

CENTRO UNIVERSITÁRIO FEI

BIANCA DE LIMA SILVA
DANIEL ISAO FUKAMIZU
DENISE RODRIGUES BARBOSA DA SILVA
LUCAS PAZINATO GAUTO
MILENA SAYURI KAMINAGA OSHIKATA
NATALIA SILVA BLAS

**APROVEITAMENTO INTEGRAL DE RESÍDUOS DE TECIDO DE ALGODÃO
PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL (ETANOL 2G) E BIOPRODUTO
(CARBOXIMETILCELULOSE)**

Qualificação Final

ORIENTADORA: PROF^a BRUNA PRATTO

São Bernardo do Campo

2022

BIANCA DE LIMA SILVA
DANIEL ISAO FUKAMIZU
DENISE RODRIGUES BARBOSA DA SILVA
LUCAS PAZINATO GAUTO
MILENA SAYURI KAMINAGA OSHIKATA
NATALIA SILVA BLAS

**APROVEITAMENTO INTEGRAL DE RESÍDUOS DE TECIDO DE ALGODÃO
PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL (ETANOL 2G) E BIOPRODUTO
(CARBOXIMETILCELULOSE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro Universitário FEI, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química.
Orientado pela Prof^a. Bruna Pratto.

São Bernardo do Campo

2022

Aproveitamento integral de resíduos de tecido de algodão para produção de biocombustível (etanol 2G) e bioproduto (carboximetilcelulose) / Bianca de Lima Silva...[et al.]. São Bernardo do Campo, 2022. 63 p. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário FEI.
Orientadora: Prof.^a Dra. Bruna Pratto.

1. etanol segunda geração. 2. algodão. 3. resíduos têxteis. 4. carboximetilcelulose. 5. hidrólise enzimática. I. de Lima Silva, Bianca . II. Isao Fukamizu, Daniel . III. Rodrigues Barbosa Da Silva, Denise . IV. Pazinato Gauto, Lucas. V. Sayuri Kaminaga Oshikata, Milena . VI. Silva Blas, Natalia. VII. Pratto, Bruna , orient. VIII. Título.

Elaborada pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da FEI com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BIANCA DE LIMA SILVA
DANIEL ISAO FUKAMIZU
DENISE RODRIGUES BARBOSA DA SILVA
LUCAS PAZINATO GAUTO
MILENA SAYURI KAMINAGA OSHIKATA
NATALIA SILVA BLAS

**APROVEITAMENTO INTEGRAL DE RESÍDUOS DE TECIDO DE ALGODÃO
PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL (ETANOL 2G) E BIOPRODUTO
(CARBOXIMETILCELULOSE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro Universitário FEI, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química.
Orientado pela Prof^a. Bruna Pratto.

Comissão julgadora

Orientador e presidente

Examinador (1)

Examinador (2)

São Bernardo do Campo

2022

RESUMO

Com a crescente demanda por combustíveis renováveis, torna-se necessário o uso de processos que permitam o uso de materiais lignocelulósicos para produção de biocombustíveis de segunda geração. Em contrapartida, a indústria têxtil é um ramo da indústria brasileira que gera impactos negativos ao meio ambiente, em especial, pela má destinação de sua grande quantidade de resíduo. A indústria brasileira gerou em média 160 mil toneladas de resíduos têxteis por ano antes do período de pandemia (2018), sendo que a maioria destas toneladas são direcionadas à aterros. Tendo em vista o exposto, o presente trabalho tem como objetivo o aproveitamento de resíduo de tecido de algodão da indústria têxtil para a obtenção de etanol de segunda geração a partir da fermentação com a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* de açúcares fermentescíveis obtidos via hidrólise enzimática do material celulósico presente no algodão. Experimentos de hidrólise enzimática foram realizados avaliando os efeitos da concentração de enzima e biomassa. Sob condições otimizadas, operando em uma concentração elevada de biomassa (20% m/v) e dosagem enzimática de 15 FPU/g_{celulose}, foi possível obter uma concentração de açúcares redutores de 103 g/L correspondendo à uma conversão de celulose a glicose de 47,34%. Observou-se que a carga de sólidos é o fator que mais impacta a produção de açúcares redutores da hidrólise enzimática. Por outro lado, a carga enzimática não apresentou grandes variações nas taxas de conversão, devido à fatores como o contato limitado promovido pela agitação e o tempo de reação. A fermentação da solução açucarada obtida da melhor condição experimental avaliada teve conversões acima de 99% de glicose consumida, e em média 86,91% de conversão de glicose a etanol, o qual corresponde a um teor de etanol de 42,55 g/L. Além disso, utilizando a celulose residual do tecido de algodão resultante da etapa de hidrólise, foi possível avaliar qualitativamente a produção de carboximetilcelulose (CMC) via RMN em espectrofotômetro, o que significa que os resíduos sólidos da hidrólise podem ser reaproveitados para sua produção. Sendo assim, com base no observado, o processo de produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos de tecido de algodão mostra grande potencial principalmente após uma futura otimização da hidrólise enzimática, que possui conversão de celulose a glicose abaixo de 50%.

Palavras-chave: etanol segunda geração; algodão; resíduos têxteis; carboximetilcelulose; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

With the growing demand for renewable fuels, it becomes necessary to use processes that allow the use of lignocellulosic materials to produce second generation biofuels. On the other hand, the textile industry is a branch of Brazilian industry that generates negative impacts on the environment due to the poor disposal of its large amount of waste. The Brazilian industry generated an average of 160 thousand tons of textile waste per year before the pandemic period (2018), with most of these tons being sent to landfills. In view of the above, the present work aims to use cotton fabric residue from the textile industry to obtain second generation ethanol as from the fermentation with industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* of fermentable sugars obtained via enzymatic hydrolysis of the cellulosic material present in cotton. Enzymatic hydrolysis experiments were performed evaluating the effects of enzyme concentration and biomass. Under optimized conditions, operating at a high biomass concentration (20% m/v) and enzymatic dosage of 15 FPU/g_{cellulose}, it was possible to obtain a reducing sugar concentration of 103 g/L corresponding to a conversion of cellulose to glucose of 47.34%. It was observed that the solid load is the factor that most impacts the production of reducing sugars by enzymatic hydrolysis. In turn, the enzymatic load did not show great variations in the conversion rates, due to factors such as the limited contact promoted by the agitation and the limited reaction time. The fermentation of the sugar solution obtained from the best evaluated experimental condition had conversions above 99% of glucose consumed, and an average of 86.91% of conversion of glucose to ethanol, which corresponds to an ethanol content of 42.55 g/L. In addition, using the residual cellulose from the cotton fabric resulting from the hydrolysis step, it was possible to qualitatively evaluate the production of carboxymethylcellulose (CMC) via NMR in a spectrophotometer, which means the remaining residues from the hydrolysis can be reused for its production. Thus, based on what has been observed, the second-generation ethanol production process from cotton fabric waste shows potential if it is developed and optimized in the future, especially the hydrolysis step, which has cellulose to glucose conversion below 50%.

Keywords: second generation ethanol; cotton; textile waste; carboxymethylcellulose; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da celulose.....	15
Figura 2 - Cadeia de microcelulose cristalina	17
Figura 3 - Estrutura química da carboximetilcelulose (CMC) na sua forma de sal sódico.....	18
Figura 4 - Esquema da hidrólise enzimática.....	22
Figura 5 - Retalhos da Disbrau Uniformes.....	25
Figura 6 - Moinho de facas utilizado na fragmentação mecânica	26
Figura 7 - Retalhos de algodão após passarem por fragmentação mecânica.....	26
Figura 8 - Reação de quantificação de açúcares redutores totais por DNS.....	31
Figura 9 - Fluxograma do processo de produção de etanol 2G e CMC a partir de resíduo de tecido de algodão.....	34
Figura 10 - Aspecto das amostras após 4 e 96 horas de hidrólise enzimática, respectivamente	35
Figura 11 - Resultado dos ensaios antes e após a centrifugação, respectivamente	36
Figura 12 - Cinética da hidrólise enzimática	37
Figura 13 - Diagrama de Pareto para açúcar redutor (g/L).....	40
Figura 14 - Superfície de reposta para açúcar redutor obtido durante os ensaios de hidrólise enzimática.....	40
Figura 15 - Cinética comparativa entre diferentes condições de alimentação em hidrólises enzimáticas	41
Figura 16 - Análise do tamanho das partículas de sólido residual da hidrólise.....	45
Figura 17 - Espectro 1H-RMN para identificação de hidrogênio	46
Figura 18 - Espectro 13C-RMN para identificação de carbono	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre hidrólise ácida e enzimática	21
Tabela 2 - Níveis das variáveis avaliadas no planejamento experimental	27
Tabela 3 - Condições da hidrólise enzimática	35
Tabela 4 - Conversão de celulose em glicose.....	38
Tabela 5 - Resultados do Software Statistica	39
Tabela 6 - Resultados da conversão das hidrólises enzimáticas.....	42
Tabela 7 - Resultados da Fermentação	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a_j	Conjunto de coeficientes dos termos lineares
AR	Açúcar redutor
b_{jm}	Conjunto de coeficientes associados às interações entre as variáveis
CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
CGEE	Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3-5-dinitrossalicílico
FPU	<u><i>Filter Paper Units</i></u>
FPU/g _{celulose}	FPU por grama de celulose
$g_{biomassa}$	Gramas de biomassa
g/L	Gramas por litro
g/mol	Gramas por mol
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
K	Número de variáveis independentes
$m_{biomassa\ seca}$	Massa de biomassa seca
MCC	Microcelulose cristalina
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/v	Massa por volume
nm	Nanômetro

N	Concentração Normal
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
um	Tamanho de partícula
UV/VIS	Ultravioleta visível
V _{solução ácida}	Volume de solução ácida
2G	Segunda geração
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 PROCESSO PRODUTIVO DO ETANOL 2G	13
3.2 RESÍDUOS DE TECIDO DE ALGODÃO NA INDÚSTRIA TÊXTIL	14
3.3 ALGODÃO	14
3.4 HOLOCELULOSE.....	14
3.5 CELULOSE.....	15
3.5.1 Celulose do algodão	15
3.5.2 Cristalinidade celulósica	16
3.5.3 Microcelulose cristalina	16
3.5.4 Carboximetilcelulose	17
3.6 HEMICELULOSE	19
3.7 LIGNINA	19
3.8 PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	19
3.8.1 Pré-tratamento	20
3.9 HIDRÓLISE.....	21
3.9.1 Hidrólise enzimática	22
3.10 AÇÚCARES REDUTORES X AÇÚCARES NÃO REDUTORES.....	23
3.11 FERMENTAÇÃO	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 PREPARO DO MATERIAL.....	25
4.1.1 Moagem	25
4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	26
4.2.1 Enzima	27
4.2.2 Reação de hidrólise enzimática	27
4.3 FERMENTAÇÃO	28

4.3.1 Ativação da levedura	28
4.3.2 Fermentação do hidrolisado de tecido de algodão	29
4.4 OBTENÇÃO DA CARBOXIMETILCELULOSE	29
4.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS	30
4.5.1 Caracterização do tecido de algodão em termos de celulose	30
4.5.2 Quantificação de açúcares redutores	30
4.5.3 Quantificação da glicose e do etanol	32
4.5.4 Caracterização do sólido residual da hidrólise enzimática: determinação do tamanho de partícula	32
4.5.5 Análise dos resultados	32
4.5.6 Análise estatística	33
4.6 FLUXOGRAMA DE PROCESSO	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE DO TECIDO DE ALGODÃO	35
5.1.1 Análise da hidrólise enzimática	36
5.1.2 Análise da hidrólise enzimática em batelada alimentada	41
5.2 FERMENTAÇÃO	43
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO RESIDUAL DA HIDRÓLISE	45
5.4 CARBOXIMETILCELULOSE	45
6 CONCLUSÃO	48
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A – Curva de calibração para quantificação dos açúcares redutores	61

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a economia mundial depende muito dos combustíveis fósseis e sua exploração não é um processo sustentável a longo prazo. Os combustíveis fósseis como fontes de energia têm um impacto ambiental considerável, os quais devem ser substituídos por recursos mais limpos de acordo com a estratégia de desenvolvimento sustentável. Nessa perspectiva, a produção global de energia renovável vem aumentando rapidamente (NIKOLIĆ et al., 2009).

O etanol é um biocombustível renovável e ambientalmente limpo, tem sido considerado como um dos mais promissores da atualidade, sendo capaz de emitir até 15 vezes menos carbono na atmosfera considerando o balanço em sua cadeia produtiva e na própria combustão em relação a quantidade de energia produzida (SARKAR et al., 2012). Este pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas de biomassa e tecnologias de conversão. Além disso, a produtividade, a demanda de energia para produção e os custos operacionais, bem como o impacto ambiental, variam de acordo com o tipo de matéria-prima utilizada no processo (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Ao longo de décadas, a produção desse biocombustível dependia principalmente de culturas energéticas contendo amido e açúcar. No entanto, novas tecnologias para conversão da biomassa lignocelulósica em etanol estão em desenvolvimento e implementação (BALAT; BALAT, 2009). Assim, surge o conceito de etanol de segunda geração. O etanol de segunda geração, também conhecido como etanol 2G, é um biocombustível produzido a partir dos resíduos que são descartados do processo produtivo do etanol de primeira geração, esse tipo de combustível tem grande importância no âmbito da sustentabilidade industrial, pois permite aumentar os ciclos produtivos de culturas agrícolas como a cana-de-açúcar, por exemplo, ao utilizar como matéria prima resíduos do plantio e de outros processos produtivos. A estimativa é de que o aproveitamento do bagaço e parte das palhas e pontas da cana-de-açúcar eleve a produção de álcool em 30 a 40%, para uma mesma área plantada (PACHECO, 2011).

Sendo assim, destaca-se a oportunidade de explorar retalhos de algodão deixados após a alfaiataria, corte na indústria têxtil e até roupas usadas, que são gerados em grande volume e geralmente terminam em estações de resíduos, aterros sanitários ou incinerados. A aplicação desses tecidos de algodão residuais para produção de etanol se torna uma opção atraente e viável por razões ambientais e econômicas (SUN et al., 2014).

Tendo isso em vista, para o presente trabalho foi utilizado o algodão como matéria-prima, visto que a maior vantagem das fibras de algodão e resíduos do mesmo em comparação

com outros materiais lignocelulósicos é seu alto teor de celulose e, praticamente, ausência de lignina (GUPTA; VERMA, 2015). Portanto, a parte celulósica dos resíduos têxteis à base de algodão pode ser utilizada como uma biomassa renovável alternativa para a produção de etanol por hidrólise da celulose seguida pela fermentação da glicose a etanol (HONG; GANGSUN, 2013; JEIHANIPOUR; TAHERZADEH, 2009).

Dito isso, o objetivo deste estudo é investigar a possibilidade de conversão de resíduos têxteis à base de algodão em etanol via hidrólise enzimática ou ácida, com posterior fermentação dos açúcares obtidos.

2 OBJETIVOS

Esta seção refere-se à definição dos objetivos geral e específicos para a execução do presente trabalho.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é o aproveitamento integral do resíduo de tecido de algodão para a produção de biocombustível (etanol 2G) e bioproduto (carboximetilcelulose).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visando alcançar o objetivo geral, pretende-se:

- Realizar a hidrólise enzimática nos retalhos de algodão visando à obtenção de açúcares fermentescíveis;
- Realizar análise quantitativa dos açúcares redutores formados;
- Fermentar os açúcares formados para obtenção do etanol;
- Realizar análise quantitativa do etanol produzido;
- Avaliar a produção de carboximetilcelulose a partir do resíduo da hidrólise enzimática.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção é reservada para estado da arte relacionado ao tema de produção de etanol de segunda geração e carboximetilcelulose.

3.1 PROCESSO PRODUTIVO DO ETANOL 2G

A produção de etanol a partir da fermentação de tecidos vegetais ricos em celulose, como por exemplo a cana-de-açúcar, a beterraba e outras fontes, é chamado de etanol de primeira geração. Já o etanol 2G é o termo utilizado para designar o etanol produzido a partir de diversas fontes de biomassa vegetal lignocelulósica e resíduos que são descartados do processo produtivo do etanol de primeira geração, como o bagaço de cana-de-açúcar. Vale ressaltar que a produção do etanol 2G é uma fonte renovável e sustentável, além de não afetar as indústrias, sobretudo a alimentícia, e conseqüentemente não necessitar de área para cultivo, visto que utiliza apenas resíduos (MELO, 2020).

Além disso, o etanol de segunda geração também é conhecido como bioetanol devido a fonte biológica renovável. A única diferença entre o bioetanol e o etanol convencional é a matéria-prima e o processo produtivo empregado.

Um grande desafio para a produção deste combustível atualmente é a viabilidade econômica dos processos de produção a partir da celulose, em contrapartida, devido ao aumento da demanda pela sustentabilidade, de substitutos ao petróleo e da redução do uso de combustíveis fósseis, este combustível se torna uma oportunidade para pesquisas e o desenvolvimento de processos produtivos envolvendo material celulósico.

De maneira geral, as etapas produtivas para a obtenção do etanol 2G consistem em um pré-tratamento do material celulósico para remoção das impurezas e preparação das fibras, isto depende de qual material será utilizado e suas propriedades, posteriormente, será feita a hidrólise (ácida ou enzimática) das cadeias celulósicas, e então, a fermentação da glicose presente nos produtos da hidrólise (GROSSI, 2015).

Portanto, o algodão residual das indústrias têxteis possui potencial para ser convertido em etanol, reduzindo a poluição sólida resultante de resíduos de roupas, possibilitando a elaboração de um processo ambientalmente sustentável.

3.2 RESÍDUOS DE TECIDO DE ALGODÃO NA INDÚSTRIA TÊXTIL

O algodão possui uma grande importância na indústria têxtil, sendo utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de muitos materiais por possuir características como: absorção de água, conforto e seu preço acessível (HOLTZ, 2009). Parte do algodão utilizado nesse segmento se torna resíduo, gerado nos processos de corte para modelagem de vestuário.

O grande impasse está no fato de que os resíduos formados são volumosos e, conseqüentemente, ocupam grandes espaços físicos nas indústrias, visto que possuem baixas taxas de decomposição no solo e poucas destinações a processos de reaproveitamento. Sendo assim, há um grande espaço para a utilização desses materiais em processos industriais.

3.3 ALGODÃO

O algodão é obtido a partir das fibras naturais da planta pertencente ao gênero *Gossypium*, da família *Malvaceae* (GUEDES, 2012). É uma fibra básica, ou seja, é formado por comprimentos de fibras variados. No Brasil, o algodão é a fibra mais utilizada na produção de manufaturados têxteis, seguido de poliéster (sintético) e viscose (artificial) (AMARAL et al., 2018).

Esse material é composto quimicamente por 95% de celulose, 2% de hemicelulose e 0,3% de lignina (SANTOS et al., 2012). Sua alta quantidade de celulose e, praticamente, ausência de hemicelulose e lignina, torna o material propício ao processo de conversão em açúcares fermentescíveis, para posterior geração de bioetanol, por exemplo (GUEDES, 2012).

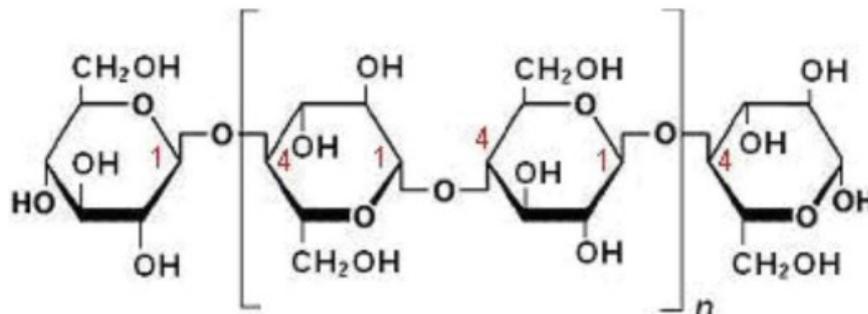
3.4 HOLOCELULOSE

A holocelulose se trata de material polissacarídeo de tecidos vegetais compostos por celulose e hemicelulose. É obtido principalmente a partir da remoção da lignina e outros compostos presentes no material natural (MOREIRA et al., 2012). Quando este material é separado da lignina, a composição das fibras de holocelulose consiste essencialmente de fibrilas de celulose e camadas externas hemicelulósicas. Aplicações de nanofibras de holocelulose vêm sendo estudadas, pois apesar de seu pequeno tamanho, possuem alta massa molar em um pequeno diâmetro, concedendo assim uma alta força à materiais integrados a mesma, como papéis (RISE, 2019).

3.5 CELULOSE

A unidade repetitiva da celulose é composta por duas moléculas de glicose esterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas como mostra a Figura 1. Esta unidade repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações hidrogênio intra e intermolecular (GROSSI, 2015).

Figura 1 - Fórmula estrutural da celulose



Fonte: BARROS (2017)

A celulose ganha destaque no cenário mundial atual, ao passo que o interesse no aproveitamento da biomassa e suas possíveis aplicações aumentam, sendo utilizada para processos biotecnológicos, indústria de química fina e como fonte de energia. A área que tem atraído maior interesse para o mercado é a obtenção de biocombustíveis, no caso, etanol celulósico (DE LIMA et al., 2015).

Além da obtenção de biocombustíveis, a celulose ganha destaque também para a produção de bioprodutos quando suscetível às reações de adição (agrupamento OH^- reage com diversos agentes de adição) e substituição (agrupamentos OH^- pode ser esterificado ou eterificado), desta maneira forma-se produtos como nanocelulose, acetato de celulose, nitrato de celulose, ácido levulínico, carboximetilcelulose, entre outros (CAMARGO, OLIVEIRA, 2019).

3.5.1 Celulose do algodão

O teor de celulose do algodão é superior em relação às fibras lignocelulósicas, o que evita o processo intermediário de pré-tratamento para remoção de outros constituintes não celulósicos (TEIXEIRA et al., 2010).

Sendo assim, o algodão possui um bom potencial para ser hidrolisado. Porém, um fator que pode limitar o seu uso neste processo é o índice de cristalinidade das fibras celulósicas, que dificultam a ação dos reagentes e das enzimas. As nanofibras cristalinas de algodão ou *whiskers* são de interesse para a formação de nanocompósitos para reforço de materiais, pois possuem alto módulo elástico e força específica (TEODORO et al., 2013). Sendo assim, é pertinente uma posterior análise da cristalinidade das fibras de algodão que restarem após o processo de hidrólise.

3.5.2 Cristalinidade celulósica

A estrutura cristalina da celulose consiste em fibrilas unidas por ligações de hidrogênio intra e intercadeias. Cada camada adjacente de celulose é atraída umas às outras pelas forças de van der Waals, resultando então em uma fibra compacta capaz de impedir o acesso de enzimas e dependendo de quão unidas e compactas estão as camadas, também impedem o acesso de moléculas pequenas como a água (LENGOWSKI, 2012).

O índice de cristalinidade ou grau de cristalinidade de um material lignocelulósico indica a quantidade de celulose em estado cristalino, podendo assim ser utilizada para estudar suas propriedades mecânicas.

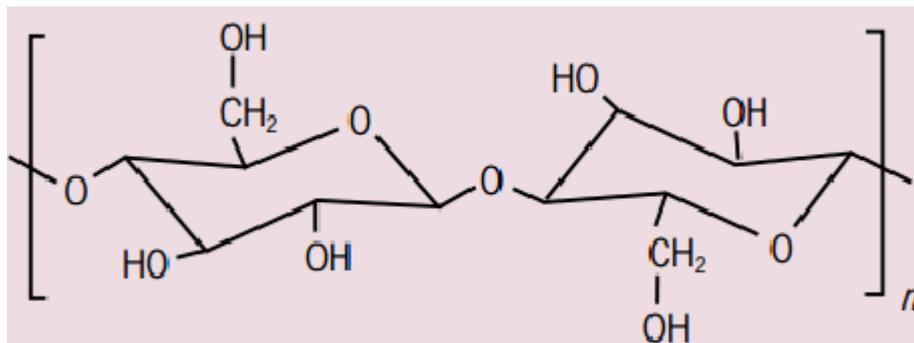
3.5.3 Microcelulose cristalina

A microcelulose cristalina (MCC) é obtida a partir de fontes de celulose natural, após purificação, e pode ser utilizada em diversos setores de diferentes indústrias, sendo alimentícia, farmacêutica e cosmética as principais delas (MORAES et al., 2018). Na indústria alimentícia, por exemplo, é listada como ingrediente utilizado na estabilização de espumas e emulsões, substituição dos óleos e gorduras, controle da cristalinização e viscosidade e, devido às suas propriedades tixotrópicas, formação de géis termoestáveis. Além disso, não existe qualquer restrição ao seu uso na indústria no que diz respeito à toxicidade nas principais organizações mundiais que regulam a produção e consumo de alimentos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013, p.42).

É produzida através do processo de hidrólise das cadeias de celulose, que remove a maior parte da fração amorfa e destrói a morfologia fibrilar da celulose, produzindo a MCC. (HOYOS; CRISTIA; VÁZQUEZ, 2013).

A molécula de MCC é composta por um arranjo linear de unidades de D-glicose conectadas por ligação β -1,4: $[C_6H_{10}O_5]_n$ e possui grupos de hidroxilas disponíveis que participam do encadeamento de hidrogênio entre moléculas de celulose adjacentes. Esse conjunto de cadeias moleculares de celulose são chamadas microfibrilas e estão representadas na Figura 2. (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013, p.39).

Figura 2 - Cadeia de microcelulose cristalina



Fonte: Food Ingredients Brasil (2013)

3.5.4 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC), cuja fórmula estrutural está demonstrada na Figura 3, é um dos derivados carboxilados mais importantes da celulose. Trata-se de um éter celulósico de caráter aniônico, solúvel em água quente ou fria, o que possibilita uma ampliação no campo de aplicações. Sua forma sólida tem coloração branca a levemente amarelada, além disso, é inodoro e insípido. Para formação desses éteres de celulose, ocorre a reação de substituição nucleofílica, sendo que o tipo de substituinte bem como o grau de substituição determina a solubilidade destes (DENVER, 2019).

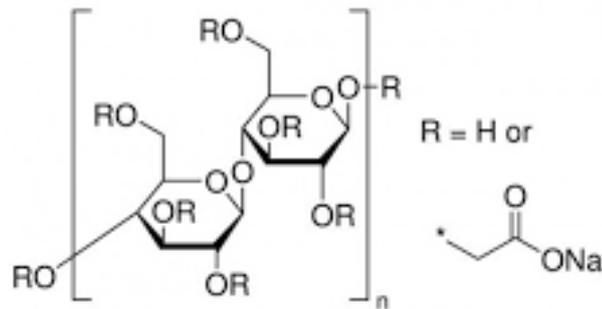
O processo para se obter a CMC ocorre em duas diferentes etapas: a alcalinização e a eterificação. Na etapa de alcalinização, ocorre o intumescimento das fibras de celulose ao reagir o hidróxido de sódio e a celulose, formando álcali celulose (MACHADO, 2000).



Já na etapa de eterificação, o álcali celulose reage com o ácido monocloroacético para formar a CMC (MACHADO, 2000):



Figura 3 - Estrutura química da carboximetilcelulose (CMC) na sua forma de sal sódico



Fonte: VHTEX (2022)

Como aplicações, a CMC é utilizada na indústria de alimentos, como agente estabilizante, e na indústria de perfuração de petróleo, como modificador de viscosidade em fluidos de perfuração. As propriedades únicas, tais como características hidrofílicas, alta viscosidade e adesividade, têm incentivado o uso de CMC para fabricar diferentes produtos, entre eles estão o cimento, detergente, papel, cosméticos, adesivos, tintas, plásticos, têxteis, cerâmica e produtos farmacêuticos.

Se tratando da obtenção de carboximetilcelulose (CMC) a partir de materiais celulósicos, a aplicação é bastante promissora já que a CMC é o principal éter celulósico consumido em todo o mundo, representando cerca de 58% do volume mundial de éteres de celulose utilizado nas indústrias. Seu mercado global está atualmente avaliado em cerca de US\$ 1,8 bilhões em 2022 e deverá progredir em um CAGR (*Compound Annual Growth Rate*, que significa Taxa de crescimento anual composta) de 4,8% entre 2022 e 2032, para atingir uma avaliação de US\$ 2,9 bilhões até 2032. Esta crescente demanda por carboximetilcelulose das indústrias de alimentos, tintas, revestimentos, papel e celulose, construção e indústrias têxteis é um fator que impulsiona o crescimento do mercado. Em virtude da sua grande aplicação, estima-se que o consumo mundial de CMC atinja 5,9 bilhões de quilos até o ano de 2024 (IHS Markit, 2016).

3.6 HEMICELULOSE

O termo hemicelulose se refere de maneira geral a uma mistura, uma matriz altamente ramificada composta por pentoses, como a xilose, e hexoses, como a glicose e ácidos urônicos. Esta representa cerca de 20 a 35% de toda a biomassa do planeta (SHIMIZU, 2018).

São estruturalmente mais semelhantes à celulose do que a lignina, apresentando ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. Quando comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida (SANTOS, 2012). Na composição dos tecidos 100% algodão, a hemicelulose não representa uma parte significativa para ser tratada e fermentada.

3.7 LIGNINA

A lignina é uma macromolécula composta por heteropolímeros aromáticos complexos, encontrada associada à celulose e à hemicelulose das paredes celulares dos vegetais. Sua função na natureza é promover a união das células vegetais provendo assim proteção mecânica, química e biológica aos tecidos interiores e não possui açúcares simples em sua composição. Sua presença em massa nas paredes celulares é responsável pelo aspecto cristalino do complexo lignina-celulose-hemicelulose e representa, portanto, um empecilho no processo de fermentação alcoólica. Além disso, costuma ser separada da celulose antes do procedimento (SHIMIZU, 2018).

Apesar de não ser de interesse ao processo de fermentação, a lignina pode ser utilizada como fonte de energia biomássica, já que é primariamente composta por três monômeros alcoólicos caloríficos: o álcool coniferílico, o álcool sinapílico e o álcool cumarílico (DUVAL; LAWOKO, 2014).

3.8 PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Embora o pré-tratamento possa ser conduzido por princípios bastante variados, este tem por finalidade alterar ou remover a hemicelulose e/ou a lignina, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose. Ocasionalmente assim o aumento da digestibilidade enzimática e, conseqüentemente, do rendimento em açúcares fermentáveis (CANILHA et al., 2010).

3.8.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento químico tem como principal objetivo remover a lignina, promovendo a degradação do material lignocelulósico (SUN; CHENG, 2002). Como já citado anteriormente, a composição do algodão possui baixo percentual desse material. Sendo assim, no presente trabalho não foi realizado esse pré-tratamento. O tratamento consistirá apenas em uma exposição das fibras do algodão e do branqueamento destas caso necessário.

3.8.1.1 Fragmentação mecânica

Fragmentação mecânica é um termo genérico para a divisão de um material em diversas partes menores, aumentando assim sua superfície de contato, fator de extrema importância para a cinética e para o rendimento de reações químicas. No caso de materiais flácidos e secos como os tecidos de algodão, um equipamento apropriado seria o moinho de facas.

Na hidrólise, o processo de fragmentação mecânica facilita o acesso à celulose presente no tecido realizando a ruptura das fibras e assim proporcionando maior conversão em açúcares fermentáveis, fato observado por Guedes (2012) ao fazer a comparação da quantidade de açúcares fermentáveis obtidos pela hidrólise enzimática em substratos com e sem pré-tratamento em moinho de facas.

3.8.1.2 Branqueamento

O branqueamento dos retalhos de algodão envolve a remoção de qualquer corante ou pigmento que possa prejudicar o processo de hidrólise e a fermentação dos açúcares resultantes. A fim de remover os corantes, adiciona-se peróxido de hidrogênio ou descolorante de tecidos indicado para descolorir fibras de algodão, linho, sisal, ramí, rayon-viscose e mesclas, composto por redutores inorgânicos estabilizados. Como os retalhos utilizados neste trabalho não possuem corantes/pigmentos, esta etapa não foi realizada já que o branqueamento implicaria em custos adicionais ao processo.

3.9 HIDRÓLISE

As cadeias poliméricas de celulose podem ser quebradas pelo processo de hidrólise química sob diversas condições e apresentando resistência ou não à reação. Normalmente, esta deterioração é acompanhada por uma modificação química da molécula de celulose, bem como um aumento no poder de redução e o desenvolvimento de grupos reativos ao longo da cadeia polimérica (GROSSI, 2015). A reação de hidrólise da celulose pode ser representada pela equação a seguir e para a realização desta, os principais métodos utilizados são a hidrólise ácida e a enzimática, sendo a diferença entre elas no tipo de catalisador utilizado. A hidrólise ácida utiliza ácido sulfúrico como catalisador, podendo ser feita com ácido diluído ou concentrado e a hidrólise enzimática, com enzimas, como por exemplo celulasas.



Na Tabela 1, tem-se um comparativo entre os dois tipos de hidrólise com relação à algumas variáveis de reação.

Tabela 1 - Comparação entre hidrólise ácida e enzimática

Variável	Hidrólise ácida	Hidrólise enzimática
Necessidade de pré-tratamento	Depende	Necessário
Condições de temperatura e pressão	Abruptas	Amenas
Formação de subprodutos inibidores	Provável	Não há
Velocidade de reação	Rápida	Lenta
Rendimento da reação	Baixo	Alto

Fonte: Adaptado MONTES (2017)

A hidrólise ácida pode ser feita de duas maneiras: através do uso de ácido diluído a alta temperatura ou utilizando ácido concentrado a baixa temperatura (BALAT, 2011). Em ambas as condições, há necessidade de remoção ou neutralização do hidrolisado antes da fermentação, o que gera grande quantidade de resíduos e custos associados ao tratamento do hidrolisado ácido (GÍRIO et al., 2010). Além disso, a rota ácida requer equipamentos resistentes à corrosão encarecendo consideravelmente o processo (ZABED et al., 2016).

Levando em consideração o contexto e motivação para a realização deste trabalho, bem como os contrapontos dos dois tipos de hidrólise, a realização de uma hidrólise enzimática foi considerada a escolha mais adequada.

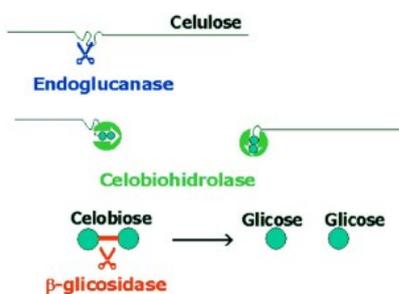
3.9.1 Hidrólise enzimática

As enzimas atuam no ambiente biológico como catalizadores de reações químicas essenciais para o funcionamento de tecidos e organismos dos mais simples aos mais complexos, sendo uma parte destas reações o processo de metabolismo. Sendo assim, o uso de enzimas é interessante para o processo de produção de bioetanol para aumentar sua velocidade, sua eficiência e evitar o uso de ácidos fortes como o ácido sulfúrico, que além de poder causar danos à celulose, requer um tratamento especial de seus resíduos e pode acarretar a formação de moléculas indesejadas como a xilose, o furfural e o hidroximetilfurfural (DE LIMA et al., 2015).

O complexo de enzimas utilizado para hidrolisar a celulose é a celulase. Esta consiste em um complexo de moléculas que atuam em sinergia, sendo subdivididas em 3 classes: endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- β -D-glucosidades que hidrolisam a celobiose à glicose, que é o produto desejado e que foi posteriormente fermentado (OGEDA; PETRI, 2010).

A Figura 4 apresenta um esquema de como funciona a hidrólise enzimática.

Figura 4 - Esquema da hidrólise enzimática



Fonte: OGEDA; PETRI (2010)

3.9.1.1 Hidrólise enzimática em batelada alimentada

Diferente do processo de batelada simples, onde toda a biomassa e enzima são adicionadas ao meio reacional logo no início do processo e os produtos são retirados ao final da reação. A batelada alimentada consiste em realizar a adição de biomassa ou enzima gradualmente ao longo da reação em porcentagens menores, até que toda a porção seja adicionada ao meio.

Diversos autores como Varga et al. (2004) e Cabral (2014) realizaram estudos que mostram que um importante parâmetro nas reações de hidrólise enzimática é a quantidade de substrato sólido utilizado. Paradoxalmente, o aumento da concentração de substrato aumenta a produção de açúcar, mas também pode causar problemas de mistura e transferência de calor devido às propriedades reológicas de uma suspensão muito densa e fibrosa (Rudolf et al., 2005).

Varga et al. (2004) concluíram, através da realização de um processo de sacarificação e fermentação simultâneas, que uma maior concentração de substrato causou uma inibição fermentativa, afetando a eficiência da reação. Eles indicaram que, em concentrações altas do substrato, a enzima não foi capaz de liquefazer o material celulósico, resultando em uma baixa taxa de sacarificação e subsequente eficiência na produção de etanol.

Chen et al. (2007) realizaram hidrólises enzimáticas em batelada alimentada com o amido de milho como fonte de substrato e reportaram que a batelada alimentada diminuiu o tempo de reação e aumentou a produtividade em etanol quando comparada à batelada simples, apontando que isso se deve à redução de problemas de mistura, uma vez que pequenas quantidades de substrato adicionadas aos poucos e sendo consumidos antes da próxima adição mantêm a viscosidade da reação baixa, o que é uma vantagem já que os materiais lignocelulósicos geralmente são substratos densos.

3.10 AÇÚCARES REDUTORES X AÇÚCARES NÃO REDUTORES

Açúcares são carboidratos que podem ser classificados de diversas maneiras. Uma destas classificações separa os açúcares em redutores e não redutores. Açúcares redutores possuem grupo carbonílico livre, podendo então ser oxidados por diversos agentes oxidantes, inclusive os mais simples, como íons de ferro ou cobre. Quando são oxidados, atuam como agentes redutores da reação de oxirredução, recebendo então a nomenclatura “redutores” (MONTEIRO et al., 2012).

Esta classificação é de interesse pois como os açúcares redutores reagem desta maneira, é possível analisar sua presença e quantidade através de diversos testes. A glicose produzida na hidrólise da celulose, por exemplo, é um açúcar redutor, e sua presença pode ser confirmada e a quantidade analisada, pelo método DNS (ácido 3-5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959).

3.11 FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo bioquímico pelo qual moléculas orgânicas (geralmente carboidratos) são degradadas a fim de se liberar e utilizar sua energia química de maneira anaeróbica estrita ou facultativa, diferente da respiração celular, que é um processo exclusivamente aeróbico. O processo de fermentação é utilizado por diversos seres vivos, geralmente unicelulares, embora possa também ser feito por tecidos animais e vegetais. São três os principais tipos de fermentação: a fermentação láctica, que produz o ácido láctico, a fermentação acética, que produz o ácido acético; e a fermentação alcoólica, que produz o álcool etílico, molécula de interesse no presente trabalho (IVANOV, 2011).

Dentre os vários micro-organismos capazes de fermentar a glicose, estes podem ser divididos entre parâmetros relevantes para o processo, como faixa de pH da atuação, temperatura/pressão ideal, taxa de crescimento, tolerância ao etanol formado, velocidade, rendimento etc.

O micro-organismo mais utilizado para a fermentação alcoólica em processos industriais é a *Saccharomyces cerevisiae*, mais conhecida como levedura de pão cerveja, já que fermenta hexoses de maneira eficiente nas faixas de temperatura entre 25 °C e 35 °C (CRUZ, 2019).

4 METODOLOGIA

A metodologia para a realização do trabalho iniciou-se com a obtenção dos retalhos 100% algodão. O material foi doado pela confecção de uniformes Disbrau Uniformes, localizada em São Paulo/SP.

A partir da obtenção da matéria-prima, o etanol de segunda geração foi produzido seguindo as seguintes etapas.

4.1 PREPARO DO MATERIAL

A etapa de preparo do material têxtil (Figura 5) é fundamental para o aumento da eficiência do processo, já que estes apresentam pequena área de contato, fator que pode atrapalhar a reação de hidrólise ácida ou enzimática ao substrato celulósico.

Figura 5 - Retalhos da Disbrau Uniformes



Fonte: Autores (2022)

4.1.1 Moagem

Os retalhos de algodão foram submetidos à fragmentação mecânica com o auxílio do moinho de facas Marconi MA680 tipo Willy Macro (Figura 6). Antes da moagem foi necessário cortar os retalhos em pedaços menores para que não enroscassem e danificassem o equipamento.

Na Figura 7 observa-se como ficaram os retalhos de algodão após a moagem.

Figura 6 - Moinho de facas utilizado na fragmentação mecânica



Fonte: Autores (2022)

Figura 7 - Retalhos de algodão após passarem por fragmentação mecânica



Fonte: Autores (2022)

4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O material pré tratado foi então submetido à hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares fermentescíveis.

4.2.1 Enzima

Foi utilizado o complexo enzimático comercial de celulasas *Cellic®CTec2*, (Novozymes Latin America, Araucária, PR) para todos os ensaios de hidrólise enzimática. A atividade enzimática da *Cellic®CTec2* é de 214 FPU/mL. As enzimas tiveram de ser armazenadas em geladeira para manutenção da sua atividade enzimática.

4.2.2 Reação de hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com volume reacional total de 100 mL, agitados a 250 rpm e 50 °C por 96 h em pH 5,0 (tampão citrato de sódio 50 mM) utilizando a Incubadora Shaker Innova 43, Eppendorf International.

A fim de encontrar a condição ótima de hidrólise enzimática dos retalhos de algodão, foi realizado um planejamento experimental fatorial 2^2 , com três replicatas no ponto central, totalizando 7 experimentos. As variáveis operacionais avaliadas foram: carga de biomassa variando de 10 a 20% (m/v) e dosagem enzimática variando de 15 a 30 FPU/g_{biomassa}. As condições operacionais foram definidas de acordo com a literatura (PRATTO et al., 2020).

A Tabela 2 apresenta os níveis para cada variável avaliada na etapa de hidrólise enzimática, na qual a biomassa foi submetida ao pré-tratamento.

Tabela 2 - Níveis das variáveis avaliadas no planejamento experimental

Variável	Ponto fatorial	Ponto central	Ponto fatorial
	-1	0	+1
Concentração de biomassa (% m/v)	10	15	20
Dosagem enzimática (FPU/g _{biomassa})	15	22,5	30

Fonte: Autores (2022)

Ao longo da reação foram coletadas alíquotas de aproximadamente 1,5 mL, para futuras análises quantitativas de açúcares redutores, com os seguintes tempos de reação: 4, 8, 20, 32, 44, 56, 72 e 96 horas.

Após o término da reação a suspensão foi centrifugada (com o auxílio da centrífuga Mettich modelo Universal 32 R, nas seguintes condições: temperatura de 25 °C, rotação de 4000 rpm durante 15 minutos). A fração líquida obtida, rica em açúcares fermentescíveis, foi armazenada em Freezer para posterior fermentação.

4.2.2.1 Hidrólise enzimática em batelada alimentada

Os ensaios de batelada alimentada foram realizados em duplicata para a condição em que o hidrolisado apresentou maior concentração de glicose.

A metodologia utilizada foi similar à apresentada no item 4.2.2, porém, em substituição à adição única de toda biomassa e/ou enzima logo no início da reação, foram realizados ensaios com quatro adições graduais, sendo a primeira delas no início da reação (0 horas) e as demais nos tempos de 2, 4 e 48 horas, respectivamente.

Além disso, duas condições diferentes foram testadas: a primeira duplicata recebeu cinco adições de 5% m/v de biomassa, totalizando 20% m/v de carga total de sólidos e 100% da dosagem enzimática já na primeira adição, já a segunda condição recebeu cinco adições de 5% m/v de biomassa, totalizando 20% m/v de carga total de sólidos e 5% da dosagem enzimática total em cada adição.

Após cada adição houve a mistura manual do meio reacional com bastonetes para que este ficasse mais homogêneo e foram retiradas alíquotas para a construção das curvas que demonstram a cinética das reações.

O encerramento da reação foi feito da mesma forma que foi apresentada no item anterior.

4.3 FERMENTAÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* industrial na forma liofilizada (Y-904, AB Brasil, Pederneiras, SP, Brasil) foi utilizada nos experimentos de fermentação.

4.3.1 Ativação da levedura

A *S. cerevisiae*, em sua forma seca, foi inicialmente ativada (incubação em meio de ativação a 250 rpm e 34 °C por 4 h) para obtenção do inóculo ativado. O meio de ativação foi

composto por meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona e 40 g/L de glicose). Depois do cultivo, o meio foi centrifugado e as células foram inoculadas ao meio de fermentação.

4.3.2 Fermentação do hidrolisado de tecido de algodão

Após a etapa de hidrólise, com as condições do meio ajustadas para pH 5,0 e temperatura de 34 °C, os nutrientes foram adicionados ao meio hidrolisado antes que a fermentação se iniciasse, sendo composto por (em g/L): 5,6 de KH_2PO_4 ; 1,4 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6,8 de extrato de levedura; 5,32 de ureia (SONEGO et al., 2016). A levedura *S. cerevisiae* ativada foi adicionada ao meio hidrolisado e a fermentação ocorreu até que os açúcares se esgotassem ou próximo a isso.

4.4 OBTENÇÃO DA CARBOXIMETILCELULOSE

Baseado na caracterização do sólido residual não solubilizado após a hidrólise enzimática (item 4.4.4), verificou-se que a celulose remanescente apresenta potencial para produção de bioprodutos de maior valor agregado, tais como a carboximetilcelulose (CMC).

Para isso, 3 g de celulose foram tratadas com 80 mL de isopropanol e 8 mL de água, sob agitação constante por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, 20 mL de solução de hidróxido de sódio 40% em massa foi adicionado ao sistema lentamente visando ativação dos sítios ativos (hidroxilas) pelo processo de alcalinização da celulose que leva ao intumescimento e redução da cristalinidade da celulose. O meio reacional foi mantido sob agitação por 90 min. Após essa etapa, foi realizada a reação de substituição nucleofílica com 8 g de ácido monocloroacético dissolvidos em 10 mL de isopropanol gerando o produto eterificado. O sistema foi mantido a 55 °C por 4 h, sob agitação. O produto obtido foi filtrado, tratado com solução metanólica 80%, neutralizado com ácido acético e, por fim, filtrado novamente e seco em estufa a 50 °C até peso constante. A CMC obtida foi caracterizada via grau de substituição e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em um espectrômetro Bruker modelo Avance III HD 600. (ANDRADE NETO, J. C., 2019).

As caracterizações visam verificar a eficiência de purificação do material e determinar o grau de substituição da CMC em função das modificações durante a síntese. Salienta-se que, durante a etapa de síntese, o acompanhamento da mudança do grau de substituição se mostra

fundamental, uma vez que parâmetros como solubilidade mudam significativamente devido a mudança no mesmo. Esse parâmetro descreve o número de hidroxilas envolvidas na reação de substituição.

4.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS

As análises foram realizadas em paralelo ao restante das etapas para quantificação de celulose contida no algodão, açúcares e etanol produzidos nas etapas de hidrólise e fermentação, respectivamente.

A determinação do teor de celulose na biomassa foi realizada de acordo com os procedimentos analíticos descritos em NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2008). Para a quantificação de açúcares fermentescíveis, seguiu-se a metodologia DNS descrita por Miller (1959), utilizando o espectrofotômetro UV/VIS da Kasuaki. Já para a quantificação da glicose e de etanol, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - High Performance Liquid Chromatography).

4.5.1 Caracterização do tecido de algodão em termos de celulose

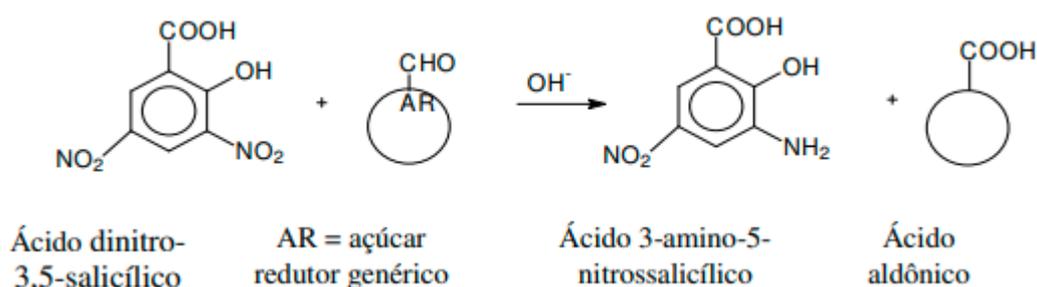
A biomassa da matéria-prima bruta foi determinada em termos de sua composição percentual de celulose. De maneira geral, a biomassa sólida passou por hidrólise ácida com H_2SO_4 72% (m/m) respeitando a proporção (1:10 $m_{\text{biomassa seca}}/V_{\text{solução ácida}}$) a 30 °C por 1h. Em seguida, a suspensão foi colocada em autoclave a 121 °C por mais uma hora. Após o término da hidrólise o material foi filtrado e a fração líquida foi utilizada para a determinação de açúcares (glicose e celobiose) e produtos de degradação (ácido fórmico e hidroximetilfurfural) da celulose, via HPLC.

4.5.2 Quantificação de açúcares redutores

Para a análise quantitativa de açúcares em cada etapa do processo, foi feita a determinação da concentração de açúcares fermentescíveis de acordo com o método colorimétrico do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) descrito por Miller (1959). O método baseia-se na redução deste ácido a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico ao passo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico (Figura 8), resultando na alteração de cor capaz

de quantificar os grupos redutores presentes na reação por espectrofotometria. Esta quantificação é medida em absorbância, no comprimento de onda de 540 nm e a coloração apresentada varia de acordo com a concentração de açúcar redutor. Soluções mais concentradas apresentam coloração marrom escura, enquanto as menos concentradas apresentam tons mais amarelados.

Figura 8 - Reação de quantificação de açúcares redutores totais por DNS



Fonte: MILLER (1959)

A solução de ácido dinitro-3,5-salicílico foi preparada dissolvendo-se 10 g do reagente sólido em 500 mL de água destilada. Acrescentou-se 200 mL de NaOH 2N (16 g de NaOH em 200 mL de água destilada). Após a dissolução total adicionou-se à mistura 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio. Avolumou-se em 1000 mL com água destilada no balão volumétrico e a solução foi armazenada em temperatura ambiente.

Para a quantificação de açúcares fermentescíveis, foram misturados em tubo de ensaio 0,5 mL de solução diluída, resultante de cada amostra de hidrólise enzimática (as diluições foram diferentes para cada alíquota e foram considerados fatores como tempo de hidrólise decorrido e carga de algodão utilizada), e 1,0 mL de DNS. Em seguida, os tubos de ensaio foram submetidos ao aquecimento em banho de água fervente durante 10 minutos para que ocorresse a reação. Passado o tempo de reação, os tubos foram colocados em água resfriada com gelo para interromper a reação com o DNS e avolumados para 25 mL. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS Kasuaki em comprimento de onda de 540 nm. Para determinação das concentrações de açúcares redutores formados foi utilizada a curva de calibração presente no Apêndice A, obtida através do preparo de soluções de glicose com diferentes concentrações de 1 g/L até 5 g/L.

4.5.3 Quantificação da glicose e do etanol

Para quantificar a glicose, formada após a hidrólise da celulose, e o etanol formado após a fermentação do hidrolisado, foi utilizada a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) utilizando o cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, com um detector de índice de refração RID-10A e coluna Aminex HPX-87H, com a fase móvel de ácido sulfúrico 5 mM, vazão de 0,6 mL/min e temperatura de 65 °C.

4.5.4 Caracterização do sólido residual da hidrólise enzimática: determinação do tamanho de partícula

As análises de distribuição do tamanho das partículas do hidrolisado foram realizadas no equipamento Microtrac Bluewave. Este opera via seco e utiliza ar como fluido da câmara contendo o sólido. Assim, os resultados da medida de espalhamento e incidência de laser na amostra foram obtidos através de sensores localizados em diferentes posições que detectam a intensidade de radiação residual. (ANDRADE NETO, J. C., 2019)

4.5.5 Análise dos resultados

A partir dos resultados obtidos e para consolidar a discussão dos mesmos, realizou-se o cálculo de conversão da etapa de hidrólise enzimática e fermentação, bem como análise estatística dos dados a fim de verificar a qualidade e validação dos modelos.

4.5.5.1 Cálculo da conversão de celulose a glicose

A partir dos resultados da quantificação após as 96 horas de hidrólise enzimática, foi possível realizar o cálculo da porcentagem de material celulósico convertido em açúcares redutores através da equação (2).

$$\%Conversão_{celulose\ a\ glicose} = \frac{glicose\ produzida}{glicose\ potencial} \cdot 100 = \frac{glicose\ produzida}{concentração_{(biomassa)} \cdot 0,98 \cdot 1,11} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde a glicose produzida está expressa em concentração (g/L), 0,98 corresponde à fração correspondente ao teor de celulose presente na biomassa de algodão e 1,11 é o fator

estequiométrico da conversão de celulose (considerando sua unidade básica) em glicose levando em consideração suas massas molares. De acordo com a reação (3) e sabendo que a massa molar de uma unidade básica de celulose é 162 g/mol e 180 g/mol para a glicose, então sabe-se que 1 g de celulose produz estequiometricamente 1,11 g de glicose.



4.5.5.2 Cálculo da conversão de fermentação

Com os resultados da concentração de etanol obtida após a fermentação dos açúcares redutores, calculou-se a conversão percentual do processo através da equação (4).

$$\%Conversão_{glicose \ a \ etanol} = \frac{etanol \ produzido}{etanol \ potencial} \cdot 100 = \frac{etanol \ produzido}{concentração_{glicose} \cdot 0,511} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde o etanol produzido está expresso em concentração (g/L), concentração_{glicose} refere-se à concentração final de glicose obtida na hidrólise (g/L) e 0,511 é o fator estequiométrico da transformação da glicose em etanol levando em consideração suas massas molares. De acordo com a reação (5) e sabendo que a massa molar do etanol é 46 g/mol, então sabe-se que 1 g de glicose produz estequiometricamente 0,511 g de etanol.



4.5.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos após a hidrólise do algodão foi feita pelo software StatisticaTM que deu origem ao gráfico de pareto, tabela de efeitos e superfície de resposta presentes no tópico 5 deste trabalho, considerando um intervalo de confiança de 90%, sendo este intervalo adequado para processos biológicos (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A tabela de efeitos foi utilizada para gerar o modelo matemático que prevê a concentração de açúcares redutores em função das variáveis operacionais avaliadas (concentração de biomassa e dosagem enzimática) na reação de hidrólise enzimática de retalhos de algodão.

Uma equação de regressão polinomial de primeira ordem (8) foi proposta para descrever a relação de cada variável independente com a resposta.

$$y_i = a_0 + \sum_{j=1}^K a_j \cdot X_j + \sum_{j \neq m}^K b_{jm} X_j X_m \quad (9)$$

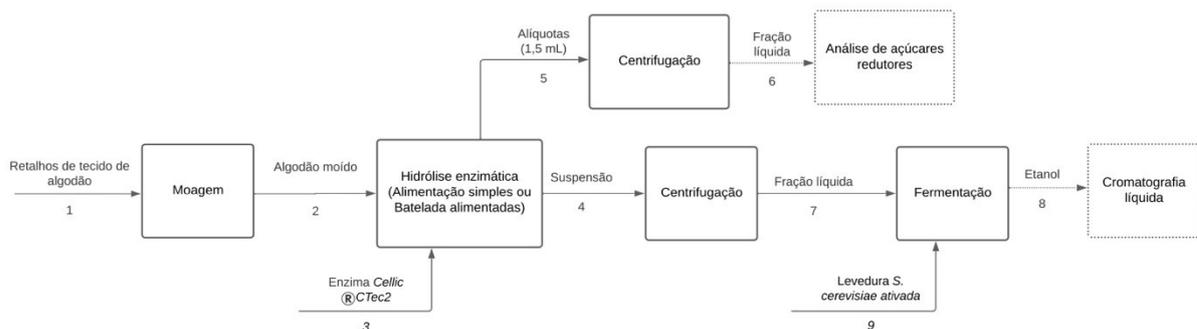
onde: y_i é a resposta experimental para a variáveis-resposta; a_0 é uma constante, X é o conjunto de parâmetros operacionais normalizados; a_j 's é o conjunto de coeficientes dos termos lineares; b_{jm} 's é o conjunto de coeficientes associados às interações entre as variáveis; e K é o número de variáveis independentes.

O modelo obtido durante a análise estatística está apresentado na forma codificada, ou seja, os coeficientes são obtidos a partir das variáveis na forma codificada (-1, 0, +1), conseqüentemente para se obter um valor real de uma variável-resposta é necessário substituir na equação os valores dos parâmetros operacionais em sua forma codificada.

4.6 FLUXOGRAMA DE PROCESSO

A Figura 9 esquematiza os procedimentos apresentados na metodologia.

Figura 9 - Fluxograma do processo de produção de etanol 2G e CMC a partir de resíduo de tecido de algodão



Fonte: Autores (2022)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão descritos nos itens 5.1 a 5.4.

5.1 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE DO TECIDO DE ALGODÃO

Os retalhos de algodão branco crus e moídos foram hidrolisados em sete condições diferentes, utilizando planejamento experimental conforme mostrado na Tabela 3.

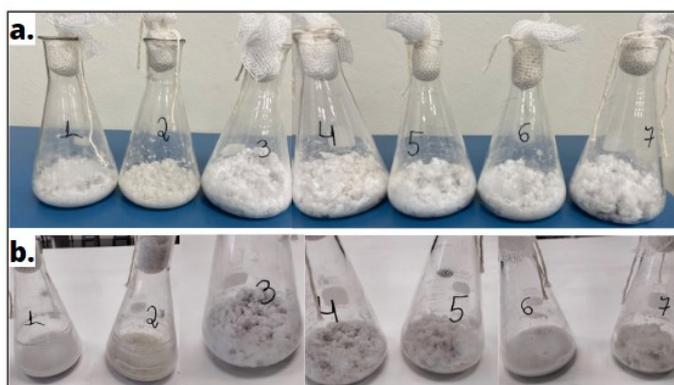
Tabela 3 - Condições da hidrólise enzimática

Ensaio	Concentração de biomassa (% m/v)	Dosagem enzimática (FPU/g _{celulose})
1	10 (-1)	15 (-1)
2	10 (-1)	30 (+1)
3	20 (+1)	15 (-1)
4	20 (+1)	30 (+1)
5	15 (0)	22,5 (0)
6	15 (0)	22,5 (0)
7	15 (0)	22,5 (0)

Fonte: Autores (2022)

As Figuras 10 a. e b. mostram a aparência das amostras após 4 e 96 horas de reação, respectivamente.

Figura 10 - Aspecto das amostras após 4 e 96 horas de hidrólise enzimática, respectivamente

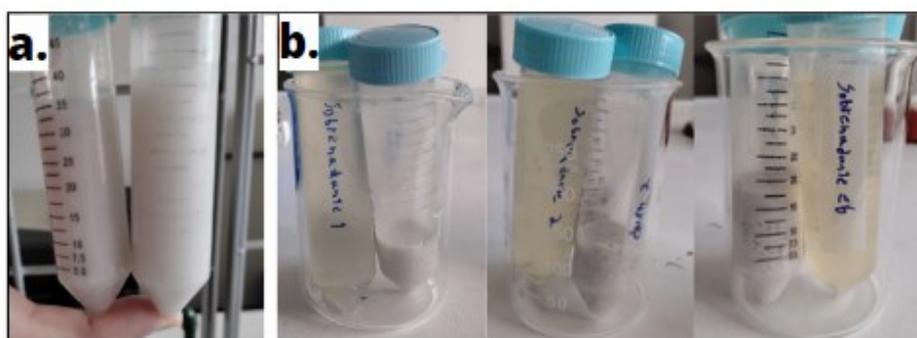


Fonte: Autores (2022)

Qualitativamente, foi possível observar uma mudança na aparência das amostras com o decorrer da reação, resultado da quebra das estruturas das moléculas de celulose. Estas inicialmente apresentaram insolubilidade em meio aquoso e, com o passar do tempo, a celulose foi sendo hidrolisada em oligossacarídeos, os quais possuem maior solubilidade em meio aquoso, tornando o meio cada vez mais líquido, indicando uma ocorrência da conversão de celulose em oligossacarídeos.

As Figuras 11 a. e b. mostram a aparência das amostras antes e após a centrifugação.

Figura 11 - Resultado dos ensaios antes e após a centrifugação, respectivamente



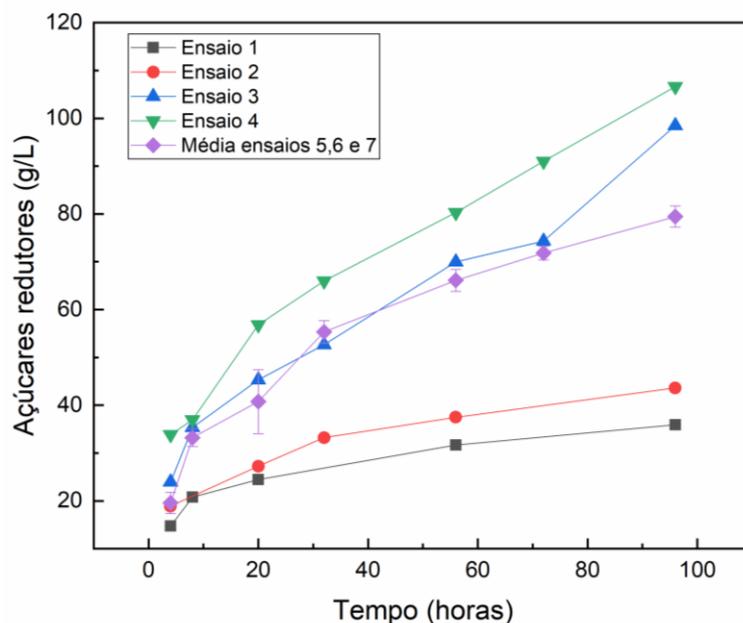
Fonte: Autores (2022)

5.1.1 Análise da hidrólise enzimática

Para análise dos resultados das hidrólises enzimáticas via metodologia DNS foi utilizada a curva de calibração (Apêndice A), a qual demonstra a relação entre a concentração de açúcar redutor em g/L, de acordo com a absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

Assim, obteve-se os resultados da velocidade cinética da reação para cada um dos 7 ensaios ao longo de 96 horas (Figura 12).

Figura 12 - Cinética da hidrólise enzimática



Fonte: Autores (2022)

As curvas seguem o modelo proposto por Michaelis-Menten o qual descreve a cinética das reações enzimáticas. “A quantidade de produto formado aumenta com o passar do tempo, embora finalmente seja alcançado um momento em que não ocorre nenhuma mudança efetiva do substrato ou produto” (MACHADO, 2019). Devido a isso, espera-se que o formato da curva seja mais acentuado nos primeiros momentos seguido de uma estabilização.

Ao analisar o gráfico, conclui-se que as velocidades de reação se reduzem ao longo do tempo, fato observado através da inclinação das curvas que foi decaindo ao longo da reação. As amostras 1 e 2, que possuem a menor carga de sólido (10%), estão próximas de atingir uma concentração de açúcares redutores praticamente estável entre os tempos de 56 e 96 horas, o que significa que prosseguir com a reação deixa de ser interessante uma vez que a extensão do tempo de reação tornaria o processo mais caro e não traria resultados muito melhores. Já nos ensaios 3 e 4, que possuem 20% de carga de sólido, pode-se considerar estender o tempo de reação em trabalhos futuros, tendo em vista que embora a velocidade da reação esteja se reduzindo, ainda há produção considerável de açúcares redutores entre os pontos coletados para análise.

A Tabela 4 apresenta a conversão para cada um dos ensaios. O valor extraído se refere a quantidade de açúcar redutor obtida após a hidrólise em relação a porcentagem de celulose presente na carga inicial de sólido utilizada no ensaio. Após a caracterização dos resíduos de

tecido de algodão, concluiu-se que a porcentagem de celulose presente corresponde à 98% da biomassa.

Tabela 4 - Conversão de celulose em glicose

Ensaio	Carga de sólido (%)	Carga enzimática (%)	Concentração de A.R. após 96 h (g/L)	Concentração de glicose após 96h (g/L)	Conversão de celulose em A.R. (%)	Conversão de celulose em Glicose (%)
1	10,00	15,00	35,90	29,27	33,02	26,91
2	10,00	30,00	43,60	40,36	40,09	37,10
3	20,00	15,00	103,00	101,9	47,34	46,84
4	20,00	30,00	106,60	96,75	49,02	44,47
5	15,00	22,50	79,40	67,66	48,68	41,47
6	15,00	22,50	82,1	68,51	50,34	41,49
7	15,00	22,50	76,80	69,48	47,05	42,58

Fonte: Autores (2022)

Acredita-se que a baixa conversão dos ensaios possa ter sido ocasionada por conta da biomassa (retalhos de tecido de algodão) não ter sido submetida à um pré-tratamento prévio a hidrólise enzimática. A única mudança sofrida pelo material antes da hidrólise foi a sua moagem em moinho de facas, sendo assim, aditivos químicos desconhecidos utilizados na produção dos tecidos podem ter atrapalhado a conversão ao diminuírem o acesso da celulose a enzima.

Segundo FIOROTTO (2022) “Os produtos têxteis são (..) tratados ou acabados com um grande número de produtos químicos diferentes, muitos dos quais são pouco conhecidos. A maioria desses produtos químicos pode ser encontrada em corantes e na fase de processamento têxtil”

Além disso, a estrutura celulósica é bastante cristalina e recalcitrante sendo de difícil acesso ao ataque enzimático. Quando é realizado um pré-tratamento, o grau de polimerização e cristalinidade da celulose tendem a diminuir, facilitando assim a reação enzimática subsequente (XU; HUANG, 2014).

Outra possível explicação para a baixa conversão está associada à alta carga de sólidos empregada. Altos teores de sólidos levam a uma alta viscosidade aparente do meio, resultando em limitações de transferência de calor e massa do meio. Essas questões representam impactos

negativos no rendimento da hidrólise, e o uso da operação em batelada alimentada oferece uma abordagem alternativa para contornar esses problemas (PRATTO et al., 2021).

Através do software Statistica foi possível entender o efeito que as variáveis escolhidas, isto é, biomassa (m/v) e dosagem de enzima (FPU/g_{celulose}), tem sobre a quantidade de açúcar redutor produzido (g/L). Após analisar as entradas de variáveis e os resultados, obteve-se a Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados do Software Statistica

Fator	Efeito	p-valor	Coeficiente	-90%	+90%
				Limite de conf.	Limite de conf.
Média	74,70000	0,000083	74,70000	68,80719	80,59281
(1) Biomassa (% m/v)	62,80000	0,002489	31,40000	23,60454	39,19546
(2) Dosagem enzimática (FPU/g _{celulose})	7,90000	0,318802	3,950000	-3,312476	11,74546
1 vs. 2	0,20000	0,977812	0,100000	-7,69546	7,89546

Fonte: Autores (2022)

Assim, a equação que descreve a quantidade de açúcar redutor obtido é dada por:

$$y = 74,7 + 31,4 \cdot x_1 + 3,95 \cdot x_2 + 0,1 \cdot x_1 \cdot x_2 \quad (10)$$

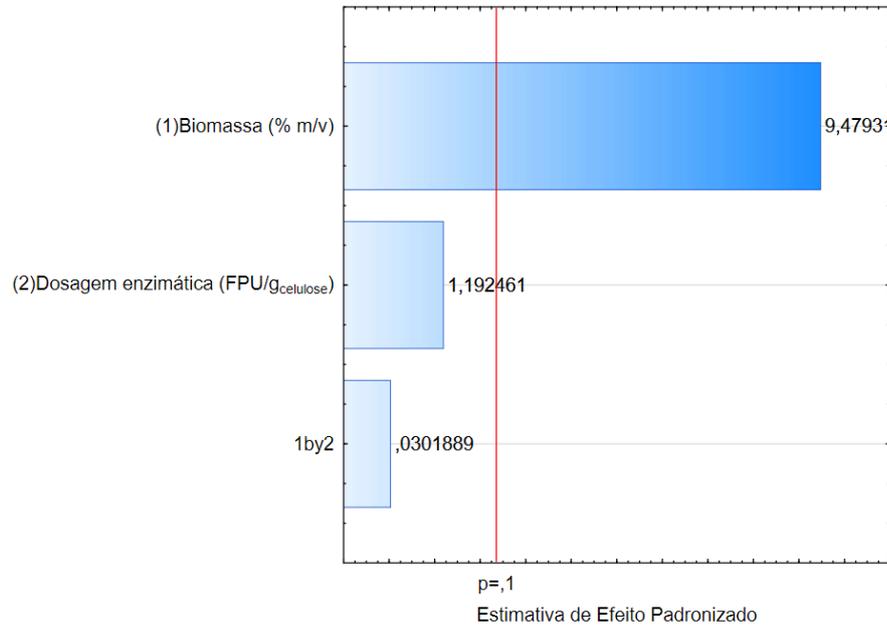
Sendo y a concentração de açúcar redutor (g/L) e x_1 e x_2 , os valores codificados das variáveis concentração de biomassa e dosagem enzimática, respectivamente.

Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos, foram considerados significativos os parâmetros com p – valores menores que 10% ($p < 0,1$) (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Sendo assim, é possível concluir que a dosagem enzimática não foi uma variável significativa dentro do intervalo de confiança avaliado, dessa forma a equação pode ser descrita como:

$$y(g/L) = 74,7 + 31,4 \cdot x_1 \quad (11)$$

Abaixo, o diagrama de Pareto (Figura 13) expõe relação de causa e efeito, onde apenas o parâmetro biomassa é o estatisticamente significativo.

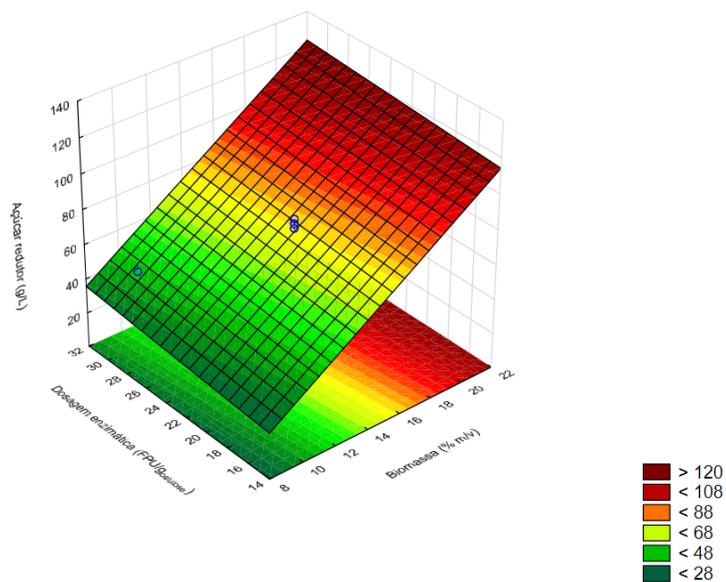
Figura 13 - Diagrama de Pareto para açúcar redutor (g/L)



Fonte: Autores (2022)

Abaixo, a superfície de resposta (Figura 14) relaciona de maneira gráfica o gradiente de concentrações de açúcar redutor de acordo com a dosagem de enzima e a quantidade de biomassa empregadas. É possível notar, novamente, que a variação de enzimas não é estatisticamente significativa.

Figura 14 - Superfície de resposta para açúcar redutor obtido durante os ensaios de hidrólise enzimática



Fonte: Autores (2022)

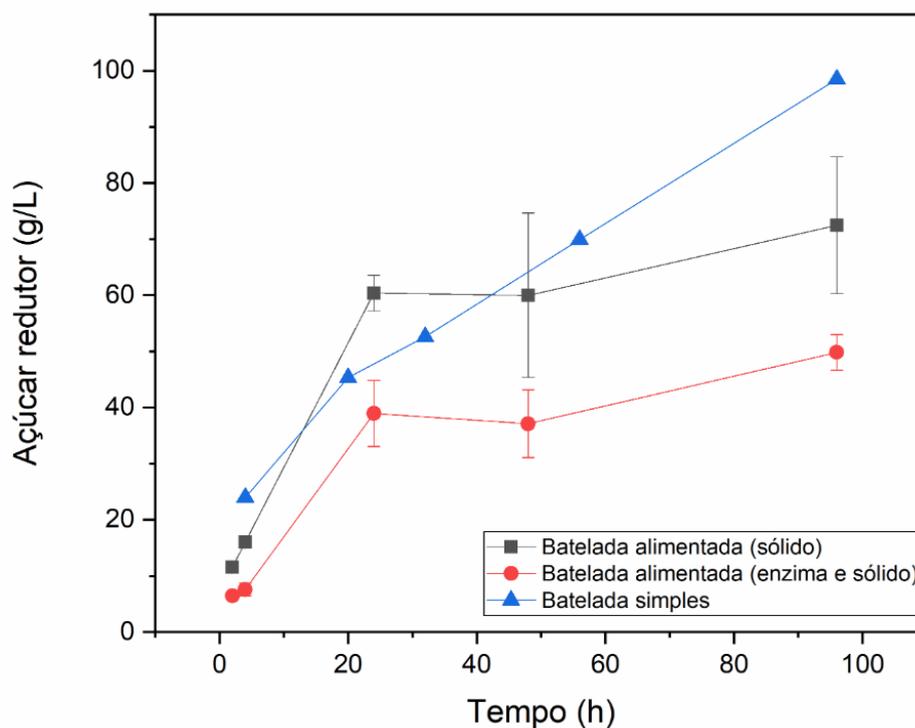
Uma vez que parte da carga pode estar obstruída pelos aditivos desconhecidos utilizados na confecção dos uniformes cujos retalhos foram utilizados e todos os sítios ativos disponíveis já estarem saturados de enzima, o acréscimo ou a redução da dosagem enzimática não irá interferir significativamente na conversão.

5.1.2 Análise da hidrólise enzimática em batelada alimentada

Com o intuito de aumentar a conversão de hidrólise enzimática, avaliou-se a estratégia de hidrólise enzimática em processo de batelada alimentada. O ensaio escolhido para ser operado nesta condição foi o ensaio 3, dado que, se comparado às outras condições, este obteve a maior concentração de glicose utilizando metade da carga enzimática do ensaio 4 (o ensaio em que se obteve a segunda maior concentração).

No gráfico a seguir (Figura 15) observam-se simultaneamente as cinéticas das reações de hidrólise enzimática de alimentação simples, batelada alimentada de biomassa e batelada alimentada de biomassa e de enzima.

Figura 15 - Cinética comparativa entre diferentes condições de alimentação em hidrólises enzimáticas



Fonte: Autores (2022)

Tomando como base os históricos de conversão da hidrólise enzimática em batelada alimentada apresentado na revisão bibliográfica, o resultado esperado era obter concentrações de açúcares redutores superiores às observadas na hidrólise enzimática de adição única. No entanto, os resultados acima demonstram o contrário. A hidrólise enzimática realizada em condição de alimentação simples apresentou maior concentração final de açúcar redutor (96 h), seguido do ensaio de hidrólise enzimática em batelada alimentada de biomassa e, por fim, o ensaio em hidrólise enzimática em batelada alimentada de biomassa e enzima. Na tabela a seguir, suas respectivas conversões:

Tabela 6 - Resultados da conversão das hidrólises enzimáticas

Ensaio	Concentração de açúcar redutor após 96h (g/L)	Conversão em açúcar redutor (%)
Alimentação simples	103,00	47,34
Batelada alimentada (Biomassa)	84,7	38,93
Batelada alimentada (Biomassa e Enzima)	53,00	24,36

Fonte: Autores (2022)

Ao analisar a concentração de açúcares redutores e conversão dos ensaios realizados, verifica-se que não houve melhoria nos ensaios de batelada alimentada. Uma possível causa desses resultados é a agitação do Shaker utilizado durante a reação não misturar por completo os componentes da reação. Sendo assim, uma vez que o presente processo não foi satisfatoriamente misturado, o substrato se tornou bastante denso, viscoso e “seco”, assim como a alimentação simples se apresentava no início de sua reação, impactando diretamente na hidrólise da celulose. Destaca-se que o ensaio de batelada alimentada apresenta uma desvantagem em relação ao ensaio em batelada simples, uma vez que parte da carga de algodão passa menos tempo em reação, os 5% de carga adicionados após 48 horas de reação só passaram por 48 horas de hidrólise ao passo que no ensaio batelada simples todo o material foi adicionado no início da reação e passou por 96 horas de hidrólise.

Em teoria, esta desvantagem seria compensada pelo melhor contato adquirido ao se adicionar aos poucos a carga de sólidos, mas como o meio se tornou seco, é possível que o contato superior inicial não compense as horas de hidrólise que se perdem. Caso o tempo de

ensaio fosse superior a 96h e os sólidos tenham sido racionados de maneira diferente: mais adições de menos sólidos em períodos menores, os resultados da batelada alimentada poderiam ser superiores aos da alimentação simples.

Comparando os dois ensaios de batelada alimentada, a adição de toda a enzima logo no início da reação poderia levar a uma diminuição da atividade da mesma uma vez que toda a enzima seria submetida à efeitos de inibição pelo produto (glicose) desde o início da reação, o que resultaria em menores conversões de celulose à açúcares redutores. Isto não ocorreu, o resultado observado é que a adição de toda a enzima resultou em conversões superiores.

Estes resultados podem ser causados pelo fato de que nas últimas adições de sólidos e enzima, o meio reacional já estava denso e mais “seco” devido ao substrato lignocelulósico adicionado, em vez de adicioná-los a um meio de cultura líquido antes da adição do substrato como feito no ensaio com apenas adição de biomassa e na alimentação simples. Desta maneira é possível que as enzimas não tenham se distribuído de maneira uniforme mesmo com a realização de mistura manual, ocasionando baixo contato dos sítios ativos da enzima com o substrato e, conseqüentemente, baixa conversão da hidrólise.

Uma interessante sugestão para trabalhos futuros que poderia solucionar ou melhorar os problemas encontrados nos dois casos seria a realização de novos ensaios com a substituição do uso do Shaker pelo uso em banho sob a presença de um sistema de agitação mecânica capaz de realizar a mistura do sistema reacional de forma a deixá-lo mais homogêneo.

5.2 FERMENTAÇÃO

Os ensaios de fermentação foram realizados com os hidrolisados obtidos nos ensaios de hidrólises enzimática em batelada simples (Tabela 6) pelo período de 24 horas. Abaixo, estão os resultados das análises de concentração de glicose e etanol via HPLC (Tabela 7). O equipamento empregado foi utilizado na UFSCar (Universidade Federal de São Carlos).

Tabela 7 - Resultados da Fermentação

Amostra da fermentação	Concentração de glicose no final da fermentação (g/L)	Concentração de etanol no final da fermentação (g/L)	Glicose consumida (%)	Etanol potencial (g/L)	Conversão em etanol (%)
1	0,05	13,40	99,85	14,96	89,59
2	0,01	18,50	99,99	20,62	89,70
3	0,53	42,55	99,51	54,87	77,55
4	0,24	43,73	99,76	49,44	88,45
5	0,03	29,96	99,96	34,57	86,65
6	0,03	29,38	99,96	35,01	83,92
7	0,03	32,84	99,96	35,50	92,50

Fonte: Autores (2022)

De imediato é possível notar que o consumo de glicose foi altamente satisfatório para todos os ensaios, sendo em média 99,86% de consumo entre todas as fermentações. No entanto, é importante pontuar que nem todo o açúcar consumido é usado no processo para conversão em etanol, parte dele acaba sendo consumido no crescimento celular dos microrganismos.

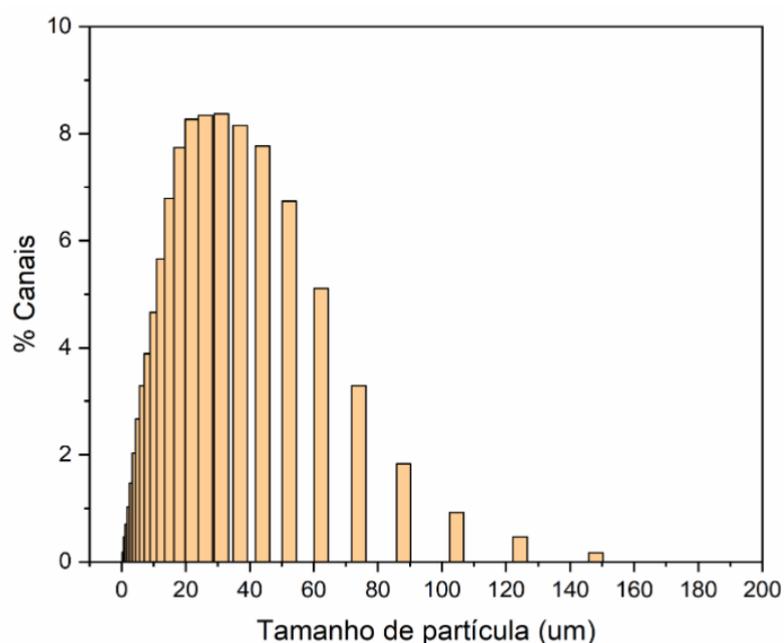
Levando em consideração o etanol potencial calculado a partir da estequiometria da reação de fermentação, pode-se notar uma alta conversão em etanol. Os resultados demonstram conversões entre 77% e 92%, dado que, se comparado a escala industrial de processos fermentativos que empregam biomassa de cana de açúcar (rendimento de conversão acima de 90% em algumas usinas de acordo com CCGE (2009), pode ser considerado bastante promissor.

De acordo com alguns autores (MODENBACH; NOKES, 2013; LIU; CHEN, 2016), uma concentração de etanol maior do que 40 g/L no caldo de fermentação deve ser o ponto de referência para uma destilação eficiente, considerando o consumo de energia envolvido nesta etapa. Assim, os resultados obtidos neste estudo motivam o uso industrial de resíduos de algodão para a produção de etanol 2G.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO RESIDUAL DA HIDRÓLISE

Após a realização da hidrólise, foi realizada a caracterização dos sólidos restantes para avaliar a possibilidade de convertê-los em produtos úteis para a indústria, aumentando assim o aproveitamento total dos retalhos de algodão iniciais.

Figura 16 - Análise do tamanho das partículas de sólido residual da hidrólise



Fonte: Autores (2022)

O gráfico acima, obtido do software Microtrac Flex, demonstra de maneira visual o tamanho médio das partículas residuais de sólido após a hidrólise enzimática do tecido de algodão. É notável que o material obtido se encontra na escala micro, predominantemente entre 20 e 40 μm . A partir do exposto, é possível dizer que o material é elegível para produção de carboximetilcelulose (CMC)

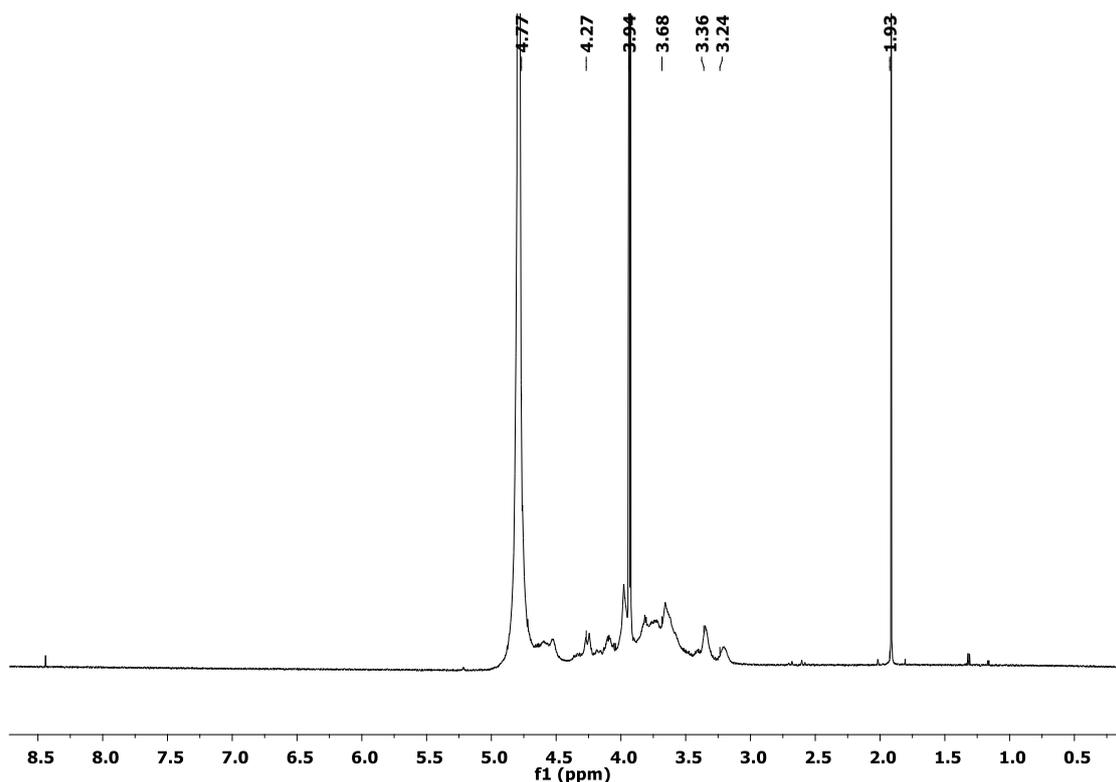
5.4 CARBOXIMETILCELULOSE

A caracterização da CMC foi realizada via RMN em um espectrômetro Bruker modelo Avance III HD 600, sendo utilizado como solvente para obtenção dos espectros de hidrogênio (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN), o óxido de deutério.

Para análise da CMC utilizou-se a celulose residual da hidrólise enzimática e foram obtidos os seguintes resultados.

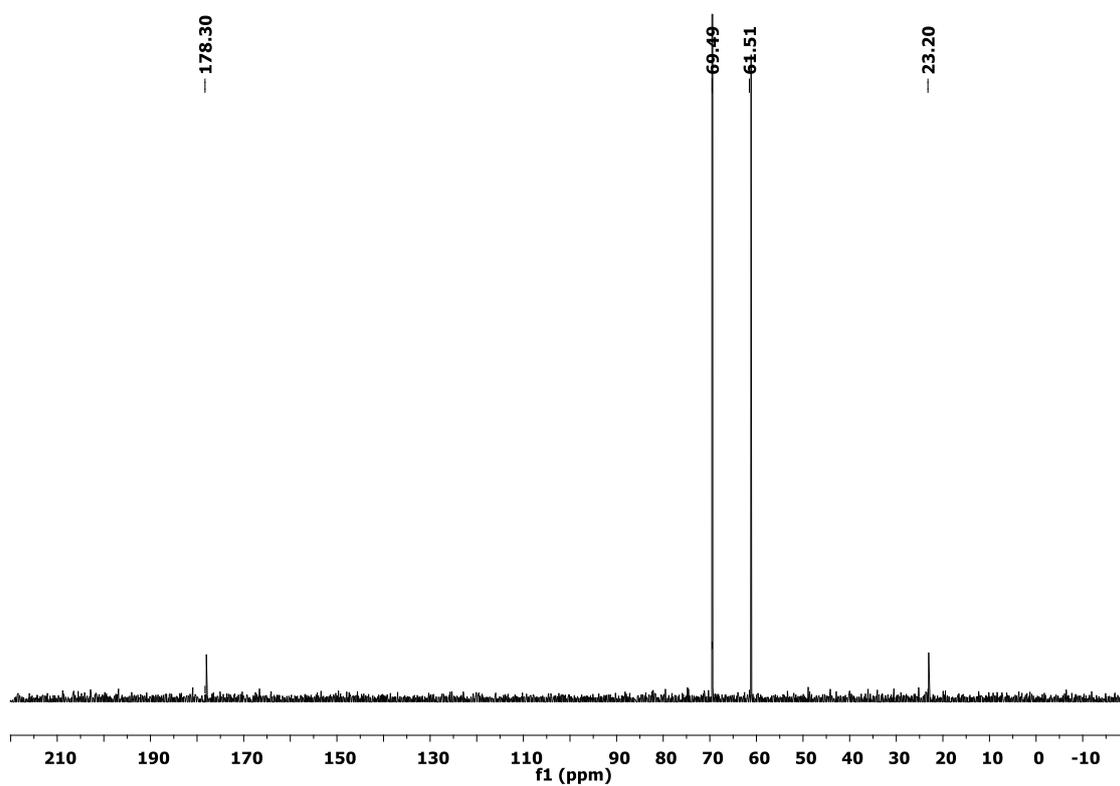
As Figuras 17 e 18 representam os perfis dos espectros obtidos pela análise qualitativa que caracterizam a presença de CMC.

Figura 17 – Espectro ^1H -RMN para identificação de hidrogênio



Fonte: Autores (2022)

A análise via ^1H -RMN mostra a presença de sinais entre 3,24 e 3,94 ppm (como identificado na parte superior do gráfico acima) e, também, um sinal em aproximadamente 4,50 ppm, referentes aos hidrogênios das posições de 1 a 6 bem como sinais em aproximadamente 4,00 e, 4,27 ppm atribuídos aos hidrogênios dos grupos carboximéticos ($-\text{CH}_2$) da CMC. Com relação a análise via ^{13}C -RMN, verifica-se a presença de sinais entre 178,30 e em 69,49 ppm (como identificado na parte superior do gráfico a seguir) referentes a presença de carbonilas e do grupo carboximético ($-\text{CH}_2$), respectivamente, comprovando a formação efetiva da CMC.

Figura 18 - Espectro ^{13}C -RMN para identificação de carbono

Fonte: Autores (2022)

6 CONCLUSÃO

A hidrólise enzimática dos tecidos de algodão produziu uma solução açucarada mais concentrada nas condições 3 e 4 (20% de carga de sólidos com 15 FPU/g_{celulose} e 30 FPU/g_{celulose} de carga enzimática, respectivamente), atingindo em torno de 50% de conversão de celulose a glicose. A baixa conversão na etapa de hidrólise pode ser devido à agitação do sistema não ser o suficiente para promover um bom contato entre os centros ativos das enzimas e a celulose do algodão, que possui alto índice de cristalinidade, ou seja, altas cargas de enzima não influenciaram de maneira significativa no rendimento da reação no período de 96 horas.

O rendimento da fermentação atingiu em média 86,91% de conversão em relação aos valores de etanol que potencialmente poderiam ser produzidos, sendo a maior concentração de etanol obtida a dos ensaios 3 e 4 mencionados acima, que atingiram valores de 42,55 g/L e 43,73 g/L, respectivamente.

O algodão restante possui alto teor de cristalinidade da celulose, não sendo viável economicamente reutilizá-lo em uma hidrólise e assim, obter mais etanol. Portanto, com o algodão remanescente das hidrólises, foi possível uma outra destinação para converter o material celulósico em carboximetilcelulose (CMC), um bioproduto que possui um valor agregado maior do que o etanol, possibilitando um bom aproveitamento dos retalhos de algodão iniciais, transformando-os em diferentes produtos de interesse industrial.

Em suma, os ensaios de hidrólise enzimática dos retalhos de algodão mostram grande potencial, porém, requerem um desenvolvimento do processo explorando outras formas de otimizar a produção da solução açucarada, alterando o sistema de agitação, como por exemplo, reatores de bancada com a presença de impelidores, os quais promoveriam uma mistura mais eficiente do meio reacional.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo da influência da agitação durante a hidrólise enzimática através da utilização de um sistema de mistura com impelidores que torna o meio mais homogêneo e promove maior contato entre a enzima e a biomassa.

Além disso, uma outra sugestão para trabalhos futuros seria um estudo utilizando como matéria prima os resíduos de tecido de algodão coloridos e verificar a possibilidade/viabilidade de um pré-tratamento inicial.

REFERÊNCIAS

ANDRADE NETO, J. C. **Avaliação da adsorção de cromo em carboximetilcelulose obtida a partir de palha de milho modificada e ativada com diferentes líquidos iônicos**. 2019. 203 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Universitário FEI, São Bernardo do Campo, 2019 Disponível em: <<https://repositorio.fei.edu.br/bitstream/FEI/780/1/fulltext.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2022.

AMARAL, M. et al. **Industrial textile recycling and reuse in Brazil: case study and considerations concerning the circular economy**. Gestão e Produção. São Carlos, v. 25, n. 3, p. 431-443, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/gp/a/65F6GD8rvkYGfnqJQ83XWnF/?lang=en>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review**. Energy conversion and management, v. 52, p. 858-875, fev., 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410003791?casa_token=PKz_MPIY3xEAAAAA:XrkJI9IpTvxRA5e2KftnRfxJRKc8YZ918ohnExu7rXw3sqSay9kgTZPLfE78Nu7QjLZD3Y294vk>. Acesso em: 07 jun. 2022.

BALAT, M.; BALAT, H. **Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel**. Applied energy, v. 86, p. 2273-2282, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306261909000919>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

BARROS, L. **Obtenção de nanocelulose por hidrólise ácida e enzimática de fibras de algodão de resíduo de tecido tingido com corante índigo**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte. 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/20423>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

CAMARGO, A; OLIVEIRA, D. **Obtenção de carboximetilcelulose (CMC) através da celulose do bagaço de malte utilizando a reação cruzada com epícloridrina**. Revista

Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 04, Ed. 07, Vol. 02, pp. 131-163. Julho de 2019. ISSN: 2448-0959. Disponível em: <<http://lyceumonline.usf.edu.br/salavirtual/documentos/3087.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2022.

CANDIDO, R. **Utilização da celulose de resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de alto valor agregado**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-22082013-161627/publico/BID11006.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2022.

CANILHA, L. et al. **Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal**. Revista Analytica, v. 44, p. 48-54, 2010.

Carboximetilcelulose de Sódio. Denver Especialidades Químicas. Cotia, São Paulo. 2019. Disponível em: <<http://www.denverespecialidades.com.br/cmc/>>. Acesso em: 23 nov. 2022.

CGEE, CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol combustível: Uma oportunidade para o Brasil**. Brasília - DF. 538 p, 2009.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. **Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 59, p. 85-89, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830506001326>>. Acesso em: 20 out. 2022.

CHU, C. et al. **Kinetics of cotton cellulose hydrolysis using concentrated acid and fermentative hydrogen production from hydrolysate**. International Journal of Hydrogen Energy, v. 36, p. 8743-8750, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319910014102>>. Acesso em: 28 mai. 2022.

CIULIK, C. **Modificação química de celulose para utilização em mistura com polietileno de alta densidade**. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. Disponível em:

<<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/23933/Claudio%20Batista%20Ciulik.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 nov. 2022.

CRUZ, M. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. 2019. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <<http://clyde.dr.ufu.br/bitstream/123456789/24567/3/AvaliacaoCondicoesOperacionais.pdf>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

DE LIMA, E. et al. **Caracterização e hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo de caju**. Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. 2015. Disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/editora/anais/conepetro/2015/Modalidade_4datahora_30_03_2015_09_54_44_idinscrito_652_8b2d7acdaec3ce1d6950fb9c1460f76.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2022

DUVAL, A.; LAWOKO, M. **A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials**. Reactive and Functional Polymers, v. 85, p. 78-96, 2014. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1381514814001965?token=C9B3D345D2A9FDC865D3788AF3FB0D4A56F3AD2239BC91AEE50C3AF84049BDAD18D1E5A45BD38042444A76351C4FB231&originRegion=us-east-1&originCreation=20220408223021>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

FIOROTTO, N. **Toxicidade escondida nos produtos químicos têxteis**. SENAI, 2022. Disponível em: <<https://textil.sp.senai.br/5499/toxicidade-escondida-nos-produtos-quimicos-texteis#:~:text=Os%20produtos%20qu%C3%ADmicos%20perigosos%20encontrados,anti%2D%20mancha%20ou%20impermeabiliza%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **A celulose microcristalina na indústria alimentícia**. Editora Insumos Ltda. vol. 15, n. 27, 2013.

GÍRIO, F. M. et al. **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review**. *Bioresource technology*, v. 101, p. 4775-4800, jul., 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852410001744?via%3Dihub>>.

Acesso em: 07 jun. 2022.

GROSSI, C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. 2015. 75f. Instituto de Química, Universidade de Brasília, Distrito Federal. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/18579>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

GUEDES, F. **Inovação na produção de etanol de segunda geração pela sacarificação de resíduos de algodão provenientes da indústria têxtil**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2012.

GUPTA, A.; VERMA, P. **Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review**. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 41, p. 550-567, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032114007084>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana-de-Açúcar: Estudo Cinético de Sacarificação de Celulose para Produção de Etanol**. 2010. 315 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, 2010. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75131/tde-25032011081629/publico/LeandroViniciusAlvesGurgelR.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

HOLTZ, M et al. **Cultivo de pleurotus ostreatus utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil**. *Revista de Ciências Ambientais*. 2009. 15f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Engenharia Química, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2009. Disponível em: <<https://revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/113/129>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

HONG, H.; SUN, G. **Photohydrolysis of cotton cellulose for producing bioethanol.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 129, p. 3782-3786, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.39019>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

HOYOS, C., CRISTIA, E., VÁZQUEZ, A. **Effect of cellulose microcrystalline particles on properties of cement based composites.** *Materials and Design*, v. 51, p. 810–818, 2013.

IHS MARKIT. **Cellulose Ethers.** *Chemical Economics Handbook*. 2016. Disponível em: <<https://ihsmarkit.com/products/cellulose-ethers-chemical-economics-handbook.html>>. Acesso em: 21 nov. 2022.

IVANOV, R. **Fermentação acética: abordando transformações químicas e bioquímicas.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/14816/2/PB_COQUI_2011_1_06.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2023.

JEIHANIPOUR, A.; TAHERZADEH, J. **Ethanol production from cotton-based waste textiles.** *Bioresource technology*, v. 100, p. 1007-1010, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852408006226>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

LEGOWSKI, C. **Caracterização e predição da cristalinidade de celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada.** 2012. Disponível em: <<https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/34600/R%20-%20D%20-%20ELAINE%20CRISTINA%20LENGOWSKI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 07 de jun. 2022.

LIU, Z. H.; CHEN, H. Z. **Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading.** *Bioresource Technology*, v. 201, p. 15–26, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852415015497>>. Acesso em 20 out. 2022.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. **Likely features and costs of mature biomass ethanol technology**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 57, n. 8, p. 741-761, 1996. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311345221_Features_of_promising_technologies_for_pretreatment_of_lignocellulosic_biomass>. Acesso em: 07 jun. 2022.

MACHADO, G. **Preparação e caracterização do CMC e CMC grafitizada**. 100 p. Dissertação (Ciência e Eng. dos Materiais) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade São Paulo – USP. São Carlos, SP. 2000. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-11092001-160555/publico/disgilmara.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2022.

MACHADO, M. **Modelagem matemática do processo de hidrólise da produção de etanol por meio do mecanismo enzimático de Michaelis-Menten**. 2019. 12 f. TCC (Graduação) - Curso de Graduação em Matemática, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/233924432.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MANIS, A. et al. **Separation of copper from sulfuric acid by nanofiltration**. 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/266234974_Separation_of_copper_from_sulfuric_acid_by_nanofiltration>. Acesso em: 11 out. 2022.

MILLER, G. L. **Modified DNS method for reducing sugars**. Anal Chem, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

MELO, Nicholas Rocha. **Etanol 2g: processo produtivo e seu contexto atual no brasil**. 2020. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. Disponível em:

<<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/31885/1/Etanol2GProcesso.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. **Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review**. *Biomass and Bioenergy*, v. 56, p. 526–544, 2013.

MONTEIRO, V. et al. **Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel**. 2003. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cta/a/fsfZj35NNBsVXkTfHJWrRQG/>>. Acesso em: 09 out. 2022

MONTES, A. C. R. **Avaliação do processo de obtenção de etanol de 2ª geração utilizando bagaço de cana**. 2017. Dissertação (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/20371/3/AvaliacaodoProcesso.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

MORAES, K. et al. **Avaliação das propriedades mecânicas de compósitos de matriz cimentícia com microcelulose cristalina**. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-707620180003.0514>>. Acesso em: 27 nov. 2022.

MOREIRA, L. et al. **The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes**. 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjm/a/qVWWT3gfGqFZ6yJS7D9vbXd/>>. Acesso em: 07 out 2022.

NIKOLIĆ, S. et al. **Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus***. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, v. 84, p. 497-503, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.2068>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

OGEDA, T; PETRI, D. **Hidrólise enzimática de biomassa**. 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/9n4nqyhZ3dVtZrpHQy5thDh/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 07 de jun. 2022.

PACHECO, T. F. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Circular Técnica 04, v. 1, p. 6, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32985/1/CITE-04.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

PEREIRA, A. L. S. **Extração de nanocelulose de fibras vegetais.** 2010. 54 f. Monografia. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PRATTO, B. et al. **Experimental optimization and techno-economic analysis of bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation process using sugarcane straw.** *Bioresource Technology*, v. 297, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419317249>>. Acesso em: 08 abr. 2022.

PRATTO, B. et al. **Rational feeding strategies of substrate and enzymes to enzymatic hydrolysis bioreactors.** *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, v. 28 (3), p.191–201, 2022.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e Otimização de processos.** Third ed. ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

ROSA, S; GARCIA, J. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades.** 2009. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/10017/1/RB%2032%20O%20etanol%20de%20segunda%20gera%20c3%a7%20c3%a3o_limites%20e%20oportunidades_P_BD.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2022.

RUDOLF, A. et al. **A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 195-204, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022905000876>>. Acesso em: 30 out. 2022.

SALAZAR, S. et al. **Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos**. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Unicamp, SP, 2005.

SANCHEZ, J.; CARDONA, A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks**. *Bioresource technology*, v. 99, p. 5270-5295, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852407009376>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

SANCHIS-SEBASTIÁ, M. et al. **Novel sustainable alternatives for the fashion industry: A method of chemically recycling waste textiles via acid hydrolysis**. *Waste Management*, v. 121, p. 248-254, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X20307194> >. Acesso em: 05 jun. 2022.

SANTOS, F. et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/i/qn/a/39pFr9k5VPS9hqhs4yTjdbr/?lang=pt>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

SARKAR, N. **Bioethanol production from agricultural wastes: an overview**. *Renewable energy*, v. 37, p. 19-27, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096014811100382X>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

SHIMIZU, F. **Remoção de lignina e hemicelulose: influência na acessibilidade à celulose e sacarificação enzimática**. 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/153394/shimizu_fl_me_rcla.pdf?sequence=5>. Acesso em: 09 abr. 2022.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. *Laboratory Analytical Procedure*. 2008. Disponível em: <

https://www.researchgate.net/profile/Mofoluwake-Ishola/post/How_can_we_find_out_the_cellulose_hemicellulose_and_lignin_compositions_of_lignocellulosic_biomass/attachment/59d622ecc49f478072e9926e/AS%3A272120532144135%401441889998912/download/Determination+of+Structural+Carbohydrates+and+Lignin+in+Biomass.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2022.

SONEGO, J. et al. **Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO₂ Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling**. *Energy & Fuels*, v. 30, p. 748-757, 2016. Disponível em: <https://proceedings.science/proceedings/44/_papers/38840/download/fulltext_file3>. Acesso em: 08 abr. 2022.

SUN, X. et al. **Melt-processed poly (vinyl alcohol) composites filled with microcrystalline cellulose from waste cotton fabrics**. *Carbohydrate polymers*, v. 101, p. 642-649, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861713009892>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review**. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852401002127>>. Acesso em: 07 abr. 2022.

THE Story of Holocellulose, 14 Jun. 2019 (30 min). Publicado pelo canal: RISE – Research Institutes of Sweden. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=3q7n41gahj8&ab_channel=riseresearchinstitutesofsweden>. Acesso em: 7 out. 2022.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. *Alpha, beta and gamma cellulose in pulp: T203 cm-99*. Atlanta, 1999.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. *Ash in wood, pulp, paper and paperboard: T211 om-02*. Atlanta, 2002.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRYI. Preparation of wood for chemical analysis: T264 om-88: Atlanta, 1996.

TEIXEIRA, E. et al. **Nanofibras de Algodão Obtidas sob Diferentes Condições de Hidrólise Ácida**. Polímeros, vol. 20, nº 4, p. 264-268, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/po/a/rppsXrcvyQKV9sjPF3C3jbm/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

TEODORO, K et al. **Avaliação da morfologia, cristalinidade e estabilidade térmica de whiskers de algodão extraídos sob diferentes condições reacionais**. 12º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2013. Disponível em: <<http://e-democracia.com.br/cbpol/anais/2013/pdf/6FPN.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

VARGA, E. et al. **High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol**. Biotechnology and Bioengineering, v.88, p. 567-574, 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.20222>>. Acesso em: 30 out. 2022.

XU, Z.; HUANG, F. Pretreatment methods for bioethanol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 43–62, 2014.

ZABED, H. et al. **Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches**. Renewable and sustainable energy reviews, v. 66, p. 751-774, dez., 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032116304695>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

**APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS
AÇÚCARES REDUTORES**

