

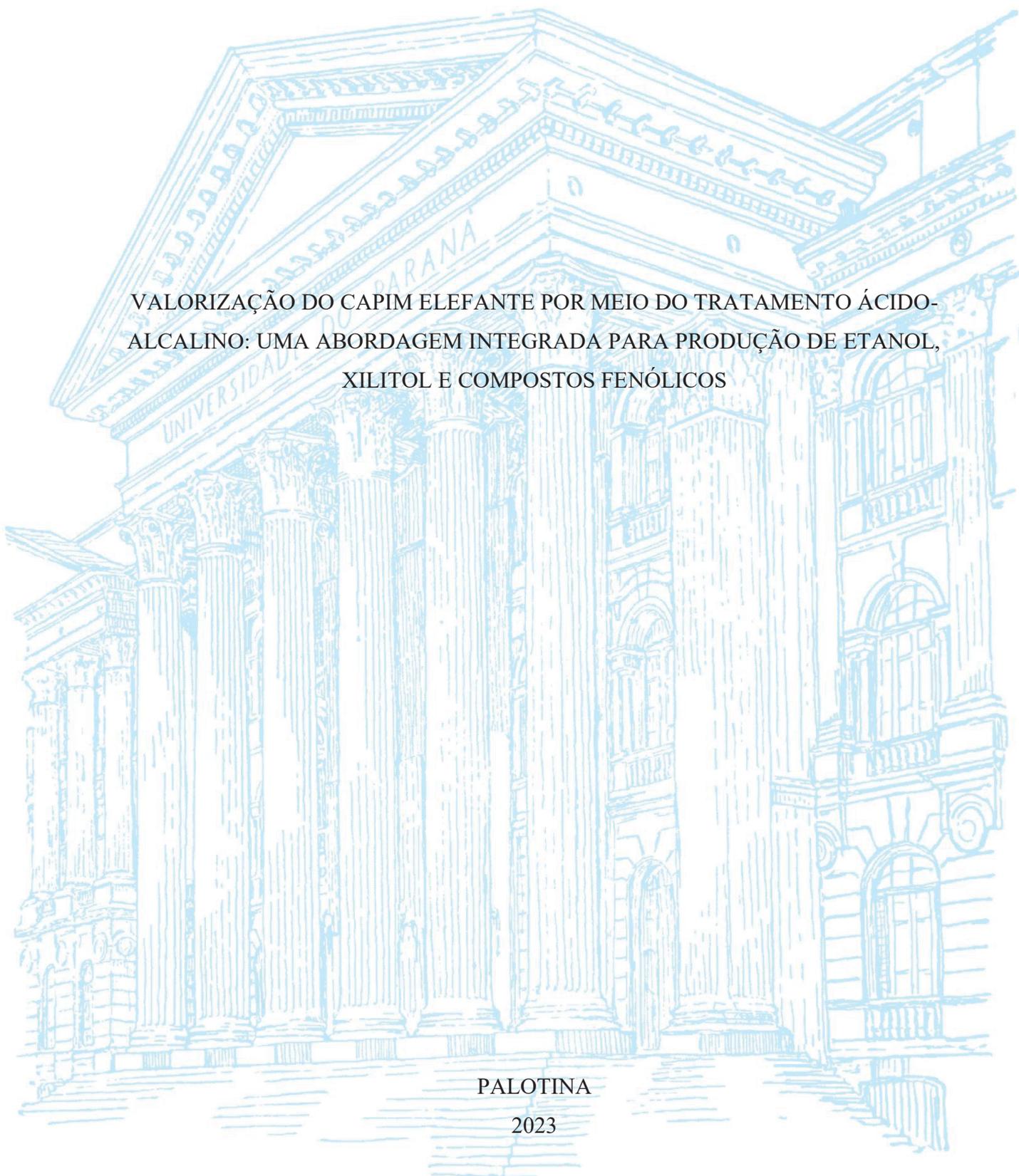
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE PERIN DRESCH

VALORIZAÇÃO DO CAPIM ELEFANTE POR MEIO DO TRATAMENTO ÁCIDO-
ALCALINO: UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL,
XILITOL E COMPOSTOS FENÓLICOS

PALOTINA

2023



ALINE PERIN DRESCH

VALORIZAÇÃO DO CAPIM ELEFANTE POR MEIO DO TRATAMENTO ÁCIDO-
ALCALINO: UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL,
XILITOL E COMPOSTOS FENÓLICOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Bender
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli

PALOTINA

2023

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

D773 Dresch, Aline Perin
Valorização do capim elefante por meio do tratamento ácido-
alcalino: uma abordagem integrada para produção de etanol, xilitol
e compostos fenólicos / Aline Perin Dresch. – Palotina, PR, 2023.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken.

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Bender.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli.

1. Antioxidantes. 2. Biocombustíveis. 3. Biorrefinaria.
I. Teleken, Joel Gustavo. II. Bender, João Paulo. III. Mibielli,
Guilherme Martinez. IV. Universidade Federal do Paraná.
V. Título.

CDU 574

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ALINE PERIN DRESCH** intitulada: **VALORIZAÇÃO DO CAPIM ELEFANTE POR MEIO DO TRATAMENTO ÁCIDO-ALCALINO: UMA ABORDAGEM INTEGRADA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, XILITOL E COMPOSTOS FENÓLICOS**, sob orientação do Prof. Dr. JOEL GUSTAVO TELEKEN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 27 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

28/10/2023 09:03:12.0

JOEL GUSTAVO TELEKEN

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/10/2023 17:03:11.0

ROGÉRIO MARCOS DALLAGO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E MISSÕES - CAMPUS ERECHIM)

Assinatura Eletrônica

27/10/2023 17:06:56.0

SÉRGIO LUIZ ALVES JÚNIOR

Avaliador Externo (UFFS - UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

AGRADECIMENTOS

Antes de iniciar, peço desculpas pelo tamanho e extensão dos agradecimentos, me empolguei levemente na hora de escrevê-los, ficando um pouco maior do que eu imaginava (risos). Mas todas as pessoas que aqui cito, contribuíram enormemente para o meu crescimento pessoal e profissional.

Primeiramente agradeço à Deus, pelo dom da vida e por ter me guiado até aqui.

À minha mãe, Alcira Rosa Perin, e meu pai, José Etacir Dresch, por todos os sacrifícios que fizeram e ainda fazem por mim, de forma a permitir que me dedique aos estudos.

Ao meu orientador, Joel Gustavo Teleken, por toda a atenção e acolhimento desde as nossas primeiras conversas. Quero te dizer que lhe admiro como orientador e pesquisador, você sempre foi muito atencioso e prestativo na hora de sanar as dúvidas que tive nesse meio tempo. Muito obrigado por acreditar na minha capacidade e aceitar orientar meu trabalho.

Aos meus coorientadores, João Paulo Bender e Guilherme Martinez Mibielli, por toda a atenção e acolhimento nesses mais de sete anos de orientação que se decorreram desde a época da iniciação científica da graduação. Quero lhes dizer que sou muito grata por toda a atenção e paciência que tiveram comigo ao longo desses anos, além disso, gostaria de agradecer também pelos puxões de orelha e pela troca de conhecimento que contribuíram, e muito, para meu crescimento pessoal e profissional. Aprendi muito com ambos, e lhes admiro como orientadores, professores e pesquisadores. Vocês transformaram a minha visão sobre a docência, a ciência e a escrita. Parte da pesquisadora que sou hoje, devo a vocês. Além disso, vocês se tornaram mais do que meros orientadores, mas sim, amigos. Obrigado pelos conselhos e por me segurarem firme nos tempos tortuosos da graduação e da pós-graduação. Serei eternamente grata por vocês terem acreditado no meu potencial quando nem eu mesma acreditava, e terem feito de tudo e mais um pouco por mim. Muito obrigado!

À Aline Ruth Schmidt, minha amiga e dupla de laboratório, por toda a ajuda na realização dos experimentos laboratoriais, pela troca de conhecimento e parceria. E também, claro, pelos momentos de risadas, cafés e diversão que partilhamos durante esse meio tempo. Fiz uma nova amizade que não imaginava há 2 anos atrás, mas que se tornou muito especial, sem a sua ajuda no laboratório tudo teria sido mais difícil. Saiba que parte desse trabalho é seu também. Muito obrigado!

À Bruna Caline Sampaio dos Santos, Karine Sayuri Lima Miki e Letícia Renata Bohn, pelos auxílios nos experimentos, pelas conversas, e também pelos momentos de diversão e

risadas que compartilhamos, vocês foram muito especiais nessa trajetória, fizeram o processo se tornar um pouco mais leve. Muito obrigado!

A todos os demais membros do Laboratório de Resíduos Sólidos da UFFS/CH pela troca de conhecimento e pelas horas partilhadas durante esse período.

À Odinei Fogolari, técnico de laboratório da UFFS/CH, pelo auxílio nas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). E aos demais técnicos de laboratório, Caroline Zarzeka, Rodrigo Rodrigues e Tiago Boldrin, por toda a disponibilidade em resolver os problemas que apareciam, seja em termos dos ensaios experimentais ou até mesmo com os equipamentos. Muito obrigado!

À Dayane Gonzaga Domingos e Matheus Cavali, doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA – UFSC) pela parceria na realização das análises de Difração de Raios-X (DRX).

Ao professor Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior, da UFFS/CH, por gentilmente nos ceder as leveduras e os materiais necessários para a realização das fermentações executadas nesse estudo.

Aos meus amigos Sival Francisco de Oliveira Júnior, Marcos Cavalli, Juliane Brancalione e Leiliane da Silva Souza, que mesmo estando longe, sempre me incentivaram, aconselharam e acreditaram na minha capacidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

E por fim, à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Ambiental (PPGETA), os quais me proporcionaram uma imensa troca de conhecimento e experiência.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

(José de Alencar)

RESUMO

Em uma biorrefinaria, busca-se aproveitar ao máximo todos os constituintes presentes nas matérias-primas, de forma a impulsionar a sustentabilidade e a economia circular. Diferentes biomassas já são utilizadas em biorrefinarias, no entanto, dependendo da cultivar escolhida, esta pode parar o processo de produção por um período devido à escassez desse insumo. Diante disso, é de suma importância buscar matérias-primas que sejam disponíveis durante todo o ano. O capim elefante é uma gramínea que possui um rápido crescimento e uma elevada produtividade em termos de matéria seca (35 ton/ha) e é resistente a pragas e a solos com baixos nutrientes, podendo ser plantando em todos os períodos do ano em diferentes condições climáticas. No entanto, apesar de suas propriedades serem relevantes, ainda são poucos os estudos que abordam o aproveitamento total dessa matéria-prima em cenários de biorrefinaria. À vista disso, o presente trabalho teve como objetivos (i) apresentar um possível cenário de biorrefinaria para o fracionamento dos constituintes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de capim elefante por meio do emprego de tratamentos químicos e (ii) obter, a partir desses componentes, produtos de elevado valor agregado, como etanol, xilitol e compostos fenólicos. Primeiramente, foram investigados diferentes tipos de tratamentos químicos: ácido (ácido oxálico 5% m/v), alcalino (hidróxido de sódio 4% m/v) e combinado (ácido-alcalino ou alcalino-ácido). Após definir o melhor cenário de pré-tratamento, foi realizada uma aplicação tecnológica para cada fração lignocelulósica. A produção de xilitol e/ou etanol a partir do licor hemicelulósico foi obtida por meio da fermentação em condições reacionais ótimas por cinco linhagens de leveduras selvagens: CHAP-149, CHAP-155, CHAP-158, CHAP-204 e CHAP-208c. A fração de lignina foi precipitada em meio ácido e caracterizada em termos do seu conteúdo fenólico total e atividade antioxidante, através do método de Folin-Ciocalteu e DPPH, respectivamente. Além disso, o perfil fenólico da lignina foi determinado a partir da análise em CLAE. Por fim, a celulose obtida foi sacarificada através da enzima celulase Cellic CTec2 e fermentada em condições reacionais ótimas por meio da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* PE2. A partir do resultado dos tratamentos químicos, observou-se que o melhor cenário dentro do conceito de biorrefinaria é aquele no qual se realiza primeiramente uma extração ácida, com ácido oxálico 5% (m/v) seguido da extração alcalina, com hidróxido de sódio 4% (m/v). A partir desse tratamento, foi possível solubilizar 99,8% (m/m) da hemicelulose e 97,7% (m/m) da lignina, e, ainda, recuperar 60% (m/m) da celulose com um teor de pureza de 81,1%. O hidrolisado hemicelulósico proveniente do tratamento ácido possuía inicialmente concentrações de 15,2 g/L de xilose, no entanto, a partir da fermentação realizada por meio das leveduras selvagens foi possível determinar que concentrações de 5% (m/v) de ácido oxálico inibiram o metabolismo das leveduras através da elevada concentração de oxalato na solução, fazendo com que elas não produzissem etanol nem xilitol. A lignina recuperada da fração líquida do tratamento alcalino apresentou um valor de atividade antioxidante (IC₅₀) de 0,20 mg/mL, sendo um resultado promissor frente ao encontrado em antioxidantes sintéticos como o hidroxitolueno butilado (BHT) (0,64 mg/mL). Por fim, a partir da fração de celulose, foi possível obter um licor com 46,91 g/L de glicose, o qual apresentou um rendimento em termos da produção de etanol de 0,42 g_{etanol}/g_{glicose} (82% de eficiência fermentativa). A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a biomassa de capim elefante pode ser utilizada como um insumo nas biorrefinarias, visto que possui um grande potencial na produção de diferentes produtos de elevado valor agregado, de forma a contribuir, portanto, na implementação da economia circular e da sustentabilidade.

Palavras-chave: Biorrefinaria. Tratamento químico. Oxalato. Antioxidantes. Biocombustíveis.

ABSTRACT

In a biorefinery, the aim is to maximize the utilization of all constituents present in raw materials in order to promote sustainability and a circular economy. Different biomass sources are already used in biorefineries; however, depending on the chosen cultivar, the process may be halted for a period due to the scarcity of this input. Therefore, it is extremely important to seek raw materials available year-round. Elephant grass is a grass species characterized by rapid growth and high dry matter productivity (35 tons/ha). It is resistant to pests and can thrive in low-nutrient soils, making it suitable for planting year-round under various climatic conditions. Despite its promising properties, there is still limited research on fully harnessing this raw material in biorefinery scenarios. Therefore, the present work aimed to (i) present a possible biorefinery scenario for the fractionation of cellulose, hemicellulose and lignin constituents from elephant grass biomass through the use of chemical treatments and (ii) obtain from these compounds, high-value-added products such as ethanol, xylitol, and phenolic compounds. Different chemical treatments were initially investigated: acid (5% w/v oxalic acid), alkaline (4% w/v sodium hydroxide), and combined (acid-alkaline or alkaline-acid). Immediately after defining the best pre-treatment scenario, an application was carried out for each lignocellulosic fraction. Xylitol and/or ethanol production from hemicellulosic liquor was subjected to fermentation under optimal reaction conditions using five wild yeast strains: CHAP-149, CHAP-155, CHAP-158, CHAP-204, and CHAP-208c. The lignin fraction was precipitated under acidic conditions and characterized in terms of total phenolic content and antioxidant activity using the Folin-Ciocalteu and DPPH methods, respectively. Furthermore, the phenolic profile of lignin was determined through HPLC analysis. Finally, the cellulose obtained was saccharified using the Cellic CTec2 cellulase enzyme and fermented under optimal reaction conditions using the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE2. Based on the results of the chemical treatments, the best scenario within the biorefinery concept involved an initial acid extraction with 5% (w/v) oxalic acid, followed by alkaline extraction with 4% (w/v) sodium hydroxide. This treatment solubilized 99.8% (w/w) of hemicellulose and 97.7% (w/w) of lignin while recovering 60% (w/w) of cellulose with a purity of 81.1%. The hemicellulosic hydrolysate initially contained 15.2 g/L of xylose; however, fermentation using wild yeasts revealed that oxalic acid concentrations of 5% (w/v) inhibited yeast metabolism through the high concentration of oxalate in the solution, meaning that they did not produce ethanol or xylitol. The recovered lignin from the alkaline treatment liquid fraction exhibited an antioxidant activity value (IC₅₀) of 0.20 mg/mL, which is promising compared to that found in synthetic antioxidants such as BHT (0.64 mg/mL). Finally, a liquor containing 46.91 g/L of glucose from the cellulose fraction was obtained, yielding 0.42 g ethanol/g glucose (82% fermentative efficiency). In conclusion, elephant grass biomass can be utilized as a resource in biorefineries, given its significant potential in the production of various high-value-added products. This contributes to the implementation of a circular economy and sustainability initiatives.

Keywords: Biorefinery. Chemical treatment. Oxalate. Antioxidants. Biofuels.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS UTILIZANDO A PALAVRA-CHAVE “BIOMASS BIOREFINERY” INDEXADOS NA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE ENTRE 2002 E 2022.....	19
FIGURA 2 - ESQUEMA DA ANATOMIA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE.....	21
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA HIERÁRQUICA DAS FIBRAS VEGETAIS	22
FIGURA 4 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CADEIA DE CELULOSE.....	23
FIGURA 5 - REGIÕES AMORFAS E CRISTALINAS DA ESTRUTURA DAS FIBRAS DE CELULOSE.....	23
FIGURA 6 - ESTRUTURA DOS MONOSSACARÍDEOS DAS HEMICELULOSES	24
FIGURA 7 - ESTRUTURA DOS MONOLIGNOIS DE ÁLCOOL P-CUMARÍLICO, ÁLCOOL CONIFERÍLICO E ÁLCOOL SINAPÍLICO DA LIGNINA	25
FIGURA 8 - PRINCIPAIS LIGAÇÕES ENTRE A LIGNINA E AS CADEIAS DE CELULOSE E SEU MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO POR MEIO DA QUEBRA DAS LIGAÇÕES EM DECORRÊNCIA DA HIDRÓLISE ALCALINA	28
FIGURA 9 - POTENCIAIS APLICAÇÕES DOS COMPONENTES DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA PRESENTES NAS FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS	30
FIGURA 10 - MONOLIGNOIS E FRAGMENTO DE LIGNINA MOSTRANDO A LIGAÇÃO PRINCIPAL B-O-4	31
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE ORGANIZAÇÃO E HIERARQUIA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO ESTUDO	33
FIGURA 12 - COLHEITA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NAS ÁREAS EXPERIMENTAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL.....	34
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO EM TRATAMENTOS COM TEMPERATURAS INFERIORES A 100 °C	35
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DOS TRATAMENTOS ALCALINOS REALIZADOS NA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE.....	36
FIGURA 15 - PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA	40

FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DE DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL DA LIGNINA	41
FIGURA 17 – FLUXOGRAMA DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA LIGNINA.....	43
FIGURA 18 - PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE	44
FIGURA 19 - FLUXOGRAMA DE ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA	45
FIGURA 20 - DESCOLORAÇÃO TOTAL DAS AMOSTRAS APÓS REALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO	47
FIGURA 21 - FILTRAÇÃO À VÁCUO EM FUNIL DE BÜCHNER DO HIDROLISADO ÁCIDO OBTIDO NO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE CELULOSE E HEMICELULOSE E LIGNINA	49
FIGURA 22 - DIFRATOGRAMAS DE DRX PARA A BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE ANTES E PÓS-TRATAMENTOS QUÍMICOS.....	58
FIGURA 23 - CONSUMO DE (A) XILOSE E (B) GLICOSE NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PARA AS CINCO LEVEDURAS SELVAGENS TESTADAS.....	61
FIGURA 24 - FRAÇÃO DE CELULOSE REMANESCENTE APÓS A ETAPA DE SACARIFICAÇÃO	67
FIGURA 25 - CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL DO HIDROLISADO PROVENIENTE DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE...	67
FIGURA 26 – FLUXOGRAMA DO BALANÇO DE MASSA GLOBAL DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONDIÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OXÁLICO UTILIZADAS EM CADA ENSAIO DE MELHORAMENTO DA ETAPA ÁCIDA DE TRATAMENTO	37
TABELA 2 - FATOR DE HIDRÓLISE DE CADA AÇÚCAR, ÁCIDO ORGÂNICO OU INIBIDOR UTILIZADO PARA INTEGRALIZAR O CÁLCULO DE CELULOSE E HEMICELULOSE	50
TABELA 3 - ANÁLISE COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NÃO TRATADA OBTIDA NESSE ESTUDO E NA LITERATURA	53
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAPIM ELEFANTE (FRAÇÃO SÓLIDA) APÓS A REALIZAÇÃO DO TRATAMENTO QUÍMICO ALCALINO, ÁCIDO E COMBINADO.	55
TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA DOS PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS.....	57
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO CAPIM ELEFANTE NÃO TRATADO E DAS FRAÇÕES SÓLIDAS OBTIDAS APÓS A REALIZAÇÃO DO TRATAMENTO ÁCIDO.	59
TABELA 7 – DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA DOS ENSAIOS DE MELHORAMENTO DO TRATAMENTO ÁCIDO	60
TABELA 8 - COMPARATIVO DOS VALORES DE CFT E IC50 OBTIDOS A PARTIR DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NESSE ESTUDO COM OUTROS ESTUDOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	64
TABELA 9 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA A BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NESTE ESTUDO E NA LITERATURA	68

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AG	- Ácido Gálico
AT	- Atividade Antioxidante
BHA	- Hidroxianisol Butilado
BHT	- Hidroxitolueno Butilado
CFT	- Conteúdo Fenólico Total
CI	- Índice de Cristalinidade
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CSF	- Combined Severity Factor
DPPH	- Radical Livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
IC ₅₀	- Mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de DPPH
kV	- Quilovolt
HMF	- 5-hidroximetilfurfural
mA	- Miliampere
NREL	- National Renewable Energy Laboratory
nm	- Nanômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

®	- Marca registrada
Θ	- Theta
Β	- Beta
α	- Alfa
μ	- Micro (10^{-6})
%	- Porcentagem
/	- Divisão
g	- Grama
°	- Grau
°C	- Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 CONCEITO DE BIORREFINARIA	19
3.2 CAPIM ELEFANTE	20
3.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	21
3.3.1 Celulose	22
3.3.2 Hemicelulose.....	24
3.3.3 Lignina.....	25
3.4 PROCESSOS DE FRACIONAMENTO DA FIBRA VEGETAL	26
3.4.1 Pré-tratamento ácido de materiais lignocelulósicos	27
3.4.1.1 Ácido oxálico	27
3.4.2 Pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos	28
3.4.3 Pré-tratamento químico combinado de materiais lignocelulósicos.....	29
3.5 POTENCIAIS APLICAÇÕES DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE	34
4.2 FRACIONAMENTO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA	34
4.2.1 Tratamento alcalino, ácido e combinado de biomassa de capim elefante	35
4.2.1.1 Tratamento ácido (TAC)	35
4.2.1.2 Tratamento alcalino (TAL).....	36
4.2.1.3 Tratamento combinado.....	37
4.2.1.4 Melhoria da etapa do tratamento ácido.....	37
4.2.2 Determinação do fator de severidade combinada (<i>combined severity factor</i> – CSF) dos pré-tratamentos	38
4.3 OBTENÇÃO DE XILITOL, ETANOL E COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DAS FRAÇÕES DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA.....	38
4.3.1 Produção de Etanol e Xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico.....	38
4.3.1.1 Análise da concentração de sódio no hidrolisado hemicelulósico em fotômetro de chama.....	38

4.3.1.2	Fermentação do hidrolisado hemicelulósico.....	38
4.3.2	Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da lignina isolada.....	39
4.3.2.1	Preparação da solução de lignina.....	41
4.3.2.2	Determinação do conteúdo fenólico da lignina.....	41
4.3.2.3	Determinação do perfil fenólico da lignina via CLAE-MS.....	42
4.3.2.4	Determinação da atividade antioxidante da lignina.....	42
4.3.3	Produção de etanol a partir da fração de celulose.....	43
4.3.3.1	Sacarificação da celulose.....	43
4.3.3.2	Fermentação do caldo hidrolisado rico em glicose.....	44
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FRAÇÕES SÓLIDAS.....	45
4.4.1	Determinação do teor de umidade das frações sólidas.....	46
4.4.2	Determinação do teor de cinzas das frações sólidas.....	46
4.4.3	Determinação do teor de extrativos das frações sólidas.....	46
4.4.4	Determinação do teor de lignina total, celulose e hemicelulose das frações sólidas.....	47
4.4.5	Determinação do Índice de Cristalinidade.....	51
4.5	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FRAÇÕES LÍQUIDAS.....	51
4.6	PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DA CELULOSE E REMOÇÃO DA HEMICELULOSE E LIGNINA PÓS-TRATAMENTOS QUÍMICOS.....	51
4.7	ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE.....	53
5.2	FRACIONAMENTO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA.....	54
5.2.1	Tratamento ácido, alcalino e combinado da biomassa de capim elefante.....	54
5.2.2	Etapa de melhoramento do tratamento ácido.....	59
5.3	OBTENÇÃO DE ETANOL, XILITOL E COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE.....	61
5.3.1	Produção de Xilitol e/ou Etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico.....	61
5.3.2	Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da lignina.....	63
5.3.3	Produção de etanol a partir do caldo hidrolisado rico em glicose.....	66
5.4	BALANÇO DE MASSA GLOBAL DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO E DOS PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DO CAPIM ELEFANTE.....	69
6	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

APÊNDICE A	83
APÊNDICE B.....	84

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o conceito de bioeconomia vem sendo mencionado e discutido com mais frequência devido à maior atenção por parte da indústria e sociedade à sustentabilidade (LARA et al., 2020). Dentro da bioeconomia, o conceito de biorrefinaria é importante, pois é um sistema integrado que leva em conta a sustentabilidade do processo aliado ao desenvolvimento da economia, de forma a aproveitar toda a matéria-prima para produção de produtos de elevado valor agregado (PINO et al., 2019; RUIZ; THOMSEN; TRAJANO, 2017).

As biomassas lignocelulósicas são consideradas uma das fontes mais abundantes do planeta, e uma valiosa fonte de matéria-prima renovável e barata encontrada na natureza (PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021; VERDINI et al., 2021). Contudo, as matérias-primas mais utilizadas no Brasil nas biorrefinarias ainda são a cana-de-açúcar e o milho, cultivares que geram certa competitividade com a indústria alimentícia. Diante disso, atualmente, busca-se utilizar matérias-primas renováveis, de baixo custo, elevada produtividade (menor área de plantio) e que, principalmente, não gerem uma competitividade com a indústria de alimentos.

O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma biomassa lignocelulósica que atende a todos esses requisitos. Possui um rápido crescimento, podendo ser colhido de duas a quatro vezes por ano, sem necessitar o uso de defensivos agrícolas e fertilizantes (LISTA et al., 2020; VARGAS et al., 2023). Além disso, pode ser plantado em áreas menos férteis, devido a sua alta capacidade de adaptação. O capim elefante possui elevada produtividade, de 35 ton/ha, sendo superior à cana-de-açúcar (21 ton/ha), e por se tratar de uma biomassa lignocelulósica, apresenta elevados teores de celulose (~30-50%), hemicelulose (~15-30%) e lignina (~15-30%) em sua composição (ROBAK; BALCEREK, 2020; TOSCAN et al., 2019).

Nas fibras vegetais, a celulose está aderida à hemicelulose e cercada por uma matriz amorfa de lignina. Devido à essa complexa estruturação dos componentes, um dos principais desafios da utilização das biomassas em uma biorrefinaria é desenvolver métodos eficientes para a separação dos componentes, visando sua conversão em produtos comercializáveis de elevado valor econômico (GARCÍA et al., 2022; HALDAR; PURKAIT, 2022; SCOPEL; CAMARGOS; PINTO, 2023). À vista disso, faz-se necessário realizar processos de tratamento que irão promover a quebra dessas ligações entre os três polímeros de celulose, hemicelulose e lignina (DAS et al., 2019). Atualmente, as tecnologias de tratamento utilizadas podem ser físicas, químicas, biológicas ou combinadas. Dentre as citadas, destacam-se os tratamentos químicos, no qual se utilizam álcalis (hidróxido de sódio) e ácidos diluídos (ácido sulfúrico, clorídrico e oxálico) (LU et al., 2019; QING et al., 2015).

Os tratamentos alcalinos são eficientes para a deslignificação, e podem remover um pouco da hemicelulose (SCHMATZ; MASARIN; BRIENZO, 2021). Já os tratamentos ácidos são eficazes para a completa solubilização das hemiceluloses (SAÏED et al., 2023). Por outro lado, pode-se ainda realizar o tratamento químico de forma combinada, o qual atua de forma sinérgica entre os tratamentos alcalinos e ácidos (BARUAH et al., 2018; BHUTTO et al., 2017; PIELHOP et al., 2016). Todos os tratamentos possuem limitações e mecanismos diferentes, portanto, a escolha do método a ser utilizado deve levar em consideração a aplicação final dos constituintes de celulose, hemicelulose e lignina (SCOPEL et al., 2020).

Dentre as inúmeras aplicações possíveis para a celulose, hemicelulose e lignina, pode-se destacar a produção de etanol, xilitol e compostos fenólicos, respectivamente. A produção de etanol combustível é uma realidade no Brasil desde a época de 1970, e sua produção a partir de biomassas lignocelulósicas é uma alternativa que visa reduzir a emissão de gases poluentes (KOLO; WAHYUNINGRUM; HERTADI, 2020). O xilitol é um adoçante alternativo utilizado na indústria de alimentos, que possui um elevado valor econômico (VARGAS et al., 2023). Já os compostos fenólicos obtidos a partir da lignina, apresentam propriedades antioxidantes que podem ser utilizadas no mercado farmacêutico e alimentício (CAVALI et al., 2020; TAVARES et al., 2022).

Diante do exposto, este estudo visou o fracionamento dos constituintes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de capim elefante por meio da realização de tratamentos químicos (ácido, alcalino e combinado), e ainda, a avaliação do potencial de aplicação desses compostos diante da obtenção de produtos de elevado valor agregado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi isolar as frações de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de capim elefante por meio do emprego de diferentes tratamentos químicos, visando a obtenção de etanol, xilitol e compostos fenólicos de forma integrada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atender ao objetivo geral, foram realizadas as seguintes etapas:

- Caracterizar a biomassa de capim elefante *in natura* quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina total (solúvel e insolúvel em ácido), celulose e hemicelulose;
- Avaliar o efeito dos tratamentos químicos na composição físico-química e morfológica da biomassa de capim elefante;
- Avaliar a produção de etanol a partir da fração de celulose;
- Avaliar a produção de etanol e xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico;
- Avaliar o conteúdo fenólico total e a capacidade antioxidante da lignina isolada da biomassa de capim elefante.

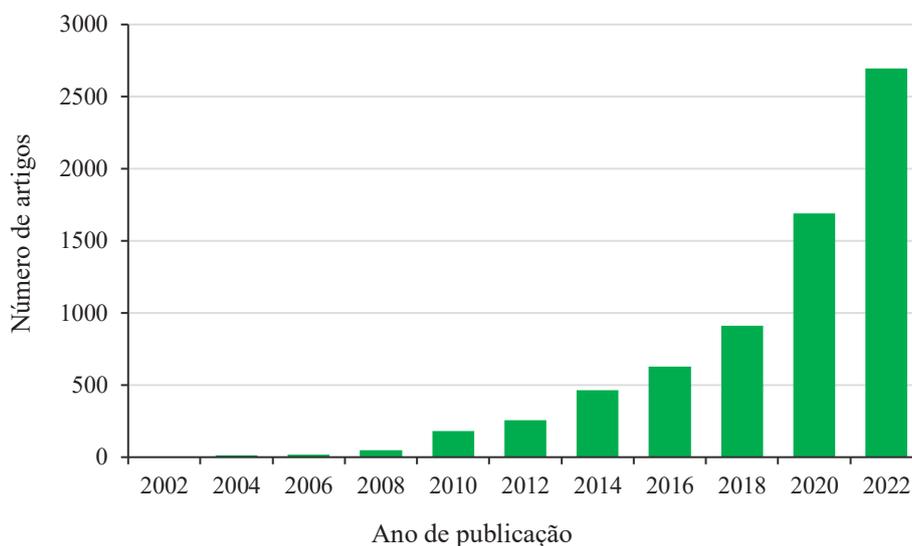
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONCEITO DE BIORREFINARIA

Até o ano de 2050, estima-se que ocorra um aumento populacional de 2,3 bilhões no planeta, e conseqüentemente, nos anos que virão, a comunidade enfrentará um aumento na demanda por alimentos, energia e produtos (TREVISAN; REZENDE, 2020a). Diante disso, busca-se desenvolver cada vez mais produtos e processos mais sustentáveis a partir da transformação e uso de biomassas lignocelulósicas e diferentes tipos de resíduos.

O conceito por trás desse processo é conhecido como bioeconomia, e tem como foco principal o desenvolvimento de biorrefinarias, que são sistemas integrados baseados na transformação econômica e sustentável da biomassa, em produtos de elevado valor agregado, tais como materiais, alimentos, combustíveis, produtos químicos, biológicos e bioenergia (CHANDEL et al., 2018; MTHEMBU; GUPTA; DEENADAYALU, 2023; PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021). Na base de dados Web of Science, é possível notar um aumento significativo no número de artigos publicados utilizando o termo “*Biomass Biorefinery*” nos últimos 20 anos (Figura 1).

FIGURA 1 - NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS UTILIZANDO A PALAVRA-CHAVE “BIOMASS BIOREFINERY” INDEXADOS NA BASE DE DADOS WEB OF SCIENCE ENTRE 2002 E 2022



FONTE: A autora (2023).

No entanto, embora haja um aumento significativo na quantidade de trabalhos publicados, grande parte apresenta somente as potencialidades do uso da biomassa e os métodos de separação das frações, sem apresentar propostas de processos integrados ou o uso de diferentes

matérias-primas. Ainda, nos poucos estudos que apresentam propostas de uso integrado, a biomassa não é utilizada de forma que suas frações sejam aproveitadas em sua máxima potencialidade, pois os componentes são apenas queimados com o propósito de gerar energia na própria refinaria, e não de utilizá-los para obter produtos com um valor agregado superior no mercado (CAVALI et al., 2020). Além disso, na maioria dos artigos opta-se por investigar o potencial de biomassas como cana-de-açúcar e milho, que são mais estudadas para fins de utilização em biorrefinarias, principalmente, no Brasil.

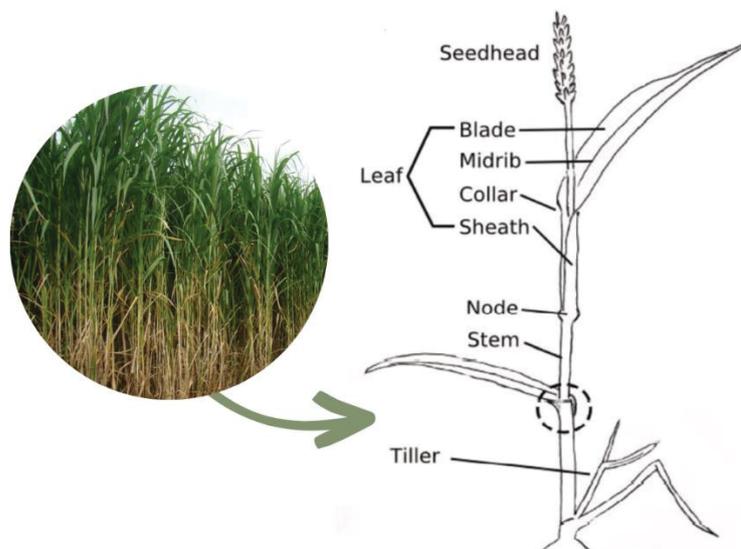
À vista disso, os esforços estão cada vez mais divididos entre a busca por biomassas mais renováveis, a otimização dos processos e a obtenção de produtos de elevado valor agregado, visando reduzir os impactos gerados por insumos derivados do petróleo. Além disso, a utilização de biomassas pode contribuir para a economia circular por meio do emprego de processos mais sustentáveis que beneficiem tanto a indústria, como o meio ambiente.

3.2 CAPIM ELEFANTE

O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma planta originária da África Tropical que pertence à família das gramíneas (*Graminae* ou *Poaceae*) (SCOPEL, 2019). Foi descoberta em 1905 pelo Coronel Napier e difundida no Brasil nos anos de 1920 em todas as cinco regiões do país (FONTOURA; BRANDÃO; GOMES, 2015; LISTA et al., 2020). Possui um alto potencial de produção de matéria seca de aproximadamente 35 ton/ha (comparado a 21 ton/ha da cana-de-açúcar), e se adapta muito bem às condições climáticas adversas e a solos com baixos nutrientes, sendo muito resistente a pragas e doenças (GARCÍA et al., 2022; TOSCAN et al., 2022; VARGAS et al., 2023). Além disso, pode ser colhido de duas a quatro vezes por ano, e não necessita o uso de defensivos agrícolas e fertilizantes para ser cultivado, sendo uma vantagem frente à produção de outras cultivares (NASCIMENTO; REZENDE, 2018).

No Brasil, o capim elefante vem sendo utilizado como planta de cobertura de solo no período entressafra e como pastagem, no qual ocupa cerca de 140.000 ha do território brasileiro (SCOPEL, 2019; TREVISAN; REZENDE, 2020a). Conforme mostra a Figura 2, é uma planta perene, que possui colmos eretos, entre 2 a 2,5 cm de diâmetro (GARCÍA et al., 2022) e folhas largas e compridas, podendo alcançar entre 3 a 5 metros de altura (BRITO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2016).

FIGURA 2 - ESQUEMA DA ANATOMIA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE



FONTE: Adaptado de Nascimento (2020).

Além disso, o capim elefante possui um metabolismo do tipo C_4 , ou seja, uma maior tendência de crescimento e uma elevada eficiência fotossintética que leva à uma alta produção de componentes lignocelulósicos (GARCÍA et al., 2022; TREVISAN; REZENDE, 2020b). A biomassa pode apresentar elevados teores de celulose (~30-50%), hemicelulose (~15-30%) e lignina (~15-30%) em sua composição, sendo semelhante ao encontrado em outras cultivares como milho (DRESCH et al., 2023), cana-de-açúcar (PRAMASARI et al., 2023), milho (JIA et al., 2016) e sorgo sacarino (ZHANG et al., 2019).

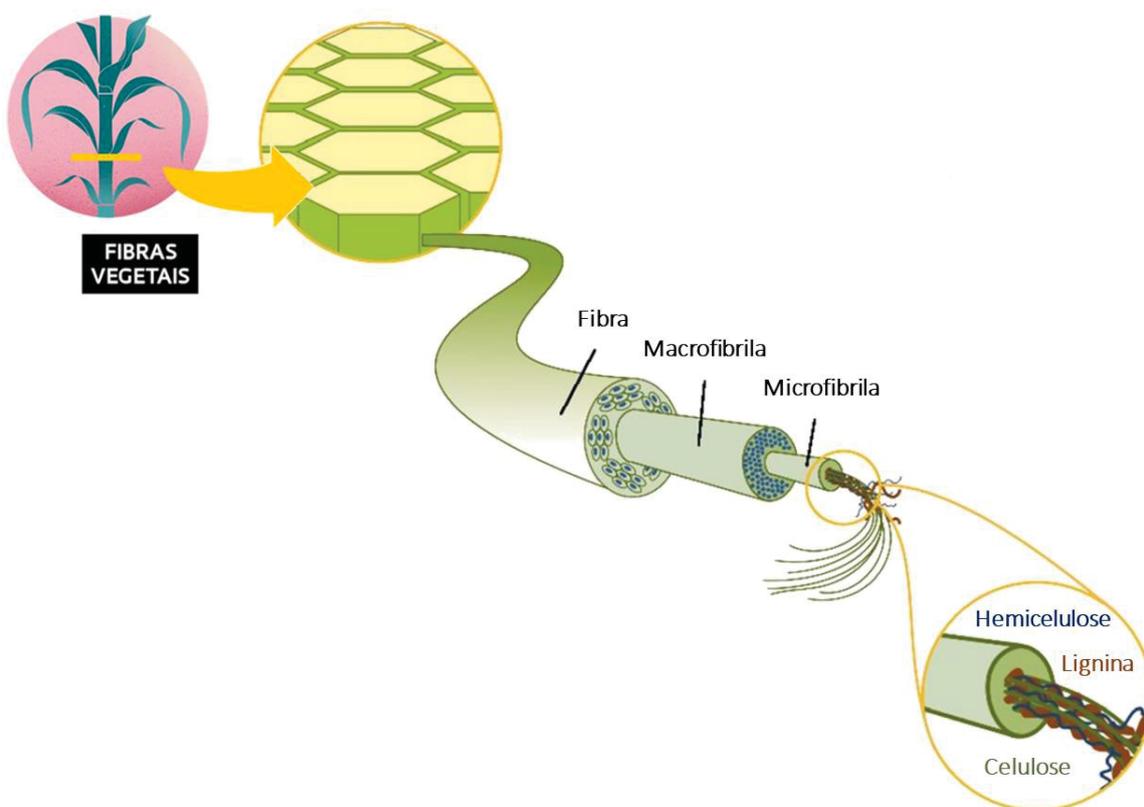
Porém, a grande vantagem que torna o capim elefante promissor frente as demais cultivares, e que o leva a ser considerado para o uso em biorrefinarias, é seu baixo custo, sua elevada produtividade, e principalmente, sua não competitividade com a indústria alimentícia. Além disso, a utilização de forma integral de matérias-primas renováveis, como o capim elefante, pode proporcionar um meio de produção sustentável, diminuindo a emissão de gases poluentes, além de promover o desenvolvimento econômico através da obtenção de diferentes produtos de elevado valor agregado.

3.3 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

As fibras vegetais são materiais lignocelulósicos considerados compostos de fibrilas de celulose unidas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, além de interações de van der Waals (DE OLIVEIRA et al., 2017; XU et al., 2020). As microfibrilas são protegidas por uma matriz constituída de hemicelulose e lignina, formando estruturas maiores chamadas de

macrofibrilas, que compõem a parede celular das plantas (Figura 3) (NASCIMENTO; REZENDE, 2018; SCOPEL, 2019).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA HIERÁRQUICA DAS FIBRAS VEGETAIS



FONTE: Adaptado de Martin-Martinez (2018).

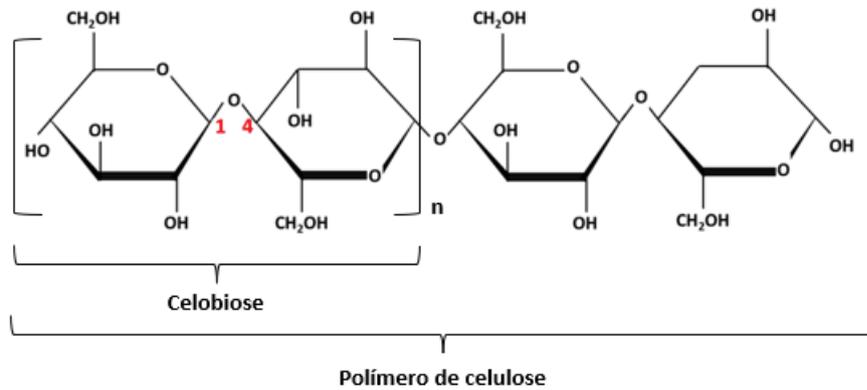
Essa estrutura tem como principal função agir como uma barreira natural a ação de microrganismos, tornando esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (BI et al., 2019; VAIDYA et al., 2016). Devido à essa complexa estruturação dos componentes nas fibras vegetais, um dos principais desafios para produção de insumos a partir de diferentes matérias primas é desenvolver métodos eficientes para a separação dos componentes de celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes presentes em sua composição, como cinzas e extrativos (~5-20%) (BHUTTO et al., 2017; LENHANI et al., 2021; REGO et al., 2019; SCOPEL, 2019).

3.3.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos (KLEMM et al., 2005). Quimicamente, é uma molécula simples formada por anéis de β -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β -1,4-glicosídicas, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. Este polímero natural é

um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose, que estabelece ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (Figura 4) (KLEMM et al., 2005; NASCIMENTO, 2020; VAIDYA et al., 2016).

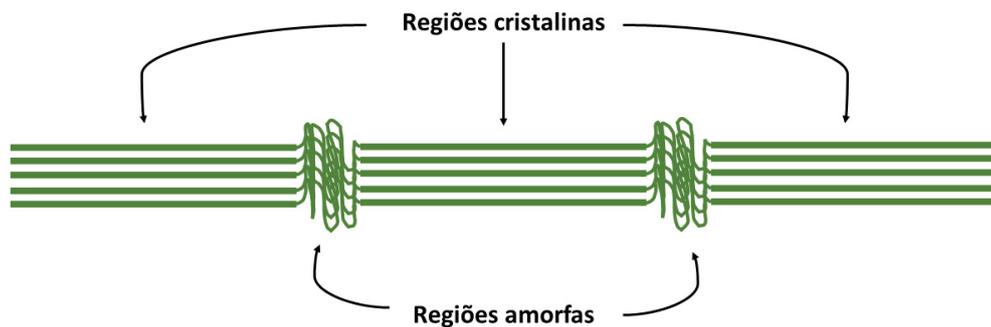
FIGURA 4 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CADEIA DE CELULOSE



FONTE: Adaptado de Okoli et al., 2021.

Nas plantas, as cadeias de celulose podem conter de 2.000 a 25.000 moléculas de glicose, formando as microfibrilas, que são regiões relativamente impermeáveis e resistentes à ação química ou degradação biológica (MENG et al., 2016; SCOPEL, 2019). Devido ao arranjo de suas cadeias, as fibrilas de celulose apresentam regiões cristalinas e amorfas, conforme mostra a Figura 5. Na região amorfa, as moléculas não são tão ordenadas quanto na região cristalina, portanto, se torna mais suscetível aos processos químicos de isolamento (KAUR; KUHAD, 2019; ROBAK; BALCEREK, 2020).

FIGURA 5 - REGIÕES AMORFAS E CRISTALINAS DA ESTRUTURA DAS FIBRAS DE CELULOSE



FONTE: Adaptado de Scopel (2019).

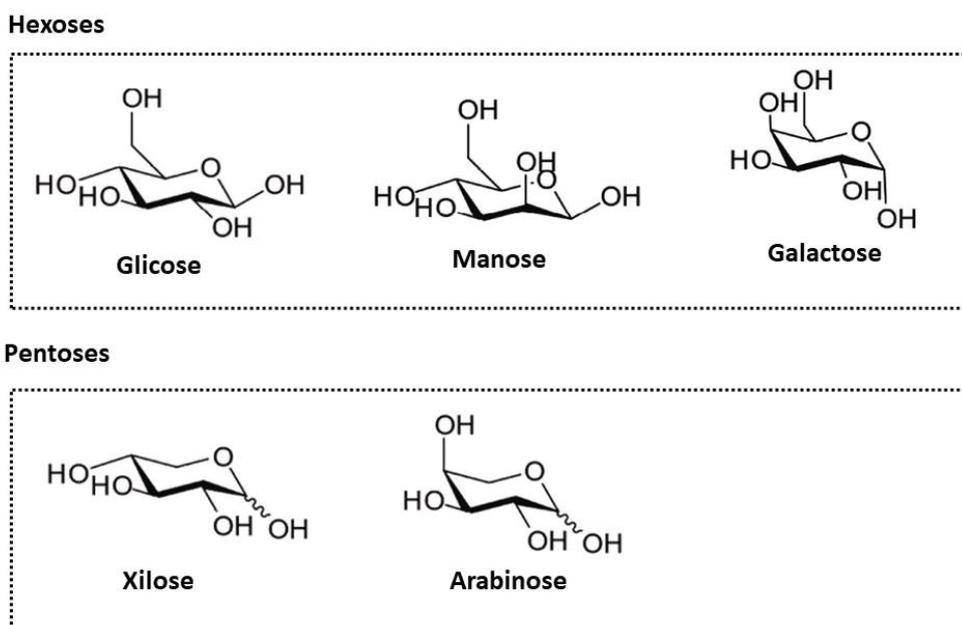
Apesar da sua simplicidade química, a celulose é insolúvel em solventes convencionais. Porém, sua baixa solubilidade se torna vantajosa, visto que permite que os demais componentes da biomassa lignocelulósica, como a lignina e a hemicelulose sejam solubilizados

primeiramente, permanecendo portanto, ao fim, apenas a fração de celulose isolada na fração sólida (NASCIMENTO; REZENDE, 2018; SOUZA et al., 2020).

3.3.2 Hemicelulose

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primárias e secundárias, onde estão diretamente associadas à celulose e à lignina (SCOPEL et al., 2020; VARGAS et al., 2023). As unidades de açúcares que formam as hemiceluloses podem ser subdivididas em grupos, denominados de pentoses e hexoses (Figura 6), que podem variar sua composição de acordo com o tipo de matéria-prima (KLEMM et al., 2005; VILLAIN-GAMBIER et al., 2020).

FIGURA 6 - ESTRUTURA DOS MONOSSACARÍDEOS DAS HEMICELULOSES



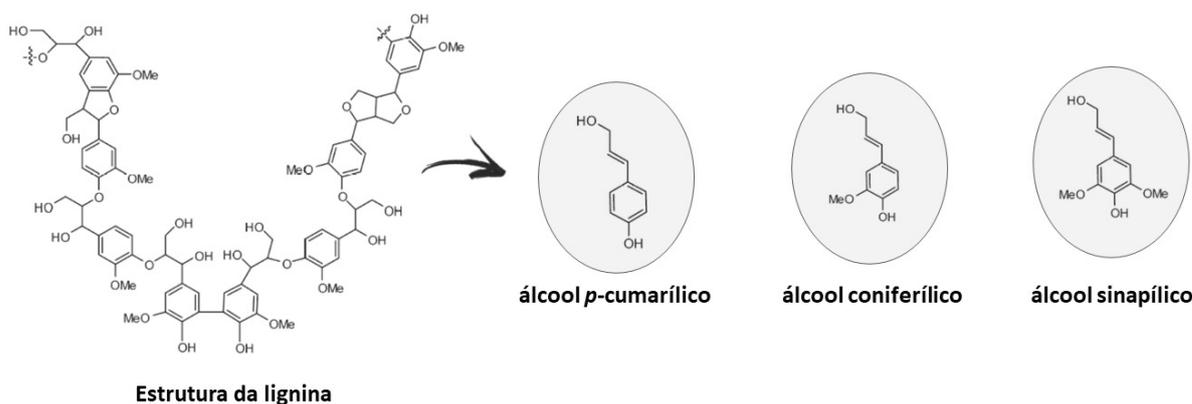
FONTE: Adaptado de Scopel (2019).

Devido à combinação de diversos açúcares e por apresentar uma matriz altamente ramificada, a hemicelulose é um polímero amorfo, mais solúvel em água, que é degradado mais facilmente do que a celulose (LI et al., 2021; SOUZA et al., 2020). Durante a extração, a hemicelulose é convertida em seus oligômeros ou monômeros correspondentes, os quais podem ser utilizados como insumos para a produção de produtos de elevado valor agregado a partir de processos de hidrólise ou fermentação (PRAMASARI et al., 2023).

3.3.3 Lignina

A lignina é um polímero natural heterogêneo que confere rigidez à parede celular, proteção aos ataques microbianos, impermeabilidade e resistência à biomassa vegetal (AN et al., 2019; LANG; LI, 2022). Assim como a hemicelulose, possui estrutura e composição que variam de acordo com a matéria-prima (SCOPEL, 2019). A Figura 7 demonstra a estrutura dos seus precursores, chamados monolignóis, que são formados a partir da polimerização dos fenilpropanóides: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (CAVALI et al., 2021; TREVISAN; REZENDE, 2020a). Essas estruturas estão unidas por ligações éster e éter arílicas β -O-4 e α -O-4, formando uma estrutura tridimensional, amorfa e difícil de ser desestruturada (CAVALI et al., 2020; LENHANI et al., 2021).

FIGURA 7 - ESTRUTURA DOS MONOLIGNÓIS DE ÁLCOOL *p*-CUMARÍLICO, ÁLCOOL CONIFERÍLICO E ÁLCOOL SINAPÍLICO DA LIGNINA



FONTE: Adaptado de Scopel (2019).

Durante o desenvolvimento das plantas, a lignina é o último componente a ser incorporado na parede celular, interpenetrando nas fibrilas e fortalecendo a mesma. Dos três componentes, a remoção dela é a mais difícil, devido à sua forte adesão às fibras de celulose (DAS et al., 2019; TREVISAN; REZENDE, 2020a).

Na literatura, existem quatro métodos mais conhecidos para fracionar a lignina: Kraft, Sulfito, Soda e Organossolve. Nas indústrias, os métodos mais utilizados para a deslignificação da madeira são o Kraft e Sulfito, no entanto, a lignina obtida a partir desses métodos não é pura, pois apresenta elevadas quantidades de enxofre em sua composição, o que limita sua gama de aplicações (AN et al., 2019). O método organossolve pode gerar uma lignina com um teor de pureza mais elevado, entre 70% e 90%, porém, esse método depende do uso de solventes orgânicos. O método soda, comumente utilizado na solubilização da lignina, pode contaminar a mesma com teores elevados de hidratos de carbono provenientes da solubilização dos

extrativos e da hemicelulose para o licor negro junto com a lignina (FLOURAT et al., 2021). No entanto, a realização de um cenário em um processo de biorrefinaria que possibilite a solubilização da hemicelulose e dos extrativos primeiramente, culmina na obtenção de uma lignina mais pura (TREVISAN; REZENDE, 2020a).

O potencial da lignina ainda é subestimado. Esse polímero é utilizado majoritariamente na produção de energia através da queima direta. No entanto, a lignina é considerada um agente antioxidante natural muito promissor, e vários estudos recentes têm sido desenvolvidos com intuito de explorar mais essa propriedade. A lignina é composta por fenilpropanóides, que são compostos antioxidantes cujo potencial de eliminação dos radicais livres vem da capacidade dos grupos fenólicos de impedir a reação em cadeia de oxidação (AN et al., 2019; TREVISAN; REZENDE, 2020a).

3.4 PROCESSOS DE FRACIONAMENTO DA FIBRA VEGETAL

Para isolar os componentes de celulose, hemicelulose e lignina presentes nas fibras vegetais, é essencial realizar etapas de pré-tratamento, pois é nesse processo que as características naturais das ligações dos compostos serão modificadas pela alteração das estruturas supramoleculares (MARTINS et al., 2022; PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021). Ou seja, essa etapa irá potencializar a despolimerização dos componentes estruturais, para que se consiga realizar os processos subsequentes, aumentando assim a degradabilidade dos compostos por meio da realização de métodos físicos, químicos e biológicos de tratamento, bem como uma combinação desses (NASCIMENTO; REZENDE, 2018; TREVISAN; REZENDE, 2020a; VARGAS et al., 2023; WANG et al., 2020).

Cada tipo de pré-tratamento realizará diferentes modificações na estrutura dos compostos de celulose, hemicelulose e lignina, dessa forma, a escolha de qual método será utilizado se torna fundamental, pois a etapa de tratamento é uma das mais custosas de todo o processo (MUJTABA et al., 2023). No entanto, vale ressaltar que o principal objetivo de uma biorrefinaria é conseguir viabilizar esse processo de uma forma mais barata, sustentável e com um total aproveitamento desses compostos, de forma a gerar produtos com elevado valor agregado visando promover a sustentabilidade e a economia circular (NAWAZ et al., 2022; YANG et al., 2016).

3.4.1 Pré-tratamento ácido de materiais lignocelulósicos

O tratamento ácido das fibras lignocelulósicas baseia-se na suscetibilidade das ligações glicosídicas entre hemicelulose e celulose à ação de ácidos, promovendo a quebra das longas cadeias desses constituintes em seus monômeros correspondentes. No entanto, o que ocorre predominantemente é a solubilização da fração hemicelulósica, visto seu baixo grau de polimerização e seu caráter amorfo (BARUAH et al., 2018; DASGUPTA et al., 2022).

A vantagem da utilização de soluções ácidas no processo de pré-tratamento é devido ao seu baixo custo e sua elevada taxa de solubilização das hemiceluloses (> 90%), produzindo um licor rico em xilose (hidrolisado da hemicelulose) que pode ser aproveitado posteriormente (PRAMASARI et al., 2023; YANG et al., 2022). Vários tipos de ácidos minerais podem ser utilizados, sendo o ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o ácido clorídrico (HCl) os mais empregados (KAUR; KUHAD, 2019; NASCIMENTO; REZENDE, 2018).

Os ácidos podem ser utilizados tanto de forma concentrada (30 a 70% m/m ou m/v) a baixas temperaturas de reação (< 100 °C) ou de forma diluída (0,1 a 10%, m/v) sob altas temperaturas (100-250 °C) (BARUAH et al., 2018). No entanto, embora o pré-tratamento ácido de forma concentrada aumente consideravelmente a taxa de conversão de açúcares (> 90%), busca-se pela utilização de ácidos que não sejam tão tóxicos e corrosivos, não levando o processo a alcançar altos custos operacionais e de manutenção nos equipamentos (HONG et al., 2014; IMMAN et al., 2014; QING et al., 2015). À vista disso, a solução encontrada para substituir a utilização dos ácidos minerais vem sendo o emprego de ácidos orgânicos diluídos, tais como maleico, fórmico e oxálico, viabilizando, portanto, uma conversão mais ecológica frente à utilização de ácidos minerais em escala industrial (DAHIYA et al., 2018).

3.4.1.1 Ácido oxálico

O ácido oxálico, um ácido orgânico de fórmula molecular C₂H₂O₄, é um ácido dicarboxílico descoberto em 1760 pelo químico Carl Wilhelme Scheele (LEE; SEO; LEE, 2013). Vêm sendo estudado nas últimas décadas como um substituto dos ácidos minerais no processo de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas como espiga de milho (DENG et al., 2016), palha de trigo (BARISIK et al., 2016) e bagaço de cana (YAN et al., 2018).

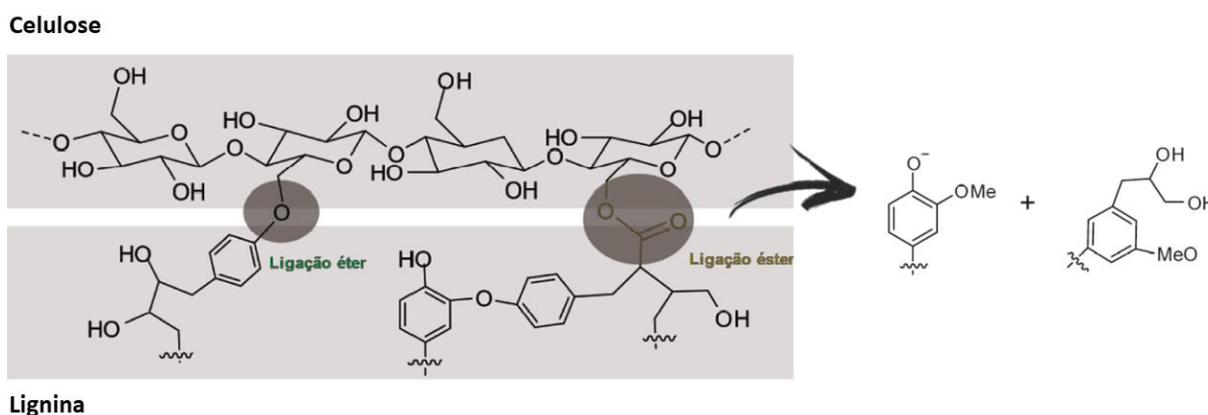
Sob condições menos agressivas, o ácido oxálico consegue despolimerizar seletivamente as regiões amorfas da hemicelulose e reduzir a degradação da celulose. Além disso, por se tratar de um ácido orgânico, espera-se obter menos compostos tóxicos, como

furfural e 5-hidroximetilfurfural, em comparação com a utilização de ácidos minerais fortes, como o clorídrico e sulfúrico (IMMAN et al., 2014; KIM et al., 2011).

3.4.2 Pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento alcalino é um dos métodos mais confiáveis devido ao seu forte efeito e a sua facilidade de processo. Esse método é muito eficaz na deslignificação da biomassa, de forma a não afetar significativamente a estrutura celulósica (BATISTA MENESES et al., 2020; GARCÍA et al., 2022; HALDAR; PURKAIT, 2022). Na etapa alcalina, pode ocorrer parte da dissolução da hemicelulose devido ao rompimento das ligações de hidrogênio com a celulose, no entanto, o que acontece majoritariamente é o rompimento das ligações éster e éter arílicas entre a celulose e a lignina (SCOPEL, 2019; TREVISAN; REZENDE, 2020a), resultando na formação de fragmentos de menor massa molecular, conforme mostra a Figura 8.

FIGURA 8 - PRINCIPAIS LIGAÇÕES ENTRE A LIGNINA E AS CADEIAS DE CELULOSE E SEU MECANISMO DE FRAGMENTAÇÃO POR MEIO DA QUEBRA DAS LIGAÇÕES EM DECORRÊNCIA DA HIDRÓLISE ALCALINA



FONTE: Adaptado de Scopel (2019).

Os principais reagentes utilizados no tratamento alcalino são o sulfito, hidróxido de sódio, hidróxido de amônio e cal (TREVISAN; REZENDE, 2020a). Contudo, com base na literatura, o hidróxido de sódio é a solução alcalina mais utilizada, pois é eficaz na deslignificação e não apresenta enxofre em sua estrutura, como no caso da utilização do sulfito (REZANIA et al., 2020). A reação utilizando o hidróxido de sódio ocorre em meio alcalino (pH entre 11 e 13) com concentrações de reagente que variam de 2 a 15% (m/v). Esse método permite a obtenção de lignina mais pura (> 85%), sem a presença de enxofre e com elevados rendimentos, razão pelo qual é muito escolhido no tratamento químico para diferentes biomassas (GARCÍA et al., 2022; SCOPEL, 2019; TREVISAN; REZENDE, 2020a).

3.4.3 Pré-tratamento químico combinado de materiais lignocelulósicos

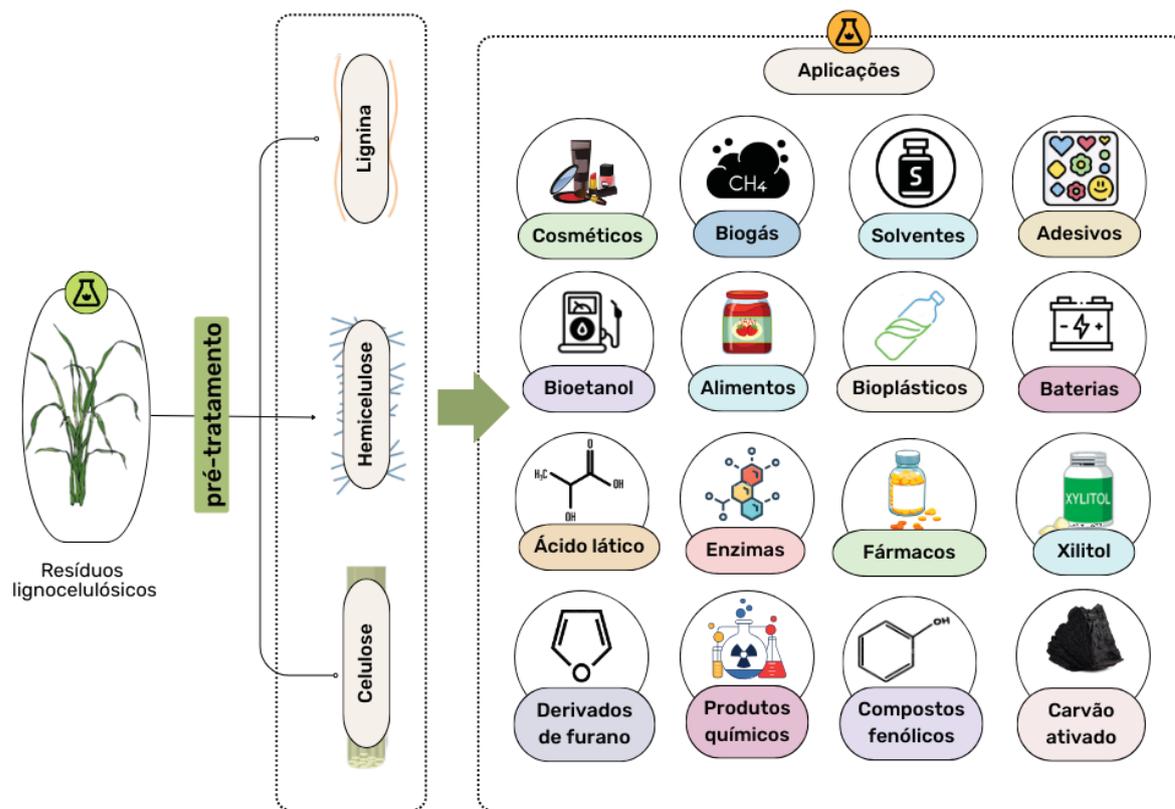
O pré-tratamento sequencial ácido-base ou base-ácido em duas etapas é um procedimento vantajoso para fracionar os componentes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de uma forma mais pura (NASCIMENTO; REZENDE, 2018; SCOPEL et al., 2020). Nesse método de pré-tratamento, a etapa básica é responsável por solubilizar a lignina por meio de grupos reativos (-OH), que atuam na quebra das ligações éter arílicas β -O-4 e α -O-4, obtendo-se, ao fim, um licor negro rico em lignina (CAVALI et al., 2021; TREVISAN; REZENDE, 2020a).

Já a etapa ácida é responsável pela solubilização das hemiceluloses, liberando hexoses e pentoses em um licor negro que pode ser hidrolisado ou fermentado posteriormente (DASGUPTA et al., 2022; HALDAR; PURKAIT, 2022). No entanto, para definir a ordem do sequenciamento dos pré-tratamentos, é necessário levar em consideração qual aplicação final será dada a cada fração, pois, a ordem de fracionamento influencia diretamente na composição final dos licores obtidos, podendo eles serem mais puros ou com outros componentes intrínsecos a eles.

3.5 POTENCIAIS APLICAÇÕES DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

A partir do fracionamento das fibras lignocelulósicas, os constituintes de celulose, hemicelulose e lignina podem ser utilizados de forma isolada como insumos para obtenção de produtos de elevado valor agregado (Figura 9).

FIGURA 9 - POTENCIAIS APLICAÇÕES DOS COMPONENTES DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA PRESENTES NAS FIBRAS LIGNOCELULÓSICAS



FONTE: A autora (2023).

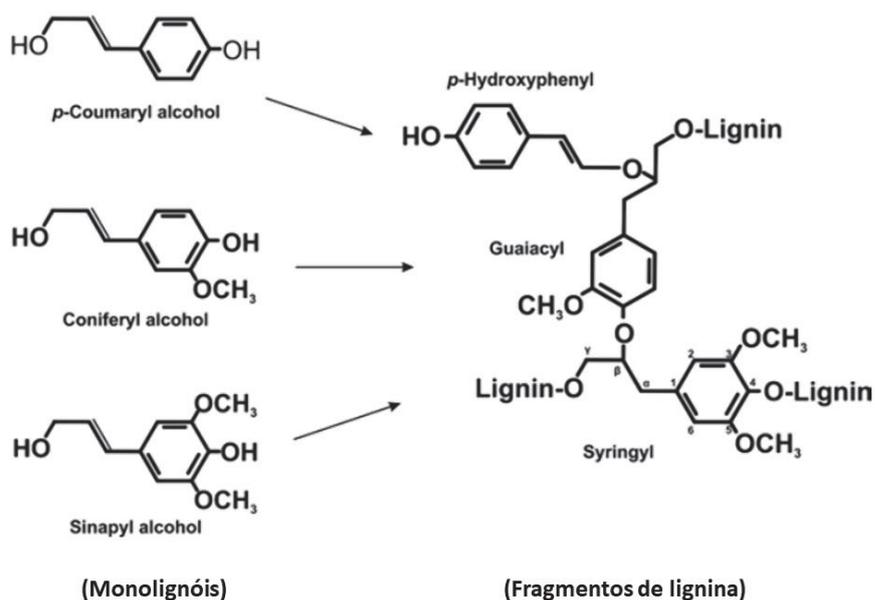
A partir da hemicelulose, uma das aplicações mais relevantes nos últimos anos têm sido a produção de xilitol. O xilitol é um açúcar álcool natural, de cinco carbonos (C₅H₁₂O₅), encontrado em pequenas quantidades nas frutas, vegetais, algas e cogumelos (MOHAMAD; MUSTAPA KAMAL; MOKHTAR, 2015). É utilizado principalmente na indústria alimentícia como adoçante alternativo, pois se assemelha aos açúcares comuns em doçura e possui baixo teor calórico (MOHAMAD; MUSTAPA KAMAL; MOKHTAR, 2015; TRIVEDI; BHONSLE; ATRAY, 2019; XU et al., 2019a). Dentre as pentoses, o xilitol é uma das mais relevantes para o desenvolvimento de processos integrados em biorrefinarias, devido ao seu valor econômico (de aproximadamente 50 a 80 reais o kg) e suas diversas aplicações (DASGUPTA et al., 2022; VARGAS et al., 2023).

Em plataformas de biorrefinaria baseadas em biomassa vegetal, o xilitol é considerado um dos mais importantes produtos derivados de carboidratos, podendo ser produzido por conversão química ou biológica da hemicelulose presente na estrutura da biomassa (BOZELL, 2008; XU et al., 2019b). Diante da produção de xilitol ainda estar em expansão, especialmente pela crescente demanda de mercado devido as suas características benéficas de uso, vem

crecendo a necessidade de realização de pesquisas que viabilizem altos rendimentos de produção, aliados a processos menos onerosos economicamente e ambientalmente sustentáveis (ALBUQUERQUE et al., 2014). Frente a isso, a utilização de biomassas vegetais vem sendo amplamente explorada como potencial insumo para a produção de xilitol, pois aumenta o interesse de fabricação desse bioproduto, agregando valor a ele.

Com relação a lignina, conforme supracitado anteriormente, sua aplicação industrial ainda é considerada um desafio. De modo geral, a lignina é queimada de forma a gerar energia na própria refinaria (SCOPEL; CAMARGOS; PINTO, 2023; TREVISAN; REZENDE, 2020a). Contudo, esse cenário enfatiza a importância da valorização desse biopolímero. Seus três monômeros básicos de fenilpropanol são conhecidos como monolignóis, que são denominados álcool *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, porém quando incorporadas ao polímero de lignina, as unidades dos monolignóis são chamadas de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente, conforme mostra a Figura 10 (CAVALI et al., 2021; TAVARES et al., 2022; TREVISAN; REZENDE, 2020a).

FIGURA 10 - MONOLIGNÓIS E FRAGMENTO DE LIGNINA MOSTRANDO A LIGAÇÃO PRINCIPAL B-O-4



FONTE: De Oliveira et al. (2017)

Esses componentes presentes na lignina levam esse biopolímero a apresentar propriedades biológicas, como atividade antioxidante (TREVISAN; REZENDE, 2020a). Como um antioxidante natural, pode ser colocada no grupo de polifenóis antioxidantes, bem como flavonoides e ácidos fenólicos (CAVALI et al., 2021; LANG; LI, 2022; TREVISAN; REZENDE, 2020a). As características da lignina (por exemplo: alto teor fenólico, capacidade

de interagir com radicais e diversos grupos funcionais) a tornam adequada para aplicações como aditivo polimérico, de tolerância UV, antimicrobianas, anticancerígenas e como base para a produção de vários nanomateriais (CAVALI et al., 2021; HUBBE et al., 2019; TREVISAN; REZENDE, 2020a).

A partir da celulose, uma das aplicações mais realizadas é a produção de etanol combustível. O uso de bioetanol é uma realidade no Brasil desde a década de 1970, e sua produção a partir de biomassas lignocelulósicas é uma alternativa que visa reduzir a emissão de gases de efeito estufa (KOLO; WAHYUNINGRUM; HERTADI, 2020). Somente no ano de 2022, 50,43% da produção de etanol foi proveniente da utilização do melaço da cana-de-açúcar (ANP, 2022). No entanto, reforça-se a necessidade de produzir-se cada vez mais etanol de 2G a partir de resíduos agroindustriais ou plantas que crescem em terrenos menos férteis, devido a diminuição da produção de etanol nos períodos no qual a produção é diminuída, devido ao fim do período de colheita da cana-de-açúcar (SCOPEL, 2019). À vista disso, o capim elefante se mostra como uma alternativa, devido sua grande produtividade em termos de matéria seca e sua facilidade de cultivo, além de não interferir no ciclo do carbono, sendo considerado, portanto, uma fonte de energia limpa (SCOPEL et al., 2020; TOSCAN et al., 2022).

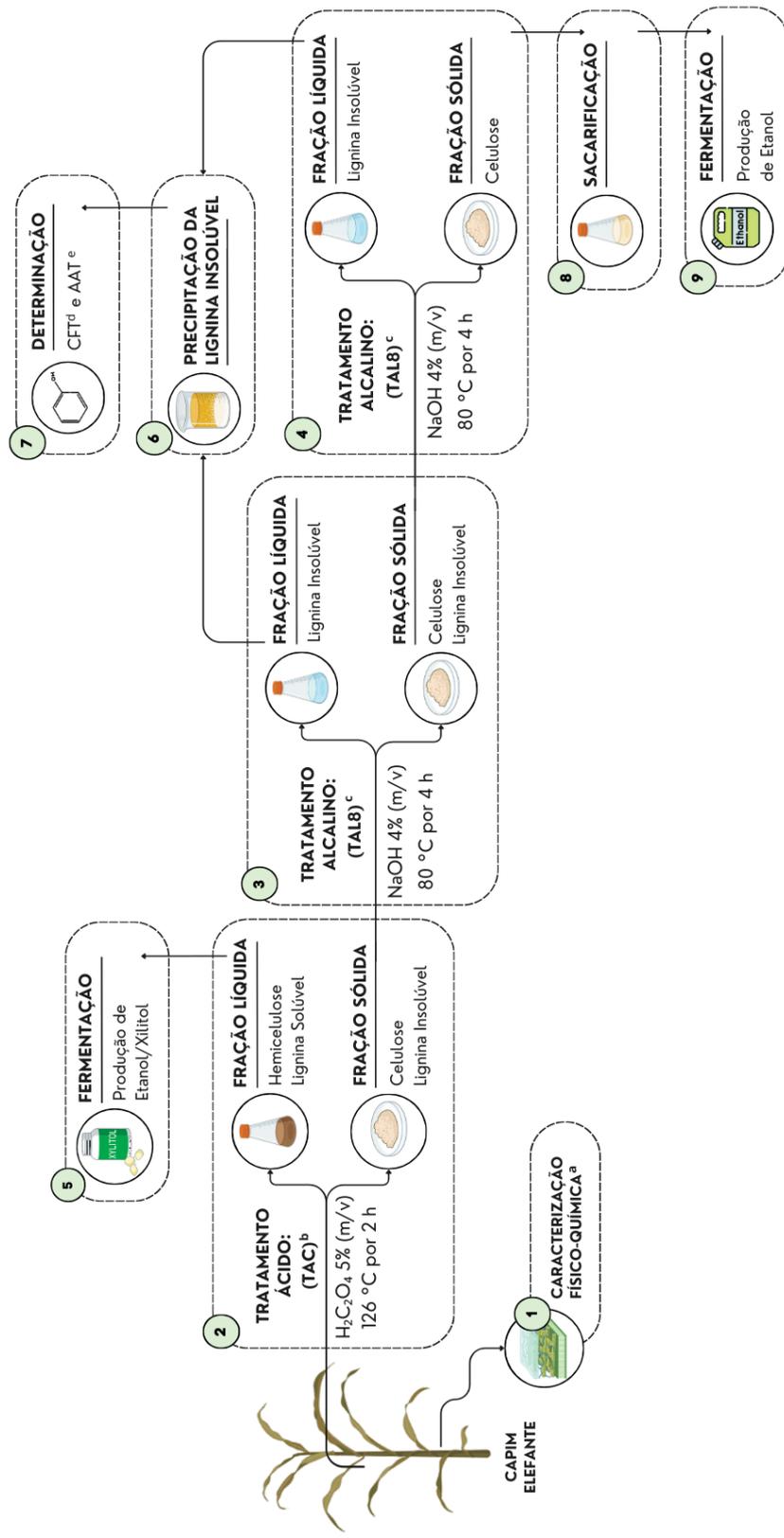
A produção de etanol 2G é dividida em quatro etapas: pré-tratamento, sacarificação, fermentação e destilação. Em uma biorrefinaria, conforme já explanado, o processo de pré-tratamento é uma das etapas mais custosas e é crucial para separar os constituintes lignocelulósicos (MUJTABA et al., 2023). O processo de sacarificação tem como principal objetivo converter a celulose em seu monossacarídeo de glicose, através da catálise de enzimas conhecidas como celulasas (WU et al., 2022). Após a obtenção dos açúcares fermentescíveis, estes serão fermentados em etanol por meio da utilização de microrganismos. Comumente, utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que consome tanto a glicose do meio quanto a sacarose (no caso do etanol de 1G) (MUJTABA et al., 2023; SCOPEL et al., 2020).

À vista disso, podemos perceber que diferentes produtos podem ser produzidos a partir dos componentes lignocelulósicos. No entanto, é de suma importância estabelecer soluções tecnológicas integradas para que se consiga aplicar o conceito de biorrefinaria e bioeconomia, através da valoração da biomassa por meio da obtenção de um processo e de um produto final mais sustentável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar o entendimento da metodologia aplicada no desenvolvimento deste trabalho, apresenta-se, na Figura 11, um fluxograma das atividades realizadas.

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE ORGANIZAÇÃO E HIERARQUIA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NO ESTUDO



^a Teor de cinzas, extrativos, lignina total, celulose e hemicelulose; ^b Tratamento ácido; ^c Tratamento alcalino de 8 horas com 2 extrações;

^d Compostos Fenólicos Totais e; ^e Atividade Antioxidante Total.

FONTE: A autora (2023).

4.1 OBTENÇÃO E PREPARO DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE

O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) foi colhido na área experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Chapecó, Santa Catarina, Brasil (27°11' S e 52°70' W), conforme mostra a Figura 12. Após a colheita, a biomassa foi seca em estufa (AmericanLab model AL - 102/480) a 60 °C por 48 horas. Em seguida, foi moída em moinho de facas tipo Willye (AmericanLab model AL - 032S), e peneirada por meio de um peneirador eletromagnético (Contenco I-1016-B) a fim de se obter partículas com um diâmetro máximo de 0,60 mm. Por fim, a biomassa foi armazenada em embalagens plásticas, para realização dos ensaios subsequentes.

FIGURA 12 - COLHEITA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NAS ÁREAS EXPERIMENTAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL



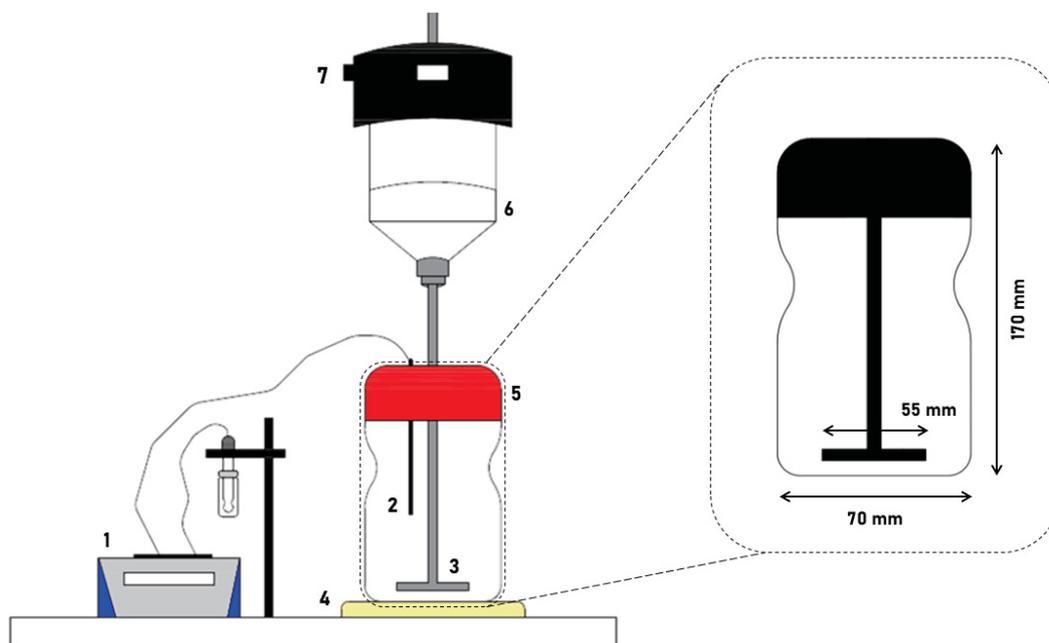
Fonte: A autora (2023).

4.2 FRACIONAMENTO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

Para separar as frações de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de capim elefante, foram testados tratamentos com bases e ácidos diluídos, bem como uma combinação desses. Vale ressaltar que nos ensaios realizados com temperaturas inferiores a 100 °C, utilizou-se uma unidade experimental composta por um reator tipo tanque agitado e um agitador mecânico

(Fisatom, Modelo 713D) acoplado a um impelidor do tipo hélice naval, conforme mostra a Figura 13.

FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO EM TRATAMENTOS COM TEMPERATURAS INFERIORES A 100 °C



(1) pHmetro de bancada; (2) Eletrodo de temperatura; (3) Impelidor; (4) Chapa aquecedora com controle de temperatura; (5) Reator; (6) Motor de agitação e; (7) Controlador de agitação (rpm).

FONTE: A autora (2023).

4.2.1 Tratamento alcalino, ácido e combinado de biomassa de capim elefante

As metodologias dos tratamentos químicos (alcalino, ácido e combinado) descritos a seguir, foram baseadas no estudo realizado por Dresch et al. (2023).

4.2.1.1 Tratamento ácido (TAC)

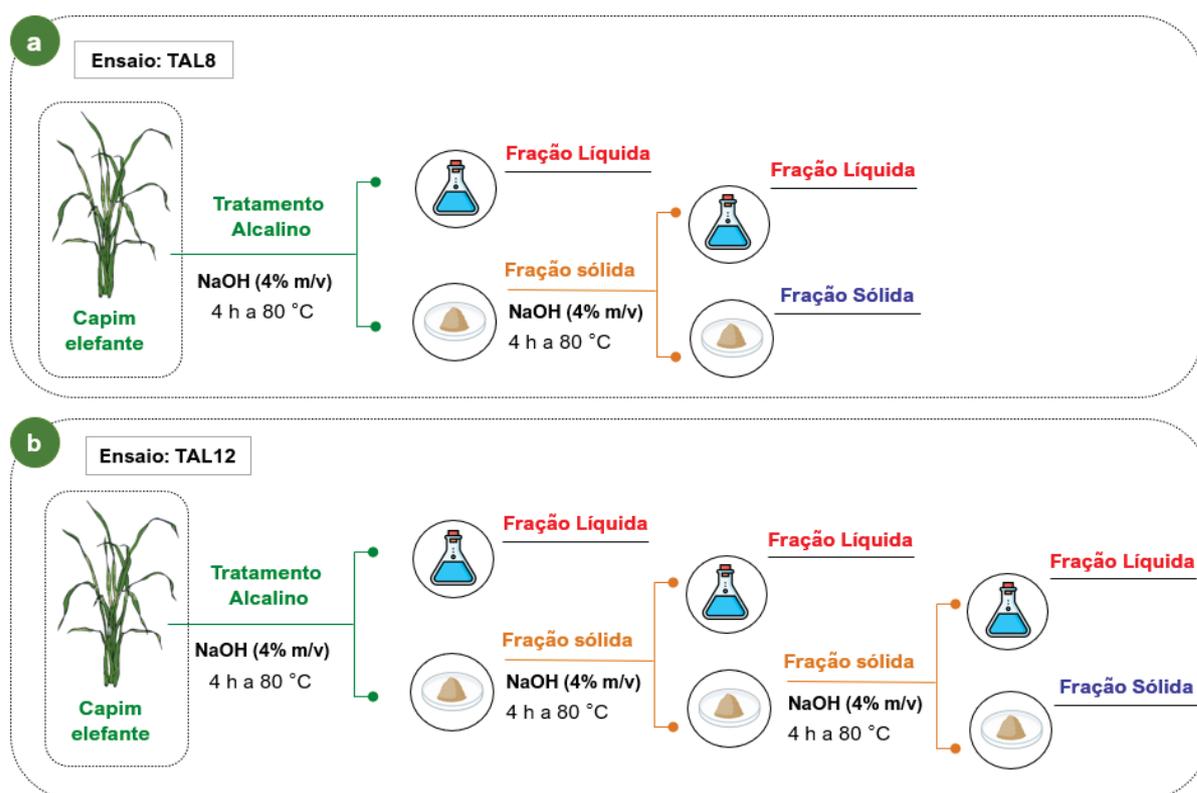
No tratamento ácido, a biomassa seca foi tratada com uma solução de ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) a uma concentração de 5% (m/v), utilizando uma razão sólido:líquido de 1:10 (g/mL). Os erlenmeyers contendo a biomassa de capim elefante e a solução de ácido oxálico foram vedados e colocados em uma autoclave vertical (AV Phoenix Lufenco) a 1,4 bar e aproximadamente 126 °C por 2 horas. Decorrido o tempo do tratamento ácido, a amostra foi filtrada a vácuo em funil de Büchner utilizando o tecido VOAL. A fração líquida foi separada e encaminhada para análise de carboidratos e inibidores em CLAE, conforme descrito no item 4.5. A fração sólida obtida foi resuspensa em 200 mL de água destilada, neutralizada com NaOH 12% (m/v) até pH 6 e filtrada novamente a vácuo em funil de Büchner, utilizando o

tecido VOAL. Ao fim do tratamento TAC, a fração sólida obtida foi seca em estufa a 60 °C por 24 horas, para realização da caracterização físico-química (item 4.4).

4.2.1.2 Tratamento alcalino (TAL)

No tratamento alcalino, a biomassa foi tratada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a uma concentração de 4% (m/v), utilizando uma razão sólido:líquido de 1:10 (g/mL). Ciclos de 4 horas de extração foram conduzidos a 80 °C e 1200 rpm em um agitador mecânico (Figura 14). Para essa metodologia de tratamento alcalino foram realizados dois ensaios, nomeados de TAL8, no qual se realizaram dois ciclos de extração de 4 horas (totalizando 8 horas de tratamento) (Figura 14a); e TAL12, no qual se realizaram três ciclos de extração de 4 horas (totalizando 12 horas de tratamento) (Figura 14b).

FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DOS TRATAMENTOS ALCALINOS REALIZADOS NA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE



a) Ensaio TAL8: dois ciclos de extração de 4 horas e; b) Ensaio TAL12: três ciclos de extração de 4 horas.

FONTE: A autora (2023).

Após o término de cada ciclo de extração de 4 horas, a biomassa foi filtrada à vácuo em funil de Büchner utilizando o tecido VOAL. A fração líquida foi separada e encaminhada para análise de carboidratos e inibidores em CLAE, conforme descrito no item 4.5. A fração sólida obtida em cada extração foi resuspensa em 200 mL de água destilada, neutralizada com ácido

acético (CH_3COOH) 3% (v/v) até pH 6 e filtrada novamente à vácuo em funil de Büchner, utilizando o tecido VOAL. Ao fim do tratamento TAL8 e TAL12, a fração sólida obtida foi seca em estufa a 60 °C por 24 horas, para realização da caracterização físico-química (item 4.4).

4.2.1.3 Tratamento combinado

O tratamento combinado foi uma associação do tratamento alcalino e ácido já descritos, no qual se realizaram dois experimentos:

- 1) AL-AC: tratamento alcalino de 8 horas (TAL8) na biomassa seguido do tratamento ácido (TAC), de forma sequencial e;
- 2) AC-AL: tratamento ácido na biomassa (TAC), seguido do tratamento alcalino de 8 horas (TAL8), de forma sequencial.

A fração líquida obtida em cada etapa foi separada e encaminhada para análise de carboidratos e inibidores em CLAE, conforme descrito no item 4.5. Já a fração sólida obtida ao fim dos ensaios, nomeados de AL-AC e AC-AL, foram secas em estufa a 60 °C por 24 horas, para realização da caracterização físico-química (item 4.4).

4.2.1.4 Melhoramento da etapa do tratamento ácido

Baseando-se nos resultados do teste preliminar do pré-tratamento ácido (item 4.2.1.1), elaborou-se uma série de ensaios a fim de analisar o efeito da aplicação de diferentes concentrações de ácido oxálico e diferentes tempos de reação. Dessa forma, foi investigado se a alteração das variáveis tempo (h) e concentração de ácido oxálico (%), de forma simultânea, reduziriam a solubilização da fração celulósica para a fração líquida, obtendo ainda, um alto rendimento de solubilização das hemiceluloses. Os ensaios foram conduzidos da mesma forma realizada no tratamento ácido (TAC) descrito no item 4.2.1.1, apenas alterando as variáveis para cada ensaio, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1 - CONDIÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPO E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO OXÁLICO UTILIZADAS EM CADA ENSAIO DE MELHORAMENTO DA ETAPA ÁCIDA DE TRATAMENTO

Condição reacional	1	2	3	4	5	6	7
$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ (% m/v)	3,8	5,2	3,8	5,2	3,5	4,5	5,5
Tempo (min)	40	40	120	120	80	80	80

FONTE: A autora (2023).

4.2.2 Determinação do fator de severidade combinada (*combined severity factor* – CSF) dos pré-tratamentos

Os pré-tratamentos foram avaliados com o fator de severidade combinada ($\log R_0$) definido primeiramente por Chum et al. (1990), que descreve a severidade de um tratamento em função do tempo de reação, da temperatura, e do pH, conforme mostra a Equação 1.

$$CSF \text{ ou } \log R_0 = \log \left[t \cdot \exp \left(\frac{T_P - T_{ref}}{14,75} \right) \right] - pH \quad (\text{Equação 1})$$

Onde t é o tempo de reação (em minutos); T_p é a temperatura do tratamento ($^{\circ}\text{C}$); T_{ref} é a temperatura de referência (100°C); e pH é o potencial hidrogeniônico da solução aquosa de ácido oxálico utilizada. Para os tratamentos alcalinos, o valor de pH é substituído pelo valor de pOH.

4.3 OBTENÇÃO DE XILITOL, ETANOL E COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DAS FRAÇÕES DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

4.3.1 Produção de Etanol e Xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico

4.3.1.1 Análise da concentração de sódio no hidrolisado hemicelulósico em fotômetro de chama

Tendo em vista que em um estudo preliminar do grupo de pesquisa não foi possível obter etanol nem xilitol por meio da fermentação do hidrolisado hemicelulósico através do emprego de três linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo uma industrial (PE-2), e duas geneticamente modificadas (MP-P5 e JDY-01) (SCHMIDT et al., 2023), resolveu-se investigar qual problema estaria ocasionando a inibição metabólica das leveduras.

A partir do exposto, a concentração de sódio presente no hidrolisado hemicelulósico foi quantificada através de fotômetro de chama (Digimed, modelo DM-64). A curva de calibração foi preparada em concentrações de 1, 5, 10 e 20 mg/L. As amostras foram diluídas em água ultrapura para atingir a concentração de trabalho. A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso em termos de concentração de sódio (g/L).

4.3.1.2 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico

A partir da elevada quantidade de sal presente no hidrolisado hemicelulósico, foi avaliado se as leveduras selvagens CHAP-149 (isolada da vegetação de restinga da beira da praia dos Ingleses, em Florianópolis/SC), CHAP-155 (isolada de alga coletada na beira da praia

dos Ingleses em Florianópolis/SC), CHAP-158 e CHAP-204 (isoladas do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda*) e CHAP-208c (isolada da flor *Senna macranthera*), conseguiriam consumir os carboidratos para produzir etanol ou xilitol.

As células de levedura foram inicialmente pré-cultivadas em meio de cultura contendo 1,0% (m/v) de extrato de levedura, 2,0% (m/v) de peptona bacteriológica, 2,0% (m/v) de glicose e 2,0% (m/v) de ágar bacteriológico. As células foram inoculadas e incubadas a 30 °C em estufa por 48 h antes de serem utilizadas. Para realizar a fermentação, o hidrolisado hemicelulósico proveniente do tratamento com ácido oxálico foi concentrado até aproximadamente 50% (v/v) do seu volume inicial, através de um evaporador rotativo, de forma a aumentar a concentração dos monômeros de xilose presentes no meio (ALBARELLO et al., 2023; TADIOTO et al., 2022).

Em seguida, o hidrolisado foi suplementado com 1% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de peptona bacteriológica, e teve seu pH ajustado para 6,0 com o auxílio de hidróxido de sódio (NaOH) 2M. Posteriormente, o hidrolisado foi esterilizado em sistema estéril de filtração à vácuo, da marca Kasvi, com membrana PES de 0,22 µm, e acondicionado em recipientes estéreis, sob refrigeração, até o momento do uso.

Os ensaios de fermentação foram realizados em erlenmeyers previamente esterilizados de 250 mL, nos quais 50 mL do hidrolisado foram adicionados juntamente com uma alçada calibrada de 1 µL do pré-inóculo de cada linhagem de levedura supracitada, à temperatura de 30 °C e 145 rpm, por 72 horas, em agitador orbital Shaker. Foram coletadas amostras de 2 mL, em triplicata, a cada 24 horas. As alíquotas coletadas foram centrifugadas a 9.000 rpm durante 5 minutos (7426 g), sendo o sobrenadante filtrado em Filtrilos® de 0,22 µm e encaminhado para análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), para análise do consumo de carboidratos e produção de etanol e xilitol (item 4.5) (LUCARONI et al., 2022; TADIOTO et al., 2022; VARGAS et al., 2023).

4.3.2 Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da lignina isolada

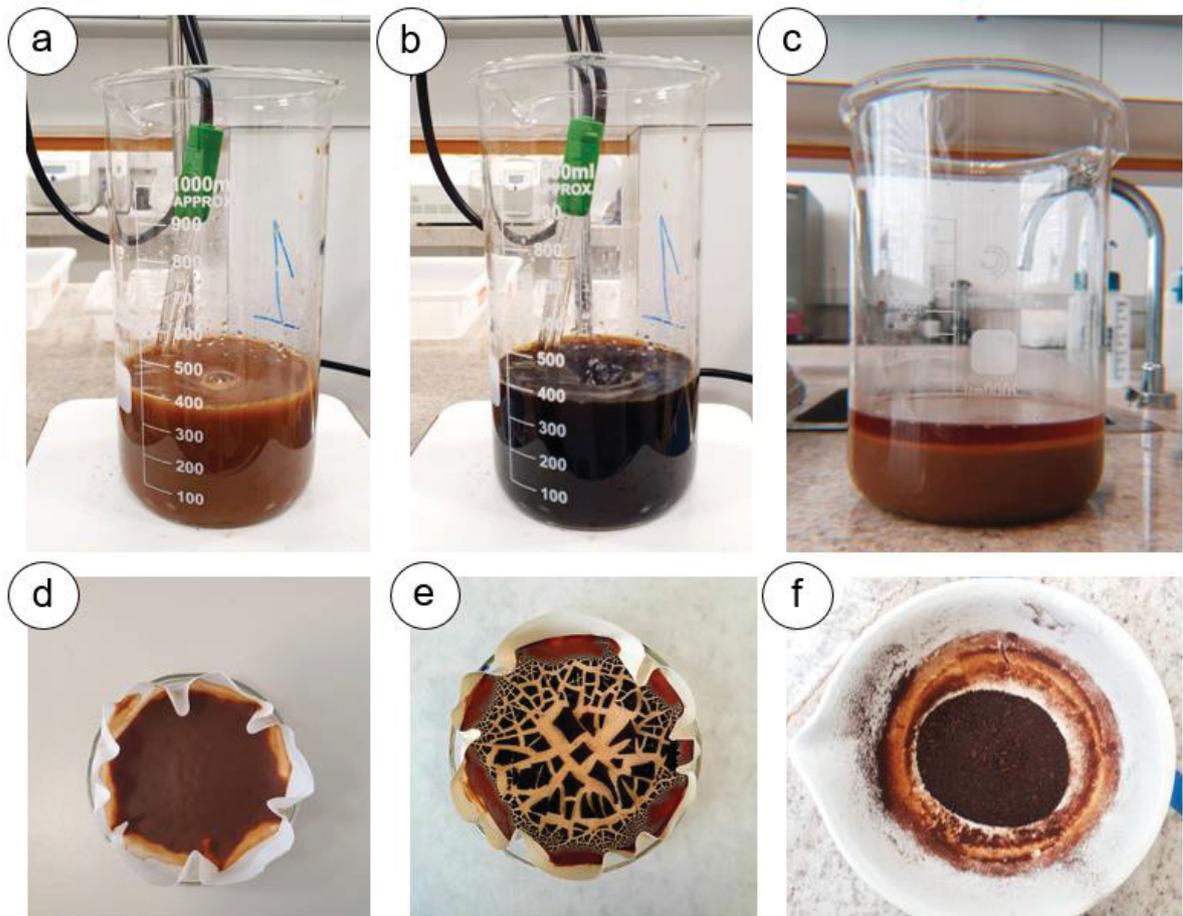
Antes de determinar o conteúdo fenólico total (CFT) e a capacidade antioxidante da lignina isolada da biomassa de capim elefante, esta foi recuperada da fração líquida obtida nas duas extrações alcalinas realizadas no tratamento ácido-alcalino (AC-AL). Para precipitar a lignina, os dois licores obtidos foram homogeneizados (Figura 15a) e tiveram o pH da solução reduzido para 2 com ácido sulfúrico (H₂SO₄) a uma concentração de 72% v/v no período da noite em temperatura ambiente (Figura 15b). A lignina precipitada (Figura 15c) foi filtrada a

vácuo em funil de Büchner utilizando papel de filtro N° 4 – Whatman (Figura 15d), lavada com água destilada e seca em estufa com circulação de ar (AmericanLab model AL - 102/480) a 55 °C até massa constante (Figura 15e) (CAVALI et al., 2021; TAVARES et al., 2022). O percentual do balanço global da recuperação da lignina precipitada (BG_{RL}) da biomassa de capim elefante (Figura 15f) foi calculado a partir da Equação 2.

$$BG_{RL} = \frac{M_{LR}}{M_{LB}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde M_{LR} é massa de lignina recuperada; e M_{LB} é a massa total da lignina insolúvel em ácido presente na biomassa de capim elefante.

FIGURA 15 - PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA



(a) Fração líquida proveniente das duas extrações do tratamento alcalino (TAL8); (b) Hidrolisado com o pH ajustado para 2 com ácido sulfúrico; (c) Lignina precipitada; (d) Lignina filtrada e lavada; (e) Lignina seca e; (f) Lignina moída.

FONTE: A autora (2023).

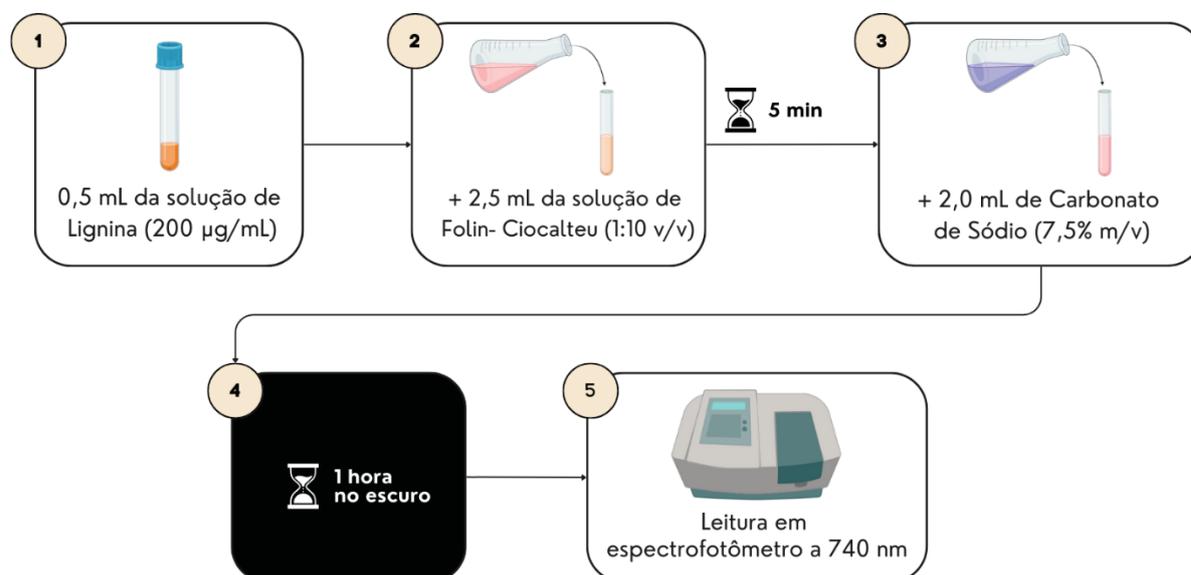
4.3.2.1 Preparação da solução de lignina

Para realização dos ensaios de quantificação dos compostos fenólicos totais (CFT) e da atividade antioxidante (AT), foi preparada uma solução de lignina a uma concentração de 250 µg/mL. Para tal, pesou-se em um béquer de 150 mL, 25 mg da lignina isolada da biomassa de capim elefante. Em seguida, foi adicionado água destilada no béquer, em um volume correspondente a 2/3 do volume final da solução (100 mL). O béquer foi colocado em uma chapa aquecedora a 60 °C com agitação magnética, e adicionou-se NaOH sólido até a solução atingir pH 12. Após a lignina se solubilizar por completo, a solução foi neutralizada até pH 7 utilizando uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (5% v/v), e teve ao fim seu volume aferido com água destilada, para 100 mL.

4.3.2.2 Determinação do conteúdo fenólico da lignina

Para determinar o conteúdo fenólico total foi utilizado o método Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia descrita por Singleton e Joseph (1965) e Medina et al. (2016), com adaptações. Para a análise, foram adicionados 0,5 mL da solução de lignina (200 µg/mL) e 2,5 mL da solução Folin-Ciocalteu (1:10 v/v) em um tubo de ensaio. Após 5 minutos, foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (7,5% m/v). A amostra foi mantida em ambiente escuro durante o período de 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de bancada (NOVA 1600/1800-UV Series) no comprimento de onda de 740 nm (Figura 16). As análises foram realizadas em triplicata e o resultado foi expresso em mg equivalentes de ácido gálico por g de lignina.

FIGURA 16 – FLUXOGRAMA DE DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL DA LIGNINA



FONTE: A autora (2023).

Para a solução controle, 0,5 mL de água destilada foi utilizada ao invés da solução de lignina. A concentração de fenóis foi determinada utilizando o equivalente em microgramas de ácido gálico ($C_7H_6O_5$), no qual foi preparada uma curva de calibração padrão na faixa de 0-100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,9924$).

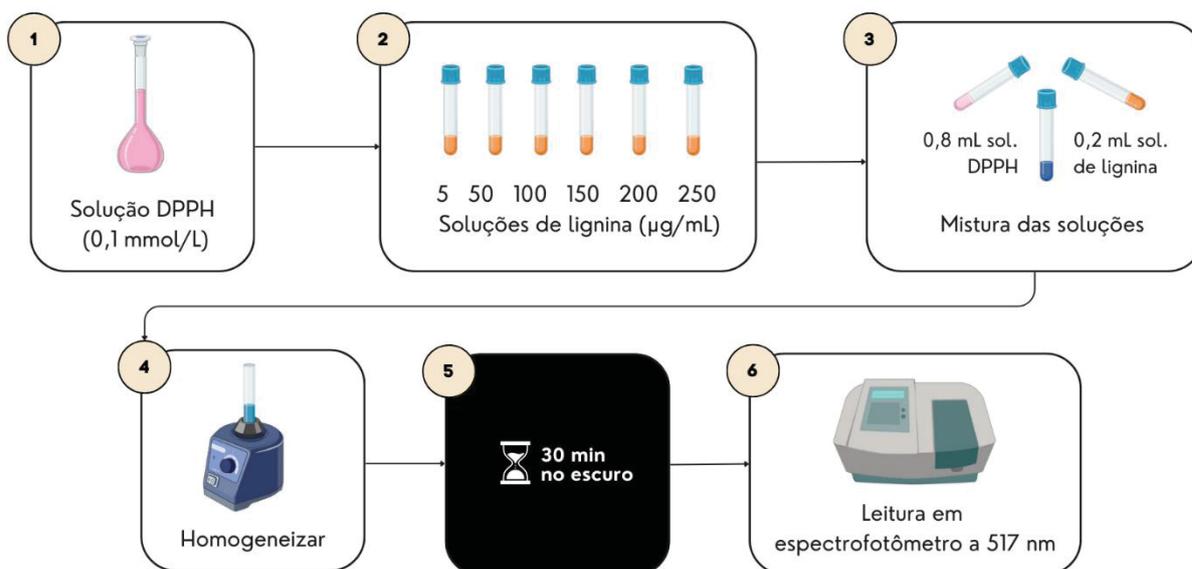
4.3.2.3 Determinação do perfil fenólico da lignina via CLAE-MS

Os compostos fenólicos foram determinados utilizando um cromatógrafo líquido (LC-MS, Shimadzu) acoplado ao detector de massa (CLAE-MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI (-)), seguindo a metodologia descrita por Arruda et al. (2018) com adaptações. A coluna utilizada foi a Shim-pack VP-ODS de fase reversa (150 mm x 2,0 mm (i.d) x 4,6 μm). Utilizou-se como fase móvel A, 0,3% de Ácido Fórmico e como fase móvel B, 50% de metanol, a um fluxo de 0,4 mL/min e temperatura de forno de 40 °C, utilizando o modo gradiente (Apêndice A). A curva padrão foi realizada diluindo os padrões analíticos individualmente, em metanol, na concentração de 1.000 ppm. Os compostos analisados foram kaempferol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, pirocatecol, ácido siríngico e flavona, sendo avaliados de acordo com o tempo de retenção dos padrões injetados (Apêndice B). A concentração dos compostos está expressa em mg/L.

4.3.2.4 Determinação da atividade antioxidante da lignina

A atividade antioxidante foi determinada a partir da capacidade de inibição do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams e Berset (1995), com adaptações. Primeiramente, foram preparadas soluções de 0,1 mmol/L de DPPH (dissolvido em metanol) e concentrações de 5, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g/mL}$ da solução de lignina. Para o ensaio, adicionou-se 0,2 mL da solução de lignina e 0,8 mL da solução de DPPH, sendo a mistura homogeneizada em um agitador Vortex e colocada no escuro por 30 min. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de bancada (NOVA 1600/1800-UV Series) no comprimento de onda de 517 nm (Figura 17).

FIGURA 17 – FLUXOGRAMA DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA LIGNINA



FONTE: A autora (2023).

Para a solução controle, 0,2 mL de água destilada foi utilizada ao invés da solução de lignina. O desempenho da lignina foi avaliado em comparação com uma substância análoga da vitamina E, o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), que possui altas propriedades antioxidantes. A curva padrão de Trolox utilizada variou entre 10 e 100 µg/mL ($R^2 = 0,9887$). A Equação 3 foi utilizada para calcular a porcentagem de inibição de radicais livres (IC_{50} (%)).

$$IC_{50}(\%) = \frac{A_{branco} - A_{amostra}}{A_{branco}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde A_{branco} é a absorbância da amostra contendo 0,2 mL de água destilada e 0,8 mL da solução de DPPH; e $A_{amostra}$ é a absorbância da amostra contendo a solução de lignina.

4.3.3 Produção de etanol a partir da fração de celulose

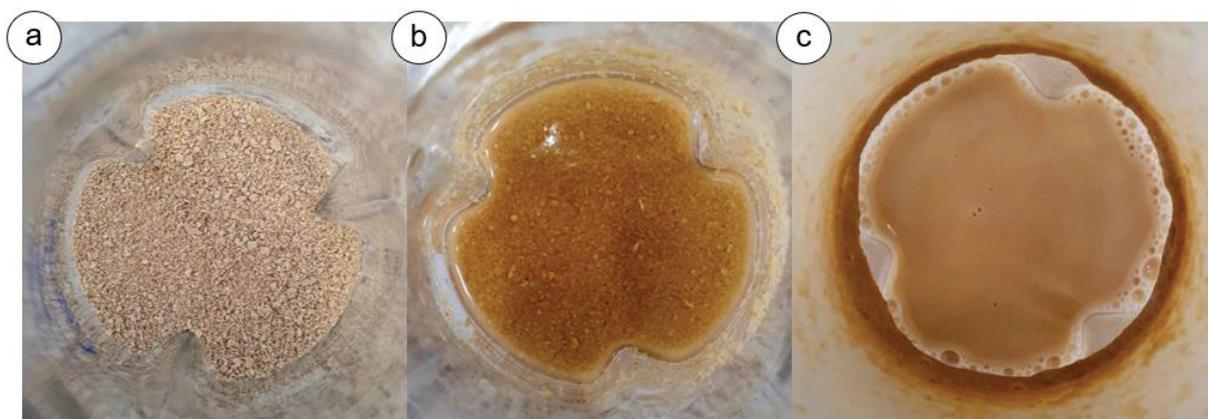
4.3.3.1 Sacarificação da celulose

O processo de sacarificação foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Vargas et al. (2023), com modificações. Para isso, 5 g de celulose (Figura 18a) foram pesadas em erlenmeyers juntamente com 100 mL de água destilada. A solução teve seu pH ajustado para 5 – 5,5 com o emprego de uma solução de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) 0,5 M. Em seguida, a enzima celulase CELLIC® CTec2 (Novozymes Latin America Ltda, Araucária, Paraná, Brasil) foi diluída na razão de 1:10 em tampão acetato (0,05 mol/L e pH 4,8), e adicionada ao meio a uma concentração de 20% (em relação a biomassa seca) (1130 FPU) (Figura 18b).

Posteriormente, os erlenmeyers foram alocados em agitação orbital em Shaker, a 50 °C e 200 rpm por 24 horas.

Após o processo de sacarificação (Figura 18c), os hidrolisados foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos em centrífuga de bancada (9384 g). Aliquotas dos hidrolisados foram filtradas utilizando filtros de membrana não estéril, com porosidade de 0,45 Millipore, diluídas 1:2 em água destilada e analisadas em CLAE (conforme metodologia descrita no item 4.5), de forma a avaliar o conteúdo de monômeros de glicose presentes na amostra.

FIGURA 18 - PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE



(a) Celulose isolada; (b) Solução antes da sacarificação e; (c) Solução após a sacarificação.

FONTE: A autora (2023).

4.3.3.2 Fermentação do caldo hidrolisado rico em glicose

Para obtenção de etanol, o caldo hidrolisado rico em glicose foi fermentado por meio da utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, linhagem industrial comumente utilizada na produção de etanol combustível (BASSO et al., 2008). As células de levedura foram inicialmente pré-cultivadas em meio de cultura contendo 1,0% (m/v) de extrato de levedura, 2,0% (m/v) de peptona bacteriológica, 2,0% (m/v) de glicose e 2,0% (m/v) de ágar bacteriológico. As células foram inoculadas e incubadas a 30 °C em estufa, por 48 h, antes de serem utilizadas (VARGAS et al., 2023).

Para realizar a fermentação, o hidrolisado celulósico proveniente do processo de sacarificação foi concentrado até aproximadamente 50% do seu volume inicial, através de um evaporador rotativo, com intuito de aumentar a concentração dos monômeros de glicose presentes no meio. Em seguida, o hidrolisado foi suplementado com 1% (m/v) de extrato de levedura e 2% (m/v) de peptona bacteriológica e teve seu pH ajustado para 6,0, com o auxílio de hidróxido de sódio (NaOH) 2M. Posteriormente, o hidrolisado foi esterilizado em sistema

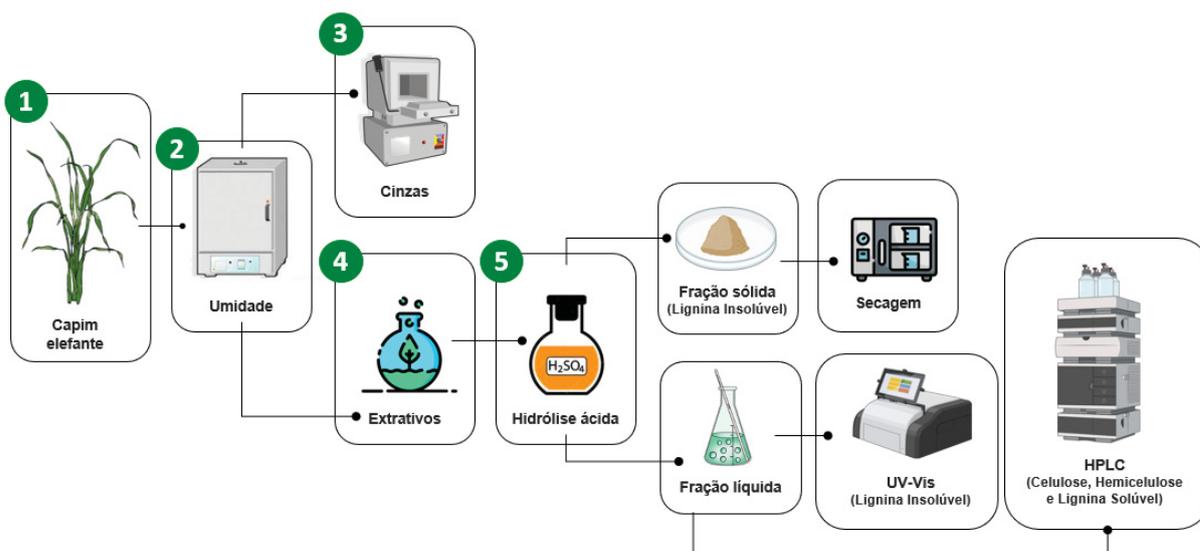
estéril de filtração à vácuo, da marca Kasvi, com membrana PES de 0,22 μm , e acondicionado em recipientes estéreis, sob refrigeração, até o momento do uso.

Os ensaios de fermentação foram realizados em erlenmeyers previamente esterilizados de 250 mL, no qual, 50 mL do hidrolisado foram adicionados juntamente com uma alçada calibrada de 1 μL do pré-inóculo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, a 30 °C e 145 rpm, por 48 horas, em agitador orbital Shaker. Foram coletadas alíquotas de 2 mL, em triplicata, no período da manhã, tarde e noite. As amostras coletadas foram centrifugadas a 9.000 rpm durante 5 minutos, onde o sobrenadante foi filtrado em Filtrilos® de 0,22 μm e encaminhado para análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), para quantificação do consumo de carboidratos e produção de etanol (item 4.5) (LUCARONI et al., 2022; TADIOTO et al., 2022; VARGAS et al., 2023).

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FRAÇÕES SÓLIDAS

Para determinação do teor de umidade, cinzas, extrativos, lignina total (solúvel e insolúvel em ácido), celulose e hemicelulose da biomassa de capim elefante *in natura* e após os tratamentos químicos realizados, seguiu-se os procedimentos descritos pela National Renewable Energy Laboratory (NREL) (SLUITER et al., 2012). Todas as análises foram realizadas em quadruplicada. Na Figura 19, é exemplificado o sequenciamento das etapas do processo.

FIGURA 19 - FLUXOGRAMA DE ANÁLISES PARA A DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA



FONTE: A autora (2023).

4.4.1 Determinação do teor de umidade das frações sólidas

Para determinar o teor de umidade, 6 gramas de amostra foram homogeneizadas, pesadas em uma placa de petri e levadas à estufa a 105 °C, até massa constante. O teor de umidade foi calculado a partir da Equação 4.

$$\% \textit{ umidade} = \left(1 - \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \right) * 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde M_1 é a massa da placa de petri vazia (g); M_2 a massa da placa de petri com a amostra úmida (g); e M_3 a massa da placa de petri com a amostra seca (g).

4.4.2 Determinação do teor de cinzas das frações sólidas

Para a quantificação do teor de cinzas, 1 g de material seco foi pesado em cadinhos de porcelana, devidamente lavados e secos. A carbonização do material foi realizada em mufla, a 800 °C, por duas horas. Em seguida, as amostras foram retiradas da mufla e colocadas em um dessecador até atingirem temperatura ambiente. A calcinação foi novamente realizada por mais 30 minutos para verificar a constância de peso. A concentração de cinzas foi calculada a partir da Equação 5.

$$\% \textit{ cinzas} = \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde M_1 é a massa do cadinho (g); M_2 a massa do cadinho com a amostra (g); e M_3 a massa do cadinho com as cinzas (g).

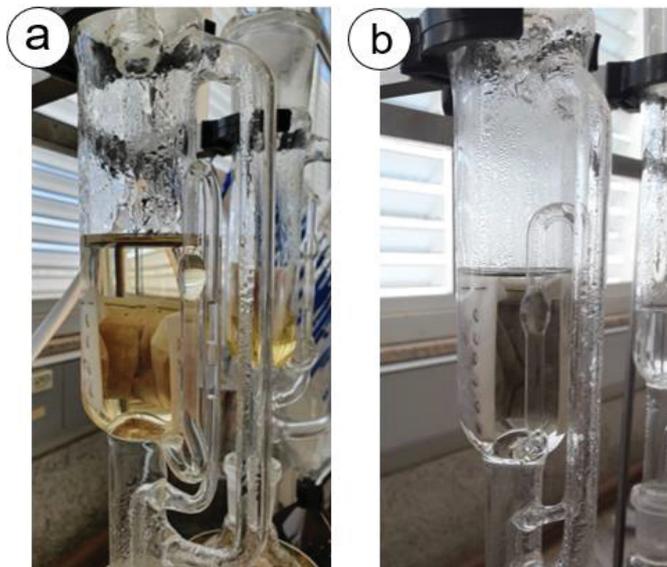
4.4.3 Determinação do teor de extrativos das frações sólidas

Cabe salientar que a determinação do teor de extrativos na biomassa apresenta duas finalidades: quantificar os extrativos para análise compositora e remover o material não estrutural antes da quantificação da lignina e dos carboidratos, para que não haja interferência nas etapas analíticas subsequentes.

Para a determinação dos extrativos, cerca de 2 g do material seco foi adicionado ao cartucho de extração previamente confeccionado com papel de filtro. Após a montagem dos cartuchos, este foi introduzido na corneta de extração do Soxhlet. Posteriormente, adicionou-se 150,0 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. O conjunto foi acoplado no equipamento e o aquecimento foi ligado, iniciando a extração (Figura

20a). A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor (Figura 20b).

FIGURA 20 - DESCOLORAÇÃO TOTAL DAS AMOSTRAS APÓS REALIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO



(a): Coloração do solvente em torno do cartucho no início da extração;

(b): Coloração do solvente após o término da extração (incolor).

FONTE: A autora (2023).

Após extração com água destilada, as amostras foram novamente submetidas à uma nova extração utilizando 150,0 mL de álcool etílico em cada balão extrator. A extração foi mantida até o desaparecimento total da descoloração das amostras. Ao término da extração, de forma a determinar o peso do material seco livre de extrativos, o cartucho foi seco em estufa a 105 °C até peso constante. Para o cálculo do teor de extrativos utilizou-se a Equação 6.

$$\% \text{ extrativos} = \left(\left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \right) * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde M_1 é a massa da biomassa utilizada (g); e M_2 a massa da biomassa livre de extrativos (g).

4.4.4 Determinação do teor de lignina total, celulose e hemicelulose das frações sólidas

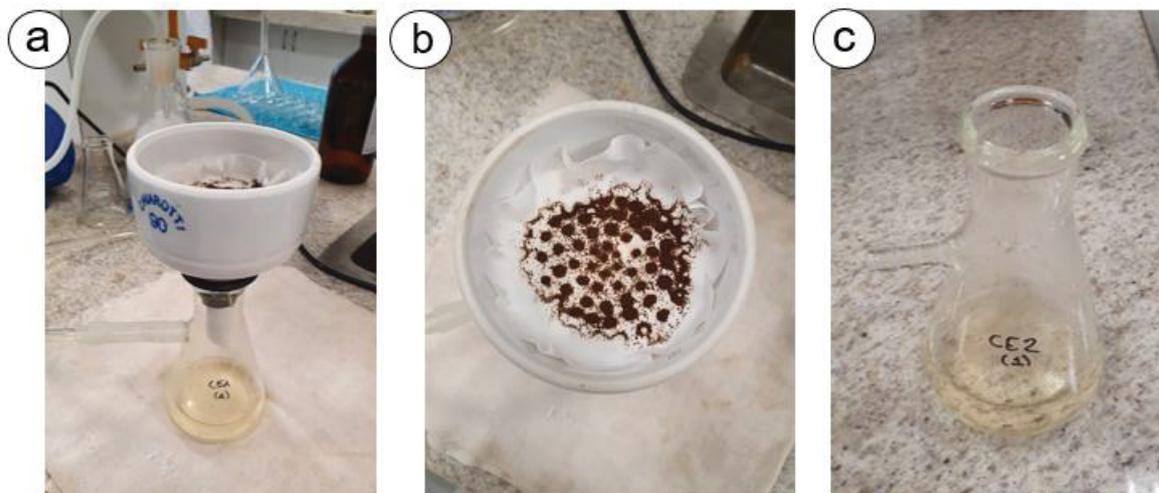
Para determinar o teor de celulose, hemicelulose e lignina total (solúvel e insolúvel em ácido), 0,3 g de amostra foram pesadas em tubos de ensaio juntamente com 3,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 72% (v/v). Para a amostra controle, foram adicionados apenas 3,0 mL de ácido sulfúrico. Posteriormente, os tubos foram colocados em um banho termostático a 30 °C por 1 h, sendo homogeneizados com um bastão de vidro a cada 5-10 min. Após o processo de

hidrólise ácida concentrada, foi realizado o processo de hidrólise ácida diluída, no qual os tubos foram removidos do banho e tiveram seu conteúdo transferido para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para isso, 84 mL de água destilada, sendo a concentração do meio ácido diluída para 4%. Para a completa hidrólise dos oligômeros, os frascos foram vedados e colocados em uma autoclave a 121 °C e 1,1 bar por 1 hora.

Decorrido o tempo, os frascos foram retirados da autoclave e resfriados até temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de büchner, utilizando papel de filtro (Figura 21a). A fração sólida obtida, conforme mostra a Figura 21b, foi lavada com água destilada em abundância — aproximadamente 500 mL —, e depois, seca em estufa, a 40 °C até peso constante. Para a fração líquida (Figura 21c), foram realizados dois procedimentos:

1. O hidrolisado ácido foi diluído na razão de 1:100, para realizar a leitura em um espectrofotômetro UV-Visível (NOVA 1600/1800-UV Series) no comprimento de onda de 280 nm, utilizando cubetas de quartzo.
2. Cerca de 20 mL do hidrolisado ácido foi adicionado em béqueres de 50 mL, para ter seu pH ajustado para a faixa entre 5 e 6 com o auxílio de Carbonato de Cálcio (CaCO_3) em pó. Posteriormente, uma alíquota foi filtrada em eppendorfs de 2 mL, utilizando seringa e filtros de seringa de 0,45 μm . A alíquota filtrada foi armazenada em freezer para posterior leitura em CLAE, a fim de quantificar as concentrações de lignina solúvel, carboidratos, grupos acetil, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Para a quantificação dos carboidratos e produtos em decomposição, foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (modelo LC-MS, Shimadzu), equipado com um detector de índice de refração (RID-1, Shimadzu) e uma coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H, Bio-Rad). Na fase móvel, foi utilizado 5 mM de ácido sulfúrico a uma temperatura de forno de 50 °C e um fluxo de 0,6 mL/min. A concentração dos produtos de decomposição foram determinadas a partir da utilização de um detector SPD-M20A, operado com uma coluna (NST-18), eluída com acetonitrila/água a uma razão de 85:15 e com ácido acético 1% (v/v), a uma temperatura de forno de 40 °C e um fluxo de 0,8 mL/min (DRESCH et al., 2023; TADIOTO et al., 2022; VARGAS et al., 2023).

FIGURA 21 - FILTRAÇÃO À VÁCUO EM FUNIL DE BÜCHNER DO HIDROLISADO ÁCIDO OBTIDO NO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE CELULOSE E HEMICELULOSE E LIGNINA



(a): Separação da fração sólida e líquida utilizando filtração à vácuo em funil de büchner; (b): Fração sólida (lignina insolúvel); (c) Fração líquida obtida (lignina solúvel, carboidratos e produtos de decomposição).

FONTE: A autora (2023).

Para o cálculo do percentual de lignina solúvel e insolúvel em ácido, utilizou-se as Equações 7 e 8.

$$\% \text{ lignina solúvel} = \left(\frac{\text{Conc. lignina solúvel} * V \text{ filtrado}}{M_1} \right) * 100 \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{Conc. lignina solúvel} = [41,87 * ((AT * FD) - APD) - 0,3279] * 10^{-3}$$

$$APD = C1 * \epsilon_1 + C2 * \epsilon_2$$

Onde V_{filtrado} é o volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); M_1 a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g); AT a absorvância da solução de lignina solúvel junto com os produtos de degradação lidos em espectro UV-Visível, a 280 nm; FD o fator de diluição para leitura da absorvância (100); e APD a absorvância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares, cujas concentrações C1 e C2 foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvâncias do furfural e HMF (146,85 e 114,00 L/g cm), sendo esses valores utilizados no cálculo do APD retirados em estudos encontrados na literatura.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = ((M_2/M_1) * 100) - \% \text{ cinzas} \quad (\text{Equação 8})$$

Onde M_1 é a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g); M_2 a massa da lignina insolúvel seca (g); e a % cinzas o teor de cinzas da biomassa *in natura* livre de extrativos.

O percentual de lignina total foi obtido a partir da soma da lignina solúvel em ácido (LSA) e lignina insolúvel em ácido (LIA) na biomassa, conforme mostra a Equação 9.

$$\% \text{ lignina total} = (\% \text{ LSA} + \% \text{ LIA}) * (1 - (E/100)) \quad (\text{Equação 9})$$

Onde E é o teor de extrativos da biomassa, em %.

Para determinar os teores de celulose e hemicelulose, faz-se necessário converter a concentração dos açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação na fonte de carboidrato precursor. Diante disso, são usados fatores de hidrólise para a obtenção de cada composto, conforme indicado na Tabela 2. Para o cálculo de determinação da celulose (Equação 10), são somadas celobiose, glicose e HMF, enquanto para a hemicelulose (Equação 11), são somadas xilose, arabinose, ácido acético e furfural.

TABELA 2 - FATOR DE HIDRÓLISE DE CADA AÇÚCAR, ÁCIDO ORGÂNICO OU INIBIDOR UTILIZADO PARA INTEGRALIZAR O CÁLCULO DE CELULOSE E HEMICELULOSE

Componente	Açúcar, ácido orgânico ou inibidor	Fator de hidrólise
Celulose	Celobiose	0,95
	Glicose	0,90
	HMF	1,29
Hemicelulose	Xilose	0,88
	Arabinose	0,88
	Ácido Acético	0,72
	Furfural	1,37

FONTE: Scopel (2019).

$$\% \text{ celulose} = \left\{ \frac{[(0,95 * Ce) + (0,90 * G) + (1,29 * HMF) * V] * [1 - (\frac{E}{100})]}{M} \right\} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde Ce é a concentração de celobiose (g/L); G é a concentração de glicose (g/L); HMF é a concentração de hidroximetilfurfural (g/L); V é o volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); E é o teor de extrativos da biomassa (%); e M a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g).

$$\% \text{ hemicelulose} = \left\{ \frac{[(0,88 * X) + (1,37 * F) + (0,72 * AA) + (0,88 * ARA) * V] * [1 - (\frac{E}{100})]}{M} \right\}$$

(Equação 11)

Onde X é a concentração de xilose (g/L); F é a concentração de furfural (g/L); AA é a concentração de ácido acético (g/L); ARA é a concentração de arabinose (g/L); V é o volume do hidrolisado filtrado (0,087 L); E é o teor de extrativos da biomassa (%); e M é a massa de biomassa livre de extrativos utilizada na hidrólise ácida concentrada (0,3 g).

4.4.5 Determinação do Índice de Cristalinidade

O índice de cristalinidade (CI) para a biomassa tratada foi calculado por meio da técnica de Difração de Raios-X (DRX), utilizando um difratômetro Shimadzu XRD-7000, operado com uma velocidade de 2°/min, uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA, na faixa de varredura (2θ) de 5° a 40°. O índice de cristalinidade foi calculado por meio da Equação 12, descrita por Segal et al. (1959).

$$CI (\%) = \left(\frac{I_C - I_A}{I_C} \right) \times 100 \quad \text{(Equação 12)}$$

Onde I_C é a máxima intensidade da difração ($22^\circ < 2\theta < 23^\circ$), que representa o material cristalino e I_A a mínima intensidade da difração ($18^\circ < 2\theta < 19^\circ$), que corresponde a porção amorfa.

4.5 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS FRAÇÕES LÍQUIDAS

Para determinar a composição dos licores obtidos após os tratamentos realizados, as frações líquidas tiveram seu pH ajustado para 6, foram filtradas, tiveram seus volumes aferidos e foram analisadas via CLAE, através do método descrito no item 4.4.4, para determinação de açúcares (glicose, celobiose, xilose e arabinose), inibidores (ácido acético, HMF, furfural, ácido fórmico e ácido levulínico), xilitol e etanol.

4.6 PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DA CELULOSE E REMOÇÃO DA HEMICELULOSE E LIGNINA PÓS-TRATAMENTOS QUÍMICOS

Após a fração sólida obtida para cada tratamento químico ser caracterizada de acordo com o item 4.4, realizou-se os cálculos percentuais em termos de recuperação de sólidos (S_{rec}), recuperação da celulose (C_{rec}), solubilização da hemicelulose (SH) e solubilização da lignina

(SL). Para realização dos cálculos, foi levado em consideração os valores da composição química do capim elefante não tratado e a quantidade inicial de biomassa utilizada em cada tratamento, de 20 g. Os cálculos foram realizados de acordo com as equações (13) – (16).

$$\% S_{rec} = \frac{m_{BT}}{m_{BNT}} * 100 \quad (\text{Equação 13})$$

$$\% C_{rec} = \frac{\% C_{BT}}{\% C_{BNT}} * (\% S_{rec}) \quad (\text{Equação 14})$$

$$\% SH = \left(\frac{H_{BNT} - H_{BT}}{H_{BNT}} \right) * 100 \quad (\text{Equação 15})$$

$$\% SL = \left(\frac{L_{BNT} - L_{BT}}{L_{BNT}} \right) * 100 \quad (\text{Equação 16})$$

Onde m_{BT} é a massa de biomassa após o tratamento (g); m_{BNT} é a massa da biomassa *in natura* utilizada no tratamento (g); C_{BT} é a quantidade de celulose obtida na biomassa tratada (%); C_{BNT} é a quantidade de celulose na biomassa *in natura* (%); H_{BNT} é a quantidade de hemicelulose na biomassa *in natura* (g); H_{BT} é a quantidade de hemicelulose na biomassa tratada (g); L_{BNT} é a quantidade de lignina na biomassa *in natura* (g); e L_{BT} é a quantidade de lignina na biomassa tratada (g).

4.7 ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os resultados obtidos ao longo desta pesquisa estão apresentados em termos de uma medida de centralização (média aritmética amostral) e uma medida de dispersão (desvio padrão amostral), organizados em planilhas através do software Excel (Versão 2307, Microsoft 365).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE

Os resultados em termos do teor de cinzas, extrativos, lignina total, celulose e hemicelulose da biomassa de capim elefante não tratada são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - ANÁLISE COMPARATIVA DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NÃO TRATADA OBTIDA NESSE ESTUDO E NA LITERATURA

Composição química em base seca (%)					Referência
Cinzas	Extrativos	Lignina total ^a	Celulose	Hemicelulose	
4,60 ± 0,2	16,7 ± 0,3	25,8 ± 0,7	34,3 ± 0,7	19,6 ± 0,3	Esse estudo
12,3 ± 0,1	16,4 ± 1,0	18,4 ± 0,1	33,6 ± 0,1	20,6 ± 0,0	(Montipó et al., 2018)
2,00 ± 0,5	12,3 ± 0,2	28,0 ± 1,5	41,8 ± 0,2	24,7 ± 1,0	(Nascimento e Rezende, 2018)
-	-	14,2 ± 0,7	33,9 ± 0,8	23,9 ± 1,8	(Santos et al., 2018)
4,90 ± 0,4	-	13,5 ± 0,8	34,5 ± 2,3	38,1 ± 4,2	(Toscan et al., 2022)
-	-	19,3	34,6	20,2	(Haldar e Purkait, 2022) ^b
9,50	-	24,5	46,4	18,4	(Iyyappan et al., 2023) ^b
6,90 ± 0,2	4,70 ± 0,2	27,4 ± 0,6	33,7 ± 0,5	19,9 ± 0,8	(Dhara et al., 2023)
5,70 ± 2,0	20,2 ± 0,2	22,5 ± 0,1	30,0 ± 2,0	24,0 ± 2,0	(Scopel et al., 2023)

^a Soma dos percentuais de lignina solúvel e insolúvel em ácido e; ^b Esses trabalhos não apresentam o valor de desvio padrão amostral.

FONTE: A autora (2023).

A biomassa de capim elefante utilizada nesse estudo apresentou um valor elevado de holocelulose (celulose e hemicelulose — 53,9%) e lignina (25,8%) em sua composição. Esses compostos, quando somados, representam aproximadamente 80% da composição da biomassa, e esse alto percentual torna o capim elefante atrativo frente aos diversos produtos de elevado valor agregado que podem ser gerados quando se realiza o fracionamento integral desses constituintes.

Conforme pode-se observar na Tabela 3, a celulose é o homopolissacarídeo mais abundante presente nos resíduos lignocelulósicos deste estudo, onde obteve-se um teor de 34,3%, estando em conformidade com os valores obtidos por Montipó et al. (2018), Santos et al. (2018), Toscan et al. (2022) e Haldar e Purkait (2022), de 33,6%, 33,9%, 34,5% e 34,6%, respectivamente. O teor de hemicelulose (19,6%) também está coerente com os encontrados por Montipó et al. (2018), Haldar e Purkait (2022), Iyyappan et al. (2023) e Dhara et al. (2023), de 20,6%, 20,2%, 18,4% e 19,9%, respectivamente. A lignina, segunda molécula orgânica mais abundante presente nas plantas após a celulose, apresentou nesse estudo um teor de 25,8%, que

está similar ao obtido por Nascimento e Rezende (2018), Iyyappan et al. (2023), Dhara et al. (2023) e Scopel et al. (2023), de 28,0%, 24,5%, 27,4% e 22,5%, respectivamente.

No entanto, conforme observado na Tabela 3, existe, de fato, uma certa variação entre os percentuais de celulose, hemicelulose e lignina encontrados nesse estudo e na literatura. Isso ocorre devido a diferença de cultivares da biomassa de capim elefante existentes. Tendo como exemplo, a espécie de capim elefante utilizada por Dhara et al. (2023) é intitulada *Saccharum ravannae grass*, já a utilizada por Toscan et al. (2022) é a *Pennisetum purpureum Schum.*, sendo ambas espécies e subespécies divergentes da utilizada nesse estudo (*Pennisetum purpureum*). Além disso, apesar do capim elefante ser uma gramínea que não necessita de um solo muito rico em nutrientes para crescer, condições muito extremas de cultivo podem afetar o crescimento da planta e conseqüentemente alterar sua composição.

No estudo realizado por Rueda e colaboradores (2020), os autores avaliaram a diferença composicional da folha e do caule da biomassa de capim elefante para diferentes tempos de corte e estações climáticas (seca e úmida). A partir dos resultados obtidos, os autores identificaram que o tempo de colheita é um dos fatores que mais afetam a composição química da biomassa. No entanto, quando se pensa em um cenário de biorrefinaria, o objetivo é utilizá-la como um todo, visando seu total aproveitamento. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados de forma a entender melhor a diferença composicional do capim elefante levando em consideração o período de corte da planta, por exemplo.

5.2 FRACIONAMENTO DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA

5.2.1 Tratamento ácido, alcalino e combinado da biomassa de capim elefante

O principal objetivo de realizar o processo de tratamento nas biomassas lignocelulósicas é soltar a estrutura recalcitrante, de forma a solubilizar os componentes não celulósicos, como a hemicelulose e a lignina (TOSCAN et al., 2019). No entanto o melhor cenário a ser considerado dentro de uma biorrefinaria é aquele que permite um aproveitamento total desses constituintes. Diante disso, foram realizados cinco tratamentos químicos visando entender como cada um modifica a estrutura composicional da biomassa. Na Tabela 4, é apresentada a composição físico-química, o percentual de recuperação e solubilização dos compostos e o grau de severidade para cada tratamento realizado na biomassa de capim elefante.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAPIM ELEFANTE (FRAÇÃO SÓLIDA) APÓS A REALIZAÇÃO DO TRATAMENTO QUÍMICO ALCALINO, ÁCIDO E COMBINADO.

Ensaio	Composição resíduo pré-tratado (% m/m)			% S _{rec} (m/m) ^e	% C _{rec} (m/m) ^f	Solubilização (% m/m)		CSF ^g	CI (%) ^h
	Celulose	Hemicelulose	Lignina			Hemicelulose	Lignina		
Não tratado	34,3 ± 0,7	19,6 ± 0,3	25,8 ± 0,7	-	-	-	-	-	45,8
TAL8 ^a	77,2 ± 0,9	16,6 ± 0,2	3,30 ± 0,3	36,7	82,6	68,9	95,3	2,09	53,8
TAL12 ^a	79,0 ± 0,9	16,4 ± 0,7	3,10 ± 0,6	35,6	81,9	70,2	95,7	2,26	55,0
TAC ^b	59,9 ± 1,6	n.d.	27,3 ± 1,1	54,4	95,0	100	42,6	2,21	49,1
AC-AL ^c	86,1 ± 1,9	n.d.	2,50 ± 0,2	23,9	60,0	99,9	97,7	2,21/2,09	62,2
AL-AC ^d	74,8 ± 0,6	n.d.	4,10 ± 0,9	30,9	67,9	99,8	95,1	2,09/2,21	67,1

^a Tratamento alcalino com NaOH 4% (m/v) a 80 °C por 8 horas e 12 horas, respectivamente; ^b Tratamento com ácido oxálico 5% (m/v) a 125,6 °C por 2 horas; ^c Tratamento combinado ácido-alcalino; ^d Tratamento combinado alcalino-ácido; ^e Percentual de recuperação de sólidos; ^f Percentual de recuperação da celulose; ^g Fator de severidade combinada; ^h Índice de cristalinidade; e, (n.d.): Componente não presente ou em uma concentração não detectada.

FONTE: A autora (2023).

Pensando no cenário de uma biorrefinaria lignocelulósica, a realização somente do tratamento alcalino (TAL8 e TAL12) não é o ideal, pois solubiliza toda a lignina ($\geq 95,3\%$ m/m) e boa parte da hemicelulose para a mesma fração líquida ($\geq 68,9$ m/m). O tratamento alcalino age especialmente na ligação éster e éter arílicas que unem os monômeros de lignina, promovendo uma quebra da estrutura em moléculas menores que são solubilizadas para a fração líquida (SCOPEL, 2019). Portanto, esse tratamento é ideal quando se requer a solubilização da lignina. Quando se realiza somente o tratamento alcalino, os componentes de hemicelulose e lignina não são isolados de forma efetiva, pois permanecem juntos na mesma fração, fazendo com que seja necessário realizar uma etapa de separação desses constituintes, o que aumentaria ainda mais os custos do processo.

O tratamento ácido (TAC) realizado de forma isolada é ideal quando se visa aproveitar somente a fração hemicelulósica. Nesse estudo foi possível solubilizar 100% (m/m) da hemicelulose presente na biomassa de capim elefante através do emprego de 5% (m/v) de ácido oxálico. A etapa ácida é a principal responsável pela hidrólise da hemicelulose em seus monômeros de xilose e arabinose, os quais, posteriormente, podem ser direcionados para diversas aplicações (SCHMIDT et al., 2023). No entanto, esse tratamento remove majoritariamente a hemicelulose e a parcela de lignina solúvel em ácido, sendo necessário realizar outro tratamento subsequente para solubilizar o restante da lignina presente na fração sólida.

Apesar do tratamento combinado alcalino-ácido (AL-AC) apresentar elevados índices de solubilização da hemicelulose (99,8% m/m) e lignina (95,1% m/m), deve-se levar em consideração a aplicação final dada aos licores obtidos. Nesse tratamento, o licor proveniente da primeira etapa de extração alcalina seria rico em lignina, mas teria mais da metade da hemicelulose solubilizada junto a ela ($\geq 70\%$ m/m). Diante disso, esse cenário também necessitaria de uma etapa de separação dos compostos, elevando o custo do processo.

Diante disso, pensando no cenário de biorrefinaria que visa o aproveitamento total de todos os constituintes, o tratamento combinado ácido-alcalino (AC-AL) se mostrou o mais efetivo, pois permitiu um melhor fracionamento dos constituintes de celulose, hemicelulose e lignina. A partir desse tratamento, foi possível solubilizar 99,9% (m/m) da hemicelulose para a fração líquida com o emprego de 5% (m/v) de ácido oxálico e ainda, solubilizar posteriormente 97,7% (m/m) da lignina a partir das duas extrações alcalinas realizadas com NaOH 4% (m/v).

Ainda, ao fim do tratamento AC-AL, foi possível recuperar 60% (m/m) da celulose com um teor de pureza de 86,1%. Uma taxa de recuperação de 60% pode ser considerada baixa, no entanto essa perda está muito relacionada com a estrutura da parede celular; algumas partes da celulose seguem ligadas fortemente com os demais componentes e, portanto, essa parcela será solubilizada junto com esses compostos (NASCIMENTO; REZENDE, 2018; REZENDE et al., 2011).

Outrossim, essa perda de cerca de 40% (m/m) da celulose pode estar relacionada com a severidade dos tratamentos químicos realizados, pois o tratamento ácido e alcalino apresentam um grau de severidade de 2,21 e 2,09, respectivamente (Tabela 4). Esse valor está acima do encontrado por Trevisan e Rezende (2020), de 1,65, e Bukhari et al. (2019), de 0,85. No entanto, o grau de severidade está diretamente relacionado com taxa de eficiência da solubilização dos constituintes, porém, deve-se ter um equilíbrio, pois quando o grau de severidade é muito elevado, pode acabar gerando a produção de compostos inibitórios, como ácido fórmico, furfural e HMF (PRAMASARI et al., 2023).

No entanto, apesar do grau de severidade ser mais elevado, não foi gerado grandes quantidades de compostos inibidores (Tabela 5). No tratamento ácido-alcalino (AC-AL) foi possível obter um licor rico em xilose (15,2 g/L) e arabinose (2,1 g/L) através do emprego do ácido oxálico 5% (m/v). Além disso, foram gerados valores muito baixos em termos de inibidores. Esses resultados em termos da baixa concentração de compostos inibitórios demonstram que o ácido oxálico pode ser menos agressivo com relação ao sulfúrico, por exemplo. Em um estudo realizado para a mesma biomassa, onde utilizou-se ácido sulfúrico 1% (v/v) na etapa de tratamento, foi gerado cerca de 2,1 g/L de ácido acético e 2,3 g/L de furfural

(NASCIMENTO; REZENDE, 2018), valores bem superiores em termos de compostos inibitórios do que os encontrados nesse estudo.

TABELA 5 - DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA DOS PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS

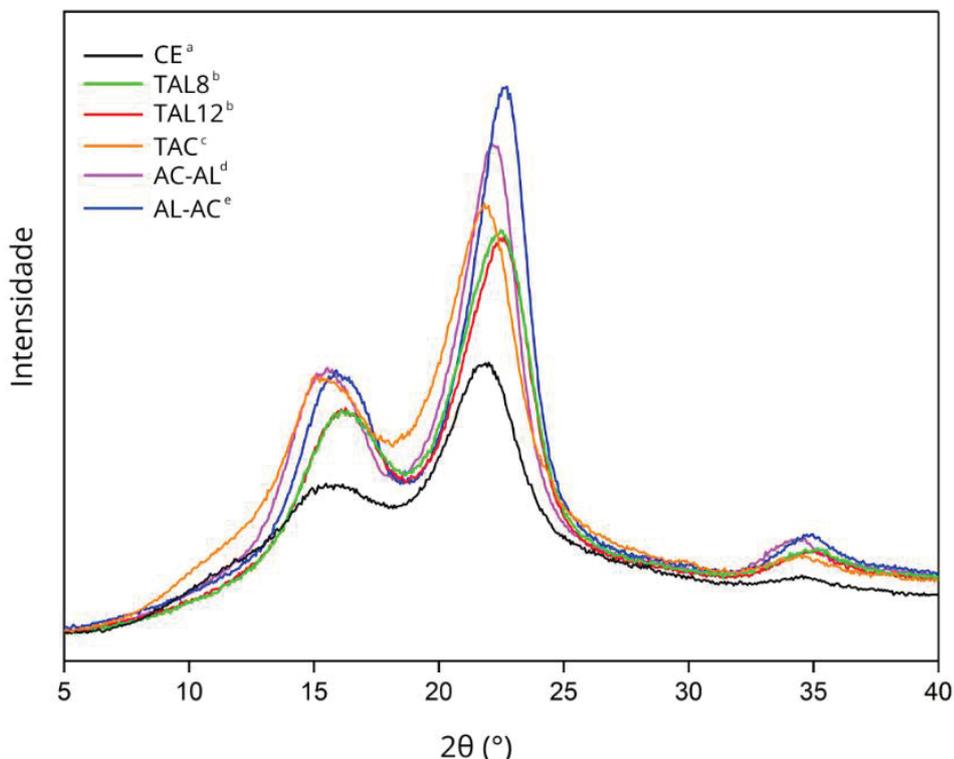
Ensaio	Ext.	Açúcares (g/L)			Inibidores (g/L)		
		Glicose	Celobiose	Xilose	Ácido Acético	HMF	Furfural
TAL8	2 AL	0,70 ± 0,1	n.d.	3,90 ± 0,4	n.d.	n.d.	n.d.
TAL12	3 AL	1,80 ± 0,2	n.d.	5,70 ± 0,3	n.d.	n.d.	n.d.
TAC	1 AC	2,80 ± 0,3	n.d.	15,5 ± 1,0	1,87 ± 0,2	0,20 ± 0,0	n.d.
AC-AL	1 AC	2,60 ± 0,4	n.d.	15,2 ± 0,6	1,82 ± 0,1	0,10 ± 0,0	0,20 ± 0,0
	2 AL	0,80 ± 0,0	n.d.	n.d.	n.d.	0,40 ± 0,0	n.d.
AL-AC	2 AL	1,20 ± 0,1	n.d.	0,85 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
	1 AC	0,70 ± 0,1	n.d.	11,5 ± 0,2	n.d.	0,30 ± 0,0	0,10 ± 0,0

(n.d.): Componente não presente ou em uma concentração não detectada.

FONTE: A autora (2023).

Além da análise composicional da fração sólida e líquida proveniente dos tratamentos químicos, foi realizada a determinação das propriedades químicas do material por meio da análise de Difractometria de Raio-X (Figura 22), a qual nos permite entender a estrutura cristalina dos materiais.

FIGURA 22 - DIFRATOGRAMAS DE DRX PARA A BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE ANTES E PÓS-TRATAMENTOS QUÍMICOS



^a Capim elefante não tratado; ^b Tratamento alcalino com NaOH 4% (m/v) a 80 °C por 8 horas e 12 horas, respectivamente; ^c Tratamento com C₂H₂O₄ 5% (m/v) a 125,6 °C por 2 horas; ^d Tratamento combinado ácido-alcalino e; ^e Tratamento combinado alcalino-ácido.

FONTE: A autora (2023).

Conforme podemos observar através dos difratogramas, houve um aumento dos picos correspondentes a parte amorfa (faixa de varredura 2θ entre 18° e 19°) e cristalina da celulose (faixa de varredura 2θ entre 22° e 23°). A biomassa de capim elefante não tratada apresentou um índice de cristalinidade de 45,8%, esse índice foi elevado para 62,2% após a realização do tratamento ácido-alcalino (AC-AL). Esse aumento do pico referente a cristalinidade do material indica que o tratamento realizado causou uma alteração estrutural na celulose, evidenciando a transformação polimórfica da celulose tipo I para tipo II. A celulose do tipo II pode ser formada a partir do tratamento da celulose I com hidróxido de sódio aquoso (mercerização), como é feito para a formação de filmes de fibras ou através de tratamento ácido (OKOLIE et al., 2021).

Em um estudo realizado por Nascimento e Rezende (2018), no qual foi efetuado um tratamento ácido com H₂SO₄ 1% (v/v) seguido do tratamento alcalino com NaOH 2% (m/v) foi possível elevar o índice de cristalinidade da biomassa de capim elefante de 50% para 70%, após

a realização do tratamento, semelhante ao aumento em termos da cristalinidade encontrada neste trabalho.

5.2.2 Etapa de melhoramento do tratamento ácido

O objetivo da realização da etapa de melhoramento do tratamento ácido foi investigar simultaneamente se a redução da concentração de ácido oxálico ou do tempo de reação reduziria o percentual de perda da celulose, mantendo o mesmo valor em termos da solubilização da hemicelulose para a fração líquida do tratamento ácido. Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos em termos da composição físico-química da fração sólida recuperada para cada condição de tratamento ácido testado.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO CAPIM ELEFANTE NÃO TRATADO E DAS FRAÇÕES SÓLIDAS OBTIDAS APÓS A REALIZAÇÃO DO TRATAMENTO ÁCIDO.

Condição reacional a 125,6 °C		Composição resíduo pré-tratado (% m/m)				Solubilização (% m/m)					
Ensaio	C ₂ H ₂ O ₄ (% m/v)	Tempo (min)	Celulose	Hemicelulose	Lignina	% S _{rec} (m/m) ^b	% C _{rec} (m/m) ^c	pH	CSF ^d	Hemicelulose	Lignina
In Natura	-	-	34,3 ± 0,7	19,6 ± 0,3	25,8 ± 0,7	-	-	-	-	-	-
TAC ^a	5,0	120	59,9 ± 1,6	n.d.	27,3 ± 1,1	54,4	95,0	0,62	2,2	100,0	42,6
1	3,8	40	45,4 ± 2,2	0,3 ± 0,0	33,3 ± 0,9	58,0	76,7	0,81	1,5	99,3	25,0
2	5,2	40	51,9 ± 3,3	n.d.	32,0 ± 1,5	57,0	84,7	0,59	1,8	100	29,2
3	3,8	120	47,9 ± 3,2	n.d.	30,9 ± 2,2	55,8	78,0	0,81	2,0	100	33,2
4	5,2	120	54,1 ± 0,6	n.d.	25,1 ± 2,4	55,1	86,9	0,59	2,2	100	46,3
5	3,5	80	45,9 ± 5,2	n.d.	22,8 ± 2,2	62,5	83,5	0,90	1,8	100	44,8
6	4,5	80	51,1 ± 1,6	0,3 ± 0,1	26,8 ± 1,3	56,1	85,5	0,72	1,9	99,0	41,7
7	5,5	80	48,5 ± 0,6	n.d.	22,8 ± 2,8	59,1	83,5	0,56	2,1	100	47,6

^a Tratamento com C₂H₂O₄ 5% (m/v) a 125,6 °C por 2 horas em autoclave; ^b Percentual de recuperação de sólidos; ^c Percentual de recuperação da celulose e; ^d Fator de severidade combinada; (n.d.): Componente não presente ou em uma concentração não detectada.

FONTE: A autora (2023).

Em nenhum dos tratamentos ácidos efetuados foi possível obter um maior rendimento em comparação com o tratamento ácido (TAC) realizado anteriormente. Para todas as 7 condições testadas obteve-se um percentual de solubilização da hemicelulose $\geq 99\%$ (m/m), porém, em nenhuma dessas condições o percentual de recuperação da celulose (% C_{rec}) chegou próximo ao valor de 95% (m/m) obtido no tratamento ácido realizado preliminarmente (TAC). Além disso, podemos observar a partir dos resultados da composição da fração líquida (Tabela 7) que o valor de concentração da xilose variou entre 8,0 e 14,2 g/L, não alcançando o valor de 15,5 g/L encontrado no tratamento TAC.

TABELA 7 – DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FRAÇÃO LÍQUIDA DOS ENSAIOS DE MELHORAMENTO DO TRATAMENTO ÁCIDO

Ensaio	Açúcares (g/L)			Inibidores (g/L)		
	Glicose	Celobiose	Xilose	Ácido Acético	HMF	Furfural
TAC ^a	2,80 ± 0,3	n.d.	15,5 ± 1,0	1,90 ± 0,2	0,20 ± 0,0	0,00 ± 0,0
1	1,90 ± 0,3	n.d.	12,6 ± 0,7	0,90 ± 0,1	0,20 ± 0,0	0,10 ± 0,0
2	2,10 ± 0,2	n.d.	13,1 ± 1,1	1,30 ± 0,2	0,10 ± 0,1	0,10 ± 0,0
3	2,70 ± 0,4	n.d.	11,4 ± 0,8	1,70 ± 0,3	0,20 ± 0,0	0,10 ± 0,0
4	2,80 ± 0,3	n.d.	8,00 ± 0,8	1,90 ± 0,3	0,10 ± 0,0	0,20 ± 0,0
5	2,50 ± 0,2	n.d.	10,2 ± 0,6	2,00 ± 0,2	0,10 ± 0,0	0,00 ± 0,0
6	2,70 ± 0,0	n.d.	14,2 ± 0,2	2,10 ± 0,1	0,20 ± 0,0	0,10 ± 0,0
7	2,80 ± 0,4	n.d.	11,6 ± 0,8	2,30 ± 0,4	0,10 ± 0,0	0,10 ± 0,0

^a Tratamento com $C_2H_2O_4$ 5% (m/v) a 125,6 °C por 2 horas em autoclave e; (n.d.): Componente não presente ou em uma concentração não detectada.

FONTE: A autora (2023).

Em contrapartida, optou-se por não elevar muito o valor da concentração de ácido oxálico devido ao seu alto custo, mas também, pensando na possibilidade de gerar maiores valores em termos de compostos inibitórios em consequência da maior concentração de ácido empregada. Podemos observar esse fator de incremento dos produtos de decomposição quando se compara o valor de furfural obtido no tratamento TAC e 4, pois o composto que antes não era detectado, apresentou uma concentração de 0,2 g/L de furfural, e esse fator decorre apenas do aumento da concentração de ácido empregada (5,2% m/v), visto que, o tempo de reação é o mesmo para ambos os ensaios, de 120 minutos. Com relação ao tempo de tratamento, o fator limitante para não abranger faixas muito grandes é a formação de produtos de degradação, pois uma vez que as pentoses e hexoses são solubilizadas e ficam expostas por um tempo maior ao ácido, são mais elevadas as chances de degradação desses compostos. Diante disso, apesar da realização dos 7 ensaios de melhoramento da etapa ácida, o melhor resultado obtido ainda foi

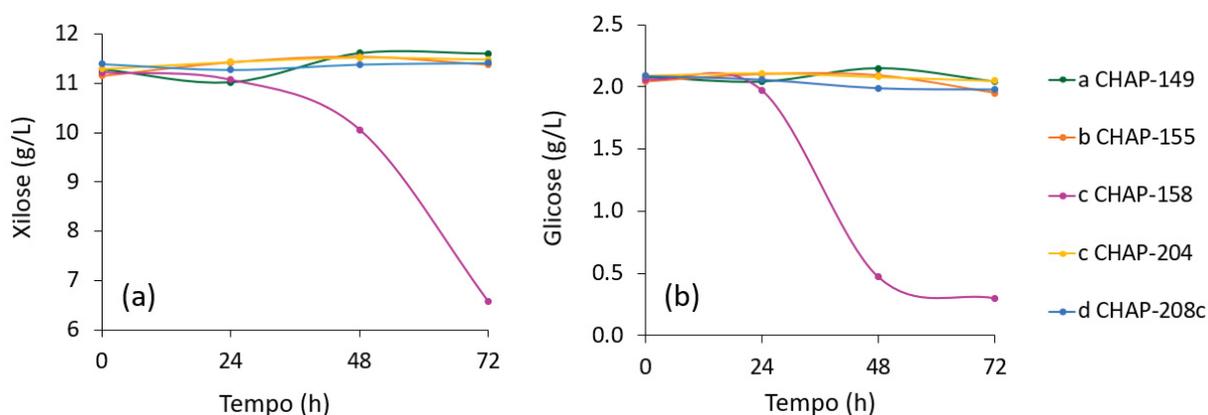
a partir do ensaio padrão (TAC), no qual foi empregada uma concentração de 5% (m/v) de ácido oxálico com um tempo de reação de 120 minutos.

5.3 OBTENÇÃO DE ETANOL, XILITOL E COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE

5.3.1 Produção de Xilitol e/ou Etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico submetido a etapa de fermentação apresentou inicialmente em sua composição um teor de açúcares de 15,5 g/L de xilose, 2,4 g/L de arabinose e 2,8 g/L de glicose, e uma concentração de inibidores de 1,9 g/L de ácido acético, 0,2 g/L de HMF e 0,02 g/L de furfural. Com relação aos ensaios fermentativos, não foi possível produzir etanol e/ou xilitol a partir das cinco linhagens de leveduras selvagens testadas. Conforme pode-se observar a partir da Figura 23, a levedura CHAP-158, isolada do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda*, foi a única que começou a consumir a xilose (Figura 23a) e a glicose (Figura 23b) disponível no meio, no entanto, não houve nenhuma produção em termos de etanol ou xilitol.

FIGURA 23 - CONSUMO DE (A) XILOSE E (B) GLICOSE NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO PARA AS CINCO LEVEDURAS SELVAGENS TESTADAS



^a Isolada da vegetação de restinga na beira da praia dos Ingleses em Florianópolis (SC); ^b Isolada de alga coletada na beira da praia dos Ingleses em Florianópolis (SC); ^c Isolada do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda* e; ^d Isolada da flor *Senna macranthera*.

FONTE: A autora (2023).

À vista disso, algum fator do meio reacional devia estar desfavorecendo o metabolismo das leveduras empregadas, fazendo com que estas não conseguissem se adaptar às condições de estresse a qual foram submetidas. O fato de nenhuma levedura selvagem conseguir se adaptar e apresentar o desempenho esperado com relação a produção de etanol e xilitol estando em condições ótimas em termos de pH e temperatura é um fato atípico. Diante disso, analisou-se a

fundo qual seria o fator limitante que estaria afetando o metabolismo das leveduras testadas. Chegou-se à conclusão de que o meio possuía uma grande quantidade de oxalato e de sódio presente, devido à etapa de aumento do pH através do emprego de hidróxido de sódio 2M, sendo este, portanto, um fator determinante para a não obtenção de etanol durante o processo fermentativo, visto que as leveduras não conseguiram se adaptar ao estresse oxidativo ao qual foram submetidas.

O ácido oxálico, um ácido orgânico dicarboxílico ($pK_{a1} = 1,25$ e $pK_{a2} = 4,27$) utilizado no tratamento pode ser encontrado tanto na forma de ácido oxálico quanto na forma de sua base conjugada, o oxalato, a depender do pH em que se encontra. O hidrolisado possuía uma concentração de 50 g/L de ácido oxálico, visto que foi empregada uma solução contendo 5% (m/v) do mesmo para a realização do pré-tratamento. Em meio aquoso, em pH neutro, o ácido oxálico está predominantemente dissociado na forma da sua base conjugada (oxalato) que pode formar diversos tipos de sais, a depender do metal disponível e da solubilidade dos produtos formados por estas espécies químicas (PALMIERI et al., 2019).

Diante disso, devido a elevada concentração de ácido oxálico e aos dois pontos de tamponamento — que ocorrem entre as faixas de pH de 0,25 – 2,25 e 3,27 – 5,27 (PALMIERI et al., 2019) — foi preciso adicionar grandes volumes de uma solução de NaOH para superar as duas faixas de tamponamento. Para conseguir atingir um pH de 6, foram utilizados 600 mL de NaOH 2M para neutralizar cerca de 1000 mL do hidrolisado hemicelulósico, acarretando, portanto, na geração de grandes quantidades de íons de sódio presentes no meio (aproximadamente 19 g/L).

A alta concentração de ácido oxálico e oxalato nos hidrolisados, e sua associação com o sódio – decorrente do emprego do NaOH 2M utilizado no ajuste de pH para 6 – pode ser considerado sim um fator limitante para o insucesso do processo fermentativo. Mesmo as leveduras selvagens CHAP-149 e CHAP-155, isoladas da vegetação de restinga e de alga coletada na beira da praia dos Ingleses (Florianópolis – SC), respectivamente, que poderiam apresentar certa resistência, por serem isoladas de ambientes que já possuem concentrações de sal, como a água do mar (~ 35 g/L de sal dissolvido), não conseguiram superar o obstáculo da concentração de oxalato no meio em que foi inoculada e produzir etanol e/ou xilitol.

Em um estudo realizado com a biomassa de dendezeiro, no qual se previa a produção de ácido succínico a partir da fermentação com o microrganismo *Actinobacillus succinogenes* 130Z, foi constatado o mesmo problema de inibição do processo fermentativo. No hidrolisado, onde se empregou 1% (m/v) de ácido oxálico no processo de tratamento, foi possível obter 12,69 g/L de ácido succínico, porém, os autores observaram uma redução de 45% do

rendimento quando se elevou a concentração de ácido oxálico para 2% (m/v). Diante disso, esse estudo demonstrou que a inibição do processo se inicia quando se ultrapassa a concentração empregada de 2% (m/v) de ácido oxálico (BUKHARI et al., 2019).

Por fim, conclui-se que, para a realização subsequente de processos fermentativos a partir da utilização do ácido oxálico visando a solubilização das hemiceluloses na etapa de tratamento, recomenda-se a utilização do ácido apenas em concentrações inferiores a 2% (m/v), de forma a evitar as perturbações metabólicas nas leveduras durante o processo de fermentação. No entanto, mais estudos devem ser realizados de forma a entender se essa redução do percentual de ácido oxálico ainda o tornaria vantajoso na remoção total das hemiceluloses frente aos demais tipos de ácidos que podem ser utilizados.

5.3.2 Determinação dos compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da lignina

Aproximadamente 97,7% da lignina presente na biomassa de capim elefante foi solubilizada através da realização do tratamento ácido-alcálico de forma sequencial. Na etapa ácida, a parcela correspondente a lignina solúvel em ácido foi carregada junto com a fração hemicelulósica, enquanto o restante da lignina presente na fração sólida foi solubilizada por completo em decorrência do emprego do tratamento alcálico com NaOH 4% (m/v).

A lignina solubilizada na fração líquida do tratamento alcálico foi precipitada em meio ácido, no qual foi possível recuperar ao fim do processo cerca de 13,1 g lignina/100 g de biomassa. Considerando que o capim elefante não tratado apresenta em sua composição um teor de 25,8% de lignina e que, destes, 17,7% correspondem a parcela de lignina insolúvel em ácido, calculou-se o rendimento de recuperação desse composto, de 74%, levando em consideração apenas o percentual da lignina insolúvel em ácido, pois a parcela solúvel foi solubilizada para a fração líquida no tratamento ácido.

Além disso, o percentual de recuperação da lignina está acima da média quando comparado com outros percentuais de recuperação encontrados na literatura para a mesma biomassa. No estudo realizado por Trevisan e Rezende (2020), os autores recuperaram cerca de 9,8 g de lignina/100 g de biomassa, por meio da realização do tratamento ácido com H₂SO₄ 1% (v/v) a 121 °C por 40 min, seguido do tratamento com NaOH 2% (m/m) sob as mesmas condições reacionais. Já Scopel e colaboradores (2023) conseguiram recuperar 10 g lignina/100 g de biomassa por meio da realização do tratamento ácido com H₂SO₄ 2% (v/v) a 121 °C e 1,05 bar por 60 min, seguido do tratamento com NaOH 4,5% (m/m) a 85 °C por 20 min.

Diante disso, percebe-se que o rendimento obtido está de acordo com o encontrado em outros estudos e que também a forma de tratamento empregada não está muito fora do que já

foi realizado por outros autores. Ainda, vale destacar, que apesar de se ter uma perda da lignina solúvel para a fração líquida do tratamento ácido, esse é o melhor cenário para viabilizar uma melhor separação desse constituinte, pois a lignina obtida é mais pura devido a completa solubilização da hemicelulose e dos extrativos para a etapa ácida realizada preliminarmente (Trevisan e Rezende, 2020).

A lignina, quando solubilizada a partir de tratamentos alcalinos, sofre rupturas entre suas ligações éter e unidades de fenilpropanol, formando grupos fenólicos que apresentam elevadas propriedades antioxidantes. O método colorimétrico mais utilizado para determinar a potencial antioxidante da lignina é o DPPH, que se baseia na captura do radical livre de DPPH. O método de Brand-Williams e Berset (1995) foi escolhido para determinar a capacidade antioxidante da lignina, sendo os resultados apresentados na Tabela 8 em termos do IC₅₀, que se refere à mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração do radical de DPPH.

TABELA 8 - COMPARATIVO DOS VALORES DE CFT E IC₅₀ OBTIDOS A PARTIR DA BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NESSE ESTUDO COM OUTROS ESTUDOS ENCONTRADOS NA LITERATURA

Biomassa	CFT (mg AG/g lignina) ^b	IC ₅₀ (mg/mL)	Referência
Capim elefante	205,0	0,20	Este Estudo
Capim elefante	-	0,02	(Trevisan e Rezende, 2020)
Lignina Kraft	181,0	-	(Fernández-Costa et al., 2014)
Espiga de milho	15,2	0,17	(Michelin et al., 2018)
Palha de milho	167,0	0,66	(An et al., 2019)
Bagaço de cana-de-açúcar	-	0,38	(Kaur; Uppal; Sharma, 2017)
Serragem de eucalipto	226,0	0,11	(Cavali et al., 2021)
Serragem de eucalipto	291,0	0,06	(Tavares et al., 2022)
BHT ^a	-	0,64	(De Menezes Nogueira et al., 2019)
BHA ^a	-	0,04	(Michelin et al., 2018)
Trolox	-	0,02	Este Estudo

^a Antioxidantes sintéticos: Hidroxitolueno butilado (BHT) e Hidroxianisol butilado (BHA) e; ^b Resultado expresso em mg de Ácido gálico/g de lignina.

FONTE: A autora (2023).

O conteúdo fenólico da lignina encontrado, de 205 mg AG/g lignina, está na média em comparação com os valores obtidos em matérias-primas como serragem de eucalipto (CAVALI et al., 2021) e lignina kraft (FERNÁNDEZ-COSTAS et al., 2014). Entretanto, esse valor pode variar de acordo com o tipo da biomassa, pois a lignina é um polímero que pode apresentar uma estrutura que varia de acordo com a matéria-prima (TREVISAN; REZENDE, 2020b). Além disso, o conteúdo fenólico pode variar também de acordo com o tipo de pré-tratamento

empregado, pois cada tratamento pode afetar de uma forma diferente a estrutura da lignina (DE MENEZES NOGUEIRA et al., 2019; MICHELIN et al., 2018). Por exemplo, tratamentos realizados com altas temperaturas e elevados tempos de reação acabam dissolvendo mais componentes a partir do material lignocelulósico, produzindo, portanto, ligninas com altos teores de impureza e elevados valores em termos de compostos fenólicos (CAVALI et al., 2021). À vista disso, nem sempre altos índices de compostos fenólicos representam um maior desempenho em termos de atividade antioxidante.

Com relação a atividade antioxidante da lignina, o valor de IC_{50} obtido, de 0,20 mg/mL, apresentou um desempenho interessante, visto que antioxidantes comerciais, como o hidroxitolueno butilado (BHT), apresentam valores maiores em termos da mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% do DPPH (0,64 mg/mL), demonstrando, portanto, o potencial antioxidante que a lignina isolada a partir de resíduos lignocelulósicos possui.

Com intuito de entender qual ácido estaria conferindo essa atividade antioxidante à lignina, realizou-se a determinação do perfil fenólico via CLAE-MS, no qual foram injetados os seguintes padrões: kaempferol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, pirocatecol, ácido siríngico e flavona. Dentre todos os padrões, foi detectada apenas a presença do ácido p-cumárico, a uma concentração de $0,95 \pm 0,01$ mg/L (0,038 mg ácido p-cumárico/mg lignina).

No entanto, conforme já mencionado, a lignina é constituída de três monômeros conhecidos como monolignóis: álcool p-cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico que uma vez polimerizados, foram unidades monoméricas designadas H, G ou S, respectivamente (AN et al., 2019; FLOURAT et al., 2021). Diante disso, dentre os padrões injetados, apenas os compostos de ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido siríngico poderiam ser derivados da lignina. No entanto, a proporção destes componentes pode variar de acordo com o tipo de matéria-prima, podendo não estarem presentes na composição da lignina ou estarem em concentrações muito baixas para serem detectados.

Os ácidos p-hidroxicinâmicos, como o ácido p-cumárico, são conhecidos há séculos por suas inúmeras propriedades biológicas. Esse ácido é produzido pela planta para lhe conferir resistência através das ligações presentes entre a hemicelulose e a lignina em sua parede celular. Para extraí-lo, são empregados diferentes métodos de tratamento, dentre eles, podemos citar a hidrólise alcalina com NaOH como a técnica mais utilizada. Os ácidos p-hidroxicinâmicos apresentam propriedades terapêuticas como atividade anticancerígena, antidiabética e anti-inflamatória, além de prevenirem trombose e doenças neurodegenerativas (FLOURAT et al., 2021).

Diante disso, a possibilidade de extração desses compostos hidroxicinâmicos a partir de subprodutos agrícolas, como o capim elefante, faz com que se estimule o processo de economia circular, além de agregar um alto valor a biomassa empregada, visto que é um componente que possui uma grande gama de aplicações. À vista disso, mais estudos com relação a extração e aplicação desses compostos a partir de matérias primas-lignocelulósicas devem ser realizados, pois essa ainda é uma área muito pouco estudada.

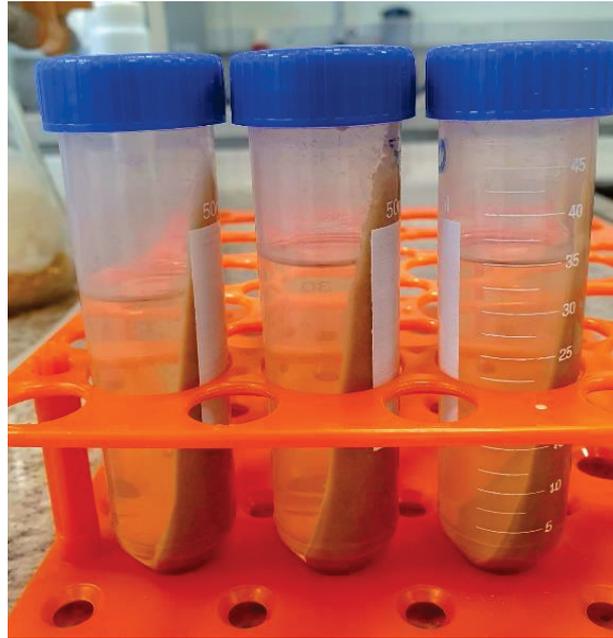
5.3.3 Produção de etanol a partir do caldo hidrolisado rico em glicose

Antes da etapa de fermentação alcoólica ocorrer, fez-se necessário realizar a quebra da celulose em seu monossacarídeo de glicose através do processo de sacarificação. A partir disso, foi possível obter um hidrolisado concentrado rico em glicose ($46,91 \pm 0,04$ g/L), com um baixo teor de compostos inibitórios ($0,96 \pm 0,01$ g/L de ácido acético).

No entanto, a conversão da celulose em glicose não ocorreu de forma total, visto que apenas 55,4% da celulose foi convertida em glicose. A partir da Figura 24, podemos observar que grande parte da fração celulósica não foi solubilizada; esse fato pode ser decorrente das modificações estruturais que os tratamentos químicos realizam na estrutura da celulose, deixando-a de forma mais cristalina. O índice de cristalinidade para a biomassa de capim elefante não tratada, de 45,8%, foi elevado para 62,2% após a obtenção da celulose isolada por meio da realização do tratamento ácido-alcálico de forma sequencial.

Um índice elevado de cristalinidade pode afetar significativamente as primeiras etapas de hidrólise, pois são fornecidos menos sítios ativos para as enzimas celulases iniciarem suas reações hidrolíticas (CHEN et al., 2007; WOICIECHOWSKI et al., 2020). Portanto, um dos fatores limitantes que podem ter causado essa baixa solubilização foi o tempo de reação empregado, de apenas 24 horas. Conforme supracitado, o alto índice de cristalinidade atenua as primeiras horas da ação hidrolítica da enzima; dessa forma, um maior tempo de reação poderia ter sido utilizado, pois diferentes estudos relatam que um maior rendimento na obtenção de açúcares foi alcançado com a realização da sacarificação com um tempo de 48 h (MENEGOL et al., 2014; SCHOLL et al., 2015) ou de 72 h (SCOPEL et al., 2023).

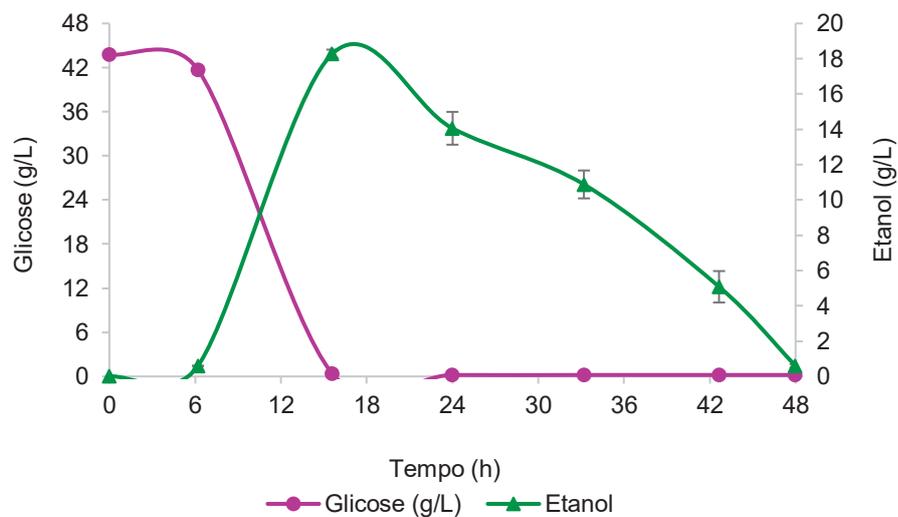
FIGURA 24 - FRAÇÃO DE CELULOSE REMANESCENTE APÓS A ETAPA DE SACARIFICAÇÃO



FONTE: A autora (2023).

A partir do ensaio de fermentação realizado após a etapa de sacarificação, utilizando a levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2, foi possível obter uma produção de etanol de 18,28 g/L a partir da celulose isolada da biomassa de capim elefante. Conforme podemos observar na Figura 25, toda a glicose presente no meio, de 46,91 g/L, foi consumida nas primeiras 15 h de reação.

FIGURA 25 - CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL DO HIDROLISADO PROVENIENTE DO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO DA CELULOSE



FONTE: A autora (2023).

Conforme podemos observar na Tabela 9, o rendimento da produção de etanol foi de 0,42 g_{etanol}/g_{glicose}. Visto que o rendimento máximo teórico é de 0,511 g_{etanol}/g_{glicose}, obteve-se um percentual de eficiência fermentativa de 82%. Além disso, pode-se observar que o rendimento de etanol encontrado neste estudo foi bastante expressivo quando analisamos os resultados obtidos em outros estudos reportados na literatura para a mesma biomassa. No trabalho de Vargas et al. (2023), o qual foi utilizado a mesma levedura industrial, *S. cerevisiae* PE-2, foi obtido um rendimento de 0,36 g_{etanol}/g_{glicose}, utilizando dois ciclos de tratamento com NaOH 4% (m/v) a 80 °C por 4 horas (idêntico ao tratamento TAL8 realizado nesse estudo). No trabalho realizado por Mueansichai et al. (2016), os autores obtiveram um rendimento idêntico ao deste estudo, de 0,42 g_{etanol}/g_{glicose}, no entanto, foi utilizado uma combinação de leveduras (*S. cerevisiae* e *T. reesei*) no hidrolisado obtido a partir da realização do tratamento químico com NaOH 3% (m/m) a 121 °C por 60 minutos.

TABELA 9 - ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA A BIOMASSA DE CAPIM ELEFANTE NESTE ESTUDO E NA LITERATURA

Microrganismos ^a	Etanol		Biomassa	Referência
	Produção (g/L)	Rendimento (g/g) ^b / (%)		
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	18,3	0,42 / 82%	Capim elefante	Este Estudo
<i>S. cerevisiae</i> PE-2	3,9	0,36 / 70%	Capim elefante	(Vargas et al., 2023)
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	4,8	0,27 / 52%	Capim elefante	(Scholl et al., 2015)
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	42,5	0,38 / 75%	Capim elefante	(Montipó et al., 2018)
<i>K. marxianus</i> MTCC1389	14,7	0,18 / 35%	Capim elefante	(Iyyappan et al., 2023)
<i>S. cerevisiae</i> ITB-R89 + <i>P. stipitis</i> ITB-R58 ^b	10,8	0,35 / 66%	Capim elefante	(Kolo et al, 2020)
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	6,1	0,43 / 84%	Capim elefante	(Menegol et al., 2016)
<i>S. cerevisiae</i>	-	0,31 / 61%	Capim elefante	(Scopel et al., 2020)
<i>T. reesei</i> + <i>S. cerevisiae</i>	25,0	0,42 / 82%	Capim elefante	(Mueansichai et al., 2022)
<i>S. cerevisiae</i> CAT-1	42,3	0,38 / 74%	Capim elefante	(Montipó et al., 2018)

^a Gêneros abreviados: *S.*, *Saccharomyces*; *K.*, *Kluyveromyces*; *P.*, *Pichia*; *T.*, *Trichoderma*; *A.*, *Aspergillus*; *Z.*, *Zymomonas* e; ^b O rendimento de etanol é dado em gramas de etanol por gramas de glicose consumida.

FONTE: A autora (2023).

Diante disso, esse trabalho demonstra o potencial da biomassa de capim elefante para a produção de etanol, pois mesmo não sendo possível converter toda a celulose em glicose na etapa de sacarificação, devido à elevada cristalinidade da celulose, o rendimento obtido de 82% foi bastante elevado em comparação com os demais resultados encontrados na literatura.

5.4 BALANÇO DE MASSA GLOBAL DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO E DOS PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DO CAPIM ELEFANTE

Tendo como base os resultados obtidos em termos do fracionamento da biomassa de capim elefante e dos resultados referentes a obtenção dos subprodutos derivados da celulose, hemicelulose e lignina, foi possível elaborar um balanço de massa global do rendimento do processo. Nesse trabalho, o cenário de biorrefinaria proposto, apresentado na Figura 26, visa aproveitar os componentes de celulose, hemicelulose e lignina por meio da realização do tratamento químico ácido-alcálico de forma sequencial, pois, dessa forma, é possível solubilizar a hemicelulose para a fração líquida do tratamento ácido e a lignina para a fração líquida do tratamento alcálico, de forma ao obter ao fim, somente a celulose remanescente na fração sólida.

Após a realização do tratamento ácido, foi possível solubilizar toda a fração de hemicelulose presente na biomassa de capim elefante, obtendo um licor rico em xilose (17,1 g) e arabinose (2,7 g). Vale ressaltar que os extrativos presentes na biomassa (16,7 g) também são solubilizados na etapa ácida, no entanto, são passíveis de recuperação por meio de uma extração líquido-líquido, podendo ser utilizados posteriormente devido a presença de compostos carboxílicos, fenólicos, hidrocarbonetos, esteroides, aldeídos, aminas, ésteres e cetonas em sua composição (SCOPEL et al., 2020).

A fração sólida remanescente, composta de celulose e lignina insolúvel em ácido, foi submetida a etapa de tratamento alcálico, dessa forma, foi solubilizada mais de 95% da lignina insolúvel presente no capim elefante, no qual foi possível recuperar por meio da precipitação em meio ácido cerca de 74% da lignina (13,1 g lignina/100 g de biomassa). Vale ressaltar que para o cálculo de recuperação, foi levado em consideração somente o valor da lignina insolúvel em ácido presente no capim elefante não tratado.

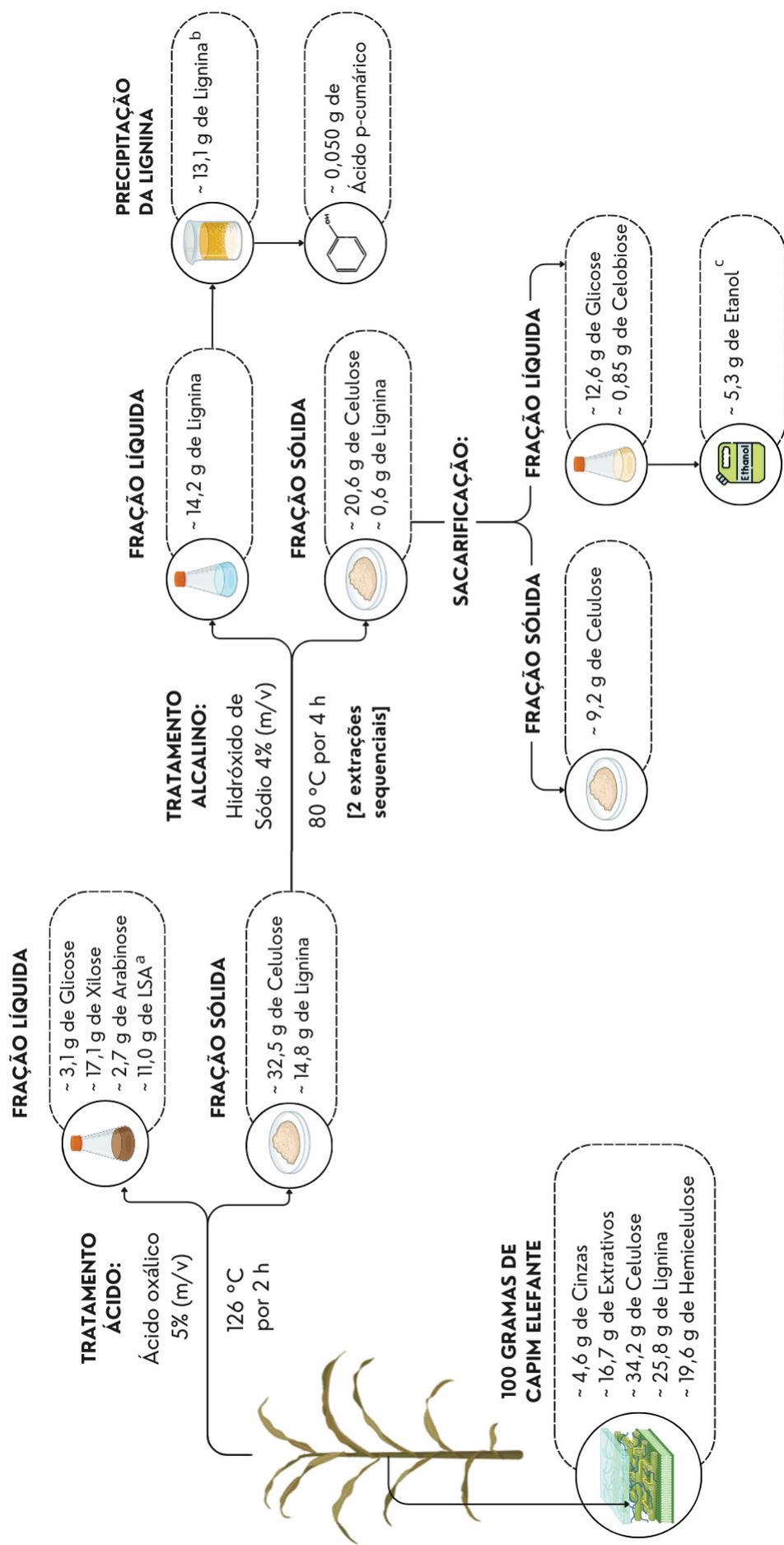
A partir da lignina precipitada, obteve-se cerca de 0,050 g de ácido p-cumárico/13,1 g de lignina, um composto de alto valor agregado que possui diferentes propriedades terapêuticas, como atividade anticancerígena, antidiabética e anti-inflamatória (FLOURAT et al., 2021; TAVARES et al., 2022). Além disso, os ácidos p-hidroxicinâmicos, como o ácido p-cumárico, podem servir como precursores na produção de moléculas de alto valor agregado, como vanilinas, aditivos anti-UV e antioxidantes, que são muito atrativos nos mercados medicinais, cosméticos e alimentícios (FLOURAT et al., 2021).

A celulose isolada proveniente da fração sólida do tratamento alcálico foi submetida ao processo de sacarificação, no qual foi possível obter cerca de 12,6 g de glicose e gerar 5,3 g de

etanol por meio do ensaio de fermentação alcoólica, alcançando um rendimento de conversão de 82%.

Assim sendo, os resultados obtidos sugerem que o cenário de biorrefinaria proposto é excelente para o aproveitamento dos componentes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de capim elefante de forma mais pura, possibilitando, portanto, a futura utilização desses componentes como insumos na produção de diferentes produtos de elevado valor agregado, além de promover a sustentabilidade e a economia circular.

FIGURA 26 – FLUXOGRAMA DO BALANÇO DE MASSA GLOBAL DO PROCESSO DE ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES DE CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA



^a Lignina solúvel em ácido; ^b Para o cálculo de recuperação da lignina precipitada foi levado em consideração somente o valor da lignina insolúvel em ácido. ^c Valor estimado a partir dos resultados experimentais da fermentação do hidrolisado celulósico.

FONTE: A autora (2023)

6 CONCLUSÃO

A partir do estudo de diferentes tratamentos químicos foi possível isolar os componentes de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa de capim elefante, de modo que todos os componentes fossem aproveitados de forma integrada. O tratamento ácido-alcalino foi o que se mostrou mais eficaz no cenário de uma biorrefinaria, pois possibilitou solubilizar 99,8% (m/m) da hemicelulose, 97,7% (m/m) da lignina e recuperar 60% (m/m) da celulose com um teor de pureza de 86,1%.

Com a realização da etapa ácida, foi possível obter um hidrolisado com elevadas quantidades de xilose (15,2 g/L) e arabinose (2,1 g/L) em sua composição. Entretanto, esse estudo demonstrou que a utilização de 5% (m/v) de ácido oxálico resultou na inibição metabólica das cinco linhagens de leveduras selvagens testadas devido a grande quantidade de oxalato dissociado na solução em consequência do ajuste de pH do meio reacional. Portanto, para nenhuma das cinco linhagens de leveduras selvagens testadas foi possível identificar a produção de xilitol ou etanol.

A partir do hidrolisado alcalino, a lignina foi precipitada do licor negro com um rendimento de recuperação de 74% (13,1 g lignina insolúvel/100 g de biomassa), apresentando uma capacidade antioxidante (IC_{50}) de 0,20 mg/mL, sendo inferior ao obtido em antioxidantes sintéticos como o BHT (0,64 mg/L). Além disso, a lignina apresentou uma concentração de 0,95 mg/L de ácido p-cumárico, um componente fenólico que possui elevado valor agregado e diversas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antidiabéticas.

A partir da celulose isolada, foi possível obter um mosto com uma concentração de 46,91 g/L de glicose e produzir 18,28 g/L de etanol, obtendo uma eficiência fermentativa de 82%. Os dados aqui apresentados demonstram o potencial da biomassa de capim elefante para a produção de etanol 2G, de forma a impulsionar cada vez a produção desse biocombustível a partir da utilização de diferentes matérias-primas.

Os resultados obtidos nessa dissertação demonstram que o capim elefante é um insumo excelente para ser utilizado em biorrefinarias, pois é uma matéria-prima de fácil cultivo, rápido crescimento e elevada produtividade, que pode contribuir para a diversificação de matérias-primas. Além disso, existem diferentes produtos de elevado valor agregado que ainda não foram produzidos a partir desse insumo, diante disso, abre-se um leque de oportunidades para otimizar os processos industriais de uma forma mais sustentável, que contribuam para a economia circular.

REFERÊNCIAS

ALBARELLO, M. L. R. et al. Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2023.

ALBUQUERQUE, T. L. DE et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1779–1789, 2014.

AN, L. et al. Enhancing the solubility and antioxidant activity of high-molecular-weight lignin by moderate depolymerization via in situ ethanol/acid catalysis. **Industrial Crops and Products**, v. 128, n. September 2018, p. 177–185, 2019.

ANP (Agência Nacional de Petróleo). Disponível em <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiaZWU1MTc0ZjYtMjVhYi00YTEwLWJhODMtODQ0MDdhNmJiMWYwIiwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTI0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzkxMyJ9&pageName=ReportSection8aa0cee5b2b8a941e5e0%22>>. Acesso em 08 set 2023.

ARRUDA, H. S. et al. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, n. December 2017, p. 738–749, 2018.

BARISIK, G. et al. Optimization of organic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 6, p. 1487–1493, 2016.

BARUAH, J. et al. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, n. DEC, p. 1–19, 2018.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.

BATISTA MENESES, D. et al. Pretreatment methods of lignocellulosic wastes into value-added products: recent advances and possibilities. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.

BHUTTO, A. W. et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724–745, 2017.

BI, Z. et al. Biomass-derived porous carbon materials with different dimensions for supercapacitor electrodes: A review. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 7, n. 27, p. 16028–16045, 2019.

BOZELL, J. J. Feedstocks for the future - Biorefinery production of chemicals from

renewable carbon. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 36, n. 8, p. 641–647, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRITO, W. et al. Capim-elefante tratado com compostos alcalinos Elephant grass treated with alkali. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, p. 714–722, 2009.

BUKHARI, N. A. et al. Oil palm trunk biomass pretreatment with oxalic acid and its effect on enzymatic digestibility and fermentability. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 119–123, 2019.

CAVALI, M. et al. Effect of sequential acid-alkaline treatment on physical and chemical characteristics of lignin and cellulose from pine (*Pinus* spp.) residual sawdust. **Bioresource Technology**, v. 316, n. July, 2020.

CAVALI, M. et al. Valorization of lignin from pine (*Pinus* spp.) residual sawdust: antioxidant activity and application in the green synthesis of silver nanoparticles for antibacterial purpose. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2021.

CHANDEL, A. K. et al. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**, v. 264, n. June, p. 370–381, 2018.

CHEN, Y. et al. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, n. 3, p. 276–290, 2007.

CHUM, H. L. et al. Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24–25, n. 1, p. 1–14, 1990.

DAHIYA, S. et al. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 248, n. May 2017, p. 2–12, 2018.

DAS, P. et al. Effects of one-step alkaline and two-step alkaline/dilute acid and alkaline/steam explosion pretreatments on the structure of isolated pine lignin. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. December 2018, p. 350–358, 2019.

DASGUPTA, D. et al. Process development for crystalline xylitol production from corncob biomass by *Pichia caribbica*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 133, p. 45–56, 2022.

DE MENEZES NOGUEIRA, I. et al. Organic solvent fractionation of acetosolv palm oil lignin: The role of its structure on the antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1163–1172, 2019.

DENG, A. et al. Production of xylo-sugars from corncob by oxalic acid-assisted ball

milling and microwave-induced hydrothermal treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 137–145, 2016.

DHARA, S. et al. High-purity alkaline lignin extraction from *Saccharum ravannae* and optimization of lignin recovery through response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 234, n. January, p. 123594, 2023.

DRESCH, A. P. et al. Different Treatments of Pearl Millet Biomass for Cellulose Recovery: Effects on Lignocellulosic Composition. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 57, n. 3–4, p. 227–236, 2023.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Phenolic Compounds in Plants: Implications for Bioenergy. In: **Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane**. [s.l: s.n.], p. 1–219.

FERNÁNDEZ-COSTAS, C. et al. Structural characterization of Kraft lignins from different spent cooking liquors by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 156–166, 2014.

FLOURAT, A. L. et al. Accessing p-Hydroxycinnamic Acids: Chemical Synthesis, Biomass Recovery, or Engineered Microbial Production? **ChemSusChem**, v. 14, n. 1, p. 118–129, 2021.

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

GARCÍA, J. C. et al. Cold alkaline extraction of Elephant grass for optimal subsequent extraction of hemicelluloses and energy production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2022.

HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. Thermochemical pretreatment enhanced bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*): insight on the production of sugars and lignin. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 4, p. 1125–1138, 2022.

HONG, B. et al. Optimization of oxalic acid pretreatment of moso bamboo for textile fiber using response surface methodology. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 2157–2166, 2014.

HUBBE, M. A. et al. Lignin recovery from spent alkaline pulping liquors using acidification, membrane separation, and related processing steps: A review. **BioResources**, v. 14, n. 1, p. 2300–2351, 2019.

IMMAN, S. et al. Effects of acid and alkali promoters on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 29–36, 2014.

IYYAPPAN, J. et al. Dual strategy for bioconversion of elephant grass biomass into

fermentable sugars using *Trichoderma reesei* towards bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 374, n. January, p. 128804, 2023.

JIA, H. et al. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 676–683, 2016.

KAUR, A.; KUHAD, R. C. Valorization of Rice Straw for Ethanol Production and Lignin Recovery Using Combined Acid-Alkali Pre-treatment. **Bioenergy Research**, v. 12, n. 3, p. 570–582, 2019.

KAUR, R.; UPPAL, S. K.; SHARMA, P. Antioxidant and Antibacterial Activities of Sugarcane Bagasse Lignin and Chemically Modified Lignins. **Sugar Tech**, v. 19, n. 6, p. 675–680, 2017.

KIM, H. Y. et al. Response surface optimization of oxalic acid pretreatment of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) for production of glucose and xylose monosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1440–1446, 2011.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KOLO, S. M. D.; WAHYUNINGRUM, D.; HERTADI, R. The Effects of Microwave-Assisted Pretreatment and Cofermentation on Bioethanol Production from Elephant Grass. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.

LANG, M.; LI, H. Toward Value-Added Arenes from Lignin-Derived Phenolic Compounds via Catalytic Hydrodeoxygenation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, n. 40, p. 13208–13243, 2022.

LARA, A. et al. Enzymes in the third generation biorefinery for macroalgae biomass. In: Singh, S. P.; Singhania, R. R.; Li, Z. (Ed.). **Advances in Enzyme Catalysis and Technologies**. 2020.

LEE, H. J.; SEO, Y. J.; LEE, J. W. Characterization of oxalic acid pretreatment on lignocellulosic biomass using oxalic acid recovered by electro dialysis. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 87–91, 2013.

LENHANI, G. C. et al. Application of Corn Fibers from Harvest Residues in Biocomposite Films. **Journal of Polymers and the Environment**, n. 0123456789, 2021.

LI, K. et al. Maximizing yield of liquid-lignin from membrane filtration retentate of kraft black liquor. **Industrial Crops and Products**, v. 169, n. May, 2021.

LISTA, F. N. et al. Nutritive value and anatomical characterization from pennisetum purpureum genotypes. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 42, p. 1–7, 2020.

LORENCI WOICIECHOWSKI, A. et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, n. January, p. 122848, 2020.

LU, X. et al. Enzymatic sugar production from elephant grass and reed straw through pretreatments and hydrolysis with addition of thioredoxin-His-S. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2019.

LUCARONI, A. C. et al. Effects of Temperature and pH on Salt-Stressed Yeast Cultures in Non-Detoxified Coconut Hydrolysate. <https://home.liebertpub.com/ind>, 28 jul. 2022.

MARTIN-MARTINEZ, F. J. Designing nanocellulose materials from the molecular scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 28, p. 7174–7175, 2018.

MARTINS, J. R. et al. Effect of Dilute Acid Pretreatment on the Sugarcane Leaf for Fermentable Sugars Production. **Sugar Tech**, 2022.

MEDINA, J. et al. Biological activities and thermal behavior of lignin from oil palm empty fruit bunches as potential source of chemicals of added value. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 630-637, 2016.

MENEGOL, D. et al. Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energy Conversion and Management**, v. 88, p. 1252–1256, 2014.

MENEGOL, D. et al. Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 280–290, 2016.

MENG, X. et al. Physicochemical structural changes of poplar and switchgrass during biomass pretreatment and enzymatic hydrolysis. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 9, p. 4563–4572, 2016.

MICHELIN, M. et al. Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 159–169, 2018.

MOHAMAD, N. L.; MUSTAPA KAMAL, S. M.; MOKHTAR, M. N. Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. **Food Reviews International**, v. 31, n. 1, p. 74–89, 2015.

MONTIPÓ, S. et al. Integrated production of second generation ethanol and lactic acid from steam-exploded elephant grass. **Bioresource Technology**, v. 249, n. October 2017, p. 1017–1024, 2018.

MTHEMBU, L. D.; GUPTA, R.; DEENADAYALU, N. Advances in Biomass-Based

Levulinic Acid Production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 1, p. 1–22, 2023.

MUEANSICHAJ, T. et al. Lignocellulosic Bioethanol Production of Napier Grass Using *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae* Co-Culture Fermentation. **International Journal of Renewable Energy Development**, v. 11, n. 2, p. 423–433, 2022.

MUJTABA, M. et al. Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 402, n. November 2022, p. 136815, 2023.

NASCIMENTO, Sandra Americo. Estudo do fracionamento do capim elefante para produzir biomateriais e uso da pressão de cristalização de sais para desfibrilar a parede celular vegetal. 2020. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020.

NASCIMENTO, S. A.; REZENDE, C. A. Combined approaches to obtain cellulose nanocrystals, nanofibrils and fermentable sugars from elephant grass. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, n. October 2017, p. 38–45, 2018.

NAWAZ, A. et al. Sustainable Production of Bioethanol Using Levulinic Acid Pretreated Sawdust. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. June, p. 1–10, 2022.

OKOLIE, J. A. et al. Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2145–2169, 2021.

PALMIERI, F. et al. **Oxalic acid, a molecule at the crossroads of bacterial-fungal interactions**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 106

PIELHOP, T. et al. Steam explosion pretreatment of softwood: The effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

PINALES-MÁRQUEZ, C. D. et al. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 162, n. October 2020, 2021.

PINO, M. S. et al. Enhancement and modeling of enzymatic hydrolysis on cellulose from agave bagasse hydrothermally pretreated in a horizontal bioreactor. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, n. January, p. 349–359, 2019.

PRAMASARI, D. A. et al. The use of hemicellulose acid hydrolysate for hydrolysis of sugarcane trash and its fermentation for producing xylitol. **Industrial Crops and Products**, v. 193, n. October 2022, p. 116163, 2023.

QING, Q. et al. Dilute Oxalic Acid Pretreatment for High Total Sugar Recovery in

Pretreatment and Subsequent Enzymatic Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 7, p. 1493–1507, 2015.

REGO, F. et al. Fast determination of lignocellulosic composition of poplar biomass by thermogravimetry. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, n. February, p. 375–380, 2019.

REZANIA, S. et al. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. **Energy**, v. 199, p. 117457, 2020.

REZENDE, C. A. et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. November, 2011.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Microbiological Research**, v. 240, n. February, p. 126534, 2020.

RUEDA, J. A. et al. Morphological composition and fiber partitioning along regrowth in elephant grass CT115 intended for ethanol production. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

RUIZ, H. A.; THOMSEN, M. H.; TRAJANO, H. L. Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of Bioethanol and High Added-Value Compounds of Second and Third Generation Biomass. 1 ed. Springer Cham, 511 p., 2017.

SAÏED, N. et al. Effects of Acid and Alkali Pretreatments on Carbohydrate Release from Sweet Sorghum and Sweet Pearl Millet Bagasse for Bioethanol Production. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2023.

SANTOS, C. C. et al. Elephant grass leaves have lower recalcitrance to acid pretreatment than stems, with higher potential for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. March 2017, p. 193–200, 2018.

SCHMATZ, A. A.; MASARIN, F.; BRIENZO, M. Lignin Removal and Cellulose Digestibility Improved by Adding Antioxidants and Surfactants to Organosolv Pretreatment of Sugarcane Bagasse. **BioEnergy Research**, 2021.

SCHMIDT, A. R. et al. Applications of Brewer's Spent Grain Hemicelluloses in Biorefineries: Extraction and Value-Added Product Obtention. **Catalysts**, v. 13, n. 4, p. 1–23, 2023.

SCHMIDT, Aline Ruth. Pré-tratamento de bagaço de malte cervejeiro com ácido oxálico para solubilização de hemicelulose e obtenção de xilitol e compostos orgânicos voláteis. 2023. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2023.

SCHOLL, A. L. et al. Ethanol production from sugars obtained during enzymatic

hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 228–237, 2015.

SCOPEL, Eupídio. Aproveitamento integral do capim elefante na produção de etanol celulósico. 2019. 130 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

SCOPEL, E. et al. Green extractions to obtain value-added elephant grass co-products in an ethanol biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, v. 274, 2020.

SCOPEL, E.; CAMARGOS, C. H. M.; PINTO, L. O. Broadening the product portfolio with cellulose and lignin nanoparticles in an elephant grass biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–14, 2023.

SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer: <http://dx.doi.org/10.1177/004051755902901003>, v. 29, n. 10, p. 786–794, 2 jul. 1959.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A. R. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SIQUEIRA, L. N. DE et al. Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 4, p. 191–196, 2016.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass - NREL/TP-510-42618. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. April 2008, p. 17, 2012.

SOUZA, A. G. et al. Innovative process for obtaining modified nanocellulose from soybean straw. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1803–1812, 2020.

TADIOTO, V. et al. Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 1–14, 2022.

TAVARES, D. et al. Lignin from Residual Sawdust of *Eucalyptus* spp.—Isolation, Characterization, and Evaluation of the Antioxidant Properties. **Biomass**, v. 2, n. 3, p. 195–208, 2022.

TOSCAN, A. et al. New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: Focus on the polysaccharide valorization. **Bioresource Technology**, v. 285, n. February, p. 121346, 2019.

TOSCAN, A. et al. Comparison of liquid hot water and saturated steam pretreatments to evaluate the enzymatic hydrolysis yield of elephant grass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2022.

TREVISAN, H.; REZENDE, C. A. Pure, stable and highly antioxidant lignin nanoparticles from elephant grass. **Industrial Crops and Products**, v. 145, n. July 2019, p. 112105, 2020a.

TREVISAN, H.; REZENDE, C. A. Pure, stable and highly antioxidant lignin nanoparticles from elephant grass. **Industrial Crops and Products**, v. 145, n. January, p. 112105, 2020b.

TRIVEDI, J.; BHONSLE, A. K.; ATRAY, N. **Processing food waste for the production of platform chemicals**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

VAIDYA, A. A. et al. Micromorphological changes and mechanism associated with wet ball milling of *Pinus radiata* substrate and consequences for saccharification at low enzyme loading. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 132–137, 2016.

VARGAS, A. C. G. et al. Batch Fermentation of Lignocellulosic Elephant Grass Biomass for 2G Ethanol and Xylitol Production. **Bioenergy Research**, n. 0123456789, 2023.

VERDINI, F. et al. Cellulose recovery from agri-food residues by effective cavitation treatments. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 10, 2021.

VILLAIN-GAMBIER, M. et al. Recovery of lignin and lignans enriched fractions from thermomechanical pulp mill process water through membrane separation technology: Pilot-plant study and techno-economic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 249, p. 119345, 2020.

WANG, J. et al. Recent progress of biomass-derived carbon materials for supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 451, n. October 2019, p. 227794, 2020.

WU, Y. et al. *Saccharomyces cerevisiae* employs complex regulation strategies to tolerate low pH stress during ethanol production. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2022.

XU, J. et al. Use of xylooligosaccharides (XOS) in hemicelluloses/chitosan-based films reinforced by cellulose nanofiber: Effect on physicochemical properties. **Food Chemistry**, v. 298, n. June, 2019a.

XU, Y. et al. Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5143–5160, 2019b.

XU, Y. et al. Silica production across candidate lignocellulosic biorefinery feedstocks. **Agronomy**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.

YAN, Y. et al. Microwave-assisted oxalic acid pretreatment for the enhancing of enzyme hydrolysis in the production of xylose and arabinose from bagasse. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

YANG, J. et al. Novel, recyclable Brønsted acidic deep eutectic solvent for mild fractionation of hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 278, n. November 2021, p. 118992, 2022.

YANG, S. et al. Valorization of lignin and cellulose in acid-steam-exploded corn stover by a moderate alkaline ethanol post-treatment based on an integrated biorefinery concept. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

ZHANG, K. et al. Effect of diluted hydrolysate as yeast propagation medium on ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 271, n. September 2018, p. 1–8, 2019.

APÊNDICE A – Tabela do modo gradiente de concentração de B em função do tempo empregado na determinação dos compostos bioativos.

Tempo (min)	Concentração de B em ppm¹
0,01	5%
1,00	5%
4,00	60%
7,00	70%
10,00	100%
11,50	100%
12,50	5%
15,00	5%
15,00	Parada

¹ ppm: parte por milhão.

Fonte: A autora (2023)

APÊNDICE B – Tabela dos parâmetros analíticos do método de quantificação por meio da utilização de um espectrômetro de ionização por electrospray (ESI) em modo positivo ou negativo: íon precursor (m/z), tempo de retenção (t.r.), linearidade (r), equação de regressão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para os compostos analisados de ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, flavona, kaempferol e pirocatecol.

Composto	Íon precursor (m/z)	Tempo de retenção (min)	(r)	Equação de regressão	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ácido cafeico	179 (-)	6,18	0,9851	$f(x) = 483185 * x + 1,59111e^{06}$	0,43	1,31
Ácido p-cumárico	163 (-)	6,67	0,9999	$f(x) = 46230,9 * x + 73484,9$	0,10	1,49
Ácido siríngico	197 (-)	6,56	0,9813	$f(x) = 11611,1 * x + 30158,6$	1,04	3,16
Flavona	223 (+)	10,0	0,9812	$f(x) = 5,44966e^{06} * x + 4,04029e^{07}$	0,06	1,14
Kaempferol	287 (+)	8,50	0,9823	$f(x) = 742189 * x + 2,78984e^{06}$	0,14	0,40
Pirocatecol	109 (-)	4,89	0,9984	$f(x) = 13914,5 * x - 4264,20$	0,43	1,30

FONTE: A autora (2023)