



# Avaliação do potencial da mistura de macrófitas aquáticas para produção de etanol de segunda geração via rota química

Camila Santiago Leal Pontes  
Caroline dos Santos Silva

## Projeto de Final de Curso

Orientadores

Prof<sup>a</sup>. Yordanka Reyes Cruz, D.Sc.  
Leonard Guimarães Carvalho, D.Sc

Outubro de 2021

# **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA MISTURA DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO VIA ROTA QUÍMICA**

*Camila Santiago Leal Pontes*

*Caroline dos Santos Silva*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheira Química.

Aprovado por:

---

Ana Mehl, D.Sc

---

Marina Damião Besteti Ribeiro, D.Sc

Orientado por:

---

Prof<sup>a</sup>. Yordanka Reyes Cruz, D.Sc.

---

Leonard Guimarães Carvalho, D.Sc

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Outubro de 2021

PP814a Pontes / Silva, Camila Santiago Leal / Caroline dos Santos

Avaliação do potencial da mistura de macrófitas aquáticas para produção de etanol de segunda geração via rota química / Camila Santiago Leal / Caroline dos Santos Pontes / Silva. -- Rio de Janeiro, 2021. 57 f.

Orientadora: Yordanka Reyes Cruz.  
Coorientador: Leonard Guimarães Carvalho.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Bacharel em Engenharia Química, 2021.

1. Etanol. 2. Macrófitas. 3. Rota Química. 4. Projeto Final (Graduação - UFRJ/EQ). 5. Yordanka Reyes Cruz e Leonard Guimarães Carvalho. I. Cruz, Yordanka Reyes, orient. II. Carvalho, Leonard Guimarães, coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiramente a Deus, que nos guiou frente aos desafios encontrados durante a realização do curso de Engenharia Química.

Agradecemos à nossa família por estar ao nosso lado em todos os momentos. Por nos compreenderem, incentivarem e apoiarem sempre que preciso foi.

Agradecemos aos nossos amigos pelo apoio de sempre, incentivo para não desistir nunca, compreensão e por compartilhar momentos de superação em nossas vidas.

Agradecemos aos nossos orientadores, Yordanka Reyes Cruz e Leonard Guimarães Carvalho, pelo aprendizado, disponibilidade, compreensão, incentivo e paciência. Por aceitarem o desafio da realização de um projeto final com experimentos durante a pandemia do COVID-19.

Agradecemos à equipe do Laboratório de Tecnologias Verdes (GreenTec) da Escola de Química da UFRJ, que nos auxiliaram diversas vezes durante a realização dos experimentos.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenharia Química.

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA MISTURA DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO VIA ROTA QUÍMICA**

Camila Santiago Leal Pontes

Caroline dos Santos Silva

Outubro, 2021

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Yordanka Reyes Cruz, D. Sc.

Leonard Guimarães Carvalho, D. Sc.

A dependência universal dos combustíveis fósseis tem se mostrado problemática por uma série de motivos que passam pelo iminente esgotamento das reservas conhecidas destes combustíveis, o grave impacto que sua extração e utilização geram no meio ambiente e até mesmo questões político-econômicas. Diante deste cenário, o uso de combustíveis de origem renovável vem se mostrando uma realidade cada vez mais presente no mundo. No Brasil, este cenário já está bem estabelecido e desde a década de 70 o país figura entre os líderes na fabricação de etanol de primeira e segunda geração. São muitos os estudos que tem por objetivo investigar novas tecnologias para fabricação de etanol. Sendo a matéria-prima um dos fatores que representa boa parte do custo do processo, é de extrema importância a busca de biomassas de baixo custo que possam ser utilizadas na obtenção do etanol. As biomassas lignocelulósicas tem sido o foco neste sentido e as macrófitas aquáticas se apresentam como uma alternativa pela sua grande disponibilidade. Neste contexto, este trabalho avaliou o potencial de uma mistura de macrófitas aquáticas, fornecida pela hidrelétrica Engenheiro Souza Dias (Jupia), como matéria-prima para produção de etanol de segunda geração via rota química. Foi feita a hidrólise ácida da biomassa para remoção da fração hemicelulósica e extração dos açúcares fermentescíveis; seguida da deslignificação pela hidrólise básica da celulignina e logo depois e hidrólise ácida da celulose para extração dos monômeros (açúcares). A etapa seguinte foi a fermentação dos hidrolisados obtidos em cada etapa, avaliando-se meios com 25%, 50% e 75% de hidrolisado. Nos melhores cenários obteve-se 16,5g/L de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico e 14,3g/L de etanol a partir do hidrolisado celulósico. Não foram avaliadas as condições otimizadas para este processo, sendo possível obter nestas condições, em escala de laboratório, 4,9kg de etanol para cada tonelada da mistura de macrófitas utilizada.

## Sumário

Capítulo I - Introdução .....	1
I.1 - Justificativa.....	1
I.2 – Objetivos.....	4
I.2.1 – Objetivos Gerais.....	4
I.2.2 – Objetivos Específicos.....	4
Capítulo II – Revisão Bibliográfica.....	5
II.1 - Macrófitas Aquáticas .....	5
II.1.1 - <i>Pistia stratiotes</i> (Alface D'água); <i>Salvinia auriculata</i> (Orelha-de-Onça) e <i>Eichhornia crassipes</i> (Aguapé).....	6
II.2 – Composição estrutural dos materiais lignocelulósicos.....	9
II.2.1 – Celulose .....	10
II.2.2 – Hemicelulose .....	10
II.2.3 – Lignina.....	11
II.3 – Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.....	12
II.3.1 – Pré-tratamento ácido.....	13
II.3.2 – Pré-tratamento alcalino.....	14
II.4 – Hidrólise de materiais lignocelulósicos.....	14
II.4.1 – Hidrólise enzimática .....	15
II.4.2 – Hidrólise ácida.....	16
II.5 – Fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos .....	18
II.5.1 – Fermentação de hidrolisados hemicelulósicos .....	18
II.5.2 – Fermentação de hidrolisados celulósicos .....	19
II.6 – Estratégias para produção de etanol de segunda geração.....	21
II.6.1 – Hidrólise enzimática e fermentação separadas (SHF).....	21
II.6.2 – Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).....	22
II.6.3 – Sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF) .....	22
II.6.4 – Biprocessamento consolidado (CBP) .....	23
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	24
III.1 – Matéria-prima .....	24
III.1.1 – Determinação de celulose, hemicelulose, lignina e cinza (Adaptado de Ververis <i>et al.</i> , 2007; Sluiter <i>et al.</i> , 2005).....	24
III.1.2 – Determinação do teor de umidade.....	27

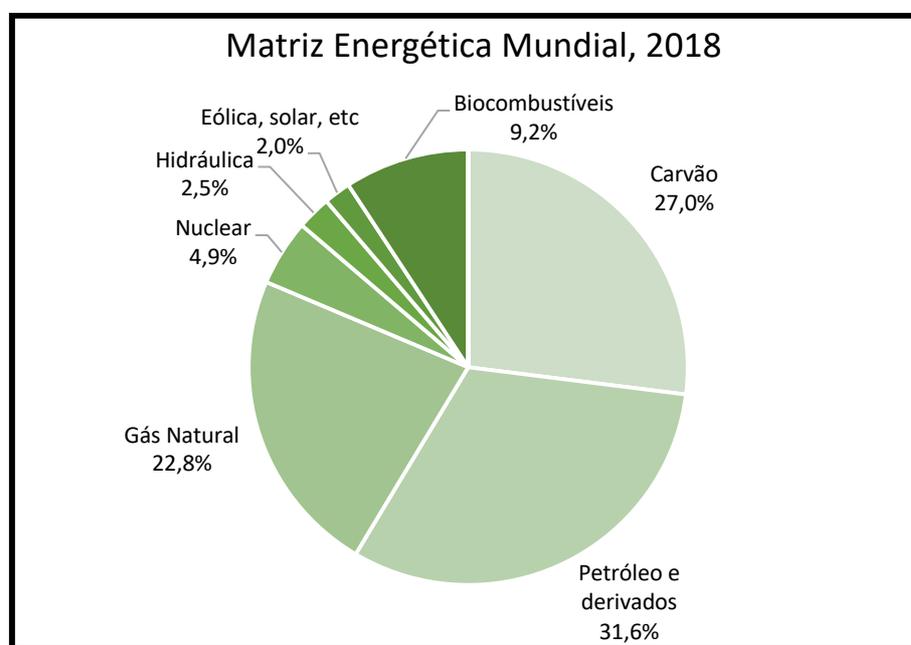
III.2 – Hidrólise da Matéria-prima.....	28
III.2.1 – Hidrólise da Hemicelulose .....	28
III.2.2 – Hidrólise da Lignina.....	31
III.2.3 – Hidrólise da Celulose .....	33
III.3 – Fermentação dos Hidrolisados.....	35
Capítulo IV – Resultados e Discussão.....	38
IV.1 – Matéria-prima .....	38
IV.1.1 – Determinação de celulose, hemicelulose, lignina e cinza.....	38
IV.1.2 – Determinação do teor de umidade .....	40
IV.2 – Hidrólise da Matéria-prima.....	41
IV.2.1 – Hidrólise da Hemicelulose .....	41
IV.2.2 – Hidrólise da lignina.....	42
IV.2.3 – Hidrólise da Celulose .....	42
IV.3 – Fermentação dos Hidrolisados.....	43
IV.3.1 – Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico .....	43
IV.3.2 – Fermentação do Hidrolisado Celulósico .....	47
Capítulo V – Conclusão e Sugestões .....	52
Capítulo VI – Referência Bibliográfica.....	54

# Capítulo I - Introdução

## I.1 - Justificativa

A demanda mundial por energia cresce significativamente em função de todos os avanços científicos e tecnológicos obtidos para o desenvolvimento socioeconômico e melhoria da qualidade de vida da população. Segundo dados levantados pela Agência Internacional de Energia (IEA), ilustrados na Figura I.1, a matriz energética mundial ainda é composta majoritariamente por fontes de energia não renováveis (INTERNACIONAL ENERGY AGENCY, 2021)

Figura I. 1 - Matriz Energética Mundial 2018



Fonte: Adaptado de IEA, 2021

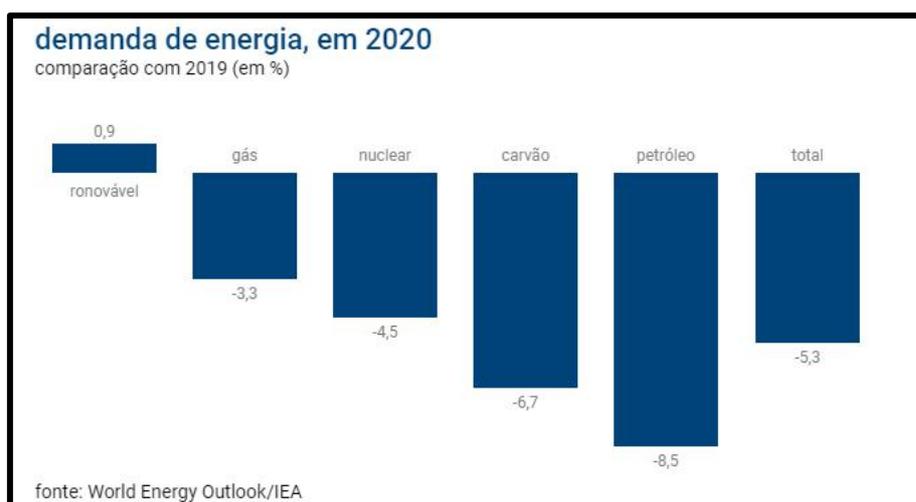
Fontes de energia renováveis como eólica, solar, dentre outras, foram responsáveis pela produção de apenas 2% de toda a matriz energética mundial no ano de 2018. Quando se somam às fatias produzidas através da energia hidráulica e da energia obtida a partir de biocombustíveis, as fontes renováveis totalizam apenas 13,7%.

O cenário de dependência mundial das fontes de energia fóssil é extremamente preocupante por duas principais razões. A primeira é que se estima para as próximas décadas um declínio na produção de energia a partir de derivados do petróleo, uma vez que a maior parte das reservas já atingiu, ou está perto de atingir o seu pico produtivo (Cavallo, 2002). A segunda está relacionada ao aquecimento global. A emissão de gases causadores do efeito

estufa aumentou, no mundo inteiro, em 50% entre 1990 e 2018, e o consumo de energia é responsável por 73% das emissões mundiais. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) corresponde a 74% das emissões de gases de efeito estufa, e 93% deste CO<sub>2</sub> é fruto do uso de combustíveis fósseis (GE, FRIEDRICH, & VIGNA, 2020).

Diante deste cenário, as atenções estão cada vez mais voltadas para as fontes de energia renováveis. De acordo com o levantamento da IEA exposto na Figura I.2, no ano de 2020, em meio a pandemia de COVID-19, houve uma retração na demanda por energias de todas as fontes, exceto por energias de fontes renováveis. A perspectiva é que esta tendência de crescimento se mantenha, e que as energias renováveis sejam responsáveis por atender a 80% do crescimento da demanda de eletricidade nos próximos 10 anos (IEA, 2020 *apud* RIBEIRO, 2020).

Figura I. 2 - Demanda de energia em 2020



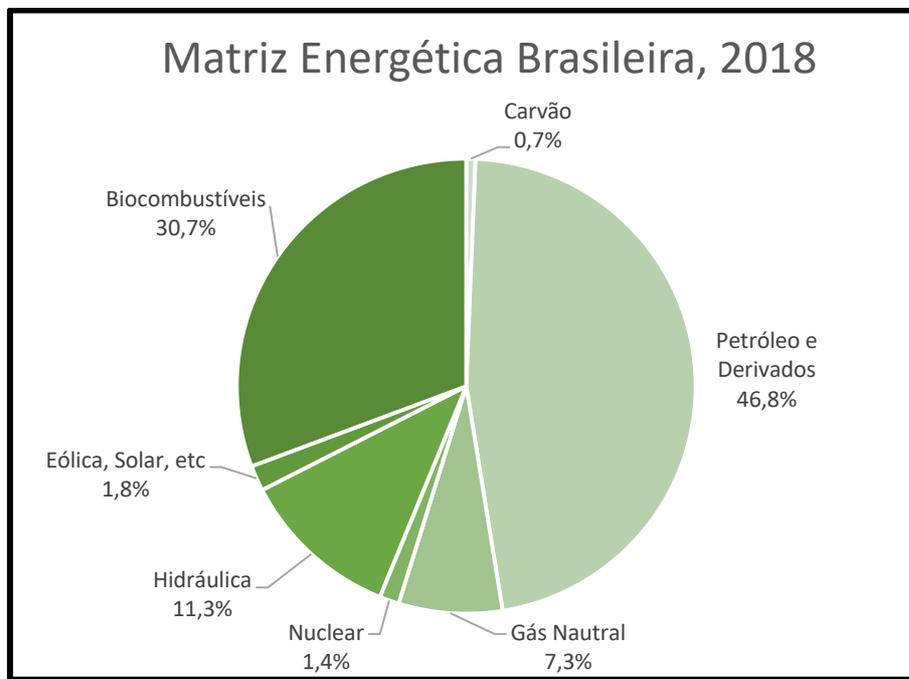
Fonte: IEA, 2020 *apud* RIBEIRO, 2020

Uma parcela significativa da energia mundial gerada através de fonte renovável advém dos biocombustíveis. Os biocombustíveis são produzidos a partir de uma fonte vegetal (oleaginosas, sacarídeas, amiláceas ou lignocelulósicas) e substituem de forma bastante eficiente os combustíveis de origem fóssil em suas mais diversas aplicações. Além disso, cabe ressaltar que a utilização dos biocombustíveis permite uma redução drástica na emissão de gases de efeito estufa.

No Brasil, os biocombustíveis ocupam uma parcela considerável da matriz energética do país. Os dados apresentados na Figura I.3 mostram que em 2018, os biocombustíveis foram a segunda fonte energética mais utilizada em território brasileiro, representando 30,7% de sua

matriz energética, enquanto no mundo inteiro esta fonte foi responsável por atender apenas 9,2% da demanda por energia (IEA, 2021).

Figura I. 3 - Matriz Energética Brasileira 2018



Fonte: Adaptado de IEA, 2021

O principal biocombustível produzido e utilizado em terras brasileiras é o etanol. Desde os anos 70 e, principalmente, a partir da década de 2000, com a popularização dos carros com motores flex, os projetos de pesquisa relacionados à produção de etanol foram intensificados e o Brasil passou a ser um dos líderes mundiais na fabricação e exportação deste biocombustível. Em 2020 o Brasil, juntamente com os Estados Unidos, foi responsável por 84% da produção e comercialização mundial de etanol. Foram 2,7 bilhões de litros exportados, 0,7 bilhão a mais do que no ano de 2019 (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2021)

Atualmente o Brasil produz etanol de primeira e de segunda geração. Chama-se etanol de primeira geração o que é produzido a partir da fermentação direta do caldo ou melaço obtido a partir da cana-de-açúcar. Já o etanol de segunda geração é obtido a partir do processo de fermentação de carboidratos liberados da biomassa residual por hidrólise da celulose e hemicelulose (PITARELO, 2013).

O etanol de segunda geração traz como um dos benefícios a possibilidade de aumento da produção sem necessidade de aumento na área cultivada, além de poder ser produzido em

períodos de entressafra, diferente da cana que deve ser processada logo após a colheita (MELO, 2020).

Neste cenário de demanda crescente por energia obtida através de fontes renováveis, buscando a diminuição da emissão de gases causadores do efeito estufa, a fabricação do bioetanol torna-se objeto de estudo e as buscas por tecnologias mais eficientes e matérias-primas cada vez mais acessíveis tem se intensificado.

As macrófitas aquáticas tem se mostrado uma matéria-prima bastante promissora para a produção de bioetanol de segunda geração. Estas plantas, em algumas ocasiões, se proliferam como invasoras, prejudicando o ecossistema e podendo ser uma fonte gratuita para produção de biocombustível.

Considerando os benefícios da produção do bioetanol de segunda geração, o presente trabalho avalia o potencial do uso de macrófitas aquáticas como biomassa lignocelulósica para obtenção de etanol de segunda geração, utilizando-se uma rota química.

## **I.2 – Objetivos**

### **I.2.1 – Objetivos Gerais**

Este trabalho tem como objetivo principal a avaliação do potencial da mistura de macrófitas aquáticas como matéria-prima para obtenção de etanol de segunda geração, através de rota tecnológica composta por processos químicos.

### **I.2.2 – Objetivos Específicos**

- Testar a rota tecnológica proposta para produção de etanol de segunda geração a partir da mistura de macrófitas aquáticas;
- Extrair a fração hemicelulósica a partir da hidrólise ácida do material lignocelulósico para produção de açúcares;
- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Produzir um hidrolisado rico em açúcares da fração celulósica a partir da hidrólise ácida do material lignocelulósico pré-tratado;
- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado celulósico, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;

## Capítulo II – Revisão Bibliográfica

### II.1 - Macrófitas Aquáticas

São conhecidas como macrófitas aquáticas as plantas visíveis a olho nu (CAVALLO, 2002) que tem suas partes fotossinteticamente ativas, permanente ou temporariamente, submersas ou flutuantes na água. De acordo com Weaner & Claments (1938, *apud* ESTEVES, 1998) as macrófitas são plantas herbáceas que crescem na água, em solos cobertos pela água ou em solos saturados pela água.

São vegetais com grande capacidade adaptativa e por isso contribuem para estruturação e dinâmica de uma imensa gama de ambientes com as características mais diversas: lagos, represas, brejos, corredeiras, ambientes de água salgada e até em fontes de águas termais (XAVIER, CAMPOS, RIBEIRO & MOTA, 2021).

Algumas das espécies mais produtivas das quais se tem conhecimento fazem parte deste grupo de vegetais e seu metabolismo produz enorme interferência no ecossistema em que se encontram de diversas maneiras. Podem agir como agente despoluidor, removendo nutrientes de ambientes eutrofizados. São responsáveis, por exemplo, pela manutenção da diversidade de espécies animais das regiões litorâneas, uma vez que essa comunidade serve de abrigo para uma série de pequenos animais se refugiarem de seus predadores (TRINDADE, PEREIRA, ALBERTONI & PALMA-SILVA, 2010). Ainda contribuem para a manutenção da estrutura dos ambientes aquáticos, onde a fixação das raízes das macrófitas emersas no solo evitam a erosão das margens (XAVIER, CAMPOS, RIBEIRO & MOTA, 2021).

Por outro lado, justamente a capacidade das macrófitas de se multiplicarem rapidamente em alguns casos representa um problema. Nutrientes vindos de esgoto doméstico, resíduos industriais, erosão de terras agrícolas, em excesso, contribuem para a proliferação desordenada destes vegetais aquáticos afetando os usos múltiplos da água (TRINDADE, PEREIRA, ALBERTONI & PALMA-SILVA, 2010). Acúmulo de lixo, de sedimentos, prejuízo ao transporte hidroviário, à irrigação, ao turismo e à pesca são alguns dos exemplos. No ambiente urbano, podem ser arrastadas pelas chuvas para os bueiros, obstruindo a passagem da água e causando inundação e enchentes. Semelhante ao que ocorre com as turbinas de usinas hidrelétricas, onde a presença de macrófitas pode prejudicar a geração de energia elétrica (DAMO, MENDES & FREITAS, 2020). Torna-se então, imprescindível controlar a proliferação do crescimento destas plantas ou a remoção delas do corpo hídrico.

Desta forma, as macrófitas aquáticas se tornam uma fonte abundante e de baixo custo de biomassa que pode ser aproveitada como matéria-prima na produção de etanol de segunda geração.

### **II.1.1 - *Pistia stratiotes* (Alface D'água); *Salvinia auriculata* (Orelha-de-Onça) e *Eichhornia crassipes* (Aguapé)**

Conforme dito anteriormente, um dos principais impactos negativos pelo crescimento desordenado das macrófitas aquáticas é o prejuízo econômico às usinas hidrelétricas devido à obstrução das grades de tomada de água nos reservatórios. Dentre as espécies mais frequentes em reservatórios hidrelétricos brasileiros temos a *Pistia stratiotes* (Alface D'água), *Salvinia auriculata* (Orelha-de-Onça) e *Eichhornia crassipes* (Aguapé), sendo as três espécies que usualmente apresentam um crescimento excessivo (XAVIER, CAMPOS, RIBEIRO & MOTA, 2021). A *E. crassipes* e a *P. stratiotes* chegam a dobrar seu peso em 12 dias e podem alcançar produtividade de até 150 toneladas por hectare em apenas um ano (MANOZZO, 2016). Enquanto a *S. auriculata* foi responsável por cobrir 150000 m<sup>2</sup> do espelho d'água no braço Rio Grande em São Paulo e gerou um volume de biomassa nesta localidade de 1250m<sup>3</sup> a 2500m<sup>3</sup> no período de um ano (GONÇALVES, 2019).

Uma forma de controle do crescimento excessivo das espécies supracitadas nas usinas hidrelétricas é a sua remoção do corpo hídrico. Desta forma, as macrófitas podem ser aplicadas como fonte de matéria-prima para produção de bioetanol de segunda geração e do ponto de vista econômico, o estudo do potencial dessas espécies se torna então atrativo, por se tratar de um excesso de biomassa vegetal disponível a baixo custo.

A *Pistia stratiotes* é popularmente conhecida como Alface d'Água, Erva de Santa Luzia ou Lentilha d'Água. Tem sua origem em locais com clima tropical, subtropical e equatorial, é identificada como originária das Américas do Sul, do Norte e Central (MANOZZO, 2016). É uma planta flutuante que faz parte da família Araceae e se reproduz de forma sexuada ou assexuada, tendo preferência pela última forma, onde a reprodução ocorre por meio de estolhos, que são brotamentos laterais que soltam raízes para baixo e folhas para cima. Tem por característica ser um vegetal com maior investimento em biomassa da parte aérea do que nas raízes, ocupando rapidamente áreas com boa incidência de luz solar (RODRIGUES, 2016). Segundo Manozo (2016), a *P. stratiotes* é composta de 16,43% de celulose, 16,52% de hemicelulose e 15,70% de lignina.

A Orelha-de-Onça, como é conhecida a macrófita *Salvinia auriculata*, é muito presente principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. Pertence à família das Salviniaceae e é uma erva flutuante livre de ocorrência anual. Se propaga através de esporos ou por divisão da planta. No último caso, a parte submersa da planta desenvolve nós que se fragmentam do talo principal e cada um destes fragmentos carregam consigo até 5 brotos dormentes que se dispersam e dão origem a novas plantas. A *S. auriculata* pode dobrar sua biomassa em apenas 2 ou 3 dias (GONÇALVES, 2019). De acordo com Gonçalves (2019), a composição química, em base seca, da *S. auriculata* é de 10% de celulose, 22% de hemicelulose e 16% de lignina.

A *E. crassipes* é uma macrófita nativa da Amazônia, da família das Pontederiaceae, flutuante que pode ser encontrada na forma livre ou fixa. Se reproduz facilmente por via vegetativa, rizomas ou pequenos fragmentos e suas sementes podem sobreviver submersas por aproximadamente 15 anos. Seu tamanho está relacionado a concentração de nutrientes na água, ou seja, funciona como bioindicadora para ambientes eutrofizados. Esta é uma das espécies mais temidas por causar inúmeros problemas em função de sua rápida proliferação. A composição química desta espécie, rica em celulose, a torna uma matéria prima atraente para produção de energia de segunda geração. A Tabela II.1 mostra uma comparação com a composição química do bagaço de cana, a quantidade de lignina é bem inferior, o que é um aspecto positivo, uma vez que a lignina é um componente indesejado na biomassa (DUTRA, 2018). Segundo Teixeira *et al.* (2019), a composição química da biomassa seca da *E. crassipes* é composta de aproximadamente 25% de celulose, 35% de hemicelulose e 10% de lignina.

Tabela II. 1 - Comparação entre as composições químicas do bagaço de cana de açúcar e a macrófita aquática *E. crassipes*

<b>Biomassa</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Bagaço de Cana	36,0	26,0	20,0
<i>E. crassipes</i>	25,0	35,0	10,0

Fonte: Adaptado de DUTRA, 2018 e TEIXEIRA *et al.*, 2019

Namadi *et al.* (2013) avaliaram o teor de açúcares e o potencial para produção de etanol das biomassas de *Eichhornia crassipes* (Águapé), *Pistia stratiotes* (Alface d'Água) e *Salvinia molesta* (Salvinia Gigante). As plantas foram colhidas, lavadas, trituradas e secas separadamente em estufa a 105°C por 6 horas. Cada uma delas passou por hidrólise com ácido sulfúrico 10% e foi levada posteriormente para fermentação com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* (juntas e separadamente). A fermentação foi

conduzida à 30°C ao longo de 3 semanas. Foram coletadas amostras do meio de fermentação após 7 dias, 14 dias e 21 dias. As quantidades de glicose encontradas na *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. molesta* foram 0,08; 0,07 e 0,04 g/L enquanto para xilose foram obtidos os valores de 0,11; 0,09 e 0,07 g/L respectivamente. As biomassas com maior potencial para obtenção de etanol foram a *E. crassipes* e *P. stratiotes* que levaram a produção de 25 cm<sup>3</sup> de etanol, enquanto a *S. molesta* gerou 20 cm<sup>3</sup> após 21 dias de fermentação.

Pothiraj *et al.* (2014) analisaram a viabilidade do uso do Aguapé como substrato para a produção de etanol através de fermentação utilizando mono e co-cultura dos microorganismos *Trichoderma reesei* e *Fusarium oxysporum* com *Pichia stipitis*. No processo separado de sacarificação e fermentação, a biomassa, que passou pelo pré-tratamento alcalino, foi sacarificada pelas enzimas da *T. reesei* e *F. oxysporum* e fermentada pela *P. stipitis*, resultando em um rendimento baixo, de 0,344 g/g de etanol em 96h. Já a sacarificação e fermentação simultânea utilizando co-culturas de *T. reesei* e *P. stipitis* se mostrou um processo promissor com rendimento de 0,411 g/g de etanol em 60h.

Em seu estudo, Bronzato (2016) avaliou de forma comparativa algumas rotas de produção de etanol de segunda geração a partir do Aguapé. Para o pré-tratamento avaliou-se a auto hidrólise, hidrólise com peróxido de hidrogênio, hidrólise com ácido sulfúrico e com ácido acético. Além disso, também foi comparado o desempenho das tecnologias de hidrólise enzimática simultânea ou separada do processo de fermentação. Determinou-se que o pré-tratamento mais eficiente foi o realizado com ácido sulfúrico e que a hidrólise enzimática e fermentação simultânea é o processo de maior produtividade, com rendimento final de 110 L/t de etanol/Aguapé seco.

Zhang *et al.* (2016) utilizaram o Aguapé como substrato para fabricação de etanol de segunda geração em seu estudo, e constataram que o processo mais efetivo foi a combinação de pré-tratamento ácido com hidrólise enzimática e sacarificação e fermentação simultânea. O estudo propôs um modelo para otimizar as condições de fermentação, e de acordo com este modelo o processo foi conduzido a 38,87°C, por 81,87h e obteve por resultado a produção de 402,93 mg de açúcares redutores e 1,289 g/L de etanol.

Teixeira (2019) estudou a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa de Aguapé e constatou o melhor desempenho do pré-tratamento ácido no processo de sacarificação obtendo 46,16% de rendimento na conversão de açúcares redutores. Combinado a este pré-tratamento, a sacarificação e fermentação separadas demonstraram maior eficiência, quando comparadas com sacarificação e fermentação simultânea, levando à obtenção de 2,62

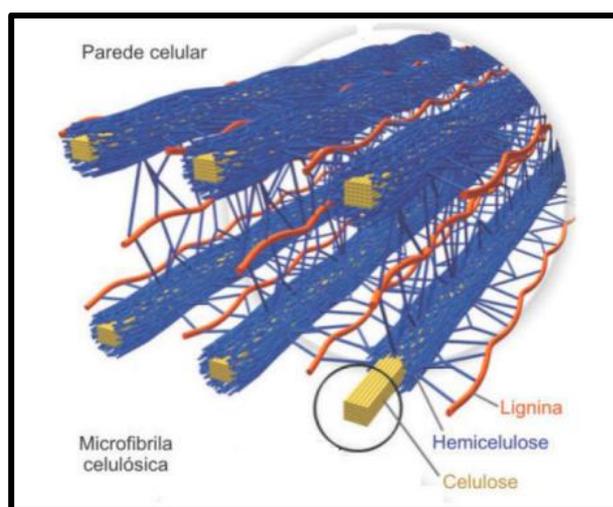
g/L de álcool no mosto fermentado. O microorganismo utilizado neste trabalho foi a *Saccharomyces cerevisiae*.

Whangchai *et al.* (2021) compararam os resultados da utilização da biomassa de Alface d'Água (*P. stratiotes*), fresca e seca, para produção de etanol de segunda geração. Foi feito o pré-tratamento com ácido sulfúrico e, posteriormente, com hidróxido de sódio. Em seguida, o material passou pela hidrólise enzimática, durante 24 horas, com adição de 1% de celulase. Por fim, foi adicionado 1% do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* previamente preparado e iniciou-se a fermentação, conduzida à 30°C por 72 horas. Os experimentos revelaram que o maior teor de açúcares totais ( $11,350 \pm 0,09\%$ ), açúcares redutores ( $4,773 \pm 0,15\%$ ) e etanol (15,385 g/L) foi obtido para a biomassa seca e pré-tratada.

## II.2 – Composição estrutural dos materiais lignocelulósicos

É conhecido como material lignocelulósico toda biomassa de origem vegetal ou resultante de seu processamento, bem como aquela produzida por resíduos agroindustriais. A estrutura destes materiais, ilustrada na Figura II.1, é composta por uma rede complexa e resistente formada, principalmente, por celulose (30% a 50%), hemicelulose (15% a 35%) e lignina (10% a 30%) (RODRIGUES *et al.*, 2017), presentes na parede celular vegetal.

Figura II. 1 - Estrutura lignocelulósica de uma biomassa vegetal



Fonte: CORDEIRO, 2016

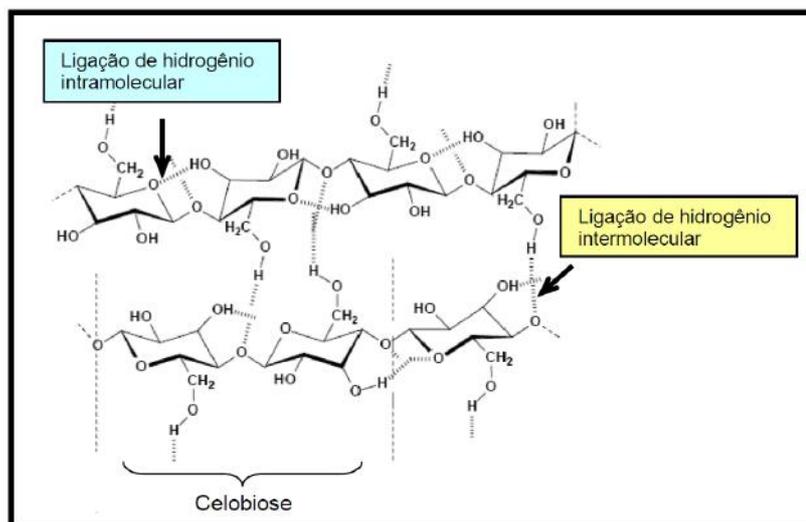
As cadeias de celulose, principal componente destes materiais, ficam ligadas entre si através de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares, e formam, juntas, as fibrilas elementares (com cerca de 36 cadeias) com larguras de 3 a 4 nm. A hemicelulose, um

polissacarídeo, tem o papel de unir as fibrilas de celulose umas às outras, através de ligações complexas. Por fim, estas duas estruturas são cobertas pela lignina, um polímero aromático, que se liga à celulose e à hemicelulose através de ligações covalentes.

## II.2.1 – Celulose

A celulose é um polissacarídeo, linear, cuja unidade básica de repetição é um dímero de glicose, conhecido como celobiose (CORDEIRO, 2016). Sua função principal é conferir forma e suporte às células vegetais, além de proteção. Suas unidades são ligadas entre si através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, que conferem a estas moléculas formas tridimensionais. Além disso, conforme exibido na Figura II.2, alguns grupos hidroxila dos monômeros podem formar ligações de hidrogênio com hidroxilas de outras moléculas de celulose, conferindo consistência às cadeias unitárias, ou podem ainda formar ligações intramoleculares, responsáveis pelo alto grau de cristalinidade, insolubilidade em água e rigidez, particulares desta molécula (DUTRA, 2018).

Figura II. 2 - Estrutura de uma molécula de celulose



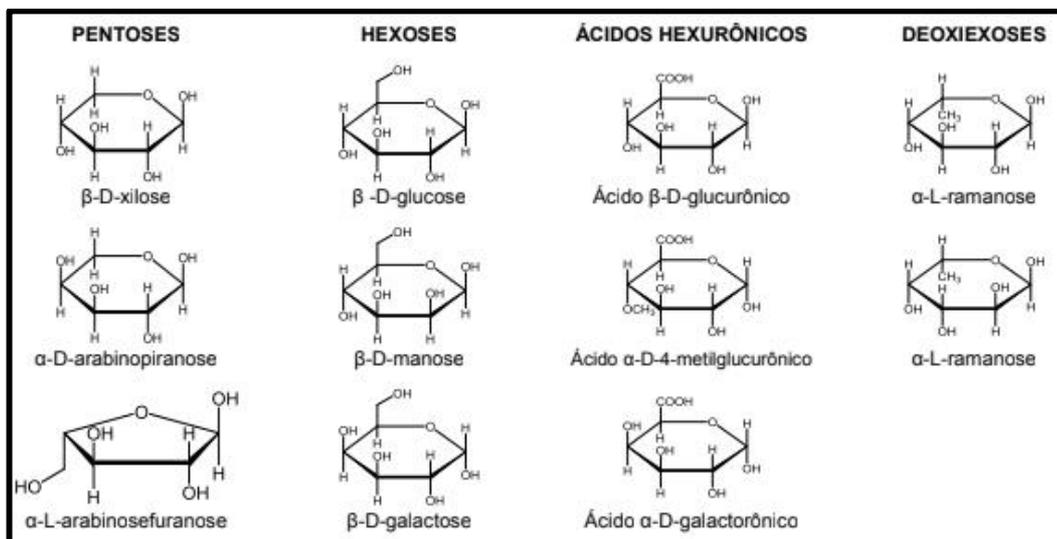
Fonte: VIANA, 2017

## II.2.2 – Hemicelulose

As hemiceluloses são também polissacarídeos, mas diferente da celulose, trata-se de heteropolímeros, compostos por pentoses, hexoses, além de desoxiaçúcares e ácidos urônicos (RODRIGUES *et al.*, 2017). Os monômeros que compõem, em proporções variadas, essas polioses são:  $\beta$ -D-xilose,  $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -L-arabinose,  $\alpha$ -L-galactose, ácido-  $\beta$ -D-

glicourônico, ácido-  $\beta$ -D-galactourônico e ácido- $\alpha$ -D-4-metilglicourônico e estão apresentados na Figura II.3 (LINO, 2015). O teor e a proporção dos monômeros que compõem as hemiceluloses é uma característica que varia de acordo com a origem e espécie de cada vegetal.

Figura II. 3 - Fórmulas dos açúcares componentes das hemiceluloses



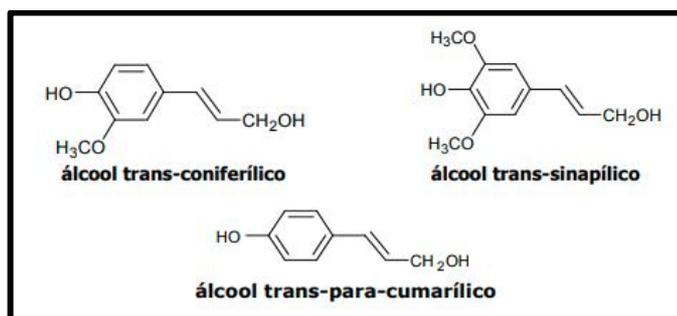
Fonte: CORDEIRO, 2016

Possuem cadeias de peso molecular relativamente baixo (polimerização inferior a 200), amorfas, que podem ser lineares ou ramificadas. Em virtude disso, são mais suscetíveis à hidrólise química, sob condições mais brandas, ou seja, sua degradação é mais fácil do que a da celulose.

### II.2.3 – Lignina

A lignina é o componente não polissacárido mais abundante da lignocelulose. Trata-se de uma molécula formada pela polimerização de três monômeros de fenil-propano: álcool p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, ilustrados na Figura II.4. Estas unidades aromáticas são também conhecidas como grupo p-hidroxifenil (H), guaiacil (C) e siringil (S) e são caracterizadas por possuírem nenhum, um ou dois grupos metoxil, respectivamente.

Figura II. 4 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina



Fonte: OLIVEIRA, 2010

É uma macromolécula complexa, heterogênea, hidrofóbica, de estrutura tridimensional e altamente ramificada, que possui várias ligações cruzadas, sendo responsável pela resistência da parede celular dos vegetais ao impacto, compressão e dobra. (OLIVEIRA, 2010).

Na parede celular dos vegetais, as unidades de fenil-propano se ligam aos resíduos de ácido glicourônico e arabinose das xilanas, que são um tipo de hemicelulose, formando uma matriz que envolve a celulose e dificulta a degradação química e/ou biológica (LEMOS, 2001 *apud* OLIVEIRA, 2010).

### II.3 – Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Como já relatado nos capítulos anteriores, a biomassa lignocelulósica é formada principalmente por componentes de estrutura complexa, com partes altamente cristalinas e ligações fortes, que conferem rigidez ao material. Desta forma, a etapa de pré-tratamento tem o papel fundamental de tornar os açúcares presentes na matéria-prima disponíveis para as etapas de hidrólise e fermentação. As principais finalidades desta etapa são a ampliação da parte amorfa da celulose, tornando sua estrutura menos cristalina, a solubilização da hemicelulose e a desagregação da matriz de lignina (DUTRA, 2018; GARSTKA, 2019; CORDEIRO, 2016). Além destes objetivos, o pré-tratamento também visa aumentar a área superficial da biomassa e evitar a formação de compostos inibidores do processo subsequente de fermentação (CORDEIRO, 2016).

Os métodos de pré-tratamento se dividem em químicos, físicos, físico-químicos e biológicos. Muitas vezes estes métodos são aplicados de forma combinada, a depender do tipo e origem de biomassa lignocelulósica na qual são empregados.

O pré-tratamento biológico se apresenta como uma alternativa ao pré-tratamento químico para alterar a estrutura dos materiais lignocelulósicos. Geralmente, microrganismos

que degradam a madeira como fungos de podridão branca, parda ou macia, são empregados neste tipo de pré-tratamento. Este método proporciona degradação da lignina e hemicelulose, tornando a biomassa mais susceptível à hidrólise (CANILHA *et al.*, 2012).

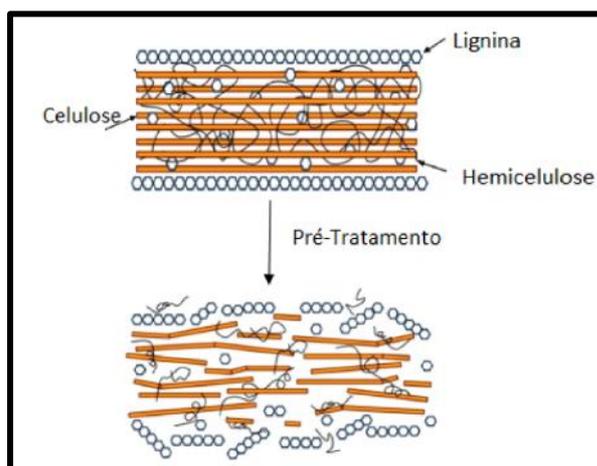
Os pré-tratamentos físicos são de natureza mecânica (moagem, trituração, pirólise), podem ser utilizados, embora sejam desfavoráveis do ponto de vista energético, com foco na redução do tamanho das partículas, aumentando sua superfície de contato, redução da cristalinidade e remoção parcial da hemicelulose (DUTRA, 2018).

Os pré-tratamentos físico-químicos são os que unem a ação de agentes químicos, como ácidos, bases ou até mesmo água, com processos físicos que incluem altas temperaturas, pressões elevadas, ultrassom. O princípio é aumentar a área superficial da biomassa e promover sua hidrólise total ou parcial. Os pré-tratamentos físico-químicos mais utilizados são explosão a vapor, tratamento com água quente (LHW), explosão com CO<sub>2</sub> e explosão com SO<sub>2</sub> (RODRIGUES, *et al.*, 2017; TAHERZADEH & KARIMI, 2007b).

Os pré-tratamentos químicos incluem a ozonólise, deslignificação oxidativa, processo organossolv, além dos pré-tratamentos ácidos ou alcalinos, que são utilizados em maior escala.

A Figura II.5 ilustra, de forma esquemática, o estado da biomassa lignocelulósica antes e depois do pré-tratamento, com seus componentes devidamente separados.

Figura II. 5 - Material lignocelulósico antes e depois do pré-tratamento



Fonte: VIANA, 2017

### II.3.1 – Pré-tratamento ácido

O tratamento com ácido é um dos mais estudados e eficientes e visa a pré-hidrólise da fração hemicelulósica, levando à obtenção da xilose, em maior proporção, e de glicose e

arabinose em quantidades menores. O ácido sulfúrico é o mais comumente empregado neste processo, mas também podem ser utilizados os ácidos clorídrico, nítrico ou fosfórico. Em geral, este processo é conduzido com ácido diluído e sob condições brandas de temperatura (até 120°C), para minimizar a formação de ácido acético e furfural, subprodutos inibidores do processo de fermentação (RODRIGUES *et al.*, 2017). Após este processo, ocorre um aumento da susceptibilidade da celulose ao processo subsequente de hidrólise, porém a remoção da lignina não é significativa.

### **II.3.2 – Pré-tratamento alcalino**

O pré-tratamento com álcalis tem como principal objetivo a disponibilização das frações celulósica e hemicelulósica através da deslignificação. Os agentes alcalinos promovem a hidrólise da lignina, através de sua desestruturação e inchaço das fibras. Com isso, a superfície interna da celulose aumenta e seu grau de polimerização e cristalinidade diminuem (DUTRA, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2017). Podem ser utilizados hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio ou amônia neste pré-tratamento, porém o hidróxido de cálcio tem se mostrado o mais efetivo, além de ter o menor custo. A amônia tem se mostrado seletiva na solubilização da lignina e vantajosa pela facilidade de recuperação (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Assim como no caso do pré-tratamento ácido, há que se cuidar para que se utilizem as condições ótimas de temperatura, concentração e tempo, de forma a minimizar formação de ácido acético, agente tóxico para as leveduras produtoras de etanol da fermentação.

### **II.4 – Hidrólise de materiais lignocelulósicos**

Após o pré-tratamento, com a quebra das estruturas lignocelulósicas, as cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose ficam disponíveis para passar pela próxima etapa do processo de obtenção de etanol: a hidrólise. A lignina segue como um subproduto do processo.

Nesta etapa, as ligações de hidrogênio dos carboidratos poliméricos oriundos da biomassa lignocelulósica são quebradas e estes são convertidos em açúcares mais simples, capazes de serem fermentados e convertidos a etanol.

A hidrólise da celulose leva a produção de glicose, cujo processo fermentativo é de amplo conhecimento, sendo realizado por séculos, enquanto a hidrólise da hemicelulose produz uma mistura de açúcares que inclui xilose, arabinose, galactose, manose e glicose.

Existem alguns métodos que podem ser utilizados na hidrólise da celulose e da hemicelulose, mas os mais usualmente utilizados são divididos em dois grupos: hidrólise

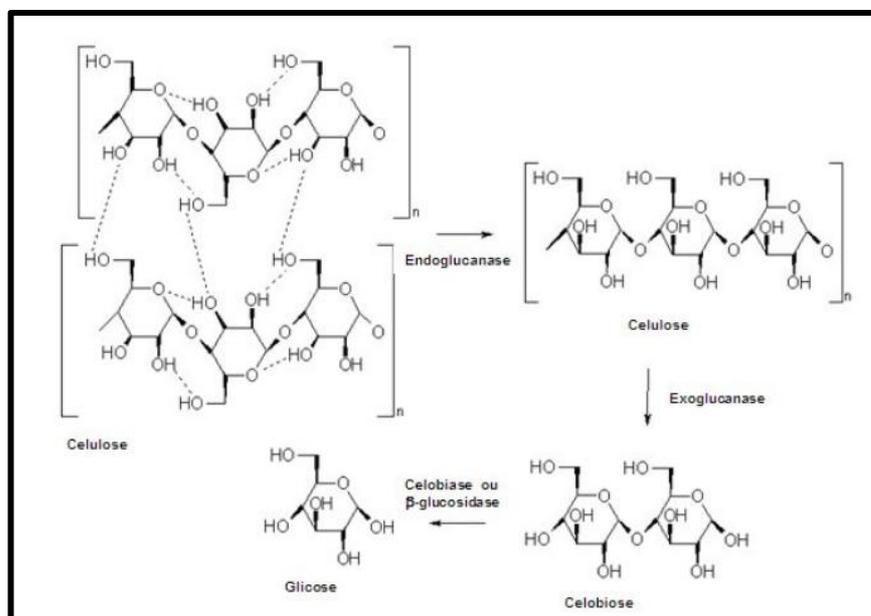
química (hidrólise ácida) e hidrólise enzimática. Existe ainda a possibilidade de hidrólise por irradiação de feixe de elétrons, irradiação de raios gamma ou ainda irradiação de micro-ondas; mas estes processos ainda não são aplicados comercialmente (TAHERZADEH & KARIMI, 2007a; DEMIRBAS, 2005).

#### II.4.1 – Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose ocorre através da ação de enzimas bastante específicas conhecidas como celulasas e hemicelulasas (glicosehidrolases).

De maneira resumida, o processo se inicia com a enzima se adsorvendo à superfície da celulose, degradando-a à açúcares fermentescíveis e termina com a dessorção da enzima. Participam deste processo três tipos de celulasas: as exo-1,4-β-D-glicanases, que atuam nas extremidades da molécula de celulose removendo unidades de celobiose; as endo-1,4-β-D-glicanases, que atacam as regiões de menor cristalinidade no meio da cadeia de celulose; e a 1,4-β-D-glicosidases, que hidrolisam as celobioses formando glicose. A Figura II.6 exhibe um esquema da degradação da celulose em glicose (TAHERZADEH & KARIMI, 2007b).

Figura II. 6 - Hidrólise enzimática da celulose



Fonte: MALBURG et al., 1992 apud VIANA, 2017

Além das celulasas, pode ser necessário a adição de enzimas hemicelulasas, um conjunto que engloba quatro enzimas. Como a hemicelulose é uma molécula mais heterogênea,

a atuação das enzimas também acontece de forma mais complexa do que no caso da celulose. As endo-1,4- $\beta$ -D-xilanas que hidrolisam as ligações no meio da cadeia de xilanas (pentanas formadas por unidades de D-xiloses); as 1,4- $\beta$ -D-xilosidases que atacam as extremidades das cadeias de xilanas, liberando xiloses; endo-1,4- $\beta$ -D-mananas que quebram as ligações internas nas cadeias de mananas; e as 1,4- $\beta$ -D-manosidases, que atuam nas extremidades das mananas gerando as manoses. Por fim, as enzimas responsáveis por remover as ramificações:  $\alpha$ -D-galactosidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\alpha$ -D-glucuronidases, acetil xilana esterases e feruloil esterases (CANILHA *et al.*, 2010).

O processo hidrólise enzimática ocorre sob condições bem controladas de temperatura (40°C-50°C) e pH (4,5-5,0). Em função das condições brandas, não é preciso lidar com questões de corrosão ou com a degradação dos açúcares formados (TAHERZADEH & KARIMI, 2007b).

Uma dificuldade no processo de sacarificação enzimática está relacionada ao acúmulo de glicose de outros polissacarídeos, produtos do processo, que em excesso inibem a atuação das enzimas e levam a um menor rendimento na obtenção dos açúcares. Além disso, os custos com as enzimas são altos e o tempo de reação costuma ser longo quando comparado à hidrólise realizada pela rota química.

#### **II.4.2 – Hidrólise ácida**

A hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos é um processo relativamente antigo, que consiste na obtenção dos monômeros da celulose e da hemicelulose ao submeter a biomassa ao contato com uma solução ácida, por determinado período de tempo, em uma temperatura específica.

Podem ser utilizados tanto ácido clorídrico quanto sulfúrico neste processo, sendo este último o mais empregado por questões ambientais que envolvem uso do ácido clorídrico. E o ácido pode ser utilizado diluído ou concentrado, com condições específicas de operação.

A hidrólise com ácido concentrado (30% a 70%) é conduzida em condições brandas de temperatura (aproximadamente 40°C) e pressão (DEMIRBAS, 2005). Em contrapartida, os tempos de reação são, em geral, maiores quando comparados ao processo que utiliza ácido diluído. Os rendimentos obtidos na obtenção de açúcar, utilizando-se ácido concentrado, costumam ser bem altos e, conseqüentemente, também são obtidos bons rendimentos para a fabricação de etanol. As condições mais brandas também levam a menores índices de

degradação dos açúcares, formando menos produtos que prejudicam a etapa posterior de fermentação.

Apesar das vantagens, este processo não tem sido tão desenvolvido, por ser relativamente lento e custoso. A recuperação do ácido envolve sistemas de alto custo e a opção de não o recuperar implica na formação de grandes quantidades de sulfato de cálcio, cuja disposição também geraria despesas extras.

O método mais utilizado é o da hidrólise com ácido diluído (concentrações da ordem de 1%). Neste caso, o processo é realizado sob condições severas de temperatura e pressão com tempos de reação de apenas alguns minutos ou até mesmo segundos. A grande desvantagem deste método é que a alta temperatura e pressão levam a degradação dos açúcares formados, fato que não apenas diminui o rendimento de açúcares, mas, principalmente, leva a obtenção de subprodutos indesejados.

Taherzadeh *et al.* (1997, *apud* TAHERZADEH & KARIMI, 2007a) conduziram um estudo para avaliar a cinética da reação de hidrólise utilizando ácido sulfúrico diluído (0,5%) em apenas um estágio, com temperaturas entre 188 e 234°C e um tempo de retenção de 7 minutos. Foi constatado que mais de 80% da hemicelulose foi hidrolisada a menos de 200°C, enquanto o maior rendimento da obtenção de glicose foi atingido a partir de 220°C. Assim, é possível minimizar a degradação dos açúcares dividindo-se o processo em dois estágios: o primeiro conduzido a temperaturas menores para obtenção de pentoses e o segundo estágio em condições mais severas para obtenção de hexoses.

A Tabela II.2 mostra uma rápida comparação entre os dois métodos de hidrólise.

Tabela II.2: Comparação entre hidrólise ácida e enzimática

<b>Parâmetro</b>	<b>Hidrólise ácida</b>	<b>Hidrólise enzimática</b>
Pré-tratamento	Pode ser necessário	Necessário
Taxa de hidrólise	Rápida (min.)	Lenta (h)
Temperatura	Alta (200 °C)	Baixa (45 °C)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	Depende do material e dos detalhes do Processo	Depende do material e dos detalhes do processo
Formação de subprodutos	Provável formação	Não há formação

Fonte: KRISHNA *et al.*, 2000 *apud* CORDEIRO, 2016

## II.5 – Fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos

### II.5.1 – Fermentação de hidrolisados hemicelulósicos

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico no qual microrganismos se nutrem de açúcares fermentescíveis gerando etanol e outros subprodutos.

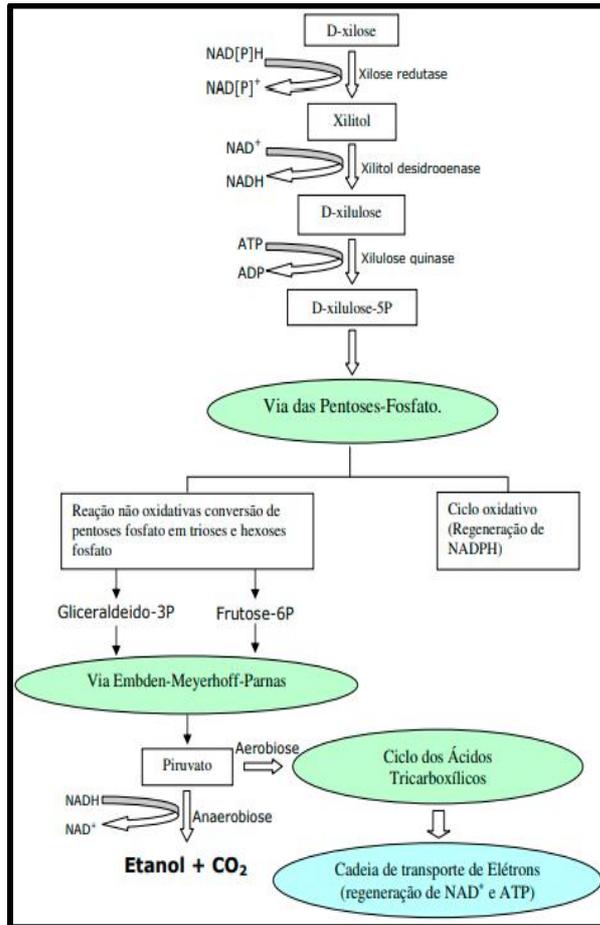
A fermentação de hidrolisados hemicelulósicos requer que o microrganismo utilizado no processo seja capaz de fermentar hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) e ainda ser tolerante aos agentes inibitórios como ácidos fracos, furaldeídos e compostos fenólicos.

Um dos maiores desafios nesta área de pesquisa tem sido a fermentação da xilose em escala industrial. A *Saccharomyces cerevisiae*, o microrganismo mais utilizado comercialmente para produção de etanol a partir da fermentação por possuir alta resistência aos inibidores, não é capaz de metabolizar as pentoses, que são os principais açúcares gerados na hidrólise da hemicelulose.

Existe uma grande variedade de leveduras, fungos e bactérias capazes de metabolizar pentose, porém apenas alguns são capazes de realizar a fermentação da xilose levando-a a etanol de forma eficiente em escala industrial. *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), *Candida guilliermondii*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* são exemplos de microrganismos capazes de consumir pentoses (CANILHA *et al.*, 2012).

Este processo consiste na conversão da xilose a xilitol pela ação da enzima D-xilose reductase (XR), na presença de NADH e/ou NADPH. Em reação subsequente o xilitol é levado à D-xilose pela ação do xilitol desidrogenase (XDH) em conjunto com as coenzimas NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>. A D-xilose é então fosforilada à D-xilose-5-fosfato em reação catalisada pela xilose quinase, com consumo de ATP. A D-xilose-5-fosfato pode ser convertida, através de reações não-oxidativas da via das pentoses, à gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Estes últimos são convertidos a piruvato através da via Embden-Meyerhoff-Parnas (PARAJÓ, DOMINGUEZ & DOMFNGUEZ, 1998). Em condições de baixa oxigenação o piruvato é levado à etanol pelas enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, com consumo de NADH. Em presença de oxigênio, o piruvato é oxidado através do ciclo de Krebs na cadeia respiratória (CARVALHO, 2009). A Figura II.7 ilustra, de maneira esquemática, o processo descrito.

Figura II. 7 - Metabolismo da xilose em leveduras



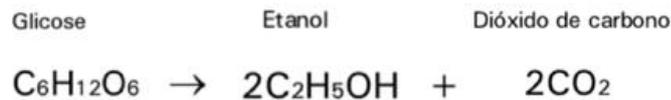
Fonte: CARVALHO, 2009

## II.5.2 – Fermentação de hidrolisados celulósicos

A hidrólise da parte celulósica da biomassa leva à formação de moléculas de glicose que, como já mencionado anteriormente, é um açúcar passível de ser convertido diretamente a etanol pela ação de uma variedade grande microrganismos, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o mais amplamente utilizado.

Teoricamente, 100g de glicose deve levar à formação de 51,1g de etanol e 48,9g de dióxido de carbono. Na prática, o rendimento desta reação nunca chega a 100%, pois parte da glicose é utilizada pelo microrganismo para crescimento celular.

Figura II. 8 - Reação global de conversão da glicose a etanol



Fonte: Elaborada pelas autoras

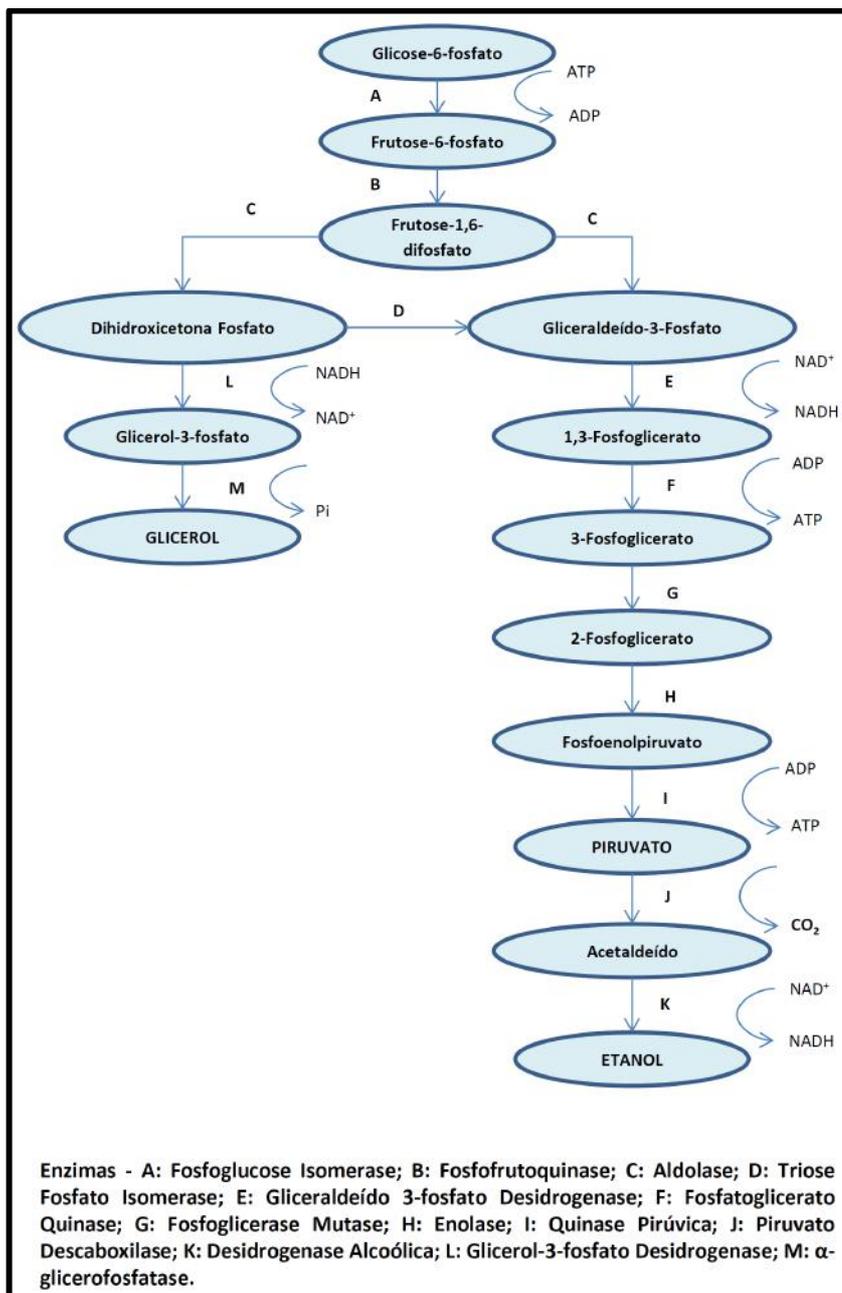
A transformação ilustrada, de forma global, na Figura II.8, envolve, na verdade, 12 reações, catalisadas por enzimas chamadas de enzimas glicosídicas. Estas enzimas são sensíveis a diversos fatores como pH, temperatura, concentração de nutrientes, presença de inibidores, entre outros, que podem interferir no processo de fermentação, estimulando-o o reprimindo-o.

Um dos fatores que contribuem para a *S. cerevisiae* ser a levedura mais utilizada neste processo ao longo da história é o fato de que este microrganismo tem se mostrado bastante resistente à presença de inibidores e a variações de temperatura. Além disso, é um aeróbio facultativo, ou seja, se ajusta tanto a condições de aerobiose quanto de anaerobiose. Na presença de oxigênio, o açúcar é convertido em biomassa,  $CO_2$  e  $H_2O$ , enquanto na ausência de oxigênio ocorre o processo conhecido como fermentação, onde o açúcar é transformado em etanol e  $CO_2$ .

A principal rota metabólica envolvida na fermentação, e exibida na Figura II.9, é a glicólise, via pela qual a molécula de glicose é transformada em duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico), por uma série de reações que incluem transferência de fosfato, oxidação-redução, descarboxilação e isomerização. O ácido pirúvico sofre então descarboxilação, pela enzima piruvato-descarboxilase, formando acetaldeído e gás carbônico. Em seguida, o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da enzima álcool-desidrogenase na presença da coenzima NADH (FURLAN, 2009).

O principal objetivo da metabolização do açúcar pela levedura é a geração de energia sob forma de ATP (adenosina trifosfato), que ocorre quando duas moléculas de 1,3-difosfoglicerato são convertidas em piruvato. O etanol, assim como o  $CO_2$ , resultantes deste processo constituem, tão somente, produtos de excreção sem utilidade para célula em anaerobiose. Estes produtos podem, no entanto, ser utilizados pela célula em condições de aerobiose para geração de mais ATP e biomassa (CARVALHO, 2009; LIMA *et al.*, 2001).

Figura II. 9 - Via glicolítica, biossíntese de glicerol e conversão do piruvato a etanol



Fonte: VIANA, 2017

## II.6 – Estratégias para produção de etanol de segunda geração

### II.6.1 – Hidrólise enzimática e fermentação separadas (SHF)

Neste processo, a matéria lignocelulósica pré-tratada é hidrolisada e subsequentemente fermentada a etanol, em unidades separadas.

Como, quase sempre, as melhores condições necessárias para cada um dos processos são diferentes, a grande vantagem desta estratégia é a possibilidade de conduzir a hidrólise e a

fermentação em suas condições ótimas. A desvantagem principal é que o acúmulo de açúcares leva à inibição da atividade das enzimas que realizam a hidrólise. Outra desvantagem é a contaminação. O processo de hidrólise é relativamente longo (1-4 dias), e a solução diluída de açúcares é bastante suscetível à contaminação por microrganismos. As próprias enzimas podem ser uma possível fonte de contaminação (TAHERZADEH & KARIMI, 2007b).

### **II.6.2 – Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)**

Uma das estratégias mais bem-sucedidas para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é a combinação da hidrólise enzimática da celulose com a fermentação em apenas uma etapa, a qual é conhecida como sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A fermentação das pentoses segue sendo realizada em reator separado.

Neste processo, a glicose produzida a partir da hidrólise da celulose é imediatamente consumida pelo microrganismo responsável pela fermentação. Desta forma, as concentrações de açúcares no meio são mantidas sempre baixas, evitando o efeito inibitório que ocorre na SHF. Os riscos de contaminação no caso de uso desta estratégia também são bem reduzidos, em razão da presença de etanol no meio.

Comparando-se com a produção de etanol pelo método SHF, o método SSF apresenta maiores rendimentos. As quantidades de enzimas e de reatores são menores também, o que torna este método mais vantajoso do ponto de vista econômico.

A desvantagem deste método reside no desafio de encontrar as condições ótimas de processo que funcionem bem tanto para a hidrólise enzimática quanto para a fermentação. A *S. cerevisiae* torna-se praticamente inativa à 40°C, enquanto a maioria das celulasas tem seu ponto ótimo de funcionamento entre 45°C e 50°C (TAHERZADEH & KARIMI, 2007b).

### **II.6.3 – Sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF)**

Uma outra possibilidade é a sacarificação e cofermentação simultâneas, onde cofermentação refere-se à fermentação de pentoses e hexoses a etanol.

O processo SSCF é considerado uma evolução do processo SSF, uma vez que nele, glicose e xilanas são fermentadas juntas em um mesmo reator, pelo mesmo microrganismo. Como não existe nenhum organismo capaz de metabolizar eficientemente tanto pentoses quanto hexoses, todos os registros de processos que utilizam essa estratégia envolvem o desenvolvimento de microrganismos recombinantes, o que implica em altos custos.

#### **II.6.4 – Biorprocessamento consolidado (CBP)**

Para todos os processos descritos até o momento, as enzimas são obtidas a partir de fontes externas. No biorprocessamento consolidado, o etanol, bem como todas as enzimas necessárias, é produzido em um único biorreator por uma única comunidade microbiana (TAHERZADEH & KARIMI, 2007b).

Ainda não existem registros de organismos, ou combinações de microrganismos, capazes de produzir celulasas e outras enzimas nas quantidades requeridas para o processo, e ainda produzirem etanol em concentrações e rendimento satisfatório e por isso, os organismos utilizados neste tipo de processo são obtidos a partir de engenharia genética.

## Capítulo III – Materiais e Métodos

### III.1 – Matéria-prima

Para o presente estudo foi utilizada como matéria-prima uma mistura de macrófitas aquáticas moída (Figura III.1), composta pelas espécies *Pistia stratiotes* (Alface D'água), *Salvinia auriculata* (Orelha-de-Onça) e *Eichhornia crassipes* (Aguapé). Não se sabe ao certo a composição exata da mistura, pois a mesma foi fornecida pela hidrelétrica Engenheiro Souza Dias (Jupia) – propriedade da CTG Brasil, localizada no rio Paraná entre as cidades de Andradina e Castilho (SP) e Três Lagoas (MS) - sem maiores especificações.

Figura III. 1 - Matéria-prima usada na pesquisa composta por uma mistura de macrófitas aquáticas



Fonte: Elaborada pelas autoras

#### III.1.1 – Determinação de celulose, hemicelulose, lignina e cinza (Adaptado de Ververis *et al.*, 2007; Sluiter *et al.*, 2005)

A caracterização da matéria-prima utilizada em relação a sua composição contribui para avaliação do potencial das macrófitas na produção de etanol de segunda geração. O procedimento para a determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foi realizado conforme descrito abaixo em triplicata.

Inicialmente executou-se o preparo das membranas de vidro para garantir que estivessem livres de impurezas. Para tal, o material foi lavado com 15 mL de água destilada, fazendo círculos do centro até a borda. Em seguida, as membranas foram dispostas em cadinhos de alumínio (Figura III.2) e secas em mufla a 575°C por 1 hora. Após esse período, o conjunto, cadinho e membrana, foi colocado em dessecador para resfriar até temperatura ambiente. Por fim, o conjunto foi pesado e sua massa registrada ( $m_0$ ).

Figura III. 2 - Conjunto cadinho e membrana após procedimento de limpeza



Fonte: Elaborada pelas autoras

Pesaram-se cerca de 200 mg da parte bem fina da matéria-prima em erlenmeyers de 125 mL. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, 3 mL de ácido sulfúrico 72% ao recipiente que foi cuidadosamente agitado até que a amostra e o ácido estivessem homogeneizados.

O erlenmeyer contendo a mistura foi incubado a 30°C por uma hora e agitado cuidadosamente a cada 10 minutos. Após a incubação, o ácido foi diluído através da adição de 84 mL de água deionizada e, em seguida, o conteúdo foi autoclavado a 121°C durante 1 hora.

Depois de resfriado a temperatura ambiente, o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado com um conjunto de filtração milipore (Figura III.3) contendo as membranas de vidro previamente taradas e o resíduo lavado com água destilada para remover todo o hidrolisado.

Figura III. 3 - Conjunto de filtração milipore



Fonte: Elaborada pelas autoras

O resíduo sólido contido na membrana de vidro foi seco em estufa a 100°C por 24 horas. Imediatamente depois, o conjunto foi pesado ( $m_1$ ) e, posteriormente, levado a mufla a 550°C durante 5 horas. Findo este período, o conjunto foi disposto em dessecador para que atingisse a temperatura ambiente e, em seguida, pesado ( $m_2$ ).

O hidrolisado obtido na filtração foi neutralizado com hidróxido de cálcio para pH entre 5,5 e 6,0. O resíduo sólido gerado foi filtrado com o auxílio de um funil de buchner (Figura III.4) e lavado com água destilada, enquanto o filtrado transferido para um balão volumétrico de 200 mL e avolumado com água destilada.

Figura III. 4 - Conjunto de filtração com funil de Buchner



Fonte: Elaborada pelas autoras

A solução obtida foi encaminhada para análise, onde determinou-se a concentração de glicose ( $C_g$ ) e açúcares redutores totais ( $C_{at}$ ) de acordo com os métodos enzimáticos de glicose oxidase (Kit Enzimático Bioclin) e DNS (MILLER, 1959), respectivamente.

De acordo com os dados obtidos nas triplicatas, utilizou-se as fórmulas abaixo para calcular o teor médio de cada componente.

$$\text{Celulose (\%m/m)} = \frac{0,90}{0,96} \cdot C_g \cdot \frac{v}{m} \cdot \alpha \cdot 100$$

Onde,

0,90 = Coeficiente que resulta da relação entre o peso molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,96 = Rendimento de sacarificação;

$C_g$  = Concentração de glicose no hidrolisado neutralizado (g/L)

$v$  = Volume total da solução de açúcar (L)

$m$  = Peso da amostra seca (g)

$\alpha$  = Diluição da amostra (se houver)

$$\text{Hemicelulose (\%m/m)} = \frac{0,88}{0,93} \cdot (C_{at} - C_g) \cdot \frac{v}{m} \cdot \alpha \cdot 100$$

Onde,

0,88 = Coeficiente que resulta da relação entre o peso molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,93 = Rendimento de sacarificação;

$C_g$  = Concentração de glicose no hidrolisado neutralizado (g/L)

$C_{at}$  = Concentração de açúcares redutores totais no hidrolisado neutralizado (g/L)

$v$  = Volume total da solução de açúcar (L)

$m$  = Peso da amostra seca (g)

$\alpha$  = Diluição da amostra (se houver)

$$\text{Cinza (\%m/m)} = \frac{(m_2 - m_0)}{m} \cdot 100$$

Onde,

$m_2$  = massa do conjunto (cadinho e membrana) após filtração e calcinação (g)

$m_0$  = massa do conjunto (cadinho e membrana) após lavagem e calcinação (g)

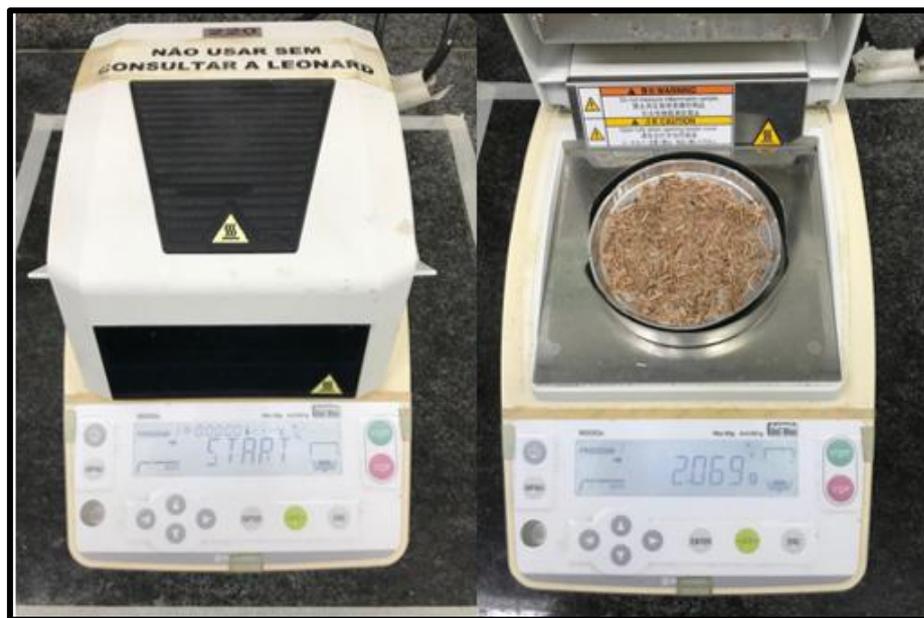
$m$  = Peso da amostra seca (g)

$$\text{Lignina (\%m/m)} = 100 - (\text{Celulose (\%m/m)} + \text{Hemicelulose (\%m/m)} + \text{Cinza (\%m/m)})$$

### **III.1.2 – Determinação do teor de umidade**

Para a determinação do teor de umidade da mistura das macrófitas aquáticas foi utilizada uma balança termogravimétrica da Shimadzu modelo MOC63c, exposta na Figura III.5.

Figura III. 5 - Balança termogravimétrica



Fonte: Elaborada pelas autoras

A temperatura de análise definida foi de 160°C e o limite de variação do teor de umidade em 30 segundos foi de 0,05%.

Primeiramente, um prato de alumínio descartável vazio foi inserido na balança para que o mesmo fosse tarado. Posteriormente, adicionaram-se dois gramas da amostra no prato de forma bem distribuída, formando uma fina camada sobre o mesmo. Em seguida, a balança foi fechada para que a análise pudesse ser iniciada. Ao finalizar a análise, a balança emite um sinal sonoro. O teor de umidade determinado foi registrado e o procedimento repetido por mais duas vezes.

## III.2 – Hidrólise da Matéria-prima

Para a produção de bioetanol a partir de uma matéria-prima lignocelulósica foi proposta uma rota química que consiste na hidrólise da hemicelulose, lignina e celulose de forma a disponibilizar os açúcares para fermentação.

### III.2.1 – Hidrólise da Hemicelulose

O pré-tratamento da mistura das macrófitas aquáticas se iniciou com a hidrólise da fração hemicelulósica. Para tal, optou-se por um tratamento ácido onde cerca de um quilo de resíduo moído foi misturado a uma solução diluída de ácido sulfúrico preparada com 0,8% m/m

de  $H_2SO_4$  em relação à massa seca de biomassa. A relação mássica de sólido:líquido (biomassa seca:solução de tratamento) usada foi de 1:4.

Para garantir uma melhor distribuição da solução na biomassa, o material sólido foi distribuído em um tabuleiro e a solução borrifada com o auxílio de um pulverizador. A solução foi adicionada até que a biomassa estivesse uniformemente úmida. A Figura III.6 exibe imagens do processo de umidificação da biomassa.

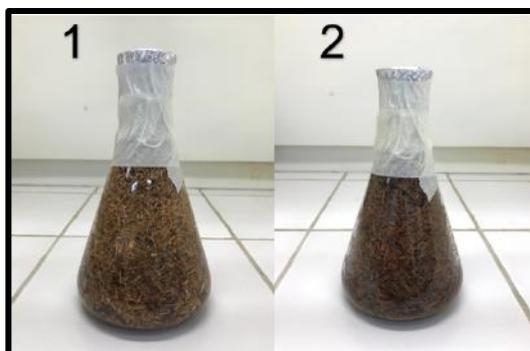
Figura III. 6 - As fotos acima mostram a biomassa ao longo do processo de umidificação com a solução ácida: Biomassa in natura (1); Biomassa com a superfície úmida (2); Mistura da Biomassa (3) e Biomassa úmida e homogênea (4)



Fonte: Elaborada pelas autoras

Com o auxílio de uma espátula, o sólido umedecido foi transferido para frascos tipo Erlenmeyers, assim como o restante da solução ácida. Em seguida, foram vedados com papel alumínio e fita crepe e submetidos ao tratamento térmico em autoclave à temperatura de  $120^{\circ}C$  durante 30 minutos. A Figura III.7 expõe um Erlenmeyer antes e após o tratamento térmico.

Figura III. 7 - Biomassa úmida transferida para o Erlenmeyer antes do processo de extração de hemicelulose (1) e após o processo de extração (2)



Fonte: Elaborada pelas autoras

Em seguida, o material proveniente da hidrólise ácida da hemicelulose foi submetido à prensagem de 7 a 8 toneladas para a separação das fases (hidrolisado hemicelulósico e torta residual). Esta etapa foi realizada utilizando um filtro prensa do LADEBIO (Figura III.8).

Figura III. 8 - Filtro prensa



Fonte: Elaborada pelas autoras

O pH do hidrolisado foi analisado com auxílio de fitas de pH e, caso necessário, ajustado para o valor de 6,0 pela adição de hidróxido de cálcio. Posteriormente, o líquido foi filtrado com o uso de um funil de Buchner e, em seguida, centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Por fim, o hidrolisado hemicelulósico (Figura III.9) foi analisado para determinação dos açúcares redutores totais em sua composição de acordo com o método DNS (MILLER, 1959) e, em seguida, congelado em frasco âmbar até seu uso para a fermentação dos açúcares extraídos.

Figura III. 9 - Hidrolisado hemicelulósico após a prensagem(1); Hidrolisado hemicelulosico após a neutralização(2)



Fonte: Elaborada pelas autoras

As tortas residuais (Figura III.10), ricas em celulose e lignina, foram lavadas até seu pH ser ajustado para o valor de 6,0. Para tal, utilizou-se uma peneira e um bécher para recolher o líquido e realizar a medição do pH. Em seguida, o material foi seco em estufa a 100°C.

Figura III. 10 - Torta residual da hidrólise ácida para extração dos açúcares da hemicelulose após a prensagem (1); após neutralização e secagem (2)



Fonte: Elaborada pelas autoras

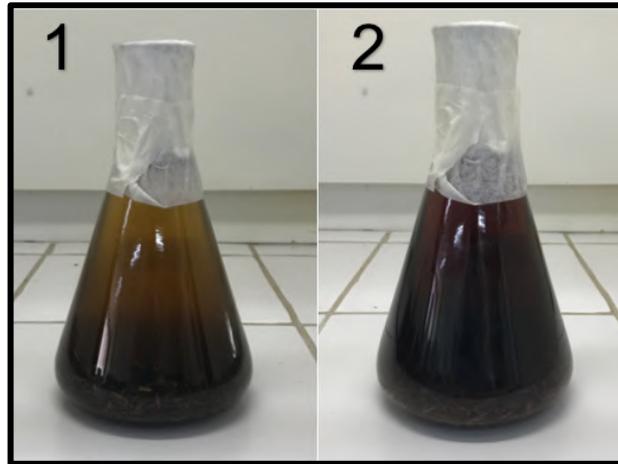
### III.2.2 – Hidrólise da Lignina

Conforme discutido anteriormente, a etapa de hidrólise da lignina na torta residual foi realizada com o objetivo de disponibilização da fração celulósica. Para tal, optou-se por um tratamento básico, onde a torta residual da hidrólise da hemicelulose foi misturada a uma solução diluída de hidróxido de sódio, preparada com 1,0% m/m de NaOH em relação à massa seca da torta residual. A relação mássica de sólido:líquido (torta residual seca:solução de tratamento) usada foi de 1:20.

Para garantir uma melhor distribuição da solução na torta, utilizou-se um pulverizador na aplicação, onde o sólido foi distribuído em um tabuleiro e a solução borrifada até que a superfície do material estivesse úmida. Neste ponto, a torta era homogeneizada com o auxílio de uma espátula. O procedimento foi repetido até finalizar toda a solução contida no borrifador.

Novamente, com o auxílio de uma espátula, o sólido umedecido foi transferido para frascos tipo Erlenmeyers, assim como o restante da solução alcalina. Em seguida, foram vedados com papel alumínio e fita crepe e submetidos ao tratamento térmico em autoclave à temperatura de 100°C durante 30 minutos. A Figura III.11 expõe um Erlenmeyer antes e após o tratamento térmico.

Figura III. 11 - Biomassa úmida e solução alcalina transferidas para o Erlenmeyer antes do processo de hidrólise de lignina (1) e após o processo de hidrólise (2)



Fonte: Elaborada pelas autoras

Após o processo de deslignificação, foi feita a separação da fase líquida, denominada de licor negro, da fase sólida, torta residual, através da prensagem de 7 a 8 toneladas no filtro prensa.

O licor negro (Figura III.12) foi conservado congelado em frasco âmbar, enquanto a torta residual (Figura III.13) foi lavada até que seu pH fosse ajustado para o valor de 5,0. Para tal, utilizou-se uma peneira e um bécher para recolher o líquido e realizar a medição do pH. O material foi seco em estufa à 100°C.

Figura III. 12 - Licor Negro



Fonte: Elaborada pelas autoras

Figura III. 13 - Torta residual da hidrólise alcalina para extração da lignina após neutralização e secagem



Fonte: Elaborada pelas autoras

### III.2.3 – Hidrólise da Celulose

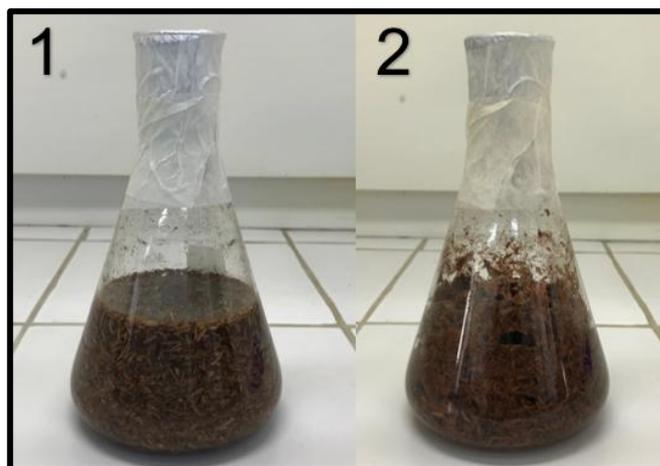
Por fim, tem-se a hidrólise da fração celulósica para disponibilização da glicose. Este processo é comumente realizado através de processos enzimáticos, porém na pesquisa realizada optou-se pelo uso unicamente de rotas químicas com o intuito de facilitar o controle do processo.

Sendo assim, a torta residual da hidrólise alcalina foi submetida a uma segunda hidrólise ácida, onde foi misturada a uma solução de ácido sulfúrico, preparada com 2% m/m de  $H_2SO_4$  em relação à massa seca de torta. A relação mássica de sólido:líquido (torta residual seca:solução de tratamento) usada foi de 1:4.

Para garantir uma melhor distribuição da solução na biomassa, o material sólido foi distribuído em um tabuleiro e a solução borrifada com o auxílio de um pulverizador. A solução foi adicionada até que a biomassa estivesse uniformemente úmida.

Com o auxílio de uma espátula, o sólido umedecido foi transferido para frascos tipo Erlenmeyers, assim como o restante da solução ácida. Em seguida, foram vedados com papel alumínio e fita crepe e submetidos ao tratamento térmico em autoclave à temperatura de 120 °C durante 30 minutos. A Figura III.14 expõe um Erlenmeyer antes e após o tratamento térmico.

Figura III. 14 - Biomassa úmida e solução ácida transferidas para o Erlenmeyer antes do processo de hidrólise da celulose (1) e após o processo de hidrólise (2)



Fonte: Elaborada pelas autoras

Findo o tratamento, a fase líquida (hidrolisado celulósico) foi separada da fase sólida (resíduo exibido na Figura III.15) através de prensagem de 7 a 8 toneladas em filtro prensa.

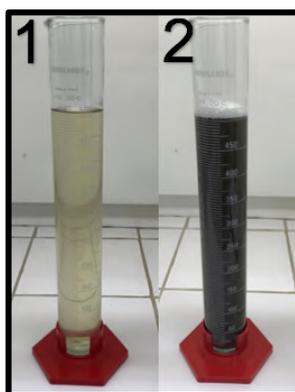
Figura III. 15 - Resíduo sólido úmido



Fonte: Elaborada pelas autoras

O pH do hidrolisado foi analisado com auxílio de fitas de pH e, caso necessário, ajustado para o valor de 6,0 pela adição de hidróxido de cálcio. Posteriormente, o líquido foi filtrado com o uso de um funil de Buchner e, em seguida, centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Por fim, o hidrolisado celulósico (Figura III.16) foi analisado para determinação de glicose em sua composição de acordo com o método enzimático de glicose oxidase (VERVERIS *et al.*, 2007) e, em seguida, congelado em frasco ambar até seu uso para a fermentação da glicose extraída.

Figura III. 16 - Hidrolisado celulósico após a filtração (1) e hidrolisado celulósico após a neutralização (2)



Fonte: Elaborada pelas autoras

### III.3 – Fermentação dos Hidrolisados

A produção do etanol de segunda geração foi realizada através da fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos e celulósicos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Cabe ressaltar que os hidrolisados podem conter inibidores da fermentação alcoólica, como o hidroximetilfurfural e furfural, e, por isso, foi feito um estudo com diferentes concentrações iniciais de hidrolisado no meio de cultivo.

Cada fermentação foi realizada em triplicata em frascos tipo erlenmeyers de 250 mL lacrados com um conjunto designado de fermentômetro, conforme mostra a Figura III.17.

Figura III. 17 - Conjunto erlenmeyer e fermentômetro usado para a fermentação



Fonte: Elaborada pelas autoras

Inicialmente, realizou-se o preparo do meio de cultivo, as concentrações dos nutrientes estão descritas nas Tabelas III.1 e III.2. Vale ressaltar que o hidrolisado não será adicionado neste momento, uma vez que o meio ainda sofrerá um tratamento térmico para se tornar estéril

que pode causar a caramelização dos açúcares contidos no hidrolisado, afetando diretamente o objetivo da pesquisa.

Tabela III 1 - Concentração dos componentes no meio de cultura

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Uréia	1,25 g/L
Fosfato de Potássio Monobásico	1,1 g/L
Extrato de Levedura	10 g/L
Solução de Sais	40 mL/L
Hidrolisado	25; 50 ou 75%(v/v)
Água deionizada	Usada para avolumar o meio

Fonte: Elaborada pelas autoras

Tabela III 2 - Composição da solução de sais

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,90
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,19
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,30
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,035
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,050
KI	0,009
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0125
Ácido Cítrico	12,5

Fonte: Elaborada pelas autoras

O meio de cultura, assim como o material necessário para inocular, foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. Para o material que não pode ser autoclavado, foi realizada a assepsia com água sanitária ou álcool 70%. Além disso, a fim de evitar contaminações durante o inóculo, todo o procedimento foi realizado em capela com fluxo laminar e próximo da chama do bico de bunsen.

Antes de iniciar o inóculo, o material foi disposto na capela de fluxo laminar e exposto a radiação ultravioleta por 15 minutos, exceto a levedura. Logo após, o hidrolisado foi adicionado ao meio, assim como uma massa de microrganismo suficiente para que a mesma atingisse a concentração de 8 g/L. Imediatamente após, uma amostra de 2 mL do meio reacional foi coletada e vedou-se o erlenmeyer com o fermentômetro adicionando uma solução ácida em seu bulbo.

Os erlenmeyers contendo o meio reacional foram pesados e incubados em um shaker a 37°C com agitação durante 5 dias. O acompanhamento da reação foi realizado através da pesagem do conjunto. Ao final da fermentação, coletou-se uma nova amostra de 2 mL.

As amostras coletadas foram prontamente centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos para separar o sobrenadante da massa celular. O sobrenadante foi encaminhado para análise, onde, dependendo de sua origem (celulósico ou hemicelulósico), determinou-se a concentração de glicose ( $C_g$ ) ou açúcares redutores totais ( $C_{at}$ ) de acordo com os métodos enzimáticos de glicose oxidase (VERVERIS *et al.*, 2007) e DNS (MILLER, 1959), respectivamente.

## Capítulo IV – Resultados e Discussão

### IV.1 – Matéria-prima

#### IV.1.1 – Determinação de celulose, hemicelulose, lignina e cinza

A caracterização da biomassa foi realizada em triplicata e as massas iniciais de material lignocelulósico foram 0,2031 g, 0,2016 g e 0,2008 g, o que resulta em uma média de peso da amostra seca (m) de 0,2018 g.

A Tabela IV.1 descreve a massa do conjunto cadinho e membrana ao longo de todo o procedimento.

Tabela IV. 1 - Massas do conjunto cadinho e membrana ao longo de todo o procedimento

Conjunto	Amostra 1 (g)	Amostra 2 (g)	Amostra 3 (g)
Cadinho + Membrana purificadas (m <sub>0</sub> )	15,5079	15,6706	15,7553
Cadinho + Membrana seco em estufa (m <sub>1</sub> )	15,5526	15,7216	15,8004
Cadinho + Membrana calcinado (m <sub>2</sub> )	15,5098	15,6737	15,7571

Fonte: Elaborada pelas autoras

Ao aplicar os valores da Tabela IV.1 na fórmula de cálculo de cinzas, obtemos os seguintes resultados:

$$\text{Cinza}_1 = \frac{(15,5098 - 15,5079)}{0,2031} \cdot 100$$

$$\text{Cinza}_1 = 0,9355\%$$

$$\text{Cinza}_2 = \frac{(15,6737 - 15,6709)}{0,2016} \cdot 100$$

$$\text{Cinza}_2 = 1,3889\%$$

$$\text{Cinza}_3 = \frac{(15,7571 - 15,7553)}{0,2008} \cdot 100$$

$$\text{Cinza}_3 = 0,8964\%$$

Os resultados da análise do hidrolisado obtido no procedimento de caracterização está descrito na Tabela IV.2.

Tabela IV. 2 - Resultados da análise espectrofotométrica do hidrolisado

Concentração	Amostra 1 (g/L)	Amostra 2 (g/L)	Amostra 3 (g/L)
Glicose (C <sub>g</sub> )	0,2292	0,2528	0,2558
Açúcares redutores totais (C <sub>at</sub> )	0,4768	0,7060	0,7721

Fonte: Elaborada pelas autoras

Ao aplicar os valores da Tabela IV.2 na fórmula de cálculo de celulose, obtemos os resultados abaixo:

$$\text{Celulose}_1 = \frac{0,90}{0,96} \cdot 0,2292 \cdot \frac{0,2}{0,2031} \cdot 100$$

$$\text{Celulose}_1 = 21,1595\%$$

$$\text{Celulose}_2 = \frac{0,90}{0,96} \cdot 0,2528 \cdot \frac{0,2}{0,2016} \cdot 100$$

$$\text{Celulose}_2 = 23,5119\%$$

$$\text{Celulose}_3 = \frac{0,90}{0,96} \cdot 0,2558 \cdot \frac{0,2}{0,2008} \cdot 100$$

$$\text{Celulose}_3 = 23,8857\%$$

Ao aplicar os valores da Tabela IV.2 na fórmula de cálculo de hemicelulose, obtemos os seguintes resultados:

$$\text{Hemicelulose}_1 = \frac{0,88}{0,93} \cdot (0,4768 - 0,2292) \cdot \frac{0,2}{0,2031} \cdot 100$$

$$\text{Hemicelulose}_1 = 23,0712\%$$

$$\text{Hemicelulose}_2 = \frac{0,88}{0,93} \cdot (0,7060 - 0,2528) \cdot \frac{0,2}{0,2016} \cdot 100$$

$$\text{Hemicelulose}_2 = 42,5431\%$$

$$\text{Hemicelulose}_3 = \frac{0,88}{0,93} \cdot (0,7721 - 0,2558) \cdot \frac{0,2}{0,2008} \cdot 100$$

$$\text{Hemicelulose}_3 = 48,6596\%$$

Ao aplicar os valores acima na fórmula de cálculo da lignina, obtemos os resultados abaixo:

$$\text{Lignina}_1 = 100 - (21,1595+23,0712+0,9355)$$

$$\text{Lignina}_1 = 54,8338\%$$

$$\text{Lignina}_2 = 100 - (23,5119+42,5431+1,3889)$$

$$\text{Lignina}_2 = 32,5561\%$$

$$\text{Lignina}_3 = 100 - (23,8857+48,6596+0,8964)$$

$$\text{Lignina}_3 = 26,5583\%$$

A Tabela IV.3 mostra um resumo de todos os resultados obtidos e o teor médio de cada componente da matéria-prima usada na pesquisa.

Tabela IV. 3 - Compilado dos resultados obtidos e teor médio de cada componente

<b>Componente</b>	<b>Amostra 1 (% m/m)</b>	<b>Amostra 2 (% m/m)</b>	<b>Amostra 3 (% m/m)</b>	<b>Teor médio (% m/m)</b>
Celulose	21,1595	23,5119	23,8857	22,8524
Hemicelulose	23,0712	42,5431	48,6596	38,0913
Lignina	54,8338	32,5561	26,5583	37,9827
Cinza	0,9355	1,3889	0,8964	1,0736

Fonte: Elaborada pelas autoras

Segundo a caracterização da matéria-prima realizada em relação a sua composição, a mistura de macrófitas aquáticas possui grande potencial na produção de etanol de segunda geração, uma vez que cerca de 60% da sua composição pode ser hidrolisada em açúcares fermentáveis.

#### **IV.1.2 – Determinação do teor de umidade**

A Tabela IV.4 descreve os resultados obtidos de teor de umidade para a biomassa aplicada na pesquisa.

Tabela IV. 4 - Resultados das análises de teor de umidade na matéria-prima

<b>Amostra</b>	<b>Teor de umidade (% m/m)</b>
1	12,35
2	12,47
3	12,30

Fonte: Elaborada pelas autoras

O resultado final do teor de umidade da mistura de macrófitas aquáticas foi de 12,37%, média aritmética dos resultados das triplicatas. Esse valor é aplicado na metodologia, sendo assim, sua definição é de suma importância para a realização da rota tecnológica proposta.

## **IV.2 – Hidrólise da Matéria-prima**

### **IV.2.1 – Hidrólise da Hemicelulose**

Na Tabela IV.5 podemos visualizar as massas ao longo de todo o processo da hidrólise da hemicelulose.

Tabela IV. 5 - Massa da matéria-prima, reagentes e produtos ao longo do processo de hidrólise da hemicelulose

<b>Matéria-prima, Reagentes e Produtos</b>	<b>Massa (g)</b>
Biomassa	943,74
Ácido Sulfúrico	6,91
Solução Ácida	3307,96
Hidrolisado Hemicelulósico	2086,69
Torta residual	890,12

Fonte: Elaborada pelas autoras

A concentração de açúcares redutores totais no hidrolisado hemicelulósico, determinada através da metodologia DNS (MILLER, 1959), foi de 1,82 g/L.

Visto que o volume obtido de hidrolisado hemicelulósico foi de 2,11 L, a massa de açúcar redutor total presente no mesmo foi de 3,84 g, ou seja, a extração de açúcares redutores totais correspondeu a cerca de 0,41% da massa inicial de biomassa empregada no processo.

Cabe destacar que as condições utilizadas na hidrólise da hemicelulose são as comumente empregadas para qualquer outro tipo de material lignocelulósico, como o bagaço de cana-de-açúcar, sendo possível a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos com maiores teores de açúcares através da otimização desta etapa (VIANA, 2017).

## IV.2.2 – Hidrólise da lignina

Na Tabela IV.6 podemos visualizar as massas ao longo de todo o processo da hidrólise da lignina.

Tabela IV. 6 - Massa dos reagentes e produtos ao longo do processo de hidrólise da lignina

<b>Reagentes e Produtos</b>	<b>Massa (g)</b>
Torta Residual (Hidrólise Hemicelulósica)	890,12
Hidróxido de Sódio	9,25
Solução Alcalina	17.802,46
Licor Negro	16.791,96
Torta residual (Hidrólise Lignina)	906,34

Fonte: Elaborada pelas autoras

Esta etapa do processo gera um grande volume de licor negro, material que tem sido objeto de diversos estudos a respeito do seu uso para obtenção de energia. O licor negro depois de concentrado tem alta viscosidade e elevado poder calorífico, de forma que, a otimização da etapa da hidrólise alcalina levaria a obtenção de um licor negro com maiores concentrações de lignina e, conseqüentemente, maior valor agregado.

## IV.2.3 – Hidrólise da Celulose

Na Tabela IV.7 podemos visualizar as massas ao longo de todo o processo da hidrólise da celulose.

Tabela IV. 7 - Massa dos reagentes e produtos ao longo do processo de hidrólise da celulose

<b>Reagentes e Produtos</b>	<b>Massa (g)</b>
Torta Residual (Hidrólise Lignina)	906,34
Ácido Sulfúrico	19,08
Solução Ácida	3625,85
Hidrolisado Celulósico	2767,45
Resíduo Sólido	1429,27

Fonte: Elaborada pelas autoras

A concentração de glicose no hidrolisado celulósico, determinada através do método enzimático de glicose oxidase (VERVERIS *et al.*, 2007), foi de 0,11 g/L.

Visto que o volume obtido de hidrolisado celulósico foi de 2,76 L, a massa de glicose presente no mesmo foi de 0,30 g, ou seja, a extração de glicose correspondeu a cerca de 0,03% da massa inicial de biomassa empregada no processo.

Novamente se faz importante salientar que a otimização da etapa de hidrólise é imprescindível para o sucesso da rota tecnológica proposta. De acordo com os resultados obtidos na caracterização da matéria-prima, sabe-se que a mistura de macrófitas aquáticas possui grande potencial para a produção de etanol de segunda geração, porém ajustes se fazem necessários para extrair mais glicose da biomassa.

### IV.3 – Fermentação dos Hidrolisados

Conforme dito anteriormente, o acompanhamento da fermentação foi realizado através da pesagem do conjunto, erlenmeyer e fermentômetro. A Figura II.8 que descreve de forma global a reação da transformação de glicose em etanol, também exhibe a formação de dióxido de carbono. Sendo assim, conforme a fermentação alcoólica progride, há o desprendimento de gás carbônico e o peso do conjunto deve diminuir.

Para construir o perfil cinético dos ensaios, considerou-se que toda a diminuição do peso do conjunto era referente ao desprendimento do dióxido de carbono, e através desse valor, foi calculado a massa de glicose consumida e de etanol gerada.

#### IV.3.1 – Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico

As Tabelas IV.8, IV.9 e IV.10 reúnem os resultados das médias das massas produzidas de gás carbônico e etanol, bem como da glicose consumida para a fermentação contendo 25%, 50% e 75% de hidrolisado hemicelulósico, respectivamente.

Tabela IV. 8 – Massas de gás carbônico e etanol produzidos e glicose consumida ao longo da fermentação com 25% do hidrolisado hemicelulósico

<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Massa de Gás Carbônico (g)</b>	<b>Massa de Etanol (g)</b>	<b>Massa de Glicose (g)</b>
0	0,00	0,00	0,00
4	0,03	0,03	0,07
22	0,15	0,15	0,30
28	0,32	0,33	0,65
46	0,58	0,60	1,18

52	0,86	0,90	1,76
70	1,22	1,28	2,50
76	1,60	1,67	3,27
94	2,05	2,14	4,19
102	2,53	2,64	5,17

Fonte: Elaborada pelas autoras

Tabela IV. 9 – Massas de gás carbônico e etanol produzidos e glicose consumida ao longo da fermentação com 50% do hidrolisado hemicelulósico

<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Massa de Gás Carbônico (g)</b>	<b>Massa de Etanol (g)</b>	<b>Massa de Glicose (g)</b>
0	0,00	0,00	0,00
6	0,03	0,03	0,06
24	0,15	0,16	0,31
30	0,30	0,32	0,62
47	0,57	0,60	1,17
54	0,87	0,91	1,78
72	1,22	1,28	2,50
78	1,59	1,66	3,25
96	2,00	2,09	4,08
102	2,42	2,53	4,96

Fonte: Elaborada pelas autoras

Tabela IV. 10 – Massas de gás carbônico e etanol produzidos e glicose consumida ao longo da fermentação com 75% do hidrolisado hemicelulósico

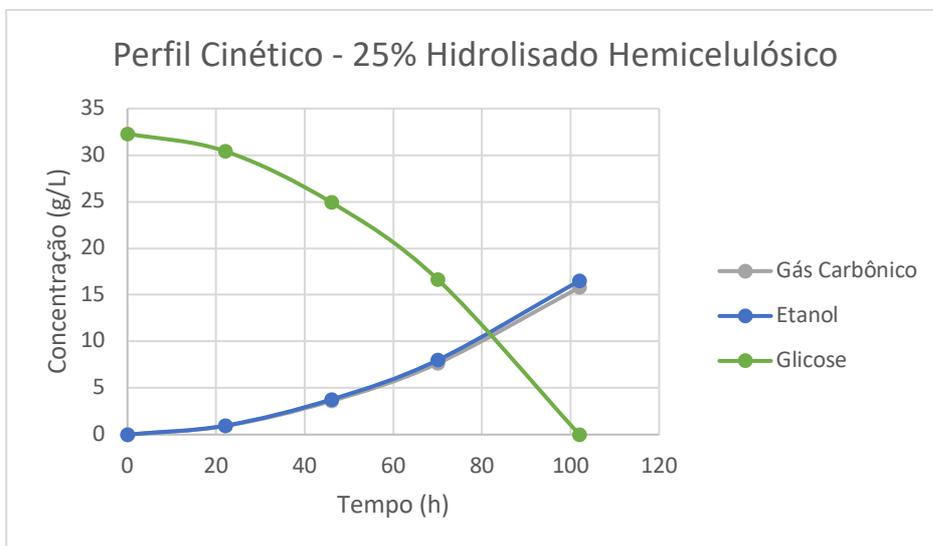
<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Massa de Gás Carbônico (g)</b>	<b>Massa de Etanol (g)</b>	<b>Massa de Glicose (g)</b>
0	0,00	0,00	0,00
4	0,03	0,03	0,07
22	0,12	0,12	0,24
28	0,26	0,27	0,53
46	0,49	0,51	1,00
52	0,73	0,77	1,50
70	1,04	1,09	2,13

76	1,37	1,43	2,80
94	1,73	1,81	3,55
102	2,11	2,21	4,32

Fonte: Elaborada pelas autoras

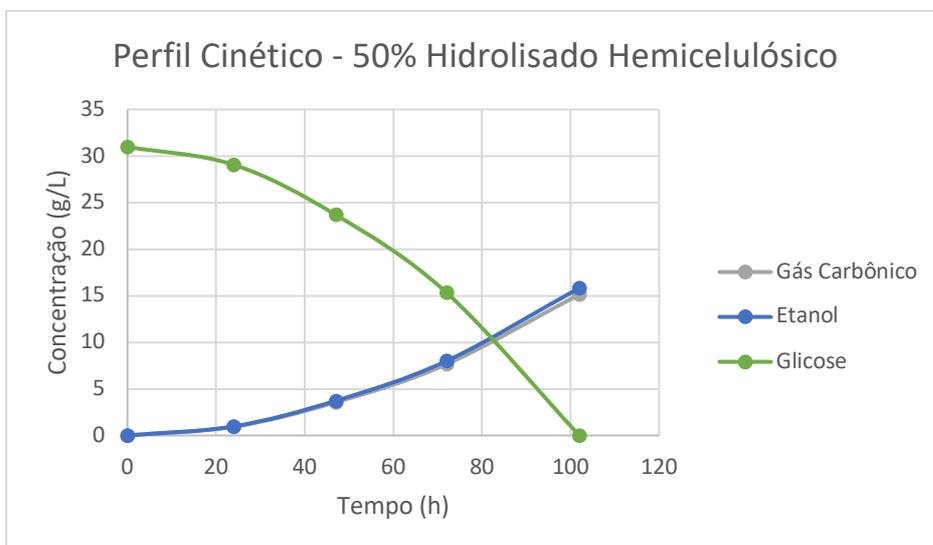
A partir dos valores compilados acima, construiu-se os perfis cinéticos obtidos para a fermentação de 25%, 50% e 75% de hidrolisado hemicelulósico, e os mesmos estão exibidos nas Figuras IV.1, IV.2 e IV.3, respectivamente.

Figura IV. 1 – Perfil cinético da fermentação de 25% do hidrolisado hemicelulósico



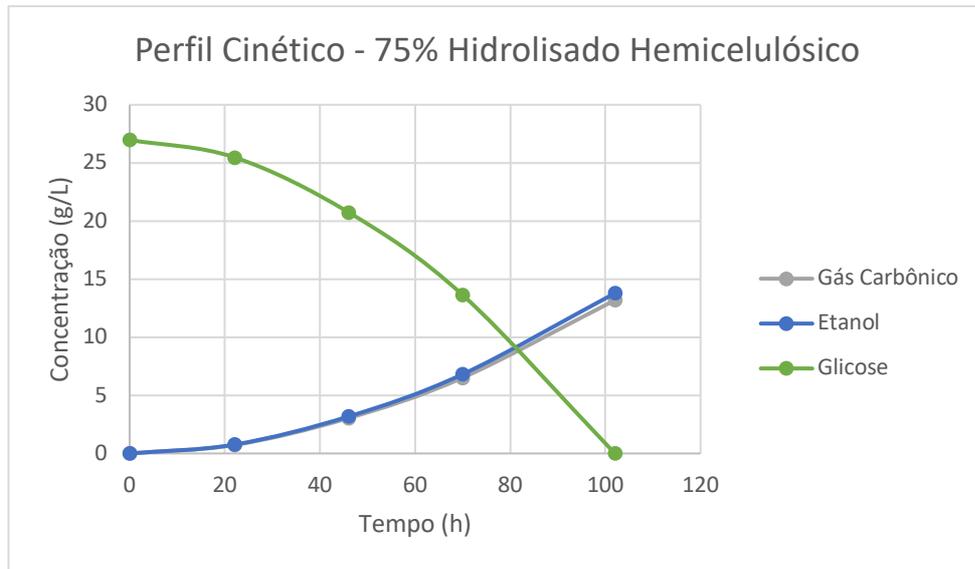
Fonte: Elaborada pelas autoras

Figura IV. 2 - Perfil cinético da fermentação de 50% do hidrolisado hemicelulósico



Fonte: Elaborada pelas autoras

Figura IV. 3 - Perfil cinético da fermentação de 75% do hidrolisado hemicelulósico



Fonte: Elaborada pelas autoras

A produção de etanol atingiu 16,5 g/L, 15,8 g/L e 13,8 g/L com a fermentação de 25%, 50% e 75% de hidrolisado hemicelulósico, respectivamente. Logo, infere-se que a condição que favorece a formação de etanol é aquela que possui o menor percentual de hidrolisado hemicelulósico. Uma possibilidade para que isso ocorra é a formação de inibidores durante a hidrólise que pode impactar na fermentação alcoólica, uma vez que a concentração de etanol com maior quantidade de hidrolisado diminui cerca de 16% em relação a concentração da fermentação com a menor quantidade de hidrolisado.

A Tabela IV.11 expõe os resultados das concentrações de açúcares redutores totais nas amostras coletadas no início e final das fermentações. Considerando os valores abaixo, a conversão de açúcar é de 57,8%, 59,0% e 75,8% para 25%, 50% e 75% de hidrolisado hemicelulósico, respectivamente. A maior conversão foi obtida com a maior concentração de hidrolisado, entretanto, não foi a fermentação com maior concentração final de etanol. Com isso, pode-se concluir que as condições estabelecidas para a fermentação não foram favoráveis para produção de etanol, e se faz necessária a otimização desta etapa para que o processo proposto seja bem-sucedido.

Tabela IV. 11 - Concentrações de açúcares redutores totais nas amostras coletadas no início e final das fermentações

<b>Concentração de Hidrolisado Hemicelulósico (% v/v)</b>	<b>Concentração de Açúcares Redutores Totais Iniciais (g/L)</b>	<b>Concentração de Açúcares Redutores Totais Finais (g/L)</b>
25	0,6937	0,2927
50	0,8928	0,3663
75	1,5768	0,3818

Fonte: Elaborada pelas autoras

### IV.3.2 – Fermentação do Hidrolisado Celulósico

As Tabelas IV.12, IV.13 e IV.14 reúnem os resultados das médias das massas produzidas de gás carbônico e etanol, bem como da glicose consumida para a fermentação contendo 25%, 50% e 75% de hidrolisado celulósico, respectivamente.

Tabela IV. 12 - Massas de gás carbônico e etanol produzidos e glicose consumida ao longo da fermentação com 25% do hidrolisado celulósico

<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Massa de Gás Carbônico (g)</b>	<b>Massa de Etanol (g)</b>	<b>Massa de Glicose (g)</b>
0	0,00	0,00	0,00
4	0,03	0,03	0,06
21	0,12	0,13	0,25
28	0,27	0,29	0,56
45	0,48	0,50	0,98
52	0,72	0,76	1,48
70	1,01	1,06	2,07
75	1,35	1,41	2,76
93	1,76	1,84	3,60
99	2,19	2,29	4,47

Fonte: Elaborada pelas autoras

Tabela IV. 13 – Massas de gás carbônico e etanol produzidos e glicose consumida ao longo da fermentação com 50% do hidrolisado celulósico

<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Massa de Gás Carbônico (g)</b>	<b>Massa de Etanol (g)</b>	<b>Massa de Glicose (g)</b>
0	0,00	0,00	0,00
24	0,08	0,09	0,17
30	0,23	0,24	0,46
47	0,43	0,45	0,88
55	0,65	0,68	1,33
72	0,98	1,03	2,01
79	1,33	1,39	2,71
99	1,74	1,82	3,56

Fonte: Elaborada pelas autoras

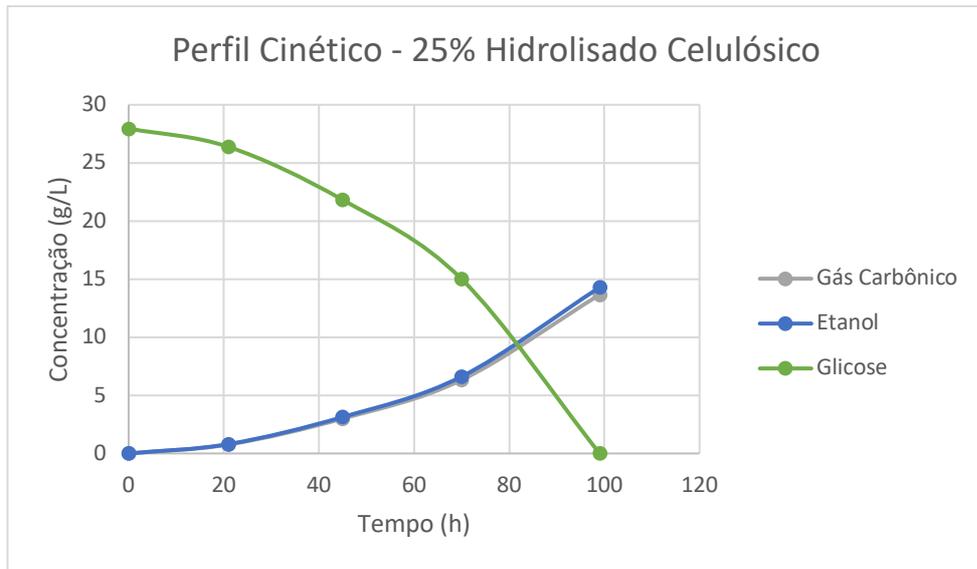
Tabela IV. 14 – Massas de gás carbônico e etanol produzidos e glicose consumida ao longo da fermentação com 75% do hidrolisado celulósico

<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>Massa de Gás Carbônico (g)</b>	<b>Massa de Etanol (g)</b>	<b>Massa de Glicose (g)</b>
0	0,00	0,00	0,00
25	0,10	0,10	0,20
72	0,38	0,39	0,77
79	0,66	0,69	1,35
96	1,00	1,04	2,04
102	1,36	1,42	2,77

Fonte: Elaborada pelas autoras

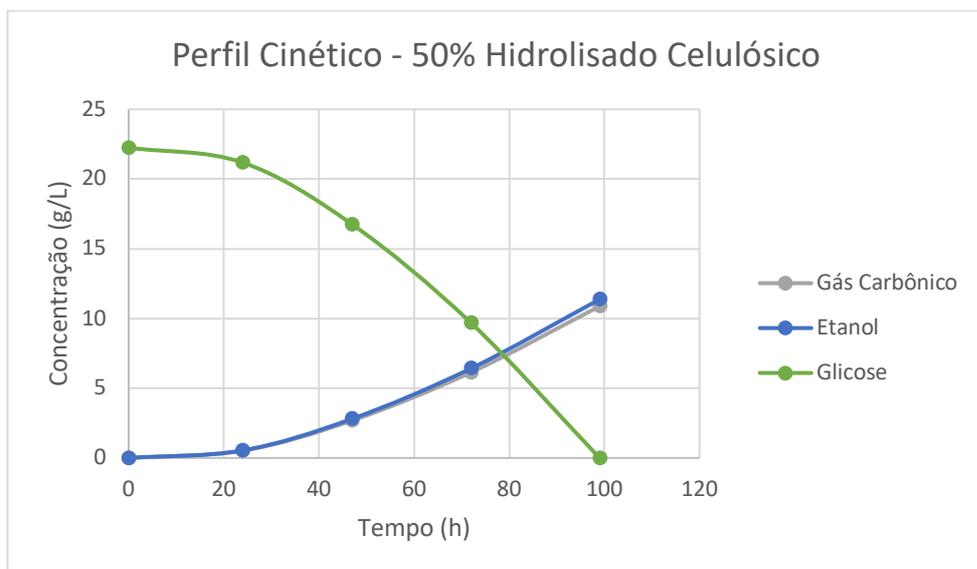
A partir dos valores compilados acima, construiu-se os perfis cinéticos obtidos para a fermentação de 25%, 50% e 75% de hidrolisado celulósico, e os mesmos estão exibidos nas Figuras IV.4, IV.5 e IV.6, respectivamente.

Figura IV. 4 - Perfil cinético da fermentação de 25% do hidrolisado celulósico



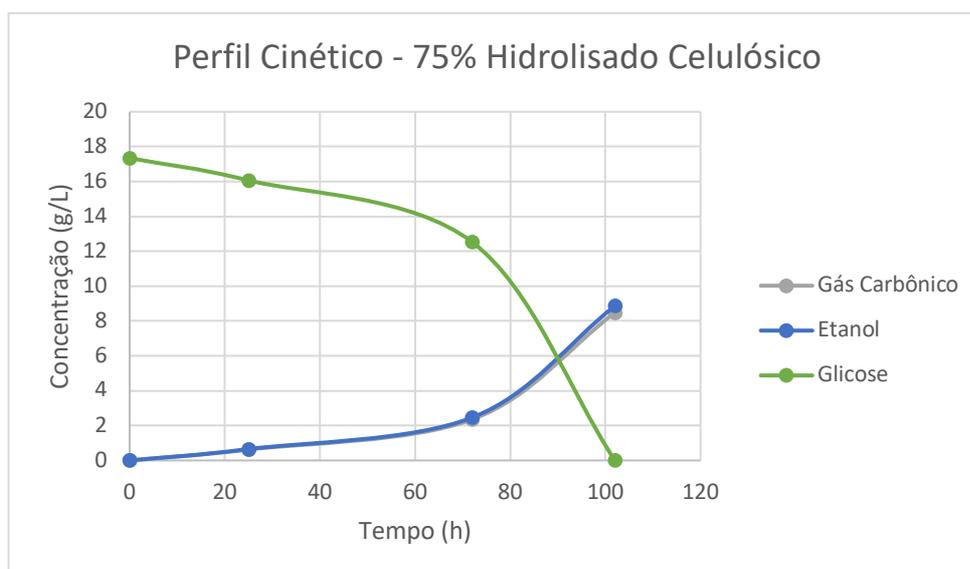
Fonte: Elaborada pelas autoras

Figura IV. 5 - Perfil cinético da fermentação de 50% do hidrolisado celulósico



Fonte: Elaborada pelas autoras

Figura IV. 6 - Perfil cinético da fermentação de 75% do hidrolisado celulósico



Fonte: Elaborada pelas autoras

A produção de etanol atingiu 14,3 g/L, 11,4 g/L e 8,9 g/L com a fermentação de 25%, 50% e 75% de hidrolisado celulósico, respectivamente. Logo, infere-se que a condição que favorece a formação de etanol é aquela que possui o menor percentual de hidrolisado celulósico. Neste caso, a concentração de etanol com maior quantidade de hidrolisado diminuiu 38% em relação a concentração da fermentação com a menor quantidade de hidrolisado, evidenciando, novamente, uma possível inibição dos produtos formados na hidrólise.

A Tabela IV.15 expõe os resultados das concentrações de glicose nas amostras coletadas no início e final das fermentações. Considerando os valores abaixo, a conversão de açúcar é de 89,7%, 93,5% e 92% para 25%, 50% e 75% de hidrolisado celulósico, respectivamente. A maior conversão foi obtida com a concentração intermediária de hidrolisado, entretanto, não foi a fermentação com maior concentração final de etanol. Novamente, infere-se que as condições da fermentação devem ser otimizadas para uma maior produção de etanol.

Tabela IV. 15 - Concentrações de glicose nas amostras coletadas no início e final das fermentações

<b>Concentração de Hidrolisado Celulósico (% v/v)</b>	<b>Concentração de Glicose Inicial (g/L)</b>	<b>Concentração de Glicose Final (g/L)</b>
25	0,0380	0,0039
50	0,0428	0,0028
75	0,0450	0,0036

Fonte: Elaborada pelas autoras

Vazques *et al.* (2007) realizaram um estudo em que foi alcançado 30 g.L<sup>-1</sup> de etanol a partir do bagaço de cana após 10h de fermentação. De acordo com os estudos de Santos (2014), foi revelado o valor de 9,3 g.L<sup>-1</sup> de etanol, sob condições de pré-tratamento ácido utilizando a palha de milho. Nos estudos de Ferro (2014) foi reportada a produção de etanol a partir do fruto da *Terminalia catappa Linn* com teor de 14,27 g.L<sup>-1</sup>, também ao ser realizado um pré-tratamento ácido. Já Carvalho (2016) encontrou concentração de etanol de 22,4 g.L<sup>-1</sup> ao utilizar o bagaço de dendê (*Elaeis guinaeensis*) utilizando o pré-tratamento ácido (VIANA, 2017).

Apesar dos resultados apontarem para uma condição de fermentação não otimizada, os valores de concentração de etanol obtidos estão compatíveis com aqueles encontrados na literatura, evidenciando que a mistura de macrófitas aquáticas possuem grande potencial para produção de etanol de segunda geração.

## Capítulo V – Conclusão e Sugestões

Este trabalho avaliou o potencial da biomassa de macrófitas aquáticas para produção de etanol de segunda geração, considerando os efeitos da quantidade de hidrolisado adicionado ao meio reacional, bem como a utilização da rota química na etapa de hidrólise e fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A caracterização da mistura de macrófitas mostrou que 60% da sua massa é composta de matéria que pode ser convertida em açúcares fermentáveis, sendo 22,85% celulose e 38,09% de hemicelulose.

Foi possível realizar a extração da fração hemicelulósica e da fração celulósica das macrófitas a partir da rota química. O hidrolisado hemicelulósico apresentou 1,82g/L de açúcares redutores totais, que representa 0,41% da massa de biomassa utilizada, enquanto o hidrolisado celulósico apresentou concentração de 0,11g/L de glicose, cerca de 0,03% da massa de biomassa utilizada. O percentual de açúcares extraídos neste processo foi bem inferior ao esperado, tendo em vista os valores encontrados na caracterização. Possivelmente um ajuste nas condições do processo como concentração do ácido, da base ou até mesmo na temperatura, possa levar a melhores resultados.

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico foi feita com diferentes concentrações de hidrolisado no meio: 25%, 50% e 75%. Para cada uma destas condições, a produção de etanol atingiu 16,5g/L, 15,8g/L e 13,8g/L respectivamente, sendo o meio com menor percentual de hidrolisado o que se mostrou mais favorável à produção de etanol. Possivelmente nesta condição houve uma menor degradação dos açúcares no processo de hidrólise e, por consequência menor efeito de inibição da ação da levedura na fermentação.

Da mesma forma, a fermentação do hidrolisado celulósico foi conduzido com meios reacionais possuindo 25%, 50% e 75% de hidrolisado. A produção de etanol atingiu 14,3g/L, 11,4g/L e 8,9g/L, seguindo a mesma tendência do hidrolisado hemicelulósico onde o menor percentual de hidrolisado se mostrou mais favorável para obtenção de etanol.

Em relação à conversão de açúcares, para o hidrolisado hemicelulósico, a melhor conversão, 75,8%, foi obtida para o meio com 75% de hidrolisado. No caso do hidrolisado celulósico, o meio com 50% de hidrolisado foi onde se observou conversão de 93,5% de conversão da glicose presente no meio. Os cenários onde há maiores concentrações de hidrolisado são, portanto, favoráveis à conversão dos açúcares, porém desfavoráveis à produção de etanol.

Sob as condições mais promissoras avaliadas neste trabalho, não otimizadas e em escala de laboratório, é possível obter 4,9kg de etanol para cada tonelada da mistura de macrófitas aquáticas utilizada.

Sugere-se para próximos trabalhos a realização de estudos a fim de otimizar o processo determinando melhores condições operacionais.

## Capítulo VI – Referência Bibliográfica

Bronzato, G. R. (2016). *Investigação da biomassa de Eichhornia crassipes (Aguapé) para obtenção de etanol de segunda geração como um processo mitigatório da poluição aquática*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu - SP. Acesso em 30 de 09 de 2021, disponível em [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141985/bronzato\\_grf\\_me\\_bot.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141985/bronzato_grf_me_bot.pdf?sequence=3&isAllowed=y)

Canilha, L., Chandel, A. K., Milessi, T. S., Antunes, F. A., Freitas, W. L., Felipe, M. d., & Silva, S. S. (2012). *Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. doi:10.1155/2012/989572

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*. Revista Analytica, 44, 48-54.

Carvalho, L. G. (2009). *Produção de biocombustíveis a partir da biomassa de dendê (Elaeis guinaeensis)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.

Cavallo, A. J. (2002). *Predicting the Peak in World Oil Production*. Natural Resources Research, 11, pp. 187-195. doi:10.1023/A:1019856621335

Cordeiro, M. A. (2016). *Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (Euterpe oleraceae Mart) para a produção de etanol*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. Belem - PA. Acesso em 01 de 10 de 2021, disponível em [https://www.researchgate.net/publication/320430846\\_ESTUDO\\_DA\\_HIDROLISE\\_ENZIMATICA\\_DO\\_CAROCO\\_DE\\_ACAI\\_Euterpe\\_oleraceae\\_Mart\\_PARA\\_A\\_PRODUCAO\\_DE\\_ETANOL/link/59e4f27b458515250246ec0a/download](https://www.researchgate.net/publication/320430846_ESTUDO_DA_HIDROLISE_ENZIMATICA_DO_CAROCO_DE_ACAI_Euterpe_oleraceae_Mart_PARA_A_PRODUCAO_DE_ETANOL/link/59e4f27b458515250246ec0a/download)

Damo, L., Mendes, K. F., Freitas, F. C. L. (2020). *Plantas daninhas aquáticas: da classificação ao controle*. Boletim Informativo: Manejo Integrado de Plantas Daninhas, 5. Acesso em 21 de 09 de 2021, disponível em [https://www.researchgate.net/publication/344455645\\_PLANTAS\\_DANINHAS\\_AQUATICAS\\_DA\\_CLASSIFICACAO\\_AO\\_CONTROLE](https://www.researchgate.net/publication/344455645_PLANTAS_DANINHAS_AQUATICAS_DA_CLASSIFICACAO_AO_CONTROLE)

Demirbas, A. (2005). *Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass*. Energy Sources, pp. 327-337. doi:10.1080/00908310390266643

Dutra, J. C. F. (2018). *Avaliação de pré-tratamentos físico-químicos em macrófitas aquáticas na produção de energia*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. Acesso em 28 de 09 de 2021, disponível em [http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/344375/1/Dutra\\_JoyceDaCruzFerraz\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/344375/1/Dutra_JoyceDaCruzFerraz_M.pdf)

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. (2021). *Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis - Ano 2020 (12 ed.)*. Acesso em 26 de 08 de 2021. Disponível em [https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-615/NT-EPE-DPG-SDB-2021-03\\_Analise\\_de\\_Conjuntura\\_dos\\_Biocombustiveis\\_ano\\_2020.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-615/NT-EPE-DPG-SDB-2021-03_Analise_de_Conjuntura_dos_Biocombustiveis_ano_2020.pdf)

Esteves, F. A. (1998). *Fundamentos de Limnologia* (2ª ed.). Rio de Janeiro, RJ: Interciência, p.120.

Furlan, V. J. M. (2009). *Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da agroindústria do arroz*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande - RS. Acesso em 06 de 10 de 2021, disponível em <http://repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/2485/dissertao%20valcenir%20j.%20m.%20furlan.pdf?sequence=1>

Garstka, B. (2019). *Avaliação de Materiais Lignocelulósicos oriundos da produção e beneficiamento de soja visando à obtenção de bioetanol*. Monografia. Universidade

Tecnológica Federal do Paraná. Toledo - PR. Acesso em 04 de 10 de 2021, disponível em [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/12608/1/TD\\_COPEQ\\_2019\\_1\\_03.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/12608/1/TD_COPEQ_2019_1_03.pdf)

Ge, M., Friedrich, J., Vigna, L. (2020). *4 Charts Explain Greenhouse Gas Emissions by Countries and Sectors*. World Resources Institute. Acesso em 23 de 08 de 2021, disponível em <https://www.wri.org/insights/4-charts-explain-greenhouse-gas-emissions-countries-and-sectors>

Gonçalves, E. C. B. M. (2019). *Caracterização de biomassas de macrófitas aquáticas - Cyperus giganteus, Eichhornia crassipes e Salvinia auriculata: potencialidade do uso de resíduos de podas de wetlands em processos de termoconversão*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica. Rio de Janeiro – RJ. Acesso em 24 de 09 de 2021, disponível em <https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/45666/45666.PDF>

Internacional Energy Agency. (2021). *Dados da matriz energética mundial*. Acesso em 23 de 08 de 2021, disponível em IEA - Internacional Energy Agency: <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-tables?country=WORLD&energy=Balances&year=2018>

Jesus, T. B., Sousa, S. S., Santos, L. T., Aguiar, W. M. (2015). *Avaliação da Potencialidade de Utilização de Espécies de Macrófitas como Acumuladoras de Metais Pesados*. Revista Virtual de Química, 7(4), 1102-1118.

Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001). *Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos* (Vol. 3). São Paulo - SP: Editora Edgard Blücher.

Lino, A. G. (2015). *Composição química e estrutural da lignina e lipídios do bagaço e palha da cana-de-açúcar*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. Acesso em 02 de 10 de 2021, disponível em <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/8522/1/texto%20completo.pdf>

Manozzo, V. (2016). *Estudo cinético da pirólise das macrófitas: Pistia stratiotes e Eichhornia crassipes*. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Acesso em 24 de 09 de 2021, disponível em <http://131.255.84.103/bitstream/tede/2907/2/Viviane%20Manozzo%202016.pdf>

Melo, N. R. (2020). *Etanol 2G: processo produtivo e seu contexto atual no Brasil*. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG. Acesso em 01 de 09 de 2021, disponível em <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/31885/1/Etanol2GProcesso.pdf>

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

Mishima, D., Kuniki, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M., Fujita, M. (2008). *Ethanol production from candidate energy crops: water hyacinth (Eichhornia crassipes) and water lettuce (Pistia stratiotes L.)*. Bioresource Technology, pp. 2495-2500. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.056

Namadi, M. M., Bawa, D. M., Dangmwan, D. S., Ahmed, A. F. (2013). *Evaluation of sugar content and bioethanol potentials of some freshwater biomass*. International Journal of Renewable and Sustainable Energy, 2(6), pp. 201-204. doi:10.11648/j.ijrse.20130206.12

Oliveira, F. P. (2010). *Avaliação da aclimação da Pichia stipitis ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro - RJ.

Pagioro, T. A., Thomaz, S. M. (1999). *Decomposition of Eichhornia azurea from limnologically different environments of the Upper Paraná River floodplain*. Hydrobiologia, 411, pp. 45-51.

Parajó, J. C., Dominguez, H., Dominguez, J. M. (1998). *Biotechnological production of xylitol. Part I: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis*. Bioresource Technology, 65, pp. 191-201.

Pitarelo, A. P. (2013). *Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. Acesso em 01 de 09 de 2021, disponível em <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/32102/R%20-%20T%20-%20ANA%20PAULA%20PITARELO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pothiraj, C., Arumugam, R., Gobinath, M. (2014). *Sustaining ethanol production from lime pretreated water hyacinth biomass using mono and co-cultures of isolated fungal strains with Pichia stipitis*. *Bioresources and Bioprocessing*, doi:10.1186/s40643-014-0027-3

Ribeiro, S. T., Mota, H. R., Xavier, J. O., Campos, M. C. (2021). *Macrófitas aquáticas: caracterização e importância em reservatórios hidrelétricos*. Belo Horizonte – MG: Companhia Energética de Minas Gerais - CEMIG. Acesso em 29 de 09 de 2021, disponível em <https://www.cemig.com.br/wp-content/uploads/2021/03/livro-macrofitas-cemig-2021.pdf>

Ribeiro, W. (2020). *Demanda global de energia cairá 5,3% em 2020, diz IEA*. *Poder 360*. Acesso em 30 de 09 de 2021, disponível em <https://www.poder360.com.br/economia/demanda-global-de-energia-caira-53-em-2020-diz-iea/>

Rodrigues, A. C. (2016). *Potencial da Alface D'Água (Pistia stratiotes) para descontaminação de águas contaminadas por Zn e Cd*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica – RJ. Acesso em 30 de 09 de 2021, disponível em <https://tede.ufrjr.br/jspui/bitstream/jspui/2346/2/2016%20-%20Ana%20Carolina%20Dornelas%20Rodrigues.pdf>

Rodrigues, C., Woiciechowski, A. L., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Goelzer, F. D., Sobral, K. C. A., Coral, J. D., Campioni, T. S., Maceno, M. A. C, Soccol, C. R. (2017). *Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial*. Em R. R. Resende, *Biotechnology Aplicada à Agro&Indústria* (Vol. 4, pp. 284-313). Editora Blucher.

Silva, F. L. (2017). *Produção de enzimas lignocelulolíticas e de bioetanol a partir de resíduos da palha de carnaúba (Copernicia prunifera) pré-tratados*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal - RN. Acesso em 06 de 10 de 2021, disponível em [https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/24948/1/ProducaoEnzimasLignocelulol%c3%adticas\\_Silva\\_2017.pdf](https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/24948/1/ProducaoEnzimasLignocelulol%c3%adticas_Silva_2017.pdf)

Souza, K. R. (2016). *Avaliação do potencial do caldo e do bagaço da casca de eucalipto para produção de bioetanol de primeira e segunda geração*. Monografia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina - MG. Acesso em 05 de 10 de 2021, disponível em <http://site.ufvjm.edu.br/dequi/files/2017/07/Kelton.pdf>

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007<sup>1</sup>). *Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*. *BioResources*, 2, 472-499.

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007<sup>2</sup>). *Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review*. *BioResources*, 2, 707-738.

Teixeira, D. A., Santos, A. S., Pantoja, L. A., Brito, P. L., Costa, A. S. V. (2019). *Produção de etanol de segunda geração a partir de aguapé: uma revisão*. *Revista Virtual de Química*, 11(1), 127-143.

Trindade, C. R. T., Pereira, S. A., Albertoni, E. F., Palma-Silva, C. (2010). *Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes limnicos do campus Carreiros*. *Cadernos de Ecologia Aquática*, 5(2), 1-22. Acesso em 21 de setembro de 2021, disponível em <http://www.repositorio.furg.br/bitstream/handle/1/436/Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20e%20import%C3%A2ncia%20das%20macr%C3%B3fitas%20aqu%C3%A1ticas%20com%20%C3%AAnfase%20nos%20ambientes%20lim%C3%ADmnicos%20do%20campus%20Carreiros%20-%20FURG%2C%20Rio%20Grande%2C%>

Ververis, C.; Georghiou, K.; Danielidis, D.; Hatzinikolaou, D.G.; Santas, P.; Santas, R.; Corleti, V. *Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements*. *Bioresource Technology*, 98: 296–301, 2007

Viana, L. S. (2017). *Avaliação do potencial dos resíduos lignocelulósicos da indústria de celulose para a produção de etanol de segunda geração via rotas químicas*. Monografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ.

Whangchai, K., Inta, W., Unpaprom, Y., Bhuyar, P., Adoonsook, D., Ramaraj, R. (2021). *Comparative analysis of fresh and dry free-floating aquatic plant Pistia stratiotes via chemical pretreatment for second-generation (2G) bioethanol production*. Bioresource Technology Reports, 14. doi:10.1016/j.biteb.2021.100651

Xavier, J. O., Campos, M. C., Ribeiro, S. T., & Mota, H. R. (2021). *Macrófitas aquáticas: caracterização e importância em reservatórios hidrelétricos*. Belo Horizonte – MG: Companhia Energética de Minas Gerais - CEMIG. Acesso em 30 de 09 de 2021, disponível em <https://www.cemig.com.br/wp-content/uploads/2021/03/livro-macrofitas-cemig-2021.pdf>

Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V., Wang, D. (2016). *Optimization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous saccharification and fermentation process*. Frontiers in Microbiology, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01411