

## OPEN ACCESS

Editado por:

Dr. Victor Hugo Gomes Sales  
Instituto Federal do Amapá, Macapá-AP, Brasil

Seção:

Esse artigo foi submetido em Bioenergia uma  
seção Interdisciplinar do *Journal of Bioenergy  
and Food Science*

ID JBFS2632019

DOI 10.18067/jbfs.v6i3.263

Processos de revisão:  
Prot. 2632019R01 (Brasil)  
Prot. 2632019R02 (Brasil)

\*Autor correspondente:

Emmanuel Zullo Godinho  
profemmanuelzullo@gmail.com

Conflito de interesse:

Os autores declararam que não há conflito de  
interesse.

Financiamento:

Os autores declararam que não receberam  
financiamento para o desenvolvimento da  
pesquisa.

Recebido em: 09 de março de 2019

Aceito em: 31 de maio de 2019

Publicado em: 01 de julho de 2019

Citação (APA):

Godinho, E.Z., PERIN, A.A., BAUMGARTNER,  
T.R. da S. & HASAN, S.D.M. (2019). Pré-  
tratamento hidrotérmico alcalino e alcalino-  
oxidativo sobre os teores de celulose e lignina  
em biomassa de capim elefante BRS Capiaçú.  
*Journal of Bioenergy and Food Science*, 6(3):  
51-65. doi: 10.18067/jbfs.v6i2.263



JBFS all rights  
Copyright: © 2019

## Pré-tratamento hidrotérmico alcalino e alcalino-oxidativo sobre os teores de celulose e lignina em biomassa de capim elefante BRS Capiaçú

*Alkaline and alkaline-oxidative hydrothermal pretreatment on cellulose and lignin contents in elephant grass biomass BRS Capiaçú*

<sup>1, ID</sup> Emmanuel Zullo GODINHO, <sup>2, ID</sup> André Angelo PERIN

<sup>1, ID</sup> Tatiana Rodrigues da Silva BAUMGARTNER e <sup>1, ID</sup> Salah Din Mahmud HASAN

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Toledo. Programa de Pós-graduação Mestrado em Bioenergia. Rua da Faculdade, 645 - Jardim Santa Maria - CEP 85903-000 - Toledo/PR, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Toledo.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos tipos de pré-tratamento hidrotérmicos sobre os teores de lignina e celulose do capim-elefante, utilizando o hidróxido de sódio e o peróxido de hidrogênio, em diferentes temperaturas. Para isso foi realizado um arranjo experimental que permitiu avaliar estatisticamente os efeitos da temperatura e dos elementos alcalinos bem como a sua interação sobre as concentrações finais de celulose e lignina. Os ensaios foram realizados em triplicata, bem como as comparações de médias para as respostas obtidas, por meio de testes estatísticos. Conforme resultados obtidos, os teores médios de celulose para o pré-tratamento com NaOH nas temperaturas de 80 e 120 °C foram de 56,94% e 57,01%, respectivamente e para o peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram de 53,85% e 53,73%, respectivamente. Os teores médios de lignina nas temperaturas de 80 e 120 °C tratado com NaOH foram de 16,09% e 18,40% respectivamente, e para o pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os teores foram de 12,13% e 15,00%, respectivamente. Com foco na obtenção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática do capim-elefante pré-tratado, concluiu-se que a melhor opção seria o pré-tratamento alcalino com NaOH a 80 °C, gerando economia de energia e com teor considerável de celulose.

**Palavras-chave:** Lignina. Etanol de segunda geração. *Pennisetum purpureum* Schum.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the types of hydrothermal pretreatments on elephant grass using sodium hydroxide and hydrogen peroxide at different temperatures on lignin and cellulose contents. For this, an experimental arrangement was set up to evaluate the effects of temperature and alkaline elements, as well as their interaction on the final concentrations of cellulose and lignin. The tests were performed in triplicate, as well as comparisons of means two to two for the answers obtained, by means of statistical tests. According to the results obtained, the average contents of cellulose for pre-treatment with NaOH at temperatures of 80 and 120 °C were 56.94% and 57.01% respectively and for peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were 53.85% and 53.73%. The average lignin contents at temperatures of 80 and 120 °C treated with NaOH were 16.09% and 18.40% respectively, and for the pretreatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> the contents were 12.13% and 15.00% respectively. With a focus on obtaining fermentable sugars by enzymatic hydrolysis of the pretreated elephant grass, it was concluded that the best option would be the alkaline pre-treatment with NaOH at 80 °C, generating energy savings and considerable cellulose content.

**Keywords:** Lignin. second-generation ethanol. *Pennisetum purpureum* Schum.

## INTRODUÇÃO

Com a industrialização, cada vez mais fica evidenciada a dependência da geração de energia a partir de novas fontes. Assim, o uso de fontes sustentáveis como por exemplo, biomassa lignocelulósica oferece grandes vantagens energéticas, ambientais e econômicas (Silva & Rocha, 2010). Os biocombustíveis têm demonstrado um grande potencial para a substituição dos derivados de petróleo e o Brasil produz e comercializa etanol de segunda geração desde 2014, sendo o país pioneiro na utilização desta fonte de energia. Atualmente, o país produz etanol de primeira geração a partir de cana-de-açúcar, e de segunda geração usando o bagaço e a palha da cana. O bioetanol é um biocombustível líquido que pode ser produzido a partir de biomassa de várias matérias-primas tais como: a cana-de-açúcar, milho, sorgo, palha de arroz, resíduos de madeira e gramíneas (Nikolić, Vesna, Đorđe & Ljiljana, 2017).

A celulose é o biopolímero presente em maior quantidade na parede celular dos resíduos lignocelulósicos, seguida de hemicelulose e lignina (Pereira, 2013), sendo que nesses últimos anos muito se vem estudando para encontrar o melhor método de obtenção de etanol a partir da celulose o qual demanda vários processos, como Upstream process: pré-tratamento da biomassa, com a escolha dos fatores (liberação do AR para a etapa seguinte); Fermentação: processo de conversão dos AR em etanol pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) ou outro microrganismo; Downstream process: processo de separação dos produtos e tratamento dos efluentes gerados.

Entre os passos cruciais na produção de etanol estão a hidrólise enzimática da celulose para obtenção dos açúcares e a fermentação da glicose para a produção de etanol. A presença da lignina torna o acesso à celulose difícil, afetando a eficiência da hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é remover ou modificar a estrutura da lignina para facilitar o ataque enzimático, evitando a degradação da célula. Os pré-tratamentos químicos podem ser definidos como técnicas que envolvem agentes químicos tais como ácidos, bases e solventes orgânicos. O pré-tratamento ácido consiste em tratar a biomassa para solubilizar a hemicelulose com o fim de obter uma celulose mais acessível. Os pré-tratamentos alcalinos consistem na remoção da lignina e tendem a causar um inchamento da biomassa, provocando uma quebra das ligações lignina-carboidrato, além de perturbação na estrutura da lignina. Os tratamentos alcalinos são mais apropriados que os tratamentos ácidos, sendo que este pode aumentar a degradação de elementos importantes para o processo de hidrólise (Nakanishi et al., 2018).

Como matéria-prima, o capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) pode ser considerado uma fonte renovável promissora para a produção de etanol de segunda geração, tendo uma alta produtividade em relação à cana-de-açúcar, dado sua produtividade média de 30 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de matéria seca, além disso, a biomassa pode ser cultivada em diferentes tipos de solo, incluindo aqueles pobres, que não são adequados para a produção de alimentos (Grasel et al., 2017; Scholl et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os pré-tratamentos hidrotérmicos alcalinos e alcalinos-oxidativos, utilizando NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na biomassa de capim elefante cultivar BRS Capiacu, em diferentes temperaturas sobre os teores finais alcançados para os teores de celulose e de lignina.



## MATERIAL E MÉTODOS Overview

### *Matéria-prima (Biomassa lignocelulósica de capim-elefante)*

Foi utilizada como matéria-prima, biomassa de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), cultivar BRS Capiáçu, a qual foi coletada em uma lavoura do sítio Mees, distrito de São Miguel na cidade de Toledo-PR, sendo selecionadas as folhas jovens (1º corte com seis meses após o plantio), por conterem maior concentração de celulose. Antes do pré-tratamento, o capim foi seco em estufa com convecção forçada (Nova Instruments, modelo HI 1514) à temperatura de 45 °C por 3 dias. Em seguida foi triturado e estocado em sacos de polipropileno, sob refrigeração, até o uso.

### *Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica*

As amostras de capim-elefante foram submetidas aos pré-tratamentos descritos a seguir, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### *Pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH)*

O tratamento com NaOH foi realizado de acordo com procedimento descrito por Krishna, Rao, Babu e Reddy (2000). Pesou-se 4,0 g de amostras, transferiu-se para um erlenmeyer de 250,0 mL juntamente com solução de NaOH a 4 % (20,0 mL de solução por grama de capim), ou seja, 80,0 mL total. A suspensão foi levada à autoclave nas temperaturas de 80 e 120 °C, por 30 min. Após o tempo da autoclave a suspensão foi submetida à filtração a vácuo onde o material recuperado (sólido filtrado) foi lavado com água corrente e neutralizado com ácido fosfórico concentrado.

### *Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)*

O tratamento alcalino-oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adaptado da metodologia descrita por Krishna, Rao, Babu e Reddy (2000). Foi pesado 4,0 g de amostra, transferiu-se para um erlenmeyer de 250,0 mL juntamente com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% em base volumétrica (50,0 mL de solução por grama de capim), ou seja, 200,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ajustou-se o pH da solução com NaOH para 11,5. Levou-se as amostras a autoclave à temperatura de 80 e 120 °C, por 30 min. Após o tempo de tratamento, o material foi submetido à filtração a vácuo e feitas lavagens sucessivas com ácido fosfórico até o sólido filtrado apresentar pH neutro.

### *Secagem da biomassa pré-tratada*

Após o pré-tratamento, as amostras de capim elefante foram colocadas em bandejas de metal, levando-as à estufa para secagem em camadas de aproximadamente 1 cm de espessura. Para ambos pré-tratamentos a temperatura de secagem foi de 65 °C, até massa constante das amostras.

### *Análise estatística*

Para a análise estatística dos experimentos foi utilizado o software Action™, versão 3.1.43, da Estatcamp. Foram determinados pelo programa a estimativa dos efeitos principais e de interação entre as variáveis por meio de Análise de Variância

(ANOVA), juntamente com os gráficos dos efeitos e análise de resíduos. O nível de significância utilizado nas análises estatísticas foi de 10% ( $\alpha = 0,10$ ). Foram feitas comparações de médias por meio de teste de Tukey.

### *Métodos Analíticos*

#### *Determinação do teor de celulose*

Para a determinação da celulose foi adaptado o método de Moraes, Rosa e Marconcini (2010). Pesou-se 1,0 g de amostra, transferiu-se as amostras para Erlenmeyer e adicionou-se 16,5 mL de reagente ácido, previamente preparado com ácido acético glacial (72,73%), água destilada (18,18%) e ácido nítrico (9,09%), ou seja, 12,0 mL de ácido acético glacial, 3,0 mL de água destilada e 1,5 mL de ácido nítrico. Para a etapa de digestão da celulose as amostras foram colocadas em banho-maria a 80 °C, por 30 min. Após a digestão, adicionou-se 20,0 mL de álcool etílico, em seguida, todo o material precisou ser filtrado e lavado com 20,0 mL de álcool etílico, na filtração adicionou-se 20,0 mL de benzeno quente e, finalmente adicionou-se 20,0 mL de éter sulfúrico, a 65 °C. O conteúdo filtrado foi levado à estufa a 105±2 °C até massa constante para calcular o teor de celulose presente na amostra (Equação 01).

$$\text{Teor de celulose} = ((M_{fc} - M_f)/M_a) * 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:  $M_{fc}$  = massa do funil + celulose (g); massa do papel + filtrado;  $M_f$  = massa funil (g); massa do filtro;  $M_a$  = massa da amostra (g); massa do capim-elefante antes da filtração; Teor de celulose: expresso em percentual (%).

#### *Determinação do teor de lignina*

A determinação da lignina segue o método proposto por Moraes, Rosa e Marconcini (2010). Adicionou-se 1,0 g de amostra em um béquer e em seguida adicionou-se 17,0 mL de ácido sulfúrico (72,0%) resfriado em geladeira de 10 a 15 °C, antes do uso. Agitou-se vigorosamente o material com um bastão de vidro, até homogeneização, formando uma pasta. As amostras foram colocadas em uma capela para deixar em digestão por 24 h. Posteriormente o ácido sulfúrico que estava na digestão junto com o capim, foi diluído para 4,0% adicionando-se 289,0 mL de água destilada. O conteúdo foi transferido para um balão de fundo redondo de 500,0 mL e mantido em refluxo por 4 h. Por fim o conteúdo do balão foi filtrado e levado à estufa a 80±2 °C até massa constante. Após a secagem em estufa, o material foi incinerado, onde colocou-se as amostras em cadinhos e levou-as à mufla a 500±2 °C por 2 h, pesou-se a amostra incinerada, para determinação do teor de cinza a partir da Equação 02 e teor de lignina presente no capim pela Equação 03.

$$\text{Teor de cinzas} = ((M_{fc} - M_f)/M_a) * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{Teor de lignina} = ((M_{fl} - M_f)/M_a) * 100 - TC \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:  $M_{fl}$  = massa do funil + lignina após a secagem na estufa (g); massa do filtro + a massa do capim-elefante após o processo de desestruturação da lignina, após estufa;  $M_f$  = massa funil (g);  $M_a$  = massa da amostra (g);  $M_{fc}$  = massa do funil + cinzas após a calcinação em mufla

(g); Teor de lignina: expresso em percentual (%); TC = Teor de cinzas: expresso em percentual (%).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados os efeitos da temperatura (80 e 120 °C), após o pré-tratamento alcalino com NaOH e o alcalino-oxidativo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre os conteúdos de celulose e lignina no capim-elefante, cujos resultados são apresentados nas Tabela 1, respectivamente.

**Tabela 1.** Resultados de celulose do pré-tratamento alcalino e oxidativo em diferentes temperaturas e *in natura*.

**Table 1.** Alkaline and oxidative pre-treatment cellulose results at different temperatures and *in nature*.

Amostra	<i>In natura</i>		Tratamentos hidrotérmicos							
			NaOH				H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			
			80 °C		120 °C		80 °C		120 °C	
	Celulose	Lignina	Celulose	Lignina	Celulose	Lignina	Celulose	Lignina	Celulose	Lignina
R1	53,14%	25,20%	55,83%	16,65%	55,55%	17,09%	55,62%	10,49%	56,74	13,46%
R2	51,46%	24,60%	58,06%	16,25%	58,32%	22,06%	55,40%	11,08%	54,80	14,57%
R3	52,45%	23,80%	56,91%	15,38%	57,18%	16,04%	50,53%	14,82%	49,64	16,97%
Média	52,34%	24,53%	56,94%	16,09%	57,01%	18,40%	53,85%	12,13%	53,73	15,00%
CV	1,6%	2,8%	1,9%	4,0%	2,4%	17,4%	5,3%	19,3%	6,8%	11,9%

CV = coeficiente de variação (coefficient of variation)

Avaliando os resultados de celulose com diferentes temperaturas o NaOH se destacou tanto na temperatura de 80 °C, quanto para 120 °C. Conforme observado na Tabela 1, as médias de teor de celulose foram semelhantes para ambas as temperaturas (80 e 120 °C), tanto para o pré-tratamento com NaOH como para com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Reforçando os dados desta pesquisa, Minmunin et al. (2105), relataram que ao pré-tratar o capim-elefante com NaOH em diferentes concentrações tiveram como resultados de celulose e lignina entre 60,20 a 68,50% e 6,50 a 8,20%, respectivamente.

Conforme se pode observar na Tabela 1, as médias de teor de lignina variaram tanto em decorrência da temperatura como em decorrência do tipo de álcali usado no pré-tratamento. Além disso, as médias observadas para a lignina foram mais baixas para temperaturas mais altas, indicando o efeito dessa variável na remoção da lignina, o que é desejável em termos do pré-tratamento da lignocelulósico. O coeficiente de variação se mostrou mais elevado para as análises de lignina, provavelmente em função da maior complexidade do método analítico utilizado.

O pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou alto desempenho na remoção da lignina, com taxa de remoção de lignina de 87,89%, comparando com o pré-tratamento NaOH a remoção da lignina foi de 85%. Apoiando com os resultados, Zhang & Zhu (2016), analisando 6 modelos de pré-tratamento de Fenton e NaOH, a combinação dos dois métodos mostrou uma sinergia no desempenho, com cerca de 50% de lignina removida e um aumento de quase 100% no teor de celulose trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar.

A biomassa utilizada neste estudo apresentou inicialmente 24,53% de lignina, conforme apresentado na Tabela 1, o pré-tratamento com NaOH a 80 °C a lignina média foi de 16,09% e após pré-tratado com a temperatura de 120 °C a média foi de

18,40%. Assim, no que se refere a deslignificação do capim, para 80 °C a remoção de lignina foi de 49,7% e para 120 °C a remoção foi de 42%.

Quando pré-tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas mesmas temperaturas citadas anteriormente, a composição química da lignina foi de 12,13 a 15,00%, respectivamente. Confirmando com estes dados, Phitsuwan et al. (2016), que ao pré-tratar o capim-elefante com NaOH na concentração e temperatura (2%; 121 °C a 1 h), o mesmo removeu 84,1% de lignina, e utilizando a concentração de 1% de NaOH com 0,8% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> removeu 69,5% de lignina.

#### *Análise estatística para a celulose*

Conforme observado na Tabela 1, as médias de teor de celulose foram semelhantes para ambas as temperaturas (80 e 120 °C), tanto para o pré-tratamento com NaOH como para com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, para cada temperatura é possível verificar diferença entre os teores médios de celulose em função do tipo de pré-tratamento. Isso pode ser corroborado por meio da análise estatística, ou seja, pela análise de variância dos experimentos, conforme a Tabela 2. Verifica-se que, no nível de significância de 10%, apenas o tipo de álcali utilizado no pré-tratamento (NaOH ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é influenciado no teor de celulose (com p-valor < 0,10).

**Tabela 2.** ANOVA dos resultados de celulose para diferentes temperaturas e pré-tratamentos ( $\alpha=0,10$ ).

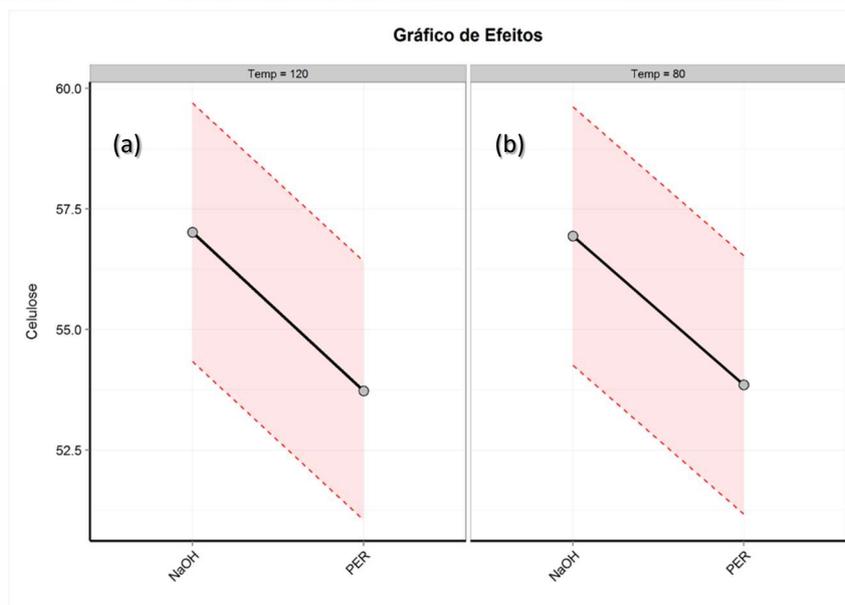
**Table 2.** ANOVA of cellulose results for different temperatures and pre-treatments ( $\alpha = 0.10$ ).

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Tratamento (tipo de álcali)	1	30,451	30,451	4,88540	0,0581
Temperatura	1	0,001	0,001	0,00022	0,9885
Tratamento:Temperatura	1	0,030	0,030	0,00486	0,9461
Resíduos	8	49,864	6,233	-	-
Total	11	80,347	-	-	-

Conforme apresentado, na Tabela 2, a ANOVA apresenta os resultados do p-valor do tratamento, da temperatura e da interação do tratamento com temperatura, o único resultado significativo foi o do tratamento com (p-valor<0,1).

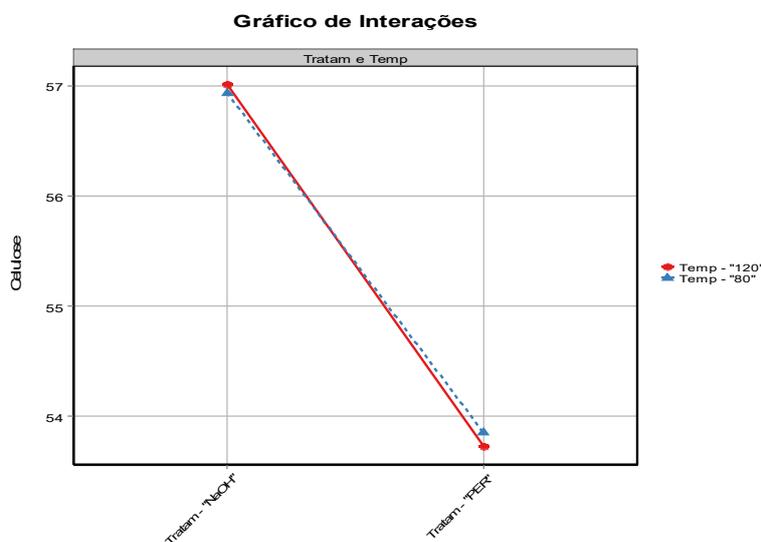
A Figura 1 mostra o gráfico dos efeitos individuais da temperatura e do tipo de pré-tratamento sobre o teor de celulose, onde verificou-se o mesmo comportamento para ambas as temperaturas, porém com mudanças de teor significativas para os diferentes pré-tratamentos. É possível verificar que ao mudar o pré-tratamento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para NaOH, houve um aumento significativo na liberação da celulose, em 120 °C, o mesmo acontece quando analisado a 80 °C na Figura 1.b.

Além disso, conforme a Tabela da ANOVA a interação entre as variáveis temperatura e tipo de pré-tratamento não é significativa, conforme pode ser visualizado no gráfico da Figura 1. Isso indica que a resposta independe do nível em que as variáveis se encontram.



**Figura 1.** Gráfico dos efeitos individuais sobre o teor de celulose ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

**Figure 1.** Graph of individual effects on cellulose content ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

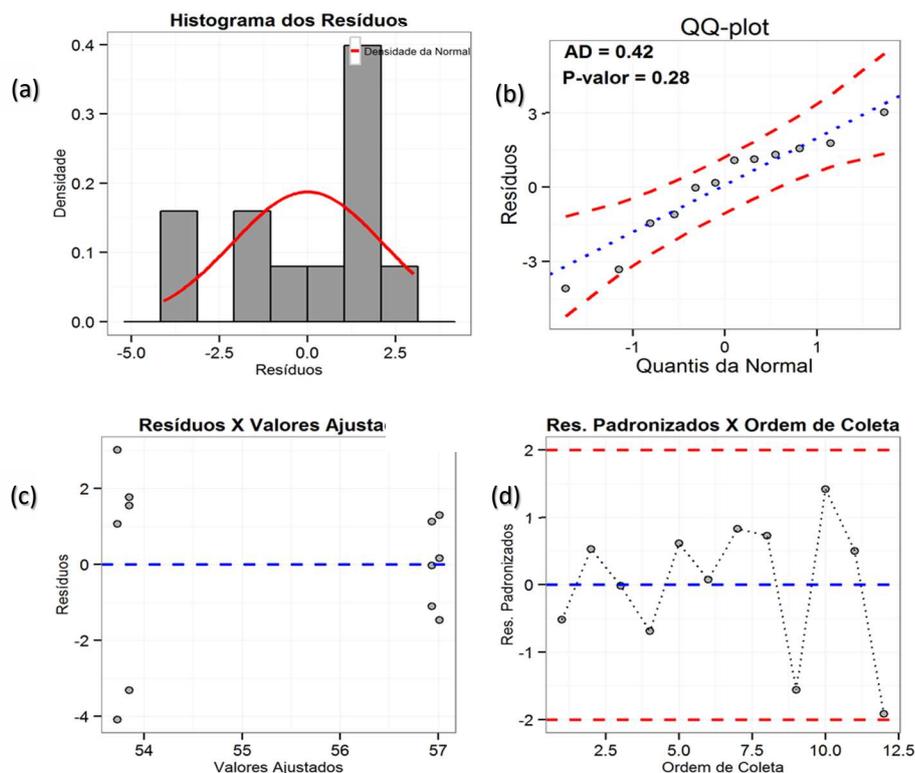


**Figura 2.** Gráfico dos efeitos de interação sobre o teor de celulose ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

**Figure 2.** Graph of the interaction effects on the cellulose content ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

Na Figura 2, observa-se que há influência entre os tipos de pré-tratamento (NaOH e  $H_2O_2$ ), para ambas temperaturas (80 e 120 °C), dado que as retas estão se cruzando, existindo assim uma relação entre o NaOH e  $H_2O_2$ , pois ao mudar a temperatura de 80 °C para 120 °C, ambas as retas mostram que aumentou a liberação da celulose (%).

A Figura 3, apresenta os gráficos de resíduos, sendo o histograma geral (a), o QQ-plot (b), resíduos x valores ajustados (c) e resíduos padronizados versus ordem de coleta (d).



**Figura 3.** Gráficos dos resíduos. (a) histograma dos resíduos, (b) QQ-plot, (c) resíduos versus valores preditos e (d) resíduos padronizados versus ordem de coleta ( $\alpha=0,10$ ).

**Figure 3.** Residual graphs. (a) histogram of the residues, (b) QQ-plot, (c) residues versus predicted values, and (d) standardized residues vs. collection order ( $\alpha = 0.10$ ). of cellulose ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

Nos gráficos de resíduos (Figura 3.c) observa-se a distribuição aleatória dos resíduos próximos do zero bem como na ordem de coleta dos ensaios (Figura 3.d). Verifica-se também que no gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura 3.b) não há a presença de *outliers*, tendo como máxima superior e inferior ( $\pm 4,0$ ) e que os resíduos aderem a uma distribuição normal, com p-valor=0,28 ( $>0,10$ ) determinado pelo teste de normalidade de Anderson-Darling (AD). Essas observações quanto aos resíduos na ANOVA satisfazem a premissa da estatística paramétrica e permite que se faça a análise dos dados.

A Tabela 3 apresenta o teste de Tukey, que é considerado um teste rigoroso e de fácil aplicação, utilizado nesse caso como um complemento para o estudo da análise de variância, sendo que as médias foram comparadas duas a duas. Considerando apenas a comparação entre as médias de celulose dentro do pré-tratamento, a qual foi a variável que se apresentou como significativa a partir da ANOVA (Tabela 3). As letras “a” e “b” indicam que as médias são diferentes dentro do tratamento (p -valor =0,033).

**Tabela 3.** Comparação de médias de celulose do teste de Tukey ( $\alpha = 0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

**Table 3.** Comparison of cellulose averages of the Tukey test ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

Fator	Média	Grupos
NaOH	56,97	a
PER	53,78	b

A Tabela 3, considerou apenas a comparação entre as médias de celulose dentro do pré-tratamento, a qual foi a variável que se apresentou como significativa a partir da ANOVA na Tabela 3 a letras “a” e “b” indicam que as médias são diferentes dentro do tratamento ( $p$ -valor = 0,033). Analisando-se os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que os melhores resultados obtidos de celulose foram para o pré-tratamento com NaOH, independentemente da temperatura. Considerando que o melhor pré-tratamento é aquele que proporciona maior concentração de celulose disponível, o pré-tratamento com NaOH se mostrou mais efetivo. Por outro lado, segundo Rabelo (2010), no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, a principal função do oxigênio ativo que foi obtido através de reações do peróxido em meio alcalino, é a remoção da lignina através da geração de compostos oxigenados. Em meio alcalino fraco, o peróxido age de forma seletiva nos compostos fenólicos, promovendo uma cisão parcial da lignina, causando a sua degradação sem alterar a fração celulósica dos materiais lignocelulósicos, comparando o pré-tratamento com peróxido alcalino a outros processos, este apresenta como vantagem a redução da cristalinidade da celulose e decomposição da lignina em gás carbônico, água e ácido carboxílico.

O principal benefício do pré-tratamento alcalino é a remoção eficiente de lignina e hemicelulose, bem como a sua capacidade para aumentar a área de superfície local para a reação de hidrólise enzimática posterior. Por outro lado, a principal desvantagem desse tipo de pré-tratamento é a formação de sais, que devem ser removidos. Segundo Shirkavand, Saeidbaroutian, Gapes e Young (2016), o solvente alcalino provoca a degradação das cadeias laterais de éster e glicosídicas, o que conduz à alteração estrutural e degradação da lignina, o inchaço e decristalização parcial da celulose.

Campos (2017), reforçou que ao pré-tratar a palha da carnaúba com 4 diferentes concentrações de NaOH (1%, 2%, 3% e 4%), obteve como resultado um aumento na liberação de celulose com o aumento conforme a aumentou a porcentagem da substância, mostrando que os resultados de apresentados nesta pesquisa estão de acordo com a literatura, pois na mesma porcentagem de NaOH (2%) os resultados foram de 56,97% e 17,24%, de celulose e lignina, respectivamente.

Wanderley *et al.* (2013) trabalhando com bagaço da cana-de-açúcar, utilizando dois tipos de pré-tratamentos, a explosão a vapor e explosão a vapor mais hidróxido de sódio tendo como controle o bagaço *in natura* sem pré-tratamento, a celulose variou de 42,8 a 87,3%, a lignina variou de 5,7 a 34,3%, com estes resultados os autores salientam que a lignina é considerada uma barreira física e protetora para um ataque enzimático, pois não poderia ser efetivamente removida apenas por pré-tratamento de explosão de vapor.

### Análise estatística para a lignina

Conforme se pode observar na Tabela 4 as médias de teor de lignina variaram tanto em decorrência da temperatura como em decorrência do tipo de álcali usado no pré-tratamento. Porém, considerando um nível de significância inferior ( $\alpha = 5\%$ ), somente o tipo de pré-tratamento exerceria influência sobre o teor de lignina. Além disso, as médias observadas para a lignina foram mais baixas para temperaturas mais altas, indicando o efeito dessa variável na remoção da lignina, o que é desejável em termos do pré-tratamento da lignocelulósico.

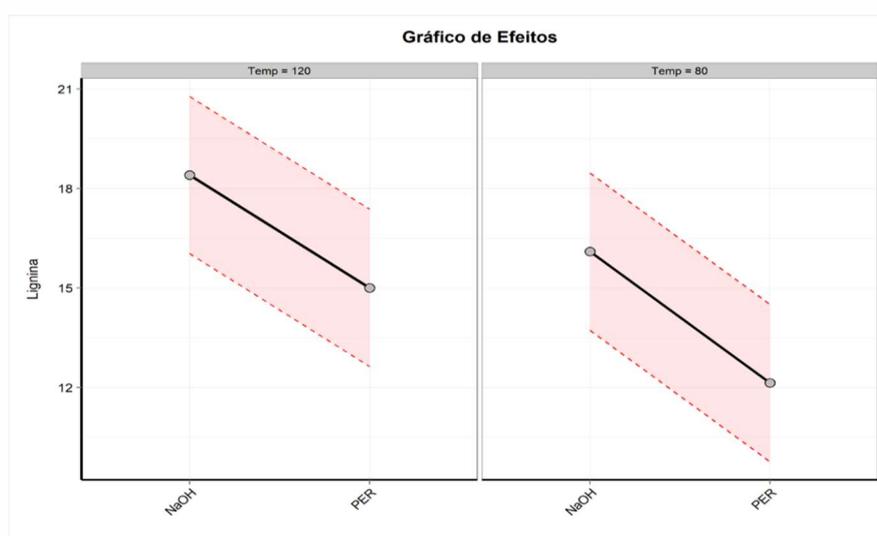
Isso pode ser corroborado por meio da análise estatística, ou seja, pela análise de variância dos experimentos, conforme a Tabela 4. Verifica-se que, no nível de significância de 10%, tanto a temperatura como o tipo de álcali utilizado no pré-tratamento (NaOH ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) influencia no teor de lignina (com p-valor < 0,10).

**Tabela 4.** ANOVA dos resultados de lignina para diferentes temperaturas e pré-tratamentos ( $\alpha=0,10$ ).

**Table 4.** ANOVA of the lignin results for different temperatures and pre-treatments ( $\alpha = 0.10$ ).

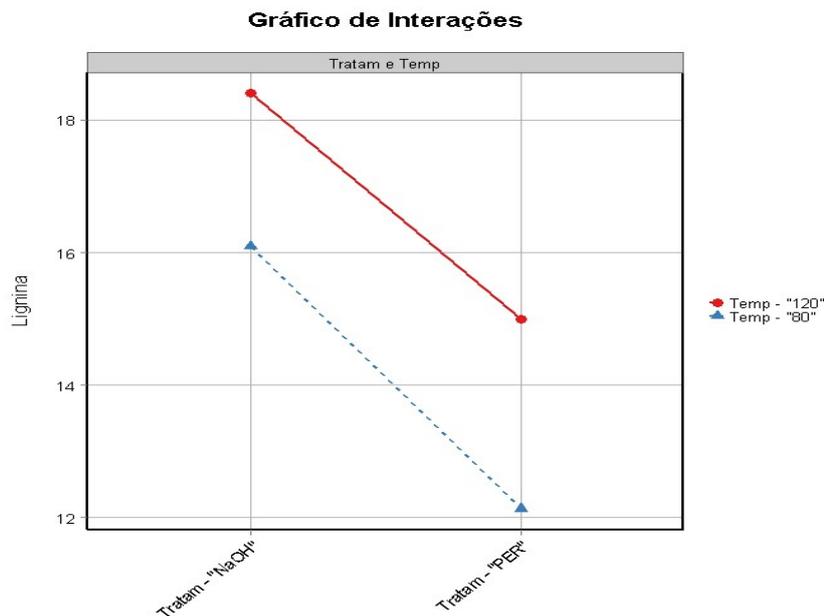
FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Pré-tratamento	1	40,63	40,63	8,331	0,0203
Temperatura	1	20,12	20,12	4,125	0,0767
Tratamento: Temperatura	1	0,23	0,23	0,048	0,8318
Resíduos	8	39,01	4,88	-	-
Total	11	99,99	-	-	-

A Figura 4 mostra o gráfico dos efeitos individuais da temperatura e do tipo de pré-tratamento sobre o teor de lignina, onde se pode verificar o mesmo comportamento para ambas as temperaturas, porém com mudanças de teor significativas para os diferentes pré-tratamentos. Além disso, conforme a Tabela da ANOVA a interação entre as variáveis temperatura e tipo de pré-tratamento não é significativa, conforme se pode visualizar no gráfico da Figura 5. Isso indica que a resposta independe do nível em que as variáveis se encontram.



**Figura 4.** Gráfico dos efeitos individuais sobre o teor de lignina ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

**Figure 4.** Graph of individual effects on lignin content ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 5.** Gráfico dos efeitos de interação sobre o teor de lignina ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

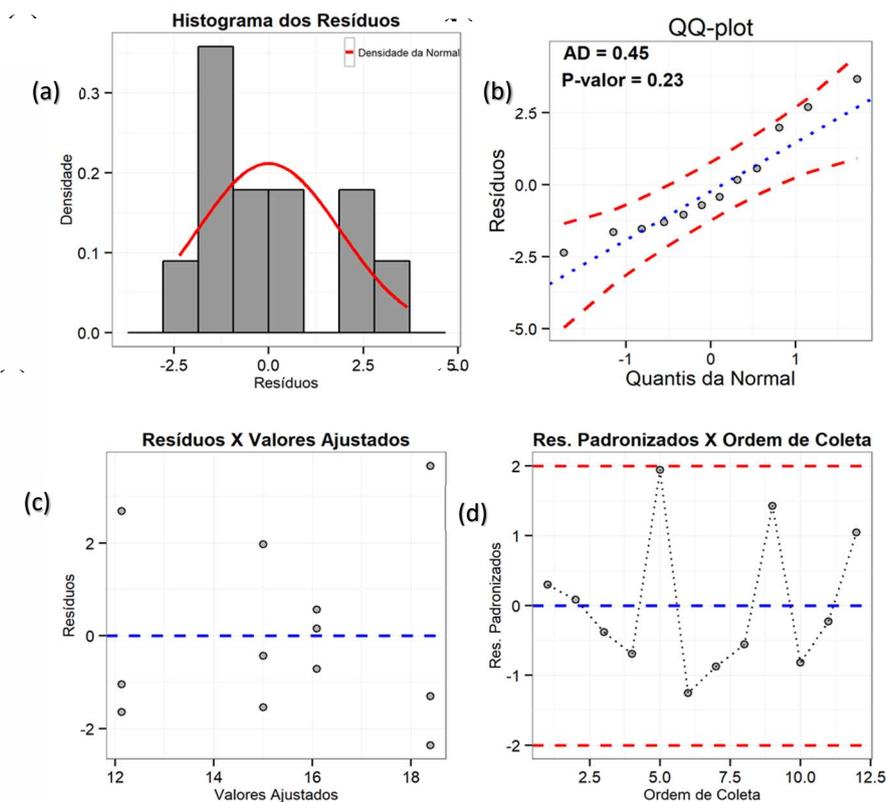
**Figure 5.** Graph of interaction effects on lignin content ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )

**Tabela 5.** Comparação de médias de lignina do teste de Tukey dentro do grupo pré-tratamento ( $\alpha=0,10$ ). PER = peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

**Table 5.** Comparison of lignin means of the Tukey test within the pre-treatment group ( $\alpha = 0.10$ ). PER = hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).

Fator	Médias (%)	Grupos
NaOH	17,24	a
PER	13,56	b

A Tabela 5 apresenta o teste de Tukey onde as médias foram comparadas. Nesta Tabela foi considerado apenas a comparação entre as médias de lignina dentro do pré-tratamento. As letras "a" e "b" indicam que as médias são diferentes dentro do tratamento ( $p$ -valor = 0,026).



**Figura 6.** Gráficos dos resíduos. (a) histograma dos resíduos, (b) QQ-plot, (c) resíduos versus valores preditos e (d) resíduos padronizados versus ordem de coleta ( $\alpha=0,10$ ).

**Figure 6.** Graphs of the residues. (a) histogram of the residues, (b) QQ-plot, (c) residues versus predicted values, and (d) standardized residues versus collection order ( $\alpha = 0.10$ ).

Nos gráficos de resíduos (Figura 6.c) observa-se a distribuição aleatória dos resíduos em torno do zero bem como na ordem de coleta dos ensaios (Figura 6.d). Verifica-se também que no gráfico da probabilidade normal dos resíduos (Figura 6.b) não há a presença de *outliers*, o qual observando a (Figura 6.c) os resíduos x valores ajustados estão com valores acima de 2,5, sendo uma faixa de  $\pm 2,5$ , juntamente com a (Figura 6.b) que é observado valores entre  $\pm 2,5$ , o que comprova a não presença de *outliers* e que os resíduos aderem a uma distribuição normal, com  $p\text{-valor}=0,23$  ( $> 0,10$ ) determinado pelo teste de normalidade de Anderson-Darling (AD). Essas observações quanto aos resíduos na ANOVA satisfazem a premissa da estatística paramétrica e permite uma análise mais aprofundada dos dados.

A Tabela 6, apresenta o teste de Tukey onde as médias foram comparadas dentro do grupo da temperatura. A letras “a” indicam que as médias são iguais dentro do grupo de dados da temperatura ( $p\text{-valor} = 0,144$ ).

**Tabela 6.** Comparação de médias de lignina do teste de Tukey dentro do grupo temperatura ( $\alpha=0,10$ ).

**Table 6.** Comparison of Tukey test lignin means within the temperature group ( $\alpha = 0.10$ ).

Fator (°C)	Médias (%)	Grupos
120	16,70	a
80	14,11	a

Os estudos relacionados ao pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração envolvem ampla variedade de condições e que dificulta a realização de comparações diretas de rendimentos, tanto no que se refere aos tipos de matéria-prima, quanto aos mecanismos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação. Portanto, para fins comparativos, na Tabela 7 são apresentados os teores de celulose e lignina obtidos por outros autores.

**Tabela 7.** Teores de lignina e celulose para diferentes fontes de biomassa e pré-tratamento conduzidos por outros autores.

**Table 7.** Lignin and cellulose contents for different sources of biomass and pre-treatment conducted by other authors.

Biomassa	Pré-tratamento	Celulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Capim-elefante	Ácido sulfúrico	53,80	15,4	Pereira (2013)
Bagaço de cana	Ácido sulfúrico	59,20	15,6	Pereira (2013)
Capim-elefante	Óxido de cálcio	47,00	10,0	Lopes et al. (2009)
Capim-elefante	Hidróxido de sódio	47,40	9,9	
Capim-elefante	Hidróxido de Sódio	57,01	16,09	Este trabalho
Capim elefante	Peróxido de Hidrogênio	53,73	12,13	Este trabalho

Observa-se na Tabela 7 que para uma mesma biomassa utilizada (capim-elefante), os teores de celulose obtidos neste trabalho pré-tratado com NaOH se mostrou superior aos trabalhos dos demais autores. Já o teor de lignina pré-tratado com  $H_2O_2$  foi o que se mostrou com valores mais próximos dos demais autores, sendo inferior aos teores obtidos por Pereira (2013) e superiores aos obtidos por Lopes et al. (2009).

Cardona et al. (2014) publicaram resultados de capim-elefante com diversos pré-tratamentos, como o NaOH, diluição em ácido, explosão a vapor e  $H_2O_2$ . Os resultados apresentados reforçam os dados da nossa pesquisa pois, ao pré-tratar o capim-elefante com NaOH, obtivemos 56,97% de celulose, utilizando o  $H_2O_2$  e os autores obtiveram 53,78%, resultados abaixo do encontrado pelo autor do trabalho, conforme Tabela 7.

De acordo com a literatura citada, os teores de celulose estão na faixa de 36,4 a 75,6%, a lignina de 0,00 a 53,1% (PENSRI et al., 2016), o que reforça os resultados desta pesquisa com pré-tratamento alcalino e alcalino-oxidativo.

Portanto, o melhor pré-tratamento em termos de liberação da celulose do capim-elefante foi aquele realizado com NaOH a 120 °C, com 57,01%±1,39 de celulose, já para a remoção de lignina o melhor foi aquele com a reação alcalino-oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), onde se obteve 12,13%±2,35 de lignina.

## CONCLUSÃO

Levando em consideração que uma biomassa ideal para a produção de biocombustível é aquela que apresenta maior teor de celulose e menor teor de lignina, observa-se que o aumento alcançado no teor de celulose para o pré-tratamento com NaOH se mostrou mais efetivo e que a temperatura não afeta significativamente o teor, e em relação a redução de lignina, o pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais eficaz. Com relação a hidrólise da biomassa pré-tratada para obtenção dos açúcares fermentescíveis com foco na produção de etanol de segunda geração conclui-se que a melhor opção seria o pré-tratamento alcalino com NaOH na temperatura de 80 °C, gerando economia de energia e com teor considerável de celulose.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Os autores EZG, AAP, TRS e SDMH participaram na pesquisa laboratorial e revisão do artigo, suporte na escrita e revisão final do manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Grasel, F. S., Stiehl, A. C. R., Bernardi, L. P., Herpich, T. L., Behrens, M. C., Andrade, J. B., Schultz, J., & Mangrich, A. S. (2017). Inovação em Biorrefinarias I. Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*) e Bagaço de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)". *Revista Virtual de Química*, 9(1): 4–14. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170003>
- Krishna, S. H., Rao, K. C. S., Babu, J. S., & Reddy, D. S. (2000). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioprocess Engineering*, 22: 467-470. <https://doi.org/10.1007/s004490050760>
- Lopes, W. B., Vieira, A. J., Porto, R. M., De, G. G. P., & Reis, M. (2009). Elephant grass treated with alkali. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 10 (3): 714-722. <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1315/867/>
- Morais, J., Rosa, M. D. F., & Marconcini, J. (2010). Procedimentos para análise lignocelulósica. Embrapa Algodão, Documentos, 236, 54p. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/883400/1/DOC236.pdf>
- Nakanishi, S. C., Nascimento, V. M., Rabelo, S. C., Sampaio, I. L. M., Junqueira, T. L., & Rocha, G. J. M. (2018). Comparative material balances and preliminary technical analysis of the pilot scale

sugarcane bagasse alkaline pretreatment to 2G ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 120: 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.064>

Nikolić, S., Vesna, L., Đorđe, V., & Ljiljana, M. (2017). Production of bioethanol from pre-treated cotton fabrics and waste cotton materials". *Carbohydrate Polymers*, 164: 136–44. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.090>

Pereira, Douglas Gualberto Sales, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. <https://doi.org/10.11606/d.76.2015.tde-23042015-104624>

Rabelo, S. C. (2010). Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração. Campinas: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 447p. Tese (Doutorado). <https://doi.org/10.11606/d.76.2015.tde-23042015-104624>

Scholl, A. L., Menegol, A., Pitarelo, A. P., Fontana, R. C., Zandoná Filho, A., Ramos, L. P., Dillon, A. J. P., & Camassola M. (2015). "Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation". *Industrial Crops and Products*, 70: 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.056>

Shirkavand, E. A., Saeidbaroutian, A. N., Gapes, D. J. B., & Young, B. (2016). Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54: 217–234. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.003>

Silva, E., & Rocha, C. R. (2010). Eucalipto e capim elefante: características e potencial produtivo de biomassa. *Revista Agrogeoambiental* 2(1): 143–52. <https://doi.org/10.18406/2316-1817v2n12010263>

Siqueira, L. N. (2016). Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. *Journal of bioenergy and food science*. 3(4): 191–96. <https://doi.org/10.18067/jbfs.v3i4.112>

