



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGROENERGIA
DIGITAL**

HYANARA EVANGELISTA OLIVEIRA

**ETANOL SUSTENTÁVEL A PARTIR DE PAPELÃO: UMA SOLUÇÃO
AMBIENTALMENTE CONSCIENTE PARA A INDÚSTRIA DE
BIOCOMBUSTÍVEIS DE SEGUNDA GERAÇÃO**

HYANARA EVANGELISTA OLIVEIRA

**ETANOL SUSTENTÁVEL A PARTIR DE PAPELÃO: UMA SOLUÇÃO
AMBIENTALMENTE CONSCIENTE PARA A INDÚSTRIA DE
BIOCOMBUSTÍVEIS DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroenergia Digital, da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Agroenergia Digital.

Orientador: Dr. Guilherme Benko de Siqueira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- O48e Oliveira, Hyanara Evangelista.
 Etanol Sustentável a partir de papelão: uma solução
 ambientalmente consciente para a indústria de biocombustíveis de
 segunda geração.. / Hyanara Evangelista Oliveira. – Palmas, TO, 2025.
 47 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
 Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-
 Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2025.
 Orientador: Guilherme Benko de Siqueira
1. Bioetanol. 2. Papelão. 3. Pré-tratamentos. 4. Hidrólise
 enzimática. I. Título

CDD 333.7

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

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

HYANARA EVANGELISTA OLIVEIRA

**ETANOL SUSTENTÁVEL A PARTIR DE PAPELÃO: UMA SOLUÇÃO
AMBIENTALMENTE CONSCIENTE PARA A INDÚSTRIA DE
BIOCOMBUSTÍVEIS DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia Digital (PPGAD). Foi avaliado para a obtenção do título de Mestre em Agroenergia Digital e aprovado em sua forma final pela Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 09 / 06 / 2025

Banca Examinadora:

Prof.Dr.Guilherme Benko de Siqueira
Orientador (UFT)

Prof.Dra.Ana Beatriz Garcia
Faitarone
Examinador Interno (UFT)

Prof.Dr. Otávio Cabral Neto
Examinador Externo (IFTO)

*Dedico este trabalho á todos que
acreditaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao Criador por me conceder a vida.

A minha família, por sempre me apoiar.

Ao Prof. Dr. Guilherme Benko pela orientação e apoio.

Aos meus amigos por sempre acreditarem em mim.

As minhas amigas Ariane e Lorranna por me seder suas casas em longas jornadas de estudo.

Ao meu colega de pesquisa Severino, por todo companheirismo.

Ao Domingos, técnico do laboratório LASOR por toda a disposição e ajuda.

As técnicas Cris e Márcia do laboratório LAMBIO que sempre estiveram dispostas a sanar qualquer duvida.

A professora Dra. Paula Benevides de Moraes por permitir a realização de partes do experiemento no laboratório que esta sob sua cordenação.

Ao Professor Dr. Tarso da Costa Alvim por permitir a realização das análises realizadas no laboratório que está sob sua coordenação

A Gabriela, técnica do laboratório LABIC pelas análises realizadas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A produção de bioetanol a partir de papelão é um processo que envolve a transformação de resíduos de papelão em uma fonte de energia renovável, o etanol. Esse método faz parte de uma abordagem sustentável para a reciclagem de resíduos e a geração de combustíveis alternativos. O bioetanol produzido a partir do papelão pode ser utilizado como combustível em veículos, podendo ser misturado à gasolina em diferentes proporções, reduzindo assim a dependência de combustíveis fósseis e contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa. Essa abordagem tem o potencial de reduzir a quantidade de resíduos de papelão em aterros sanitários, além de oferecer uma fonte de energia renovável e sustentável, contribuindo para a economia circular e para a redução do impacto ambiental causado pela queima de combustíveis fósseis. A produção deste bioetanol tem como objetivo analisar os efeitos dos pré-tratamentos, determinando se eles influenciam significativamente na produção do bioetanol ou não. O processo de produção de bioetanol a partir de papelão envolve várias etapas. Primeiramente, o papelão é coletado e passa pelos processos de pré-tratamento, nos quais foram adotados dois tipos diferentes: um utilizando água em temperatura ambiente e o outro utilizando fervura. Em seguida, é triturado para facilitar o processo de hidrólise. Após a preparação do material, o papelão é submetido a um processo de hidrólise enzimática. Na hidrólise enzimática, enzimas específicas são usadas para realizar essa quebra. Posteriormente, os açúcares resultantes são fermentados por leveduras que convertem esses açúcares em etanol. Após a fermentação, o líquido resultante é destilado para separar o etanol da solução, obtendo-se assim o bioetanol. Os resultados destacam a influência negativa do pré-tratamento de fervura, onde as altas temperaturas causam alteração na composição química da matéria-prima, afetando diretamente a produção de etanol.

Palavras-chaves: Bioetanol. Papelão. Pré-tratamentos. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The production of bioethanol from cardboard is a process that involves transforming cardboard waste into a renewable energy source, ethanol. This method is part of a sustainable approach to waste recycling and alternative fuel generation. Bioethanol produced from cardboard can be used as a fuel in vehicles, being mixed with gasoline in different proportions, thus reducing dependence on fossil fuels and contributing to the reduction of greenhouse gas emissions. This approach has the potential to reduce the amount of cardboard waste in landfills, as well as to offer a renewable and sustainable energy source, contributing to the circular economy and reducing the environmental impact caused by the burning of fossil fuels. The aim of producing this bioethanol is to analyze the effects of pre-treatments, determining whether they significantly influence ethanol production or not. The process of producing bioethanol from cardboard involves several steps. Firstly, cardboard is collected and undergoes pre-treatment processes, where two different types are adopted: one using water at room temperature and the other using boiling. Then, it is crushed to facilitate the hydrolysis process. After preparing the material, the cardboard is subjected to an enzymatic hydrolysis process. In enzymatic hydrolysis, specific enzymes are used to perform this breakdown. Subsequently, the resulting sugars are fermented by yeast, which convert these sugars into ethanol. After fermentation, the resulting liquid is distilled to separate the ethanol from the solution, thus obtaining bioethanol. The results highlight the negative influence of boiling pre-treatment, where high temperatures cause changes in the chemical composition of the raw material, directly affecting ethanol production.

Keywords: Bioethanol, Cardboard, Pre-treatments, Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Papelão face simples.....	15
Figura 2: Papelão parede simples.	15
Figura 3: Papelão parede dupla.....	15
Figura 4: Papelão parede tripla.....	16
Figura 5: Papelão parede múltipla.	16
Figura 6: Fórmula química da celulose.....	19
Figura 7: Fórmula química da hemicelulose.	20
Figura 8: Pré-tratamento, trituração, secagem e moagem.....	25
Figura 9: Hidrólise Enzimática.	25
Figura 10: Etanol Fermentado.	25
Figura 11: Papelão de parede dupla.....	26
Figura 12: Padronização do tamanho do papelão.	27
Figura 13: Pré-tratamento 1.....	27
Figura 14: Pré-tratamento 2.....	28
Figura 15: Amostra processada.....	28
Figura 16: Fermentação.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentual dos países que mais produzem bioetanol no mundo. 17

Gráfico 2: Percentual de produção de bioetanol nas Regiões do Brasil. 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de FDN, FDA e hemicelulose do papelão com dois pré-tratamento.....	32
Tabela 2: Resumo da análise de variância.	33
Tabela 3: Coeficiente de hidrólise (Coef.Hid.) de amostras submetidas a diferentes tratamentos de temperatura.....	34
Tabela 4: Estimativa do potencial de produção de etanol baseado no coeficiente de hidrólise (ETANOL_CH) sob diferentes condições de temperatura.	36
Tabela 5: Teor de etanol após fermentação (ETANOL_FER) sob diferentes condições de temperatura e purificação.	36
Tabela 6: Coeficiente de fermentação (razão ET_fer / ET_ch) sob diferentes condições de temperatura e purificação.	38
Tabela 7: Resumo da análise de variância.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância;

ATP – Adenosina Trifosfato;

CH – Coeficiente de Hidrólise;

CO₂ – Dióxido de Carbono;

CTAB – Brometo de Cetil Trimetil Amônio (Cetyltrimethylammonium Bromide);

CV – Coeficiente de Variação;

C₂H₆O – Álcool Etílico;

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado;

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (Ethylenediaminetetraacetic Acid);

EMPAPEL – Associação Brasileira de Embalagens em Papel;

ETANOL_FERMEN – Etanol Fermentado;

ETANOL_CH – Etanol estimado pelo Coeficiente de Hidrólise;

ET_FERM / ET_CH – Relação entre o Etanol Fermentado e o Etanol Estimado pelo CH;

FDA – Fibra em Detergente Ácido;

FDN – Fibra em Detergente Neutro;

GC – Gênero Candida;

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography);

H₂O – Água;

LASOR – Laboratório de Análise de Solos e Resíduos Agroindustriais;

MS – Massa Seca;

PH- Potencial Hidrogeniônico;

PROALCOOL – Programa Pro-Álcool;

RFA – Renewable Fuels Association (Associação de Combustíveis Renováveis);

RSU – Resíduos Sólidos Urbanos;

SHF – *Separate Hydrolysis and Fermentation* (Hidrólise e Fermentação Separada);

UFT – Universidade Federal do Tocantins;

1G – Primeira Geração;

2G – Segunda Geração;

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.2	Papelão como matéria-prima	14
2.3	Produção de Bioetanol.....	16
2.4	Biomassa lignocelulósica	18
2.4.1	Celulose.....	19
2.4.2	Hemicelulose	20
2.4.3	Lignina	20
2.5	Etapas de obtenção do Etanol	21
2.5.1	Pré-tratamento.....	22
2.5.2	Hidrólise.....	22
2.5.3	Fermentação.....	23
3.	OBJETIVO.....	23
3.1	Objetivos Específicos.....	23
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	Metologia	24
4.2	Produção de Etanol	26
4.3	Matéria-prima.....	26
4.5	Pré-Tratamentos.....	27
4.6	Caracterização das biomassas após os pré-tratamentos.....	29
4.7	Hidrólise enzimática	29
4.8	Fermentação	30
4.9	Delineamento Experimental e Análise Estatística	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	Caracterização das biomassa	32
5.2	Resumo da Análise de Variável	33
5.3	Coeficiente de Hidrólise	34
5.5	Coeficiente de Fermentação	37
5.6	Quadro de Correlação	38
6.	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Ao analisar a sociedade atual, nota-se uma forte presença do crescimento do consumo de energia, que em sua maioria provém de fontes não renováveis, como os combustíveis fósseis, exemplificados pelo petróleo e pelo carvão mineral. Essas fontes, por sua vez, são responsáveis pelo aumento do CO₂ (dióxido de carbono) na atmosfera, o que ocasiona o efeito estufa (Safari et al., 2022).

Na busca por fontes alternativas de suprimento energético, a biomassa torna-se uma opção atrativa, utilizando insumos renováveis provenientes de matéria orgânica para a produção de biocombustíveis. A biomassa subutilizada causa problemas ambientais quando descartada, portanto, encontrar usos para este material reduz o desperdício e, ao mesmo tempo, gera novos métodos de produção de combustível (Moser et al., 2023).

De maneira geral, os biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis provenientes de matérias-primas renováveis, principalmente de origem vegetal. O ciclo do carbono envolve a absorção de CO₂ da atmosfera pelas plantas e outros organismos vivos que realizam a fotossíntese, convertendo-o em carboidratos, triglicerídeos e outras substâncias orgânicas. Dessa forma, os biocombustíveis têm um balanço neutro em termos de carbono, pois o CO₂ emitido durante a queima pode ser reabsorvido pelas plantas no processo de fotossíntese (MOTA; MONTEIRO, 2013).

A produção dos biocombustíveis líquidos, como o etanol, pode ser realizada por meio da fermentação de açúcares (etanol de primeira geração) extraídos de meios vegetais como a cana-de-açúcar, o milho, a mandioca, a batata-doce, entre outras fontes (OGEDA & PETRI, 2010). Além disso, há a produção de etanol realizada pela hidrólise da biomassa celulósica, onde, por meio de bactérias ou leveduras com sistemas digestivos específicos, é possível quebrar o amido de matérias-primas, como o lixo urbano, culturas energéticas de curto ciclo e resíduos florestais, transformando-os em biocombustível (etanol de segunda geração) (BRANCO et al., 2018).

A indústria de papel e celulose é o terceiro maior contribuinte de resíduos biológicos. Os biorresíduos sólidos desse setor são produzidos principalmente durante os processos de destintagem, polpação e tratamento. Esses resíduos são ricos em conteúdo orgânico e representam uma ameaça ao ecossistema se descartados. A digestão anaeróbica ou outros processos auxiliam na bioconversão desses resíduos em energia (AL BATTASHI, HUDA, et al., 2021).

Considerando que a indústria global de celulose produz cerca de 400 milhões de toneladas de papel e papelão, esses materiais são responsáveis por 10% do total de resíduos sólidos urbanos (RSU), devido ao aumento do seu consumo nos últimos 40 anos (BRANCO et al., 2018). Em média, 58% desses resíduos são reciclados, produzindo produtos como jornais, guardanapos, envelopes, caixas de papelão e outros produtos. A utilização desses resíduos derivados do papel e papelão representa um recurso valioso para a produção de bioetanol, além de ser uma alternativa para reduzir a gestão de resíduos, como a reciclagem, a incineração e o aterro, devido à crescente geração de resíduos pelo aumento populacional (OZOLA et al., 2019).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biocombustíveis através de resíduos

Devido ao alto crescimento populacional, as fontes derivadas de recursos fósseis tornaram-se insustentáveis como meio de abastecimento único de energia combustível, dando espaço para os biocombustíveis, que estão se mostrando um substituto mais viável. Esses biocombustíveis podem ser produzidos a partir de uma grande variedade de biomassas (WANG et al., 2023).

Os biocombustíveis são utilizados para lidar com questões ambientais, sendo classificados como: (i) biocombustíveis de primeira geração; (ii) biocombustíveis de segunda geração. Os biocombustíveis de primeira geração são obtidos diretamente de animais, plantas e resíduos agrícolas, enquanto os biocombustíveis de segunda geração são produzidos por meio da combinação de biomassa com tecnologias avançadas, como a hidrólise enzimática e a gaseificação (HAFNER et al., 2018).

Os combustíveis feitos a partir de biomassa são fontes renováveis e contribuem para a redução do aquecimento global e da poluição. É sabido que o aquecimento global é causado pela liberação de gases de efeito estufa resultantes da combustão de combustíveis fósseis, sendo responsáveis por 29 gigatoneladas de emissões de CO₂ por ano, totalizando 35,3 gigatoneladas de emissões de CO₂ até o momento (ACS ENERGY LETT, 2021).

2.2 Papelão como matéria-prima

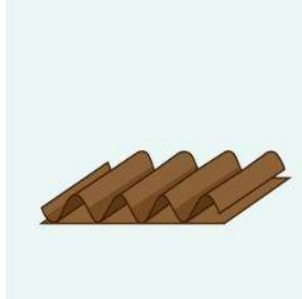
O papelão é um material com base de fibras celulósicas de fibras longas, obtidas através de árvores, onde através de fibras virgens e fibras recicladas adquiridas principalmente a partir das madeiras de Pinus. Embora o papelão possa ser reciclado diversas vezes, eventualmente torna-se inadequado para esse fim. Nesse sentido, ao invés de ser descartado em aterros, pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de bioetanol, conforme apontado por Vidal (2012).

Conforme apontado em uma pesquisa conduzida pelo Mercado Mineiro em 2023, os valores pagos pelo quilo de material destinado à reciclagem sofreram uma drástica redução como no caso do papelão, passando de R\$ 0,78 para apenas R\$ 0,21, o que representa uma queda expressiva de 73%. Embora seja importante ressaltar que os preços por quilo podem variar conforme a região, de maneira geral, a ocorrência da pandemia teve um impacto significativo.

Segundo a Empapel (Associação Brasileira de Embalagens em Papel), cerca de 75% dos produtos no mundo utilizam papelão ondulado em seu transporte e proteção. O papelão ondulado é formado por elementos planos (capa) e ondulados (miolo) em sua composição, e suas classificações são definidas pelo número de suas estruturas.

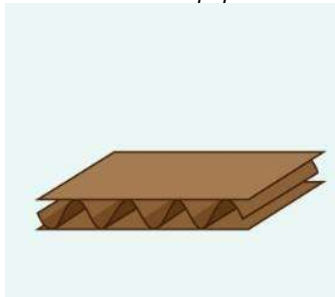
O papelão de face simples é uma estrutura composta por uma camada ondulada (miolo) colada a uma camada plana (capa), conforme representado na Figura 1.

Figura 1: Papelão face simples.
Fonte: Empapel.



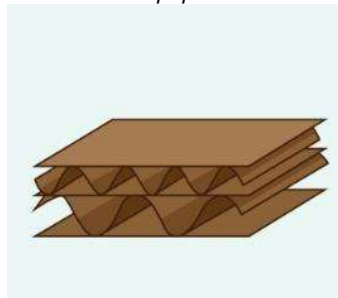
O papelão de parede simples a sua estrutura é composta por um elemento ondulado (miolo) que é colado em ambos os lados por um elemento plano (capa) como será representado na Figura 2.

Figura 2: Papelão parede simples.
Fonte: Empapel.



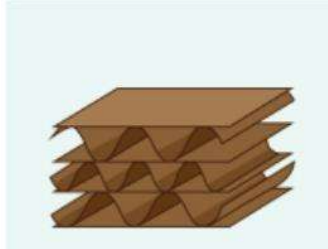
O papelão parede dupla é composto por três elementos planos (capas) colados e intercalados em dois elementos ondulados (miolo), como será representado na Figura 3.

Figura 3: Papelão parede dupla.
Fonte: Empapel.



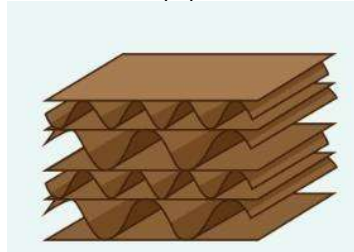
O papelão parede tripla é composto por quatro elementos planos (capa) colados e intercalados em três elementos ondulados (miolo) como será representado na Figura 4.

Figura 4: Papelão parede tripla.
Fonte: Empapel.



Em sua última classificação, o papelão de parede múltipla onde é composto por cinco ou mais elementos planos (capa) colados e intercalados em quatro ou mais elementos ondulados (miolo) como será representado na figura 5.

Figura 5: Papelão parede múltipla.
Fonte: Empapel.



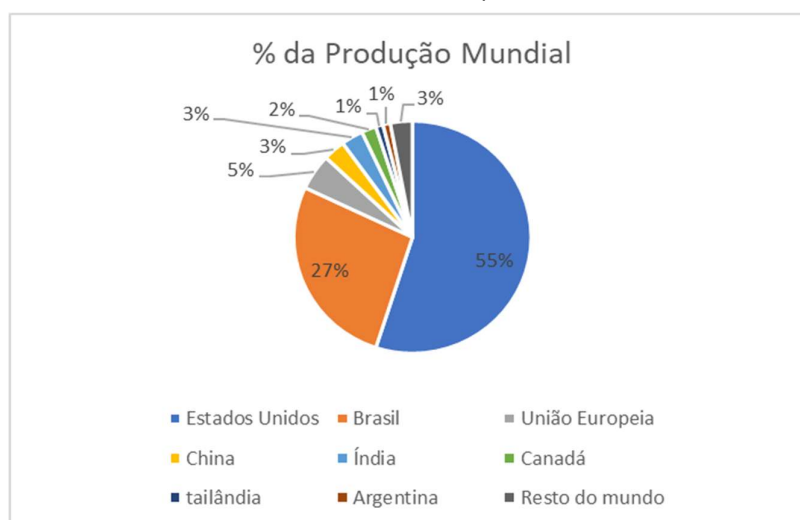
2.3 Produção de Bioetanol

A produção do bioetanol é realizada pela fermentação de açúcares ou por meio de ingredientes ricos em amido, incluindo grãos, milho e trigo. Atualmente, a biomassa lignocelulósica e outros materiais contendo sacarose são utilizados como matérias-primas para produção de etanol de baixo custo (EL-SHEEKH et al., N.D.).

A produção de etanol utilizando matéria-prima rica em açúcar e amido caracteriza o etanol de primeira geração (1G), o qual possui limitações em atender à demanda do mercado, já que sua matéria-prima é utilizada para a produção de alimentos. Por outro lado, o etanol que utiliza biomassa residual, conhecido como etanol celulósico ou etanol de segunda geração (2G), apresenta-se como uma alternativa mais viável para o suprimento do mercado (DE C. L. E PENALVA SANTOS et al., 2023).

Segundo o relatório da RFA (Renewable Fuels Association), a produção mundial de etanol em 2021 alcançou a marca de 27 bilhões de galões. Dos quais, 15 bilhões foram produzidos pelos Estados Unidos, que atualmente é o maior produtor de etanol do mundo, seguido pelo Brasil, que produziu 7,5 bilhões de galões, tendo a cana-de-açúcar como principal matéria-prima (BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS et al., 2023). O Gráfico 1 apresenta o percentual dos principais países produtores de bioetanol no mundo.

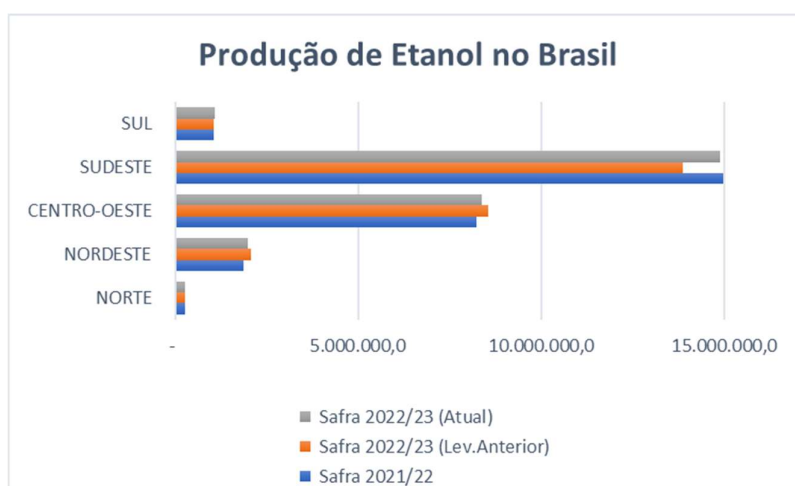
Gráfico 1: Percentual dos países que mais produzem bioetanol no mundo.
Fonte: International Trade and Exports.



Como podemos observar no Gráfico 1, o Brasil está na segunda posição como o maior produtor de etanol no mundo. Este cenário se deve ao programa Pró-álcool (PROALCOOL) lançado no Brasil em 1975, com o objetivo de substituir de 20 a 25 por cento da gasolina da época por etanol (DE C. L. E PENALVA SANTOS et al., 2023).

A estimativa de produção de etanol no Brasil para 2023 é de um aumento de 0,7% em relação à safra anterior. Essa análise pode ser baseada em estatísticas das safras anteriores, como pode ser observado no Gráfico 2, que apresenta os índices de produção de etanol no Brasil.

Gráfico 2: Percentual de produção de bioetanol nas Regiões do Brasil.
Fonte: Conab.



2.4 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um recurso natural renovável utilizado para produção de energia (EICHLER, 2015). Essa fonte de energia é descrita como uma reserva de energia química acumulada em processos fotossintéticos (BNDES e CGEE, 2008).

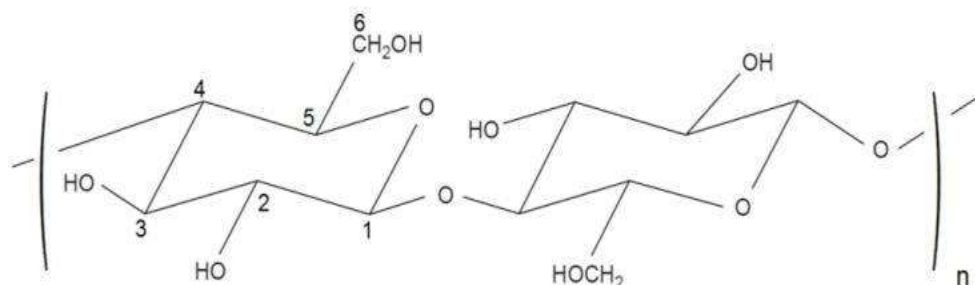
A estruturação dessa biomassa é composta por três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina. Além disso, apresenta pequenas quantidades de extrativos e cinzas (SANTOS, F. A et al., 2014).

2.4.1 Celulose

A celulose é o material orgânico mais presente no planeta, cuja produção anual totaliza cerca de 50 bilhões de toneladas e representa de 20% a 40% do peso seco da parede celular das plantas (PEREIRA, N. R. L. et al., 2019).

A sua estrutura consiste em um homopolissacarídeo linear composto por unidades de β -D-glicopiranoose unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas (BRANCO et al., 2018). A celulose é um polímero de cadeia longa de glicose, onde as cadeias químicas são unidas por pontes de hidrogênio (SHOKROLLAHI; DENAYER; KARIMI, 2023). A celulose pode ser dividida em celulose complexa e celulose pura (DONINI, Igor AN et al., 2010). Na Figura 6 é apresentada a fórmula química da celulose.

Figura 6: Fórmula química da celulose.



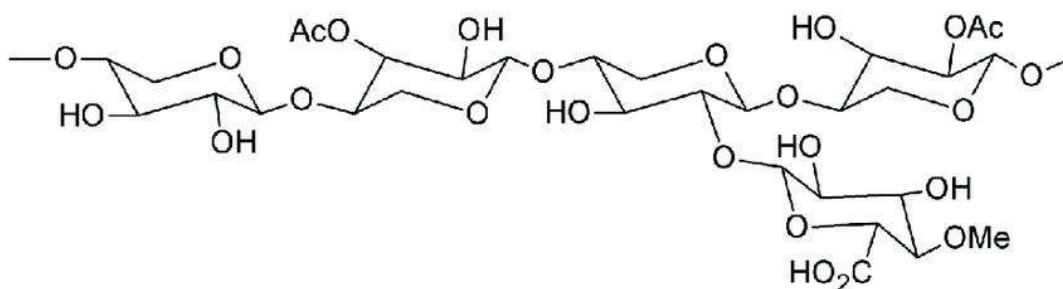
No Brasil, o setor de celulose é um importante gerador de empregos, sendo responsável por cerca de 768 mil postos de trabalho (ABTCP, 2017). Além disso, a indústria de papel brasileira é uma das maiores do mundo, ocupando a 9ª posição no ranking global de fabricantes. O país também se destaca na produção de celulose, ocupando o 2º lugar e produzindo mais de 18 milhões de toneladas anualmente (MARTINEZ, M. E. M. et al., 2018).

2.4.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um carboidrato principalmente amorfo, com predominância do monossacarídeo xilose, contendo cinco ou seis açúcares de carbono que atuam como uma ponte que mantém as fibrilas de celulose unidas (BRANCO et al., 2018).

Podemos encontrá-la em três principais grupos: pentoses, hexoses e ácidos urônicos, que são ramificações desses heteropolissacarídeos mais curtos e altamente ramificados (BORGES, 2020). Na Figura 7 está representada a fórmula química da hemicelulose.

Figura 7: Fórmula química da hemicelulose.



Segundo Sun (1996), a hemicelulose possui um grande potencial de reação química devido à presença de cadeias laterais em sua estrutura, o que facilita reações químicas, como a hidroxilação das unidades de β -D-xilose.

2.4.3 Lignina

A lignina não é utilizada na produção de bioetanol, porém possui produtos aromáticos de alto valor agregado. Ela possui uma matriz polimérica amorfa, altamente hidrofóbica e não polissacarídica, além de ser um polifenólico com massa molecular indefinida. É composta por unidades estruturais de p-hidroxifenil, guaiacil e siringil ligadas por ligações éter e também com ligações carbono-carbono entre essas unidades estruturais, o que confere à lignina uma estrutura irregular e complexa (BRANCO et al., 2018).

A lignina é frequentemente utilizada na indústria de produção de papel e celulose para a geração de calor mediante sua queima, devido ao seu elevado teor energético (LEIBBRANDT, N. H et al., 2011). Suas propriedades físicas e químicas dependem diretamente da espécie vegetal estudada e da técnica adotada para a extração (RODRIGUES, J. S. et al., 2020). Ela é responsável por proporcionar maior rigidez estrutural, durabilidade dos tecidos e transporte de água nos vasos do xilema, além de funcionar como uma barreira à ação patogênica, inibir o crescimento e complexar os carboidratos e proteínas (BEZERRA, Janieire et al., 2020).

2.5 Etapas de obtenção do Etanol

A utilização de biomassa lignocelulósica para produção de etanol se destaca como uma grande potencialidade devido ao fato de ser um recurso abundante na Terra, representando cerca de 50% da biomassa mundial. Além disso, é uma opção relativamente barata e não faz parte da cadeia alimentar humana, tornando-se assim uma opção viável para produção de etanol de segunda geração (FERNANDES, M. C. et al., 2015).

Por ser formada por polímeros de celulose e hemicelulose, protegidos por uma matriz polimérica de lignina (parede vegetal), a biomassa lignocelulósica apresenta uma barreira à ação de microrganismos fermentadores, o que requer pré-tratamento para aumentar os rendimentos e a eficiência dos procedimentos de produção do bioetanol (SANTOS, Ciro M. et al., 2020).

É importante destacar que, durante a hidrólise, as enzimas são adicionadas à biomassa lignocelulósica para quebrar as moléculas de celulose e hemicelulose em açúcares simples, principalmente a glicose, que são posteriormente fermentados pelas leveduras para produção do bioetanol (SANTOS, Ciro M. et al., 2020).

2.5.1 Pré-tratamento

Existem inúmeros métodos de pré-tratamento, cada um com rendimentos e efeitos específicos sobre a biomassa, que interferem diretamente nas próximas etapas para a obtenção de bioetanol. Os mais utilizados são pirólise, explosão a vapor, explosão de fibra de amônia, explosão de CO₂, ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organosolv (SUN & CHENG, 2005).

O pré-tratamento pode ser classificado em: (i) físico, onde ocorre moagem ou trituração; (ii) físico-químico, que envolve o uso de água quente, explosão a vapor, alta energia de radiação e explosão por fibra de amônia; (iii) químico, que usa líquidos iônicos, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácidos diluídos ou concentrados, bases alcalinas como hidróxido de sódio, com e sem catalisador e explosão a vapor com catálise; (iv) biológico, utilizando fungos de degradação. Esses pré-tratamentos podem ser combinados entre si, lembrando que todos têm suas vantagens e desvantagens (RUIZ, Héctor A. et al., 2013).

2.5.2 Hidrólise

A hidrólise é responsável pela conversão da celulose em glicose. Existem três técnicas para sua aplicação, sendo elas: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática (OGEDA & PETRI, 2010).

A hidrólise com ácidos é realizada em baixas temperaturas, o que resulta em um rendimento alto de hexoses e pentoses, além de limitar a quantidade de produtos de degradação de açúcares. No entanto, é necessário uma recuperação eficiente do ácido (OGEDA & PETRI, 2010). Apesar de possuir vantagens por ser uma tecnologia conhecida, a hidrólise com ácido apresenta uma desvantagem na utilização do ácido como catalisador, o que resulta em uma reação muito rápida e dificulta o controle de reações paralelas indesejáveis (Bastos, V. D, 2007). Segundo Ogeda e Petri, a hidrólise com ácido diluído demanda o uso de altas temperaturas, o que pode ocasionar degradação nas extensões químicas, prejudicando a fermentação.

A hidrólise enzimática utiliza enzimas para quebrar a celulose e a lignina, resultando na produção de açúcares redutores, como a glicose, que pode ser fermentada para produzir bioetanol ou convertida em metano. No entanto, a eficiência do processo de hidrólise em relação à liberação de glicose é influenciada por enzimas caras e um longo tempo de retenção. De acordo com OZOLA et al. (2019), foi observado que os métodos de pré-tratamento melhoram o resultado do processo.

2.5.3 Fermentação

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que possibilita a transformação de açúcares em álcool etílico (C_2H_6O) e dióxido de carbono (CO_2), catalisado por enzimas. Este processo ocorre por meio de leveduras no nível citoplasmático, tendo como objetivo a produção de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato), que é empregada nas funções fisiológicas, como crescimento e reprodução de micro-organismos (DE GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso et al., 2018).

Para obter um bom rendimento e eficiência na transformação de açúcar em etanol durante a fermentação alcoólica, é necessário escolher o processo mais adequado de acordo com as propriedades cinéticas dos microrganismos fermentadores e do tipo de matéria-prima utilizada. Além disso, o processo está correlacionado com fatores físicos, como temperatura e pressão osmótica, fatores químicos, como pH (potencial Hidrogeniônico), oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos e inibidores, e fatores microbiológicos, como espécie, linhagem e concentração da levedura e contaminação bacteriana (LIMA et al., 2001).

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é apresentar a potencialidade do papelão como matéria prima para produção de bioetanol.

3.1 Objetivos Específicos

- Analisar a eficiência do pré-tratamento;
- Analisar o coeficiente de hidrólise dos materiais;
- Avaliar os efeitos dos fatores estudados sobre a produção de etanol a partir do papelão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Metodologia

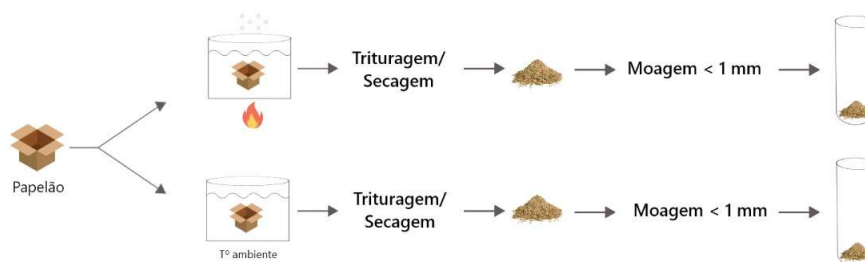
Este ensaio experimental foi conduzido no Laboratório de Solos e Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais da Universidade Federal do Tocantins (LASOR) – UFT/Palmas-TO.

Para a produção de bioetanol a partir de papelão, foi realizadas as seguintes etapas experimentais:

- Seleção do papelão adequado.
- Desidratação inicial do papelão em uma estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 24 horas.
- Pré-tratamento 1: Imersão do papelão em água a temperatura ambiente para solubilizar as frações solúveis e facilitar a trituração.
- Pré-tratamento 2: Fervura do papelão em água para solubilizar as frações solúveis e facilitar a trituração.
- Desidratação do papelão obtido a partir dos pré-tratamentos em uma estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 24 horas.
- Moagem do papelão com moinho de facas e uma peneira de malha 1mm.
- Hidrólise enzimática dos carboidratos fibrosos celulose e hemicelulose do material triturado.
- Incubação do hidrolisado (açúcares solúveis) para a fermentação utilizando *saccharomyces cerevisiae*.
- Análise das amostras fermentadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com o objetivo de quantificar os açúcares residuais e o etanol produzido.

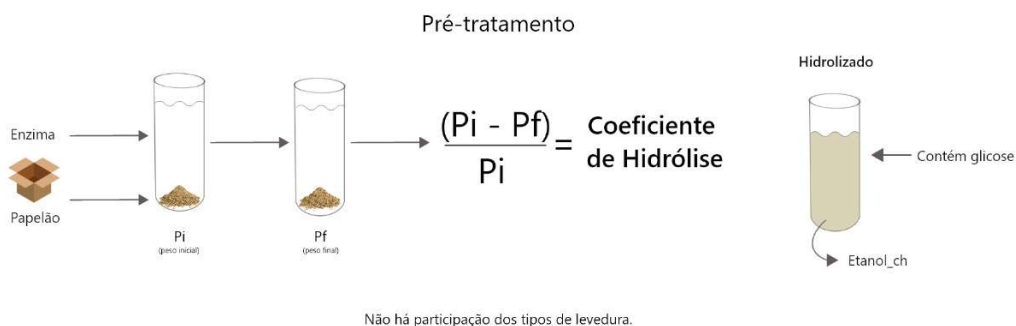
O processo inicial é composto pelas etapas de pré-tratamento, secagem e moagem, conforme representado na Figura 8.

Figura 8: Pré-tratamento, trituração, secagem e moagem.
Fonte: Própria autora.



Após a preparação das amostras, realiza-se o processo de hidrólise enzimática, no qual enzimas são adicionadas às amostras. Nessa etapa, o etanol estimado é calculado por meio do coeficiente de hidrólise (Etanol_{CH}). Esse processo está ilustrado na Figura 9.

Figura 9: Hidrólise Enzimática.
Fonte: Própria autora.



A introdução das leveduras foi realizada por meio de dois procedimentos distintos: um utilizando leveduras não purificadas e outro com leveduras previamente purificadas. Após essa etapa, ocorre a formação do etanol fermentado, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Etanol Fermentado.
Fonte: Própria autora.



4.2 Produção de Etanol

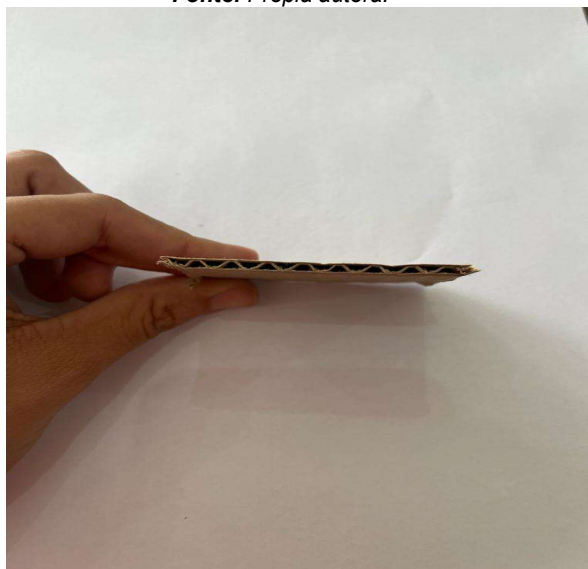
O processo para obtenção de etanol seguirá o método de Hidrólise e Fermentação Separada (*Separate Hydrolysis and Fermentation* - SHF), descrito por Pereira Jr et al. (2008). Em primeiro lugar, será feito o pré-tratamento da biomassa (papelão), seguido da hidrólise enzimática do resíduo do pré-tratamento e, por fim, a fermentação será realizada. As etapas do processo serão executadas separadamente, garantindo assim uma produção mais eficiente e controlada de bioetanol a partir do papelão.

A etapa final do processo consistiu na análise do etanol fermentado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Essa técnica foi utilizada para quantificar, com precisão, a concentração de etanol produzida durante a fermentação. O HPLC é amplamente reconhecido por sua alta sensibilidade, reprodutibilidade e confiabilidade na identificação e quantificação de compostos em amostras complexas, sendo, portanto, essencial para validar os resultados obtidos neste estudo

4.3 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada no presente estudo foi o papelão de parede dupla, composto por duas capas e um miolo. O material foi obtido em locais de descarte na cidade de Paraíso do Tocantins, no ano de 2023. Sua classificação pode ser observada na Figura 11.

Figura 11: Papelão de parede dupla.
Fonte: Própia autora.



Após a obtenção, foi realizada a padronização do tamanho do material, com o objetivo de facilitar os processos subsequentes. O papelão foi cortado manualmente em pedaços de aproximadamente 2 (dois) centímetros (Figura 12) e, em seguida, submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 55 °C por 24 horas.

Figura 12: Padronização do tamanho do papelão.
Fonte: Própia autora.



4.5 Pré-Tratamentos

No procedimento de pré-tratamento 1, cada amostra seca de 10 g foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL, juntamente com 250 mL de H₂O, sendo agitada em mesa agitadora modelo Solab, a 150 rpm e 25 °C, por 24 horas. Em seguida, foram adicionados mais 100 mL de H₂O para facilitar a trituração, realizada em liquidificador. O processo referente ao pré-tratamento 1 está ilustrado na Figura 13.

Figura 13: Pré-tratamento 1.
Fonte: Própia autora.



No pré-tratamento 2, cada amostra seca de 10 g foi transferida para um béquer de 500 mL, juntamente com 250 mL de H₂O, sendo posteriormente aquecida a 100 °C em bloco aquecedor por 1 hora. Esse procedimento está ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Pré-tratamento 2.

Fonte: Própia autora.



Após a lavagem com água de cada pré-tratamento, o material foi filtrado em papel filtro com o auxílio de uma bomba de vácuo e um kitassato. O material retido no filtro foi levado à estufa por 24 horas a 55 °C. Em seguida, o papel filtro foi retirado da estufa e, posteriormente, pesado.

Finalizados os processos de pré-tratamento, as amostras foram processadas em moinho de facas tipo Willey, com peneira de 1 mm, preparando-as para as etapas subsequentes. Na Figura 15 podem ser observadas as amostras preparadas, antes de passarem pelo moinho.

Figura 15: Amostra processada.

Fonte: Própia autora.



4.6 Caracterização das biomassas após os pré-tratamentos

O material residual fibroso foi avaliado para a determinação da composição das fibras FDN e FDA (celulose e hemicelulose), utilizando o método de Van Soest, conforme descrito por Silva e Queiroz (2012). Esse método consiste na separação das diferentes frações da biomassa por meio de reagentes específicos denominados detergentes.

A determinação do FDN foi realizada conforme a metodologia mencionada. Inicialmente, foi pesada 1 grama de amostra seca de cada pré-tratamento. Em seguida, as amostras foram submetidas a um processo de lavagem com 40 mL de solução detergente neutra para fibras, composta por água destilada, EDTA sal dissódico, fosfato de sódio e sulfato láurico de sódio. Esse procedimento foi conduzido em bloco aquecedor a 100 °C por 120 minutos

Para a determinação do FDA, utilizou-se a mesma metodologia, diferenciando-se apenas pela solução empregada na lavagem, que passou a ser um detergente ácido, composto por água destilada, ácido sulfúrico e CTAB. Após ambos os processos, as amostras resultantes foram filtradas com o auxílio de bomba a vácuo e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada a 55 °C por 24 horas.

Em cada processo, foi realizada uma duplicata com o objetivo de reduzir a margem de erro e aumentar a confiabilidade dos dados obtidos. A determinação do teor de hemicelulose foi feita por meio da diferença entre os teores de FDN e FDA.

4.7 Hidrólise enzimática

Com o objetivo de permitir a disponibilização dos açúcares fermentáveis, o material residual celulósico obtido após o pré-tratamento foi submetido à hidrólise enzimática, utilizando-se o complexo enzimático Cellic® CTec2, batelada VCNI0013, da empresa Novozymes. Esse complexo consiste em uma mistura de celulasas de alta atividade, com elevado teor de β -glucosidase e hemicelulase, promovendo a conversão de carboidratos complexos em açúcares simples antes da fermentação. Para cada reação enzimática, foi utilizado um meio reacional composto por 0,83 g de substrato e 50 μ L do complexo enzimático Cellic® CTec2, diluído em 40 mL de H₂O com pH ajustado para 5,0 por meio da adição de ácido clorídrico, em Erlenmeyer de 125 mL. As reações enzimáticas foram conduzidas em mesa agitadora modelo Solab, a 48 °C e 150 rpm, durante 72 horas. A dose do

complexo Cellic® CTec2 utilizada foi determinada com base no teor de fibra presente em cada substrato pré-tratado, sendo adotada uma dosagem correspondente a 6,0% da massa de fibra (NOVOZYMES, 2015).

Após as 72 horas de reação enzimática, o material foi filtrado em papel filtro com auxílio de bomba à vácuo e kitassato, pesado e levado à estufa a 55°C por 24 horas. Em seguida pesado novamente para determinação do coeficiente de hidrólise. Esse coeficiente foi obtido pela diferença entre o peso final (após a hidrólise enzimática) e o peso inicial (antes da hidrólise enzimática) do material.

4.8 Fermentação

Para a realização do processo de fermentação etílica, foi conduzido um ensaio com o mosto hidrolisado, utilizando-se duas espécies de levedura. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi escolhida por ser uma levedura mesofílica (20–40 °C) amplamente utilizada com eficiência em diversos processos industriais (SOUZA, 2005). Na etapa de fermentação, foi empregada uma cepa purificada em laboratório, selecionada para a fermentação de glicose, além de uma levedura do gênero *Candida* (GC), utilizada como grupo controle.

O processo teve início com a ativação das leveduras, conforme as instruções do fabricante. As células foram reidratadas em água destilada, a 35 °C, por 15 minutos. Após a ativação, as leveduras foram transferidas para uma placa de Petri contendo Ágar Sabouraud (1% de glicose; 1% de peptona; 0,5% de extrato de fermento; 2% de ágar), utilizando uma alça de Drigalski, por meio da técnica de estriamento, sendo incubadas a 28 °C por 72 horas para o crescimento inicial.

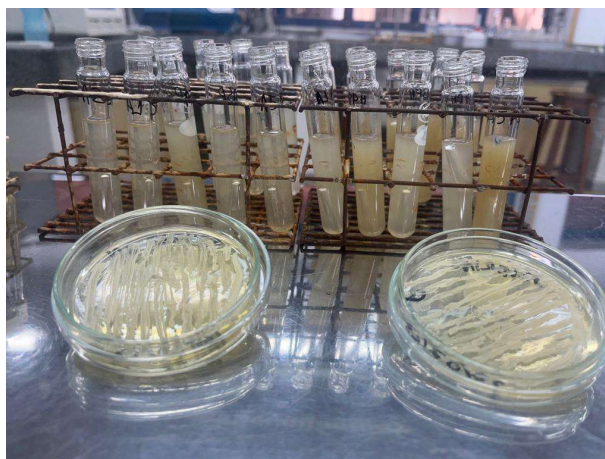
A purificação foi realizada por meio da transferência das leveduras para novas placas a cada 15 dias. Esse ciclo foi repetido por 10 (dez) vezes, sendo todas as etapas conduzidas em capela de fluxo laminar, com o objetivo de minimizar os riscos de contaminação.

Após a purificação das leveduras e sua separação em grupos purificados e não purificados, iniciou-se o processo de inoculação no meio fermentativo. Inicialmente, foi realizada a contagem celular utilizando a câmara de Neubauer, com o objetivo de estimar a quantidade de leveduras presentes. Adotou-se o padrão de inoculação celular de 1:10.000.

As leveduras em crescimento, contidas em placas de Petri, foram manipuladas em capela de fluxo laminar, a fim de reduzir o risco de contaminação externa. Utilizando-se uma alça de platina, realizou-se o raspado das colônias, que foi então diluído em 20 mL de solução salina estéril a 0,83%. Em seguida, 20 μ L dessa solução diluída foi coletado e adicionado à câmara de Neubauer para a contagem celular. Foram lidos cinco quadrantes da câmara, resultando em uma contagem total de $5,0 \times 10^6$ células.

Após a contagem celular, foi realizada a incorporação das leveduras à solução com o auxílio de uma alça de níquel-cromo de 1 μ L, adicionando-as ao hidrolisado para o início do processo fermentativo, conforme ilustrado na Figura 16.

Figura 16: Fermentação.
Fonte: Própria autora.



O processo de fermentação foi conduzido em uma mesa agitadora modelo Solab, a 38 °C, em banho-maria e sem agitação, por um período de 72 horas. A temperatura foi monitorada por meio de um termômetro externo, com o objetivo de verificar e manter as condições adequadas exigidas pelo processo fermentativo

4.9 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para as variáveis Coeficiente de Hidrólise (CH) e Etanol estimado a partir do coeficiente de hidrólise (ET_CH), adotou-se um esquema unifatorial, com dois tratamentos: lavagem em água à temperatura ambiente e fervura, cada um com 10 repetições, totalizando 20 unidades experimentais.

Para as variáveis Etanol obtido após a fermentação (ET_FERM) e Coeficiente de fermentação (ET_FERM / ET_CH), foi utilizado um esquema fatorial 2×2 , considerando dois fatores: tipo de pré-tratamento (lavagem em água à temperatura ambiente e fervura) e linhagem de levedura (duas linhagens distintas). Esse arranjo resultou em quatro combinações de tratamento, com cinco repetições cada, totalizando 20 unidades experimentais.

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a aderência à distribuição normal e, quando necessário, foram normalizados. Em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F, adotando-se nível de significância de 5%. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, também com 5% de significância, utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização das biomassa

Os valores de FDN, FDA e hemicelulose foram calculados para as amostras. Para o pré-tratamento 1 (25 °C por 24 horas), os valores de FDN, FDA e hemicelulose foram, respectivamente, 87,25%, 78,26% e 8,99% (Tabela 1). Já para o pré-tratamento 2 (100 °C por 1 hora), os valores foram, respectivamente, 88,17%, 78,77% e 9,40% (Tabela 1). Os dados apresentados correspondem à média dos resultados obtidos em amostras analisadas em duplicata.

Tabela 1: Valores de FDN, FDA e hemicelulose do papelão com dois pré-tratamento.

Pré-Tratamento	$\bar{X}$ FDN	$\bar{X}$ FDA	Hemicelulose
Ambiente	87,25	78,26	8,99
Fervida	88,17	78,77	9,4

Onde:

$\bar{X}$ FDN: Teor médio de fibra em detergente neutro (% MS);

$\bar{X}$ FDA: Teor médio de fibra em detergente ácido (% MS);

5.2 Resumo da Análise de Variável

Os dados não apresentaram distribuição normal ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, sendo necessária a transformação para a aplicação da análise de variância (ANOVA). Apresentam-se, portanto, os resultados da ANOVA para as variáveis Coeficiente de Hidrólise (Coef.Hidro), Etanol estimado a partir do coeficiente de hidrólise (Etanol_CH), Etanol obtido após a fermentação (Etanol_Ferm) e Coeficiente de Fermentação (ET_ferm/ET_ch). O fator 'pré-tratamento' apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre as variáveis Coeficiente de Hidrólise, Etanol_CH (L/tonelada), Etanol_Ferm (mL/L e L/tonelada) e Coeficiente de Fermentação, indicando que a forma de preparo do substrato influencia diretamente na eficiência do processo. Por outro lado, o fator 'levedura' e a interação entre pré-tratamento e levedura não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre nenhuma das variáveis analisadas, sugerindo que as diferenças observadas nos rendimentos de etanol foram predominantemente atribuídas ao tipo de pré-tratamento empregado. Os coeficientes de variação (CV) variaram entre 6,14% e 15,88%, indicando boa precisão experimental para a maioria das variáveis analisadas, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2: Resumo da análise de variância para parâmetros de hidrólise (Coef.Hidro), produção potencial de etanol (Etanol_FERM) e coeficiente de fermentação (Coef.Ferm).

Fontes de Variação	Coef.Hidro	Etanol_CH (ML/L)	Etanol_CH (L/TON)	Etanol_Ferm (ML/L)	Etanol_Ferm (L/TON)	Coef.Ferm (ETfer/ETch)
Pré-tratamento	0,0120687845*	0,4205 ^{NS}	2008,008*	68,973025**	167240,1025**	56915,6449**
Levedura	-	-	-	0,616225 ^{NS}	378,3025 ^{NS}	111,3025 ^{NS}
Pré-trat X Levedura	-	-	-	0,046225 ^{NS}	1486,1025 ^{NS}	44,156025 ^{NS}
Resíduo	0,001561631	0,233611111	400,5168889	0,947008333	610,2875	396,1426125
CV(%):	6,92	6,2	6,14	15,88	8,07	10,46

Legenda:

*: ($p < 0,05$)

**.: ($p < 0,01$);

NS: ($P > 0,05$);

Observa-se que a variável 'Etanol_CH' não apresentou significância estatística quando expressa em mL/L, mas foi estatisticamente significativa quando analisada em L/tonelada. Essa diferença ocorre devido à forma como cada unidade expressa os dados. A concentração em mL/L representa a quantidade de etanol presente no meio líquido, desconsiderando a massa de substrato utilizada, sendo

uma métrica comumente aplicada em contextos laboratoriais e químicos. Já o rendimento expresso em L/tonelada leva em consideração a massa seca da biomassa, refletindo a eficiência de produção por tonelada de matéria-prima, o que é mais relevante para análises de viabilidade industrial. Como a unidade L/tonelada incorpora fatores como teor de fibra e quantidade efetiva de substrato convertido, ela amplia as diferenças entre os tratamentos, aumentando a sensibilidade estatística da análise. Além disso, essa métrica está diretamente alinhada aos objetivos deste estudo, que visa aplicações em escala industrial, motivo pelo qual se adotou preferencialmente o uso da unidade L/tonelada para expressar os resultados.

5.3 Coeficiente de Hidrólise

O coeficiente de hidrólise é uma medida que reflete o quanto da fração fibrosa foi enzimaticamente desdobrada (hidrolisada) durante o pré-tratamento, resultando na liberação de açúcares solúveis, como glicose, celobiose e xilose. A quantidade e o tipo de açúcares produzidos dependem da eficiência da hidrólise e das características do material, especialmente da proporção de celulose e hemicelulose. Os resultados obtidos indicaram efeito significativo dos diferentes pré-tratamentos sobre o coeficiente de hidrólise. Ressalta-se que, nessa etapa do processo, a levedura ainda não foi incorporada, de modo que a variável investigada está exclusivamente associada ao efeito do pré-tratamento sobre a biomassa. As médias dos tratamentos podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3: Coeficiente de hidrólise (Coef.Hid.) de amostras submetidas a diferentes tratamentos de temperatura.

Tratamento	Coeficiente de hidrólise
Ambiente	0,304 a
Fervida	0,256 b

CV¹ (%) = 6,92
¹CV = Coeficiente de variação transformado. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam temperaturas e maiúsculas comparam purificação. CV = Coeficiente de Variação.

Com base na análise do coeficiente de hidrólise, era esperado que os pré-tratamentos apresentassem resultados distintos. Observou-se que o tratamento realizado à temperatura ambiente teve maior impacto na eficiência do pré-tratamento, quando comparado ao pré-tratamento por fervura. Essa diferença pode estar relacionada à preservação de estruturas fibrosas mais suscetíveis à ação enzimática, que podem ser parcialmente degradadas ou modificadas em temperaturas elevadas

5.4 Produção de Etanol

Para a avaliação do potencial de produção de etanol, foram empregados dois procedimentos principais. O primeiro baseia-se na utilização do coeficiente de hidrólise, que permite estimar o potencial de produção de etanol com base na quantidade de fibra que foi hidrolisada. No entanto, é importante destacar que nem toda a fração hidrolisada da fibra se converte exclusivamente em glicose. Parte dessa fração pode resultar na formação de outros açúcares solúveis. Por esse motivo, esse método pode superestimar a produção de etanol, ao assumir que toda a fração solúvel corresponde à glicose.

O segundo procedimento refere-se à fermentação efetiva. Nesse caso, as leveduras são inoculadas no hidrolisado e fermentam apenas a glicose disponível no meio. Esse processo resulta na produção de etanol efetivamente obtida a partir do hidrolisado, representando, portanto, o rendimento real da fermentação com base nos açúcares fermentáveis presentes.

A principal vantagem de se utilizar ambas as formas de quantificação do etanol está na possibilidade de comparar a quantidade efetivamente produzida com a estimada. Essa relação reflete as características da composição da fibra, bem como a qualidade da hidrólise realizada. Dessa forma, os dois procedimentos fornecem uma visão abrangente e mais precisa do desempenho do processo de produção de etanol.

Ao avaliar a produção efetiva de etanol por meio da fermentação, observou-se que apenas os pré-tratamentos apresentaram efeito significativo. Isso indica que a purificação das leveduras ou a ausência delas não influenciou significativamente a produção de etanol. Assim, independentemente de as leveduras serem purificadas ou não, os resultados sugerem que os pré-tratamentos utilizados foram os principais fatores determinantes da produção

efetiva de etanol a partir do papelão.

Os dados da estimativa de produção de etanol, com base no coeficiente de hidrólise, estão apresentados na Tabela 4. Já a Tabela 5 apresenta o teor de etanol obtido a partir da fermentação. Em ambas as tabelas, observa-se que a variável com significância estatística foi o tipo de pré-tratamento, sendo que o realizado à temperatura ambiente apresentou desempenho superior ao pré-tratamento com água fervente. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que a fervura provoca alterações na composição química original da biomassa, o que pode dificultar o acesso das enzimas às fibras e, conseqüentemente, reduzir a eficiência na produção de etanol.

Tabela 4: Estimativa do potencial de produção de etanol baseado no coeficiente de hidrólise (ETANOL_CH) sob diferentes condições de temperatura.

Tratamento	mL L ⁻¹	mL kg ⁻¹ MS ²
Ambiente	3,98 a	170,64 a
Fervida	3,69 a	150,60 b

¹ CV (%) = 6,20 (mL L⁻¹); 6,14 (mL kg⁻¹ MS)

² MS =Matéria seca

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam temperaturas e maiúsculas comparam purificação. MS = Matéria Seca; CV = Coeficiente de Variação.

Tabela 5: Teor de etanol após fermentação (ETANOL_FER) sob diferentes condições de temperatura e purificação.

Fator	Nível	mL L ⁻¹	mL kg ⁻¹ MS
Temperatura	Ambiente	4,84 a	232,02 a
	Fervida	0,69 b	27,55 b
Purificação	Purificada	2,57 A	134,65 A
	Não Purificada	2,69 A	124,92 A

¹CV (%) =29,09 (mL L⁻¹); 8,07 (mL kg⁻¹ MS)

Médias seguidas por letras distintas minúsculas (temperatura) ou maiúsculas (purificação) na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam temperaturas e maiúsculas comparam purificação.

MS = Matéria Seca; CV = Coeficiente de Variação.

5.5 Coeficiente de Fermentação

O coeficiente de fermentação é uma medida relevante na bioquímica e na avaliação da produção de etanol, sendo calculado pela razão entre o etanol obtido por fermentação e o etanol estimado com base no coeficiente de hidrólise. Esse índice fornece uma comparação direta entre a quantidade de etanol efetivamente produzida e a quantidade teoricamente prevista a partir da fração de fibra hidrolisada. Dessa forma, o coeficiente de fermentação constitui uma ferramenta valiosa para avaliar a eficiência do processo. Valores próximos de 1 indicam que a produção de etanol está próxima do potencial máximo estimado, enquanto valores significativamente inferiores a 1 podem revelar ineficiências em alguma etapa do processo, como na hidrólise enzimática ou na fermentação alcoólica. Assim, a análise desse coeficiente pode fornecer subsídios importantes para a otimização da produção de etanol em escala laboratorial ou industrial.

A análise do coeficiente de fermentação revelou que o fator 'levedura' não apresentou efeito significativo, indicando que a purificação das linhagens utilizadas não influenciou a produção de etanol. Por outro lado, os dados demonstraram que o tipo de pré-tratamento teve impacto estatisticamente significativo, sendo que o processo de fervura exerceu um efeito negativo sobre a fermentação. Esse resultado pode estar associado a alterações estruturais e químicas da biomassa causadas pela exposição à alta temperatura, que possivelmente reduzem a disponibilidade dos açúcares fermentáveis ou geram compostos inibitórios à ação das leveduras. Em contraste, o pré-tratamento realizado à temperatura ambiente preserva melhor a integridade da matéria-prima, favorecendo a fermentação e resultando em maior eficiência, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Coeficiente de fermentação (razão ET_{fer} / ET_{ch}) sob diferentes condições de temperatura e purificação.

Fator	Nível	Razão
Temperatura	Ambiente	137,68 a
	Fervida	18,40 b
Purificação	Purificada	75,40 A
	Não Purificada	80,68 A

¹CV (%) = 10,46

Médias seguidas por letras distintas minúsculas (temperatura) ou maiúsculas (purificação) na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras minúsculas comparam temperaturas e maiúsculas comparam purificação. CV = Coeficiente de Variação.

5.6 Quadro de Correlação

Para complementar a análise estatística das variáveis experimentais, foi realizada uma matriz de correlação de Pearson entre os principais indicadores do processo, incluindo o coeficiente de hidrólise, a estimativa teórica de produção de etanol ($Etanol_{CH}$), a produção efetiva de etanol após a fermentação ($Etanol_{FERM}$) e o coeficiente de fermentação (ET_{fer}/ET_{ch}). Essa análise permite verificar a existência e a intensidade de associações lineares entre as variáveis, auxiliando na identificação de relações consistentes ou divergentes entre as etapas do processo. A Tabela 7 apresenta os valores dos coeficientes de correlação (r) e os respectivos níveis de significância (p -valor), oferecendo subsídios para a compreensão da influência relativa de cada etapa sobre o rendimento final de etanol.

Tabela 7: Resumo da análise de variância.

	Coef. Hidrólise	Etanol CH (ml/kgMS)	Etanol Ferm. (ml/kgMS)	Coef. Ferm (ETfer/ ETch)
Etanol CH (ml/kgMS)	0.9878 **	-	-	-
<i>p-valor</i>	<i><0.0001</i>			
Etanol Ferm (ml/kgMS)	0.5347 *	0.5355 *	-	-
<i>p-valor</i>	<i>0.0399</i>	<i>0.0396</i>		
Coef. Ferm (ETfer/ETch)	0,4077 ^{NS}	0,4060 ^{NS}	0,9860 **	-
<i>p-valor</i>	<i>0,1314</i>	<i>0,1331</i>	<i><0,0001</i>	

O estudo das correlações de Pearson pode auxiliar e complementar a compreensão da magnitude das variáveis estudadas. A correlação robusta entre CH e Etanol_CH ($r=0,9878$) confirma que a hidrólise enzimática é determinante para a liberação de açúcares solúveis, base da estimativa teórica. Contudo, a correlação mais fraca entre Etanol_FERM e CH ($r=0,5347$) sugere que fatores além da hidrólise afetam a fermentação. Esse decréscimo pode ser atribuído ao pré-tratamento com fervura, que, conforme os resultados do estudo, altera a estrutura química do papelão, gerando subprodutos inibidores (como furfural ou HMF) ou reduzindo a biodisponibilidade de açúcares para as leveduras.

A ausência de correlação significativa entre Coeficiente de Fermentação e variáveis como CH ($r=0,4077$; $p=0,1314$) reforça que a eficiência da fermentação não depende apenas da hidrólise, mas de condições específicas do processo (e.g., toxicidade do meio, viabilidade celular).

A correlação muito forte entre Coeficiente de Fermentação e Etanol_FERM ($r=0,9860$) demonstra que a eficiência fermentativa (razão ETfer/ETch) é diretamente proporcional à produção real de etanol. Isso indica que:

Amostras com alta produção efetiva de etanol (Etanol_FERM) também apresentam alta conversão dos açúcares hidrolisados em etanol (Coeficiente de Fermentação).

Contudo, as correlações moderadas ($r \approx 0,53$) entre Etanol_FERM e as variáveis de hidrólise (Coeficiente de Hidrólise, Etanol_CH) sugerem que:

- A produção real de etanol (Etanol_FERM) não depende apenas da eficiência hidrolítica.
- Fatores externos à hidrólise (e.g., inibição microbiana, toxicidade do meio) limitam a conversão integral dos açúcares em etanol.

As correlações mais baixas entre Etanol_FERM e as variáveis de hidrólise são atribuíveis ao efeito negativo do pré-tratamento com fervura:

- Alteração da matriz lignocelulósica: A fervura pode promover:
 - Rearranjos da lignina, encapsulando carboidratos e reduzindo a acessibilidade enzimática.
 - Geração de subprodutos inibidores (e.g., furfural, HMF) que comprometem a atividade microbiana durante a fermentação.
- Desacoplamento entre hidrólise e fermentação: Apesar de uma hidrólise eficiente (alta Etanol_CH), a presença de inibidores oriundos da fervura reduz a conversão fermentativa, explicando a discrepância entre Etanol_CH (estimado) e Etanol_FERM (real).

A forte correlação entre Coeficiente de Fermentação e Etanol_FERM ($r = 0,9860$) reforça que a etapa fermentativa foi determinante para a produção efetiva de etanol. Entretanto, o pré-tratamento com fervura introduziu gargalos que:

- Reduziram a correlação entre hidrólise e produção real de etanol.
- Limitaram o aproveitamento integral do potencial teórico (Etanol_CH), evidenciando sua inadequação para biomassas sensíveis a altas temperaturas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que o tipo de pré-tratamento influencia significativamente a produção de etanol a partir de papelão. O pré-tratamento realizado à temperatura ambiente preservou melhor a estrutura da biomassa lignocelulósica, favorecendo a hidrólise enzimática e resultando em maior liberação de açúcares fermentáveis. Consequentemente, esse tratamento proporcionou os maiores teores de etanol após a fermentação, com coeficiente de fermentação superior. Por outro lado, a fervura comprometeu a integridade do material, reduzindo a conversão de açúcares e a eficiência fermentativa. Dessa forma, conclui-se que o papelão é uma matéria-prima viável para a produção de bioetanol de segunda geração, desde que submetido a um pré-tratamento brando, como a imersão em água à temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

ABTCP. A indústria do futuro já está sendo desenhada nos parques fabris do setor. *O Papel*, LXXXII, 12, 60-70, 2021.

ACS ENERGY LETT. Limitações da Amônia como um portador de energia de hidrogênio para o setor de transporte. v. 6, p. 4390–4394, 2021.

AL BATTASHI, Huda, et al. Produção de polihidroxialcanoato (PHA) usando ácidos graxos voláteis derivados da digestão anaeróbia de papel reciclado. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 29, n. 1, p. 250-259, 2021.

BASTOS, V. D., BANCO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO SOCIAL E ECONÔMICO: Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. BNDES Setorial: Rio de Janeiro, v. 25, p. 131-182, 2007.

BEZERRA, Janieire et al. Biossíntese de lignina em plantas submetidas ao déficit hídrico. *PUBVET*, v. 14, n. 9, p. 1-14, 28 set. 2020. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/7143/biossicutentese-de-lignina-em-plantas-submetidas-ao-deacuteficit-hiacutedrico>. Acesso em: 19 de março de 2023.

BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, K.; MIKULSKI, D.; KŁOSOWSKI, G. Pré-tratamento assistido por micro-ondas de alta pressão de biomassa de madeira macia, madeira dura e não madeira utilizando diferentes solventes na produção de etanol celulósico. *Biotechnology for Biofuels*, v. 16, p. 1-21, 2023.

BORGES, Celson Pascoal; GIGLIOLLI, Adriana Aparecida Sinópolis. Avaliação do acervo de informações de teores de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa do bagaço de cana de açúcar. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 9, p. 71782-71791, 2020.

BRANCO, R. H. R.; SERAFIM, L. S.; XAVIER, A. M. R. B. Produção de bioetanol de segunda geração: uso de resíduos da indústria de papel e celulose como matéria-prima, 2018.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES e CGEE, 2008. 316p.

DE C. L. E PENALVA SANTOS, D. et al. Brasil e o mercado mundial no desenvolvimento de tecnologias para produção de etanol de segunda geração. *Alexandria Engineering Journal*, v. 67, p. 153–170, 15 mar. 2023.

DE GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso et al. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018.

DONINI, Ígor AN et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química*, v. 35, p. 165-178, 2010.

EICHLER, Paulo et al. Produção do biometanol via gaseificação de biomassa lignocelulósica. *Química Nova*, v. 38, p. 828-835, 2015.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Bioetanol a partir da hidrólise da palha de trigo: solubilidade e estabilidade em misturas com biodiesel/diesel e gasolina em diferentes proporções. [s.d.].

EMPAPEL. (Associação Brasileira de Embalagens em Papel). Papelão Ondulado. Disponível em: <https://empapel.org.br/papel/papelao-ondulado/>. Acesso em: 15 abr. 2023.

FERNANDES, M. C. et al. Sacarificação enzimática e produção de bioetanol a partir de *Cynara cardunculus* pré-tratado por explosão a vapor. 2015.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: *Anais... 45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria*. UFSCar, São Carlos, SP, p.255-258. 2000.

FINGUERUT, J.; LEIMER, K. H.; LUCREDI, H. A.; ROSSELL, C. E. V. Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. *Boletim Técnico Copersucar*, n. 12, p. 45-48, 1985.

HAFNER, M.; TAGLIAPIETRA, S.; DE STRASSER, L. O desafio do acesso à energia na África. p. 1-21, 2018.

INTERNATIONAL TRADE AND EXPORTS. Liderando o mundo no fornecimento e demanda de etanol. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/exports-and-trade/>. Acesso em: 17 mar. 2023.

LEIBBRANDT, N. H.; KNOETZE, J. H.; GÖRGENS, J. F. Comparing biological and thermochemical processing of sugarcane bagasse: an energy balance perspective. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 2117-2130, 2011.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e*

Enzimáticos, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

MARTINEZ, M. E. M. et al. Mapeamento das tecnologias do setor de celulose e papel por meio de documentos patentários depositados no Brasil no período de 2009 a 2013. *O Papel*, v. 79, n. 7, p. 73-9, 2018.

MINEIRO, Mercado. Reciclagem: Pesquisa do quilo da Latinha de Alumínio, Papel e Garrafa PET para reciclagem (compra). Disponível em: <https://www.mercadomineiro.com.br/pesquisa/-pet-papel-pesquisa-precos>. Acesso: 17 set. de 2023.

MOSER, B. R. et al. Produção e avaliação de biodiesel a partir de lipídios de laranja doce (*Citrus sinensis*) extraídos de sementes residuais do processo comercial de produção de suco de laranja. 2023.

MOTA, C. J. A.; MONTEIRO, R. S. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1483–1490, 2013.

NOVOZYMES. Novozymes Cellic® CTec2 e HTec2 - Enzimas para hidrólise de lignocelulósicos. 2015. Disponível em: <http://www.bioenergy.novozymes.com>. Acesso em: 17 jan. 2019.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OZOLA, Z. U. et al. Reciclagem de resíduos de papel. Aspectos da economia circular. v. 23, n. 3, p. 260–273, 2019a.

PEREIRA, J. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA, A. L. M. M. Biomassa de composição lignocelulósica para produção de etanol combustível e o contexto da biorrefinaria. Na *Série em Biotecnologia*, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p. 45, 2008.

PEREIRA, N. R. L.; ANJOS, F. E.; MAGNAGO, R. F. Resíduos lignocelulósicos da bananicultura: uma revisão sobre os processos químicos de extração da celulose. *Revista Virtual de Química*, v. 11, n. 4, p. 1165-1179, 2019.

RODRIGUES, J. S. et al. Isolamento e caracterização de lignina acetossolve extraída do bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Virtual Química*, v. 12, n. 4, 2020.

RUIZ, Héctor A. et al. A importância dos pré-tratamentos no conceito das

biorrefinarias. *Biotecnologia*, v. 21, n. 3, p. 3, 2013.

SAFARI, M.; TONDRO, H.; ZILOUEI, H. Biohydrogen production from diluted-acid hydrolysate of rice straw in a continuous anaerobic packed bed biofilm reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 47, n. 9, p. 5879–5890, 29 jan. 2022.

SANTOS, Ciro M. et al. Produção de bioetanol a partir dos resíduos da indústria de papel. *Vir. Química*, v. 12, n. 4, 2020.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E.; *Quim. Nova* **2014**, 37, 56.

SHOKROLLAHI, S.; DENAYER, J. F. M.; KARIMI, K. Efficient bioenergy recovery from different date palm industrial wastes. *Energy*, v. 272, p. 127057, 1 jun. 2023.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2012. 235 p.

SOUZA, C. C. et al. Produtividade do sorgo granífero cv. sacarino e qualidade de produtos formulados isoladamente ou combinados ao caldo de cana-de-açúcar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n. 3, p. 512-517, 2005.

SUN, R.; LAWTHORP, J. M.; BANKS, W. B. *Carbohydrate Polymers*, v. 29, p. 325, 1996.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

VIDAL, André Carvalho Foster. O mercado de papelão ondulado e os desafios da competitividade da indústria brasileira. *BNDES Setorial*, n. 35, p. 5-46, mar. 2012.

WANG, X. et al. Uma revisão sobre produtos otimistas de biorefinaria: biocombustíveis e bioprodutos a partir de biomassa de algas. *Fuel*, v. 338, p. 127378, 2023.