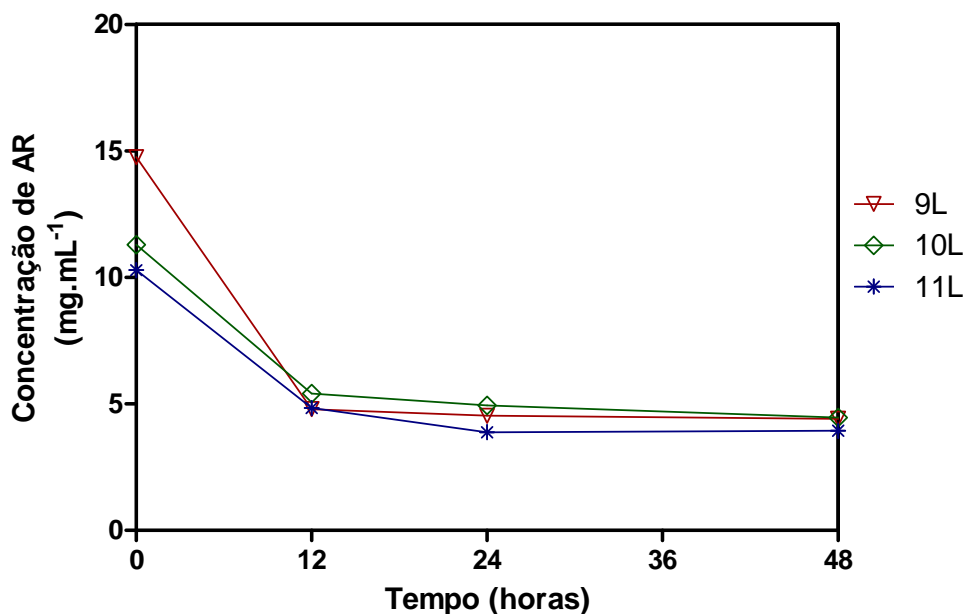


Figura 51. Consumo de AR ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em relação ao tempo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos dos pontos centrais dos pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido. 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

A Tabela 27 mostra os resultados da fermentação para os ensaios feitos com água no estado líquido, apresentando a quantidade de substrato inicial ( $S_0$ ) – glicose disponível no meio, o fator de conversão de produto ( $Y_{P/S}$ ), a produtividade volumétrica ( $P_v$ ) e o rendimento total do processo ( $\rho$ ).

Tabela 27. Substrato inicial ( $S_0$ ), fator de conversão em etanol ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $P_v$ ) e rendimento total ( $\rho$ ) do processo de fermentação dos hidrolisados enzimáticos após pré-tratamentos hidrotérmicos com água no estado líquido. 1L (3 min, 178 °C); 2L (10 min, 178 °C); 3L (3 min, 212 °C); 4L (10 min, 212 °C); 5L (6,5 min, 170 °C); 6L (6,5 min, 220 °C); 7L (1 min, 195 °C); 8L (12 min, 195 °C); 9L (6,5 min, 195 °C); 10L (6,5 min, 195 °C); 11L (6,5 min, 195 °C).

Amostra	$S_0$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$Y_{P/S}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$P_v$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	$\rho$ (%)
1L	2,636	0,301	0,013	58,905
2L	3,319	0,359	0,022	70,295
3L	3,585	0,337	0,023	65,888
4L	4,812	0,291	0,028	56,909
5L	2,533	0,328	0,014	64,263
6L	5,291	0,255	0,027	49,980
7L	2,632	0,393	0,017	76,859
8L	4,965	0,301	0,030	58,853
9L	3,637	0,254	0,019	49,725
10L	3,725	0,280	0,022	54,861
11L	3,528	0,267	0,020	52,201
<i>In Natura</i>	1,935	0,336	0,013	65,729

A maior conversão da glicose consumida se deu no ensaio 7L, assim como o maior rendimento, tendo a conversão chegado a  $0,393 \text{ g.g}^{-1}$  enquanto que o rendimento foi de 76,859 %. Porém, o ensaio 7L, assim como os demais ensaios de baixa severidade tiveram uma baixa produtividade, sendo essas comparáveis a do capim-elefante *in natura*. A maior produtividade da fermentação foi de  $0,030 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e foi observada no ensaio 8L, sendo seguido pelos outros dois ensaios de alta severidade 4L e 6L. Observa-se que tanto máximos rendimentos quanto máximas produtividades são comparáveis e muito similares aos rendimentos e produtividades obtidos para a fermentação dos ensaios de pré-tratamento hidrotérmico realizado com água no estado gasoso. Com base nos baixos valores de rendimentos obtidos, e pela variação desses valores, sugere-se que os compostos presentes nos hidrolisados enzimáticos pré-tratados hidrotermicamente com água no estado líquido causaram inibição no microrganismo utilizado para fermentação. Novamente, esta inibição pode ter sido causada não apenas pelas concentrações de 5-HMF e furfural presentes nas amostras, uma vez que apenas uma amostra apresentou esses compostos em sua composição, mas por uma combinação de compostos presentes que não chegaram a ser verificados, podendo haver compostos oriundos da própria composição do capim-elefante.

Comparando as Tabelas 26 e 27, notam-se diversas semelhanças nos resultados, principalmente quanto aos máximos valores de conversão da glicose a etanol, do rendimento do processo e na produtividade. As diferenças principais são com quais amostras de pré-tratamentos esses máximos são alcançados, porém essas diferenças podem ser explicadas pelas próprias diferenças entre os pré-tratamentos hidrotérmicos quando se utiliza água no estado líquido ou gasoso e pelos diferentes tempos e temperaturas otimizadas de cada um.

A análise de CLAE das amostras do início e do final da fermentação mostraram ainda que, conforme o previsto devido a fermentação ter sido realizada com uma *Saccharomyces cerevisiae* comercial, nenhuma pentose presente foi metabolizada.

## 5 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- As metodologias de Van Soest e a proposta pelo NREL para lignocelulósico são equivalentes para a avaliação da celulose de capim-elefante e suas frações pré-tratadas;
- A perda de massa, a perda de hemicelulose, a perda de lignina e a perda de celulose, aumentam conforme o aumento da severidade do pré-tratamento, tanto utilizando água no estado líquido quanto no gasoso;
- Existe reprodutibilidade na determinação de açúcares redutores liberados por hidrólise enzimática nos substratos, após os pré-tratamentos hidrotérmicos;
- Nos pré-tratamentos hidrotérmicos, 6V (6,5 min e 220 °C, para água no estado gasoso) e 6L (6,5 min e 220 °C, para água líquida), ocorreram os maiores rendimentos de glicose em relação a celulose presente no capim-elefante *in natura*, 60,44 % e 51,69 %, respectivamente. Os rendimentos obtidos para a biomassa *in natura* foi de apenas 26,53 %;
- O pré-tratamento hidrotérmico, utilizando água no estado gasoso, resultou em um maior rendimento de glicose a partir da celulose, com maior desestruturação da hemicelulose e menor volume de efluente gerado, quando comparado ao pré-tratamento hidrotérmico, utilizando água no estado líquido;
- Os resultados dos ensaios de fermentação sugerem que houve inibição no processo fermentativo, indicando a presença de compostos inibidores resultantes dos pré-tratamentos.

## 6 PERSPECTIVAS

- Validação dos pontos ótimos dos pré-tratamentos hidrotérmicos utilizando água no estado líquido e gasoso;
- Otimização das condições de concentração de sólidos e carga enzimática da hidrólise enzimática;
- Avaliação da inibição da fermentação e da utilização de diferentes microrganismos;
- Avaliação da viabilidade econômica do processo como um todo (custo de produção do etanol gerado no processo).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Shaikh, H.; Singh, R.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma A.J. (2005). Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carb. Polym.** 62: 6-10.
- Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnol. Adv.** 29:675-685.
- Aguilar, R.; Ramirez, J. A.; Garrote, G.; Válquez, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **J. Food Eng.** v. 55. n. 4. p. 309-318.
- Almeida, M. I. V.; Ferreira, W. M.; Almeida, F. Q.; Just, C. A. S.; Gonçalves, L. C.; Rezende, A. S. C. (1999). Valor nutritivo do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Shum), do feno de alfafa (*Medicago sativa*, L.) e do feno de capim *Coast-cross* (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) para equinos. **Rev. bras. zootec.** v.28, n.4, p. 743-752.
- Alvira, P.; Tom´s-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresour. Technol.** 101: 4851:4861.
- Andreas, J. (2001). A aplicação de celulases em processos de desbotamento. **Quím. Têxt.** 64: 5-18.
- ANFAVEA (2013). Anuário da indústria automobilística brasileira. **Disponível (online)** <http://www.anfavea.com.br/anuario.html> (16 de setembro).
- Arredondo, H. I. V. (2009). Avaliação exergética e exergo-ambiental da produção de biocombustíveis. 235 p. **Tese de Doutorado** em Engenharia Mecânica. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Azadi, H.; Jong, S.; Derudder, B.; Maeyer, P.; Witlox, F. (2012). Bitter sweet: how sustainable is bio-ethanol production in Brazil? **Renew Sust. Energ. Rev.** 16: 3599-3603.
- Azevedo, P. B. M. (2003). Aspectos econômicos da produção agrícola do capim-elefante. In: Encontro de Energia no Meio Rural. **Proceedings online...** Campinas, São Paulo, Brasil.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Convers. Manage.** 52: 858–875.

- Balat, M.; Balat, H. (2009).Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Appl. Energy**. 86: 2273-2282.
- Balat, M.; Balat, H.; Oz, C. (2008).Progress in bioethanol processing. **Prog. Energy Combust. Sci.** 34: 551-573.
- Bals, B.; Rogers, C.; Jin, M.; Balan, V.; Dale, B. (2010). Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. **Biotechnol. Biofuels**. 3:1.
- Banerjee, G.; Car, S.; Scott-Craig, J. S.; Hodge, D. B.; Walton, J. D. (2011). Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnol. Biofuels**. 4:16.
- Banerjee, G.; Car, S.; Scott-Craig, J. S.; Borrusch, M. S.; Walton, J. D. (2010).Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnol. Biofuels**. 3:22.
- Benedetii, E.; Borges, I.; Campos, W. E.; Gonçalves, L. C.; Rodríguez, N. M. (2008). Digestibilidade in vitro e in situ de três forrageiras tropicais colhidas manualmente e por vacas fistuladas no esôfago. **Acta Sci. Anim. Sci.** 30.2: p.203.
- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES); Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) (2008). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, Brasil.316 p.
- BP (2013). Statistical review of world energy. **Disponível (online)** [http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/statistical-review/statistical\\_review\\_of\\_world\\_energy\\_2013.pdf](http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/statistical-review/statistical_review_of_world_energy_2013.pdf) (12 de setembro).
- Brandon, S. K.; Sharma, L. N.; Hawkins, G. M.; Anderson, W. F.; Chambliss, C. K.; Doran-Pterson, J. (2011). Ethanol and co-product generation from pressurized batch hot water pretreated T85 bermudagrass and Merkeron napiergrass using recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst. **Biomass Bioenergy**. 35:3667-3673
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2010). Cellulases e xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagassein solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162:1889-1900.



- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2009). Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Ind. Crops Prod.** 29:642-647.
- Camassola, M. (2007). Produção de celulases e xilanases pelo fungo *Penicillium echinulatum* em cultivos submersos e em estado sólido para a hidrólise de lignocelulósicos. **Tese de doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS, Brasil. 179 p.
- Camassola, M.; De Bittencourt, L. R.; Shenem, N. T.; Andreus, J.; Dillon, A. J. P. (2004). Characterization of the Cellulase Complex. **Biocatal. Biotransform.** 22:391-396.
- Canilha, L.; Milagres, A. M. F.; Silva, S. S.; Silva, J. B. A.; Felipe, M. G. A.; Rocha, G. J. M.; Ferraz, A.; Carvalho, W. (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Rev. Analytica.** 44:48-54.
- Cassales, A. R. (2010). Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Cassales, A.; Souza-Cruz, P. B.; Rech, R.; Ayub, M. A. Z. (2011). Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy.** 55:4675-4683.
- Castro, A. M. (2010). Produção, propriedades e aplicações de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova.** 33:181-188.
- Chen, B. Y.; Chen, S. W.; Wang, H. T. (2012). Use of different alkaline pretreatments and enzyme models to improve low-cost cellulosic biomass conversion. **Biomass Bioenergy.** 39:182-191.
- Chies, V. (2013). Pesquisa investe na caracterização da biomassa para obtenção de biocombustíveis. **Disponível (online)**  
<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/junho/3a-semana/pesquisa-investe-na-caracterizacao-da-biomassa-para-obtencao-de-biocombustiveis> (12 de setembro).
- Demirbas, A.; Gupta, R. B. (2011). **Gasoline, diesel and ethanol biofuels from grasses and plants**. New York, Cambridge. 246 p.

- Deschamps, F. C. (1999). Implicações do período de crescimento na composição química e digestão dos tecidos de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Rev. bras. zootec.** 28:1358-1369.
- Dias, M. O. S.; Junqueira, T. L.; Cavalett, O.; Cunha, M. P.; Jesus, C. D. F.; Rossel, C. E. V.; Filho, R. M.; Bonomi, A.(2012). Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresour. Technol.** 103:152-161.
- Dillon, A. J. P.; Paesi-Toresan, S.; Barp, L. B. (1992). Isolation of cellulase-producing mutants from *Penicillium* sp. Strains denominated 3MUV3424. **Rev. Bras. Gen.** 15:491-498.
- Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and  $\beta$ -glucosidase activities. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 70: 740-746.
- Dillon, A. J. P.; Camassola, M.; Henriques, J. A. P.; Fungaro, M. H. P.; Azevedo, A. C. S.; Velho, T. A. F.; Laguna, S. E. (2008). Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microb. Technol.** 43:403-409.
- Dillon, A. J. P.; Bettio, M.; Pozzan, F. G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutageneses and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111(1):48-53.
- El-Zawawy, W. K.; Ibrahim, M. M.; Abdel-Fattah, Y. R.; Soliman, N. A.; Mahmould, M. M. (2011). Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic material into glucose for ethanol production. **Carbohydr. Polym.** 84:865-871.
- Embrapa (2010). Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos. **Documentos 306**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil.
- Ferreira, A. L. (2008). Capim-elefante: nova fonte alternativa de energia. **Disponível (online)** <http://hotsites.sct.embrapa.br/diacampo/programacao/2008/capim-elefante-nova-fonte-alternativa-de-energia> (12 de setembro).
- Galbe, M.; Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**59: 618–628.

- Gandini, A.; Belgacem, M. N. (1997). Furans in polymer chemistry. **Prog. Polym. Sci.** 22:1203-1379.
- Garrote, G.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. (1999). Hydrothermla processing of lignocellulosic materials. **Holz Roh Werkst.** 57:191-202.
- Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R.(2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** 101:4775-4800.
- Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. M. (2009). Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quím. Nova.** 32:1500-1503.
- Gregg, D.J.; Saddler, J.N. (1996). Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnol. Bioeng.** 51:375-383.
- Hamelinck, C.N.; van Hooijdonk, G.; Faaij, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle and long-term. **Biomass.** 28: 384–410.
- Haminiuk, C. W. I.; Oliveira, C. R. G., Baggio, E. C. R.; Masson, M. L. (2005). Efeito de pré-tratamento do escurecimento das cultivares de maçã fugi e gala após o congelamento. **Ciênc.Agrotec.,** Lavras. 29 (5): 1029-1033.
- Homrich, P. O. B.; Muniz, L. A. R.; Muniz, A. R. C. (2010). Caracterização e pré-tratamento hidrotérmico de capim-elefante para a obtenção de etanol. In: XVIII Encontro de Jovens Pesquisadores. **Resumos.** Caxias do Sul: UCS, 2010.
- Howard, R. L.; Abotsi, E.; Jansen van Rensburg, E. L.; Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.** 2 (12): 602-619.
- IEA – International Energy Agency (2012). Key world energy statistics. **Disponível (online)** <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/name,31287,en.html> (12 de setembro).
- Jegannathan, K. R.; Chan, E.; Ravidra, P. (2009). Harnessing biofuels: a global renaissance in energy production? **Renew Sust. Energ. Rev.** 13:2163-2168.
- Jones, J. L.; Semrau, K. T. (1984).Wood hydrolysis for ethanol production – previous experience and the economics of selected processes. **Biomass.** 5:109-135.

- Knauf, M; Moniruzzaman, M. (2004). Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **Int. Sugar J.** 106:147-150.
- Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. (1993). The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microb. Tech.** 15: 90-99.
- Kumar, S.; Kothari, U.; Kong, L.; Lee, Y. Y.; Gupta, R. B. (2011). Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. **Biomass Bioenergy.** 35:956-968.
- Kuhnel, S.; Schols, H. A.; Gruppen, H. (2011). Aiming the complete utilization of sugar beet pulp through mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. **Biotechnol. Biofuels.** 4:14.
- Larsson, S.; Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Tengborg, C.; Stenberg, K.; Zacchi, G.; Nilvebrant, N. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol.** 24:151-159.
- Laser, M.; Schulman, D.; Allen, S. G.; Lichwa, J.; Antal Jr., M. J.; Lynd, L. R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresour. Technol.** 81: 33-44.
- Lehtonen, M. (2011). Social sustainability of the Brazilian bioethanol: Power relations in a centre-periphery perspective. **Biomass Bioenergy.** 35:2425-2434.
- Lima, R. B. V.; Luciano, B. A.; Pontes, M. G. C. (2006). Geração de energia elétrica a partir do biodiesel: alternativa de desenvolvimento socioeconômico sustentável. In: Simpósio Brasileiro De Sistemas Elétricos. Campina Grande, Brasil. **Anais eletrônicos... Disponível (online)** [http://www.labplan.ufsc.br/congressos/SBSE/anais/159\\_sbse2006\\_final.pdf](http://www.labplan.ufsc.br/congressos/SBSE/anais/159_sbse2006_final.pdf)
- Liu, Z. L.; Slininger, P. J.; Dien, B. S.; Berhow, M. A.; Kurtzman, C. P.; Gorsich, S. W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 31:345-352.
- Lopes, W. B.; Pires, A. J. V.; Sales, R. M. P.; Carvalho, G. G. P.; Bonomo, P.; Raposo, C. M. R. (2009). Capim-elefante tratado com compostos alcalinos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 10:714-722.

- Marabezi, K.(2009). Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, Brasil.
- Marafon, A. C.; Marinho, T. M.; Santiago, A. D.; Rangel, J. H. A. (2012). Potencial de capim-elefante para produção de energia renovável. **Disponível (online)** <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2012/potencial-do-capim-elefante-para-producao-de-energia-renovavel/> (13 de setembro).
- Martins, L. F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P.; Ramos, L. P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99:1417-1424.
- Medve, J. (1997). Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II. Lund, Sweden. 49 f. **Doutorado em Bioquímica** – Department of Biochemistry, Lund University.
- Menegol, D. (2012). Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* para hidrólise enzimática de capim-elefante. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Menon, V.; Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals e biorefinery concept. **Prog. Energy Combust. Sci.** 38:522-550.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chemis.** 31: 426-428.
- Montipó, S. (2012). Produção de ácido láctico a partir da casca de arroz. **Dissertação de mestrado**. Centro de Tecnologia, Universidade de Santa Maria. Santa Maria, Brasil.
- Morais, R. F. (2008). Potencial produtivo e eficiência da fixação biológica de nitrogênio de cinco genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), para uso como fonte alternativa de energia. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Seropédica, Brasil.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapfle, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.** 96: 673-686.

- Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanbe, T., (2005). Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. **Anim. Feed Sci. Technol.** 120, 235–243.
- Overend, R. P.; Chornet, E. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments. **Philos Trans. R. Soc. Lond. A.** 321:523-536.
- Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolve pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnol. Bioeng.** 90, 473–481.
- Pereira, B. M. P.; Alvarez, T. M.; Delabona, P. S.; Dillon, A. J. P.; Squina, F. M.; Pradella, J. G. C. (2013). Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **Bioenerg. Res.** DOI 10.1007/s12155-013-9340-5.
- Petersen, M. Ø.; Larsen, J.; Thomsen, M. H. (2009). Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass Bioenergy.** 33: 834-840.
- Pitarelo, A. P. (2013). Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. **Tese de Doutorado.** Universidade do Paraná. Curitiba, Brasil.
- Quéno, L. R. M (2009). Viabilidade econômica da produção de biomassa de eucalipto e de capim elefante para energia. **Disertação de Mestrado.** Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- Quesada, D. M.; Boddey, R. M.; Reis, V. M.; Urquiaga, S. (2004). Parâmetros qualitativos de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Shum.) estudados para a produção de energia através da biomassa. Circular Técnica Embrapa. **Disponível (online)** <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/627821/1/cit008.pdf> (13 de setembro).
- Quesada, D. M. (2005). Parâmetros quantitativos e qualitativos de diferentes genótipos de capim elefante com potencial para uso energético. **Tese de Doutorado.** Instituto de Agronomia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, Brasil.
- Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nova.** 26: 863-871.
- Ramos, L.P.; Breuil, C.; Saddler, J.N. (1992). Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Appl.**

- Biochem. Biotechnol.** 34-35: 37-48.
- Reddy, N; Yang, Y. (2005). Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends Biotechnol.** 23(1):22-27.
- Reguly, J. C. (1996). **Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos.** Editora universitária, Universidade Federal de Pelotas. Vol.1.
- RFA (2013). Renewable Fuels Association. **Disponível (online)** <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics> (13 de setembro).
- Rolle, R.S. (1998). Review: Enzyme applications for agroprocessing in developing countries: an inventory of current and potential applications. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 14: 611-619.
- Saito, I. M. (2005). Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico. **Tese de Doutorado.** Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, Brasil.
- Salgado, R. (2010). O capim que gera energia. Época Negócios. **Disponível (online)** <http://epocanegocios.globo.com/Revista/Common/0,,ERT131148-16368,00.html> (13 de setembro).
- Santos, E. A.; Silva, D. S.; Queiroz F., J. L. (2001). Composição química do capim-elefante cv. roxo cortado em diferentes alturas. **Rev. Bras. Zootec.** 30(1):18-23.
- Santos, F. A.; Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova.** 35(5):1004-1010.
- Schuchardt, U.; Ribeiro, M. L.; Gonçalves, A. R. (2001). A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Quím. Nova.** 24(2):247-251.
- Sehnm, N. T.; Bittencourt, L. R.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72:163-167.
- Sehnm, N. T.; Machado, A. S.; Leite, F. C. B.; Pita, W. B.; Morais Jr., M. A.; Ayub, M. A. Z. (2013). 5-hidroxymethylfurfural induces *ADH7* and *ARII* expression in tolerant

- industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. **Bioresour. Technol.** 133:190-196.
- Sehnm, N. T. (2013). Obtenção e avaliação de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Wickerhamomyces anomalus* com potencial para aplicação na produção de etanol de segunda geração. **Tese de doutorado**. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Shibao, J.; Bastos, D. H. M. (2011). Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Rev. Nutr.**, Campinas. 24 (6): 895-904.
- Silva, V. F. N. (2009). Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. **Dissertação de Mestrado**. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, Brasil.
- Silva, R. J. (2012). Efeito de pré-tratamento hidrotérmico na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Singh, R.; Varma, A. J.; Laxman, R. S.; Rao, M. (2009). Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulase. **Bioresour. Technol.** 100: 6679-6681.
- Singh, S.; Kushwaha, B. P.; Nag, S. K.; Mishra, A. K.; Singh, A.; Anele, U. Y. (2012). *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. **Anim. Feed Sci. Technol.** 178:2-11.
- Sladden, S. E.; Bransby, D. I.; Aiken, G. E.; Prinet, G. M. (1991). Biomass yield and composition and winter survival of tall grasses in Alabama. **Biomass Bioenergy.** 1(2):123-127.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. (2008a). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable energy Laboratory**.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008b). Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable energy Laboratory**.



- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008c). Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42619. **National Renewable energy Laboratory**.
- Soares, I. B.; Marques, O. M.; Benachour, M.; Abreu, C. A. M. (2011). Ethanol production by enzymatic hydrolysis of elephant Grass. **J. Life Sci.** 5:157-161.
- Sukumaran, R. K.; Singhanian, R. R.; Mathew, G. M.; Pandey, A. (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renew Energ.** 34: 421-424.
- Tessema, Z.; Baars, R. M. T. (2004). Chemical composition, in vitro dry matter digestibility and ruminal degradation of Napier grass (*Pennisetum purpureum* (L.) Schumach.) mixed with different levels of *Sesbania sesban* (L.) Merr. **Anim. Feed Sci. Technol.** 117:29-41.
- Toor, S. S.; Rosendahl, L.; Rudolf, A. (2011). Hydrothermal liquefaction of biomass: a review of subcritical water technologies. **Energy.** 36:2328-2342.
- Toscan, A. (2010). Produção de etanol a partir de capim elefante: Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Van Soest, P. J.; Wine, R. H. (1968). Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.** 51: 780-785.
- Weil, J.; Westgate, P.; Kohlmann, K.; Ladisch, M. R. (1994). Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 1002-1004.
- Winter, C.; Kerros, M. E.; Weinbauer, M. G. (2012). Effects of sodium azide on the abundance of prokaryotes and viruses in marine samples. **PLoS ONE.** 7 (5): e37597.
- Wongwatanapaiboon, J.; Kangvansaichol, K.; Burapatana, V.; Inochanon, R.; Winayanuwattikun, P.; Yongvanich, T.; Chulalaksananukul, W. (2012). The potential of cellulosic ethanol production from grasses in Thailand. **J. Biomed. Biotechnol.** DOI: 10.1155/2012/303748.
- Wörmeyer, K.; Ingram, T.; Saake, B.; Brunner, G.; Smirnova, I. (2011). Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin. **Bioresour. Technol.** 102:4157-4164.

- Wyman, C. E. (1996). Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. In: Wyman CE (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. **Taylor & Francis**, Bristol, Pa. PP 1-18.
- Xie, X. M.; Zhang, X. Q.; Dong, Z. X.; Guo, H. R. (2011). Dynamic changes of lignin contents of MT-1 elephant grass and its closely related cultivars. **Biomass Bioenergy**. 35:1732-1738.
- Xu, J.; Thomsen, M. H.; Thomsen, A. B. (2010). Ethanol production from hydrothermal pretreated corn stover with a loop reactor. **Biomass Bioenergy**. 34: 334-339.
- Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 56:17-34.
- Zhang, Y. –H. P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**. 35:367-375.
- Zheng, Y.; Pan, Z.; Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **Int. J. Agric. & Biol. Eng**. 2(3):51-68.