



# UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

MÁRCIA ANDRÉA GOMES

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL  
LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DE RESÍDUOS DO  
CULTIVO DE COCO.



Salvador  
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA

Programa de Pós-graduação em Engenharia Industrial – PEI



MÁRCIA ANDRÉA GOMES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DE  
RESÍDUOS DO CULTIVO DE COCO.**

Salvador – BA

2023

**MÁRCIA ANDRÉA GOMES**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DE  
RESÍDUOS DO CULTIVO DE COCO.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Industrial.

Orientadora: Profª. Drª. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque

Orientadora: Profª. Drª. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

**Salvador – BA**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GOMES, MÁRCIA ANDRÉA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO A  
PARTIR DE RESÍDUOS DO CULTIVO DE COCO. / MÁRCIA ANDRÉA  
GOMES. -- SALVADOR, 2023.

97 f. : il

Orientadora: ELAINE CHRISTINE DE MAGALHÃES CABRAL  
ALBUQUERQUE.

Coorientadora: RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA.  
Tese (Doutorado - ENGENHARIA INDUSTRIAL) --  
Universidade Federal da Bahia, ESCOLA POLITÉCNICA DA  
UFBA, 2023.

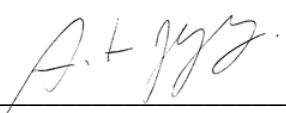
1. CASCA DO COCO VERDE. 2. FOLHA DO COQUEIRO. 3.  
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. 4. FERMENTAÇÃO. 5.  
DETOXIFICAÇÃO. I. ALBUQUERQUE, ELAINE CHRISTINE DE  
MAGALHÃES CABRAL. II. ALMEIDA, RENATA MARIA ROSAS  
GARCIA. III. Título.

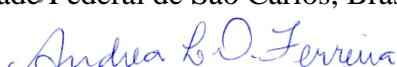
**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO A PARTIR DE  
RESÍDUOS DO CULTIVO DE COCO.**

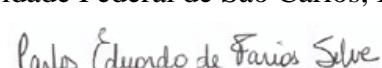
**MÁRCIA ANDRÉA GOMES**

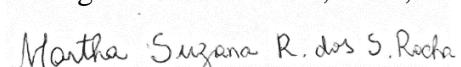
Tese submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Engenharia Industrial.

Examinada por:

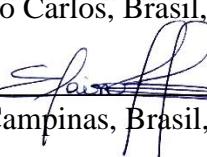
Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz   
Doutor em Engenharia Química, pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2000

Prof. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira   
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2004

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva   
Doutor em Engenharia Industrial, pela Università Degli Studi di Padova, Itália, 2017

Prof. Dra. Martha S. R. dos Santos Rocha   
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2017

Prof. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida   
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2003

Prof. Dra. Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque   
Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005

Salvador, BA - BRASIL  
Abril /2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente *a DEUS*, por me dar saúde e coragem para continuar a realização desse sonho que não só pertence a mim, mas também a minha mãe Ednilza Maria Gomes (*in memorian*).

Aos meus familiares, em especial *ao meu pai* que sempre esteve comigo me ensinando o verdadeiro sentido da vida, *ao meu irmão* por me encorajar a dar continuidade nessa batalha, *as minhas tias* Cristiane Gomes e Ednadja Gomes por me orientar nessa luta constante de seguir em frente, *os meus tios* Luiz Carlos Gomes e Carlos Alberto Gomes pela orientação no seguimento da profissão.

*Ao meu marido e filho (Théo)*, pelas noites mal dormidas com luzes acesas e algumas renúncias feitas em nossa vida, em prol desse sonho.

*Aos meus amigos*, pelo carinho, amizade, companheirismo, paciência e ajuda durante toda a elaboração desse trabalho. Em especial, Kledson Lopes e Martha Rocha que nos áudios do whatsapp se fizeram presente em todos os momentos difíceis.

*Ao meu ajudante, fiel e escudeiro Íthalo Abreu*, que durante a sua iniciação científica também me encorajou na loucura de madrugar na Ufal, durante o acompanhamento cinético.

*A professora* Elaine Cabral, por aceitar me orientar neste trabalho “mesmo nunca tendo me visto pessoalmente” e me dar à oportunidade de galgar esse sonho.

*A professora* Renata Rosas, por acreditar nessa loucura junto comigo e me orientar de forma brilhante nos caminhos da ciência e da vida. “Ganhei uma mãe na ciência e uma guia na vida”.

*Ao professor Carlos Eduardo*, pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados e apoio ao longo dessa caminhada.

*Aos professores da banca*, Antônio, Andrea, Carlos e Martha por aceitar a participação e contribuição no trabalho;

*A equipe da UFSCar*, pela atenção e acompanhamento no laboratório de engenharia bioquímica que me fez sentir super aquecida nos dias que passei em São Carlos;

*Aos alunos do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos– LTBA, da UFAL, que me ajudaram com as metodologias e com a disponibilidade do material laboratorial para desenvolver esse trabalho.*

GOMES, Márcia Andréa. **Estudo da produção de etanol lignocelulósico a partir de resíduos do cultivo de coco.** 2023. Tese de doutorado em Engenharia Industrial – Universidade Federal da Bahia, 2023.

## RESUMO

O emprego da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, como por exemplo, a casca do coco verde, implica no desenvolvimento e aperfeiçoamento das etapas de conversão da biomassa em açúcares e estes em etanol via fermentação. Assim, a execução da etapa de pré-tratamento, responsável por romper a matriz lignocelulósica deixando-a acessível ao ataque enzimático na etapa de hidrólise, é necessária. Com os monômeros disponíveis (principalmente xilose e glicose), a levedura os converte em etanol, na etapa de fermentação. Dessa forma, esse trabalho visou o estudo das condições de sacarificação e de fermentação, utilizando os resíduos do cultivo de coco como biomassa, com o objetivo de avaliar as melhores condições de sacarificação e fermentação para produção de E2G. Inicialmente realizou-se o pré-tratamento hidrotérmico (PTH) em reator tipo PARR utilizando-se 15% (m/v) de sólidos, a 195°C, 10 min e 200 rpm. Em paralelo realizou-se um planejamento experimental para o pré-tratamento ácido (PTA) (fatores: concentração 1 e 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e temperatura de 100 e 120°C) visando a otimização das condições operacionais de pré-tratamento. Em função da concentração de glicose as condições de 1% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100 °C para casca de coco verde (CCV), 2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 120 °C para os folíolos da folha de coqueiro (FFC) e 2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100°C para a raque da folha do coqueiro (RFC) seguiram para a hidrólise enzimática, empregando-se 7,5% (m/v) de sólidos e 20 FPU/g<sub>biomassa seca</sub> de Cellic Ctec2 (58 FPU/mL), suplementada com 10 % de Cellic Htec (7326 IU/mL), em relação o volume de Cellic Ctec2. Após 72h de reação, as concentrações de glicose atingiram 31,85 e 19,07 g/L para a hidrólise de CCV submetida para PTH e PTA, respectivamente. Com relação ao comportamento dos FFC na hidrólise, 21,31 e 13,65 g/L de concentração de glicose foram alcançados quando esta biomassa foi submetida ao PTH e PTA, respectivamente. Para RFC, obteve-se 45,39 e 21,01 g/L de glicose, após PTH e PTA, respectivamente. Esses resultados mostraram que a hidrólise enzimática usando pré-tratamento hidrotérmico foi mais eficiente do que os resultados obtidos para as biomassas ácidas pré-tratadas. Logo, todas as amostras seguiram para a fermentação com a levedura *Kluyveromyces marxianus* a 37°C/24 h. Nessa etapa foi possível verificar que praticamente toda glicose e xilose foram consumidas pela levedura. No entanto, o rendimento em etanol atingiu valores entre 47 e 80%, indicando possíveis problemas de natureza tóxica, ou seja, a produção de compostos secundários, como o ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF). Um estudo preliminar foi realizado

GOMES, Márcia Andréa. **Estudo da produção de etanol lignocelulósico a partir de resíduos do cultivo de coco.** 2023. Tese de doutorado em Engenharia Industrial – Universidade Federal da Bahia, 2023.

para aumentar a eficiência de fermentação no hidrolisado de bagaço de cana, biomassa bastante estudada para esse fim, e submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico (195 °C, usando 200 rpm por 10 min) e ácido (0,5% (v/v) de ácido sulfúrico a 121°C por 15 min), e em ambos, a carga de sólidos de (10% m/v). A hidrólise enzimática do material pré-tratado foi realizada utilizando o complexo enzimático CellicCtec® (60 FPU/gbiomassa seca, tampão citrato a 50 mM e pH 4,8) a 50°C usando 150 rpm por 72h. Antes do processo de detoxificação, realizou-se um planejamento experimental com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para verificar se os compostos furfural (1 e 4g.L-1), ácido acético (1 e 5% v/v) e massa da levedura (0,2 e 1% m/v) exerciam significativa inibição na espécie testada. A presença de furfural e ácido acético exibiu forte influência na espécie considerada, chegando a prejudicar em mais de 90% o consumo de açúcares no meio. O processo de detoxificação avaliou a concentração através de um planejamento experimental com carvão ativado (1, 3 e 5% m/v) e o tempo do processo (30, 45 e 60 min) a 30 °C, 150 rpm. A detoxificação aumentou em 13% a eficiência de fermentação para o hidrolisado obtido hidrotermicamente, enquanto que para o ácido não houve diferença significativa. Dessa forma, foi possível concluir que o estudo das condições de processo possibilitou o aumento da produção de etanol comparado aos valores já relatados em estudos anteriores com a casca do coco verde. Identificou-se a potencialidade da folha do coqueiro para produção de etanol de segunda geração, e verificou-se que as condições de detoxificação podem ser adaptadas as biomassas do cultivo de coco para aumentar a eficiência e tornar os resultados factíveis à produção industrial.

**Palavras chaves:** casca do coco verde; folha do coqueiro; hidrólise enzimática; fermentação; detoxificação; biomassa; energia limpa.

GOMES, Márcia Andréa. **Estudo da produção de etanol lignocelulósico a partir de resíduos do cultivo de coco.** 2023. Tese de doutorado em Engenharia Industrial – Universidade Federal da Bahia, 2023.

## ABSTRACT

The use of lignocellulosic biomass for the production of second-generation ethanol, such as green coconut husk, implies the development and improvement of biomass conversion steps into sugars and these into ethanol via fermentation. Thus, the execution of the pretreatment step, responsible for breaking the lignocellulosic matrix leaving it accessible to enzymatic attack in the hydrolysis step, is necessary. With the available monomers (mainly xylose and glucose), the yeast converts them into ethanol, in the fermentation step. Thus, this work aimed to study the conditions of saccharification and fermentation, using residues from coconut cultivation as biomass, with the objective of evaluating the best conditions of saccharification and fermentation for the production of E2G. Initially, the hydrothermal pretreatment (HPT) was carried out in a PARR type reactor using 15% (w/v) of solids, at 195°C, 10 min and 200 rpm. In parallel, an experimental design was carried out for the acid pretreatment (APT) (factors: concentration 1 and 2% of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and temperature of 100 and 120°C) aiming at optimizing the pretreatment operating conditions. Depending on the glucose concentration, the conditions of 1% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 100°C for green coconut shell (GCS), 2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 120°C for coconut-tree leaflet (CLL) and 2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 100°C for the coconut-tree leaf stalk (CLS) followed by enzymatic hydrolysis, using 7.5% (w/v) of solids and 20 FPU/gbiomass dry Cellic Ctec2 (58 FPU/mL), supplemented with 10% Cellic Htec (7326 IU/mL), relative to the volume of Cellic Ctec2. After 72h of reaction, the glucose concentrations reached 31.85 and 19.07 g/L for the hydrolysis of GCS subjected to HPT and APT, respectively. Regarding the behavior of CLL in hydrolysis, 21.31 and 13.65 g/L of glucose concentration were reached when this biomass was submitted to HPT and APT, respectively. For CLS, 45.39 and 21.01 g/L of glucose were obtained after HPT and APT, respectively. These results showed that enzymatic hydrolysis using hydrothermal pretreatment was more efficient than the results obtained for pretreated acidic biomasses. Then, all samples were sent to fermentation with *Kluyveromyces marxianus* yeast at 37°C/24 h. At this stage it was possible to verify that practically all glucose and xylose were consumed by the yeast. However, the ethanol yield reached values between 47 and 80%, indicating possible problems of a toxic nature, that is, the production of secondary compounds, such as acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF). A preliminary study was carried out to increase the fermentation efficiency in sugarcane bagasse hydrolyzate, biomass well studied for this purpose, and submitted to hydrothermal (195°C, using 200 rpm for 10 min) and acid (0.5% (v/v) of sulfuric acid at 121°C for 15 min) and in both, the solid load of (10% m/v). The enzymatic hydrolysis of the pretreated material was carried out using the CellicCtec® enzymatic complex (60 FPU/g<sub>dry</sub> biomass, 50mM citrate buffer and pH 4.8) at 50°C using 150 rpm for 72h. Before the detoxification process, an experimental design was carried out with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to verify if the compounds furfural (1 and 4g/L) and acetic acid (1 and 5% v/v) and yeast mass (0.2 and 1% m/v) exerted significant inhibition on

GOMES, Márcia Andréa. **Estudo da produção de etanol lignocelulósico a partir de resíduos do cultivo de coco.** 2023. Tese de doutorado em Engenharia Industrial – Universidade Federal da Bahia, 2023.

the tested species. The presence of furfural and acetic acid had a strong influence on the species considered, affecting the consumption of sugars in the environment by more than 90%. The detoxification process evaluated the concentration through an experimental design with activated charcoal (1, 3 and 5% m/v) and the process time (30, 45 and 60 min) at 30 °C, 150 rpm. Detoxification increased the fermentation efficiency by 13% for the hydrolyzate obtained hydrothermally, while for the acid there was no significant difference. Thus, it was possible to conclude that the study of process conditions enabled the increase in ethanol production compared to the values already reported in previous studies with green coconut husk. The potentiality of the coconut leaf for the production of second-generation ethanol was identified, and it was verified that the detoxification conditions can be adapted to the biomass of coconut cultivation to increase efficiency and make the results feasible for industrial production.

**Keywords:** green coconut shell; coconut leaf; enzymatic hydrolysis; fermentation; detoxification; biomass; clean energy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Matriz de energia elétrica do Brasil.	16
Figura 2.2	Estrutura da biomassa lignocelulósica.	19
Figura 2.3	Estrutura da celulose	21
Figura 2.4	Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas	21
Figura 2.5	Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses	22
Figura 2.6	Esquema da estrutura da lignina com suas principais ligações	23
Figura 2.7	Fotografia ilustrando a vegetação de coqueiros predominante da faixa do litoral norte de Alagoas	24
Figura 2.8	Desenho esquemático das partes que compõem a folha pinada	27
Figura 2.9	Fotografia ilustrando folhas secas de coqueiro em processo de clorose	27
Figura 2.10	Fotografia ilustrando o desenvolvimento da inflorescência	28
Figura 2.11	Representação esquemática do coco.	29
Figura 2.12	Fotografia mostrando os resíduos do coqueiro e do coco no calçadão da Praia de Ponta Verde em Maceió-AL	30
Figura 2.13	Fotografia ilustrando o lixo verde composto por casca, folha e cachos de coqueiro	31
Figura 2.14	Representação das etapas de conversão da biomassa em etanol 2G	32
Figura 2.15	Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico	33
Figura 2.16	Ação de celulases na cadeia polimérica de celulose	39
Figura 2.17	Formação dos compostos inibitórios	41
Figura 3.1	Glucose and xylose concentrations during the enzymatic hydrolyses of GCS (A), CLL (B) and CLS (C). Squares and circles represent glucose and xylose concentration, respectively. White and Black symbols represent hydrothermal and acidic pretreatments, respectively	51

- Figura 3.2 Glucose (■), xylose (□), ethanol (●), glycerol (○) and acetic acid (▲) concentrations during the fermentation step of GCS, CLL and CLS submitted to HPT (a, c and e) and APT (b,d and f), respectively 52
- Figura 4.1 Figure showing the significance of the variables. The response variable is sugar consumption (%) in the medium represented by the numbers on the right of the graphs 69
- Figura 4.2 Relation between time and adsorbent dose to the total reducing sugars (TRS) (g/L) recovered from sugarcane hydrolysate A) for hydrothermal and B) for acidic pretreatment 71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Composição Química da Biomassa Lignocelulósica	20
Tabela 2.2	Área plantada, área colhida e produção por região no Brasil – 2017/2021	25
Tabela 3.1	Chemical composition of the raw and pretreated coconut-tree biomasses	49
Tabela 3.2	Enzymatic conversion of cellulose-to-glucose and hemicellulose-to-xylose after 72 h of hydrolysis	52
Tabela 3.3	Kinetic parameters obtained when the time of maximum ethanol concentration is considered	53
Tabela 4.1	Sugar consumption during fermentation by <i>S. cerevisiae</i>	64
Tabela 4.2	Chemical characterization of the raw sugarcane bagasse and in pretreated biomass (in dry matter)	66
Tabela 4.3	ANOVA for the linear model of sugar consumption	68
Tabela 4.4	Total reducing sugars (TRS) for hydrothermal and acid pretreatment after detoxification process	71
Tabela 4.5	Ethanol concentration and fermentation efficiency obtained after the fermentation step	72

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

E1G	etanol de primeira geração
E2G	etanol de segunda geração
AR	açúcares redutores
ART	açúcares redutores totais
HMF	5-hidroximetilfurfural
PHCHS	pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio
PA	pré-tratamento alcalino
CCV	casca do coco verde
FFC	folíolos da folha do coqueiro
RFC	raque da folha do coqueiro
PTH	pré-tratamento hidrotérmico
PTA	pré-tratamento ácido
FS	fator de severidade
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
ANOVA	análise de variância
ANEEL	agência nacional de energia elétrica

## **LISTA DE ABREVIAÇÕES EM INGLÊS**

GSC	green coconut shell
CLL	coconut-tree leaflet
CLS	coconut-tree leaf stalk
APT	acid pretreatment
HPT	hydrothermal pretreatment
FPU	filter paper units
YEPD	yeast extract peptone dextrose

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1    Objetivo Geral.....	14
1.2    Objetivos Específicos .....	15
<b>Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1    A matriz energética .....	16
2.2    Biomassa: Fonte de Bioenergia .....	18
2.2.1    Celulose .....	20
2.2.2    Hemicelulose .....	21
2.2.3    Lignina.....	22
2.2.4    Compostos Orgânicos e Inorgânicos .....	23
2.3    O coqueiro e O coco .....	24
2.3.1.    Geração de Resíduos Provenientes do Coqueiro .....	29
2.4    Etapas da produção de etanol de segunda geração .....	31
2.4.1.    Pré-Tratamento .....	33
2.4.1.1    Pré-Tratamento ácido.....	35
2.4.1.2    Pré-Tratamento hidrotérmico.....	36
2.4.2    Hidrólise .....	38
2.4.3    Fermentação Alcoólica.....	39
2.4.4    Inibidores e Métodos de Detoxificação .....	40
<b>Capítulo 3 – RESÍDUOS AGRÍCOLAS DO CULTIVO DO COCO COMO MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO PELA <i>KLUYVEROMYCES MARXIANUS</i> .....</b>	<b>43</b>
3.1    Introduction.....	44
3.2    Materials and Methods.....	45
3.2.1    Raw Material .....	45
3.2.2    Lignocellulosic Characterization.....	46
3.2.3    Hydrothermal Pretreatment (HPT) .....	46
3.2.4    Acid Pretreatment (APT).....	46
3.2.5    Enzymatic Hydrolysis Using Cellulases and Hemicellulases .....	47
3.2.6    Fermentation Step by <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	47
3.2.7    Glucose, Xylose, Ethanol, Acetic Acid and Glycerol Quantification .....	47

3.3	Results and Discussion .....	48
3.3.1	Characterization of the Raw and Pretreated Coconut-Tree Biomasses.....	49
3.3.2	Enzymatic Hydrolysis .....	50
3.3.3	Fermentation Step.....	52
3.3.4	Potential of Coconut-Tree Residues for Ethanol Production .....	54
3.4	Conclusions.....	55
3.5	References.....	55
<b>CAPÍTULO 4 – A EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO EXIBIDA PELA SACCHAROMYCES CEREVIAE NO HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR, ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO E DETOXIFICAÇÃO.....</b>		<b>61</b>
4.2	Materials and Methods.....	63
4.2.1	Raw material.....	63
4.2.2	Hydrothermal pretreatment .....	63
4.2.3	Dilute sulfuric acid pretreatment .....	63
4.2.4	Chemical characterization of the biomass .....	63
4.2.5	Enzymatic hydrolysis of raw and pretreated biomass .....	64
4.2.6	Testing the inhibitory effect of acetic acid and furfural on ethanol fermentation by <i>S. cerevisiae</i> .....	64
4.2.7	Fermentation of bagasse liquor obtained by hydrothermal and acidic pretreatment and enzymatic hydrolysis and the effect of detoxification step .....	65
4.3	Results and Discussion .....	66
4.3.1	Chemical characterization of the raw and pretreated biomass .....	66
4.3.2	Effect of inhibitor presence on <i>S. cerevisiae</i> fermentation activity.....	67
4.3.3	Detoxification and fermentation of sugarcane bagasse broth.....	70
4.3.4	Fermentation of non-detoxified and detoxified sugarcane bagasse broth .....	71
4.4	Conclusions.....	73
4.5	References.....	73
<b>Capítulo 5 - CONCLUSÕES .....</b>		<b>80</b>
<b>Capítulo 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>		<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>83</b>

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

As alterações no preço do petróleo e derivados, associados à busca por uma energia limpa e renovável e a preocupação com a dependência da matriz energética dos combustíveis fósseis, sugere como uma das alternativas a produção de biocombustíveis. No entanto, a produção de etanol empregando cana-de-açúcar, o milho e a beterraba competem com a produção de alimentos. Como alternativa, surge à utilização das biomassas agroindustriais para produção de etanol. Contudo, o uso dessas matérias-primas trazem uma série de dificuldades a serem superadas nas etapas de processamento, o que desperta a necessidade de progressivos estudos e desenvolvimento para a produção de etanol de segunda geração (BARBOSA, 2017; GOMES, 2015; GONÇALVES, 2014; RUIZ *et al.*, 2023).

A biomassa é matéria vegetal gerada pela fotossíntese e seus diversos produtos e subprodutos, tais como resíduos agrícolas, dejetos animais e matéria orgânica. Além disso, podem ser encontrados nos rejeitos industriais e urbanos que descartados de forma inadequada podem gerar: demanda por espaço em aterros para descarte do resíduo; proliferação de vetores, decorrente da decomposição; emissão do gás metano, também decorrente da sua decomposição; e impacto visual do descarte em aterros (JERONIMO; SILVA, 2013; SANTOS-ROCHA, 2017).

Assim, a biomassa lignocelulósica pode ser reaproveitada energeticamente, pois possui em sua composição química macromoléculas orgânicas que constituem a parede celular formada de celulose envolvida de hemicelulose, que por sua vez se encontram envolvidas pela lignina. E os monômeros de açúcar que compõem a celulose e a hemicelulose podem ser convertidos em etanol (LORA; GLASSER, 2002). No entanto, devido à estrutura rígida da lignina se faz necessário a etapa de pré-tratamento capaz de desestruturá-la. As tecnologias de pré-tratamento aplicadas aos substratos lignocelulósicos são necessárias para diminuir esta recalcitrância. Nessa etapa, inibidores como: furfural, hidrometilfurfural, ácido acético e compostos fenólicos, podem ser formados e comprometer as etapas seguintes de hidrólise enzimática e o metabolismo da levedura na fermentação (CHEN *et al.*, 2020; CORRÊA, 2016; REZENDE *et al.*, 2011). Estudos de detoxificação utilizando carvão ativo e polímeros são propostos para aumentar a vitalidade da levedura e permitir maior produção de etanol na presença de inibidores e ainda o aproveitamento integral da biomassa (FREITAS;

NOGUEIRA; FARINAS, 2019; LI; QI; WAN, 2020). Dessa forma, esse tipo de substrato se torna passível à fermentação para produção de etanol (GOMES *et al.*, 2015).

O processo de fabricação do E2G é uma realidade na Raízen, indústria sucroenergética que produz açúcar, álcool e energia. Na Raízen, as plantas de E2G foram projetadas para processar bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima, utilizando pré-tratamento ácido e térmico aliado a uma hidrólise enzimática. As etapas de fermentação e destilação são mais parecidas com o processo produtivo do E1G. A diferença é que a fermentação do açúcar xilose requer o uso de uma levedura geneticamente modificada. A planta de E2G pode realizar outras etapas secundários, como evaporação dos caldos, separação de sólidos, secagens, tratamento de efluentes e águas (RAÍZEN, 2023).

Nesse contexto, alguns estudos já realizados apontam outras biomassas promissoras, a casca do coco verde como uma potencial biomassa lignocelulósica para produção de etanol (CABRAL, 2014; FREITAS; PEREIRA *et al.*, 2016; SILVA, 2016). De acordo com Gonçalves (2014) a casca do coco verde *in natura* possui 33,2% de celulose, 29,1% de hemicelulose e 25,4% de lignina, tais percentuais induzem o potencial energético dessa biomassa quando comparado à palha de cana de açúcar com 34,8% de celulose, 24,3% de hemicelulose e 20,2% de lignina, e esta já se apresenta no cenário industrial como biomassa na produção de etanol de segunda geração (PRATTO, 2015).

Considerando ainda que o coco, produto importante no Brasil, especificamente na região nordeste, constitui-se como biomassa promissora, uma vez que é subproduto da industrialização da água de coco assim como as demais partes do coqueiro que são depositadas em lixões e aterros sanitários, e quando não utilizados para fins mais nobres, agrava a crescente preocupação com o meio ambiente (CARDOSO; GONÇALEZ, 2016).

A fim de aprimorar a utilização da casca do coco verde e da folha do coqueiro na produção de E2G, este trabalho tem como objetivo estudar as condições necessárias às etapas de sacarificação e fermentação. Avaliou-se também etapa de detoxificação do hidrolisado lignocelulósico.

## 1.1 Objetivo Geral

Avaliar configurações de sacarificação e de fermentação utilizando a casca do coco verde e a folha do coqueiro como fonte de carbono oriundo de diferentes pré-tratamentos, para produção de etanol.

## 1.2 Objetivos Específicos

- Realizar pré-tratamento ácido e hidrotérmico da casca do coco verde e da folha do coqueiro, caracterizando a biomassa *in natura* e após cada pré-tratamento, para avaliar sua eficiência em termos de material celulósico e hemicelulósico;
- Estabelecer a quantidade do extrato enzimático responsável por hidrolisar o polímero de celulose e hemicelulose, assim como a carga microbiana a ser utilizada para fermentação;
- Estimar as condições de sacarificação e avaliar o regime e condições operacionais; avaliar as condições de fermentação e determinar a melhor levedura a ser utilizada;
- Desenvolver ensaios de detoxificação para avaliar a possibilidade de aumentar a eficiência de fermentação.

Para atingir os objetivos propostos, a tese foi estruturada em 6 capítulos, assim divididos:

O Capítulo 1 apresenta uma introdução ao tema abordado, destacando as principais motivações do estudo.

O Capítulo 2 traz uma revisão da literatura, apresentando com detalhes os temas abordados no trabalho.

O Capítulo 3 aborda uma avaliação do potencial energético de resíduos dos cultivos de coco na produção de biocombustíveis, especificamente etanol.

O Capítulo 4 refere-se ao estudo da detoxificação com a finalidade de aumentar a eficiência de fermentação no hidrolisado lignocelulósico.

As conclusões obtidas no trabalho são apresentadas no capítulo 5.

Por fim, o capítulo 6 apresenta sugestões para trabalhos futuros.

## CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

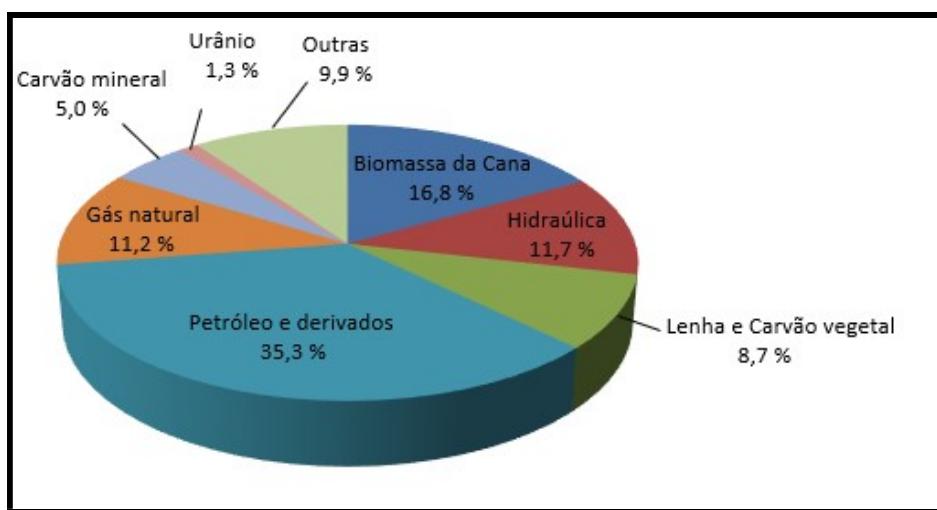
### 2.1 A matriz energética

A preocupação com a matriz energética ocupa um lugar de destaque no contexto internacional devido à dependência dos combustíveis fósseis, pois estes possuem uma natureza finita, apresentam inconstância política e econômica e ainda contribuem para emissão excessiva de gases de efeito estufa ocasionando o aquecimento global (AQUINO; BIDÔ; OLIVEIRA, 2014; BARBOSA *et al.*, 2015; KULYOYO *et al.*, 2014; (ZENG *et al.*, 2021).

Estudos relatam algumas alternativas viáveis como o investimento em energia renovável e, nesse quadro estão inseridos os biocombustíveis, os quais estão em ampliação para atingir padronização e características de tecnologia plenamente desenvolvida (KOHLHEPP, 2010; ROSO *et al.*, 2016).

No âmbito nacional a preocupação se repete, de acordo com o boletim do Ministério de Minas e Energia de outubro de 2022, as fontes que constituem a matriz de energia elétrica são: o petróleo, a biomassa da cana-de-açúcar, o gás natural, a hidráulica, a lenha e carvão vegetal, o carvão mineral, o urânio, e outras, como mostra a Figura 2.1.

**Figura 2.1: Matriz de energia elétrica do Brasil.**



Fonte: Adaptado do Ministério de Minas e Energia (2022).

A biomassa da cana-de-açúcar ou produtos da cana constitui 16,8% da matriz energética. Ainda de acordo com o boletim emitido pelo Ministério a categoria outras incluem energia eólica, energia solar e energia proveniente de outras biomassas.

A energia proveniente de outras biomassas foi analisada por Rocha; Almeida; Da Cruz, (2017), avaliando o potencial dos resíduos na geração de energia e/ou também na produção de bioetanol. Os resíduos derivados dos cultivos de arroz, milho, soja, trigo, cana-de-açúcar e coco foram estudados mostrando que as biomassas provenientes da cana-de-açúcar e do milho apresentam elevado potencial energético. Em relação ao bioetanol, o uso de biomassas residuais (palha e bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e milho e casca de coco) pode vir a contribuir com um acréscimo expressivo em litros de bioetanol por hectare, sem a necessidade de aumentar a área plantada. O estudo ainda associa a localização geográfica dos resíduos e mostra o futuro promissor apesar dos entraves ainda associados à tecnologia de conversão da biomassa lignocelulósica.

O estudo feito por De Miranda, Martins; Lopes (2019), analisa o potencial energético das biomassas agroindustriais, que engloba as culturas agroenergéticas e os resíduos e subprodutos das atividades agrícolas, como da produção de soja, milho, cana-de-açúcar e arroz e comprova a potencialidade de utilizá-los como fonte de energia. O artigo mostra o futuro próspero das biomassas agroindustriais, mas correlaciona que a falta de políticas públicas de longo prazo retarda a ampliação da utilização desta fonte renovável no setor energético, causando uma dependência dos combustíveis fósseis.

No Brasil, a preocupação com a dependência dos fósseis deu início a biocombustíveis de primeira geração como o etanol, a partir do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) em 1975, na época a preocupação ambiental ainda não era tratada de forma tão enfática. Somente na década de 80, os pesquisadores começaram a alertar os governos sobre o aquecimento global e em 1997, o Protocolo de Quioto foi assinado oficializando a preocupação com o meio ambiente que estabelecia metas quantitativas para a redução da emissão de gases de efeito estufa. Sendo assim, em 2005, ocorreu a implantação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) que pretendia promover o incentivo a produção de um combustível que gerasse menos gás carbônico e outros poluentes (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2009; DELGADO; EVANGELISTA; ROITMAN, 2017; LEITE; LEAL, 2007). O uso de biocombustíveis representa uma das formas mais efetivas de contribuir com essa redução. No entanto, os de primeira geração enfrentam uma limitação na produção, pois competem com as fontes alimentares (MURAKAMI; BOMBANA; AFFONSO, 2016).

Esses biocombustíveis são produzidos a partir de material vegetal que dispõe de bioenergia para ser processada. O etanol de primeira geração (E1G) mais conhecido é extraído do açúcar de plantas cultivadas como cana-de-açúcar e milho (RODRIGUES FILHO; JULIANI, 2013; SILVA, B. *et al.*, 2015; SILVA, 2016; THUMÉ *et al.*, 2013). Seguido pelo biodiesel produzido a partir de plantas oleaginosas como soja, mamona, dendê e girassol (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005; RIZZI; SILVA; MAIOR, 2010). O etanol de segunda geração (E2G) mais conhecido é produzido de resíduos agrícolas, industriais e florestais como bagaço e palha de cana-de-açúcar, casca do coco verde, sabugo de milho, pseudocaule da bananeira, entre outras (CABRAL *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2015; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016; SILVA, 2016).

Nesse contexto, visto a concorrência das matérias-primas com as fontes alimentares, o bioetanol, ou etanol celulósico ou ainda etanol de segunda geração apresenta-se como alternativa que possibilita a utilização das biomassas residuais. Sendo necessário o conhecimento para desenvolver as rotas tecnológicas que permitam a utilização de tais biomassas e também uma fonte de energia que complementa a matriz energética.

## 2.2 Biomassa: Fonte de Bioenergia

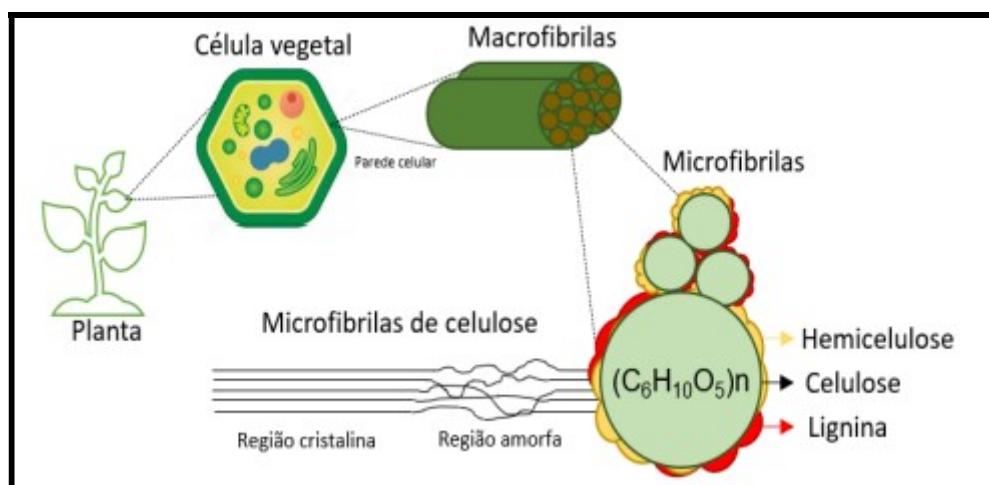
A biomassa é passível de ser transformada em energia, classificada de acordo com a origem, pode ser florestal como a madeira, agrícola como a soja, o arroz e a cana-de-açúcar, entre outras. E ainda oriunda de rejeitos urbanos ou industriais, sólidos ou líquidos. Dela é possível obter energia elétrica e combustível, como o biodiesel e o bioetanol, cujo consumo é crescente em complementação aos derivados de petróleo como o óleo diesel e a gasolina (ANEEL, 2008).

A disponibilidade de palhas, folhas, resíduo de exploração madeireira, rejeitos agrícolas e outros, tem despertado o interesse para seu uso como matéria-prima na produção de bioetanol (SOUZA *et al.*, 2012). Assim como a abundância dos resíduos agroindustriais, onde é estimado que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada sejam gerados 140 kg de bagaço e 140 kg de palha (em base seca). Em especial o bagaço, por se tratar de um material volumoso, a simples deposição ao ar livre, durante a estocagem, favorece a fermentação e apodrecimento (BONASSA *et al.*, 2015). Estes podem ser reaproveitados para gerar energia elétrica ou como biomassa na produção de etanol 2G, agregando valor aos resíduos gerados (MARTINEZ; ARMIN, 2017).

No entanto, o aproveitamento de resíduos da indústria é uma questão que se encontra diretamente associada à localização geográfica de suas culturas e suas respectivas capacidades produtivas. O levantamento feito por Rocha; Almeida; Da Cruz, (2017) mostra que no Brasil, a região centro-oeste concentra as culturas de milho e soja gerando assim grandes quantidades de sabugo e palha de milho e casca de soja. Já a região sul detém a maior produção das culturas de arroz. Enquanto a região sudeste é a que apresenta maior produção de cana-de-açúcar, consequentemente tem-se nessa região as maiores usinas e também uma maior produção de bagaço e palha. E finalmente, na região nordeste predomina a produção do coco, o que indica que fábricas de beneficiamento de resíduos do coco verde deveriam se instalar nessa região, visto que esses resíduos são volumosos, inviabilizando assim os custos associados ao transporte e ao armazenamento de tais resíduos.

Essas biomassas apresentam uma estrutura fibrosa que contêm materiais lignocelulósicos. Na conversão dessa biomassa em açúcares fermentáveis é necessário compreender a estrutura e a composição do material lignocelulósico e assim entender a tecnologia de produção do etanol de segunda geração. A Figura 2.2, mostra a estrutura da biomassa lignocelulósica e seus constituintes a celulose, a hemicelulose e a lignina.

**Figura 2.2: Estrutura da biomassa lignocelulósica.**



Fonte: Adaptado de GUERI et al. (2021).

O termo “lignocelulósico” corresponde a um conjunto de fibras, composto por macromoléculas orgânicas que constituem a parede celular formada por fibras elementares de celulose envolvidas em uma matriz amorfa, a hemicelulose. A hemicelulose é envolvida pela lignina que constitui uma barreira para o ataque de microrganismos e enzimas, tornando um material pouco reativo e bastante rígido (LORA; GLASSER, 2002).

As porções de celulose, hemicelulose e lignina da biomassa representam os componentes majoritários, porém há a presença de outros componentes que são chamados de extrativos (compostos orgânicos) e as cinzas (compostos inorgânicos) (LUCY; PETRI, 2010). A Tabela 2.1 mostra a composição química de algumas biomassas, pode-se observar que os componentes são encontrados em quantidades diferentes em vegetais de diferentes origens. A maioria das biomassas aponta a celulose como componente em maior quantidade, seguido pela hemicelulose (exceção para a casca de coco que possui maior teor de lignina do que de hemicelulose), indicando alto potencial de conversão desses polissacarídeos em etanol.

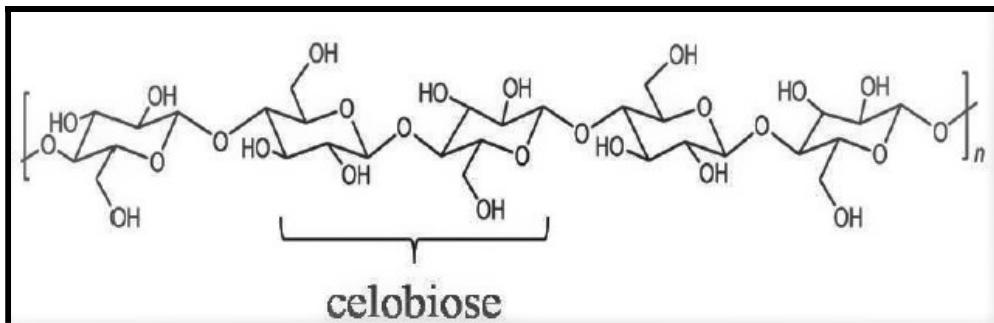
**Tabela 2.1: Composição Química da Biomassa Lignocelulósica.**

Resíduo	Composição química (%)			Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Bagaço de cana-de-açúcar	41 - 44	25 - 27	20 - 22	LINO, 2015
Palha de cana-de-açúcar	40 - 42	30 - 32	22 - 25	PRATTO, 2015
Sabugo de Milho	45	35	15	SANTOS et al., 2012
Casca de coco	35 - 47	15 - 28	30,6 - 45	PEREIRA, 2012
Sisal	43-56	21 - 24	7 - 9	DIRCEU et, al., 2006
Fibra de bananeira	52	10	11	SILVA, 2016

### 2.2.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante presente na parede celular dos vegetais, corresponde a cerca de 50% de todas as reservas de carbono disponível na biosfera. Trata-se de um homopolissacarídeo linear de cadeia longa, constituído por unidades de D-glucose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4). Contudo, esses monômeros se ligam por meio de seu grupo hidroxila e, perdendo uma molécula de água, dão origem a unidade estrutural básica da celulose, a celobiose, que é um dímero de glicose (PITARELO, 2013), como mostra a Figura 2.3.

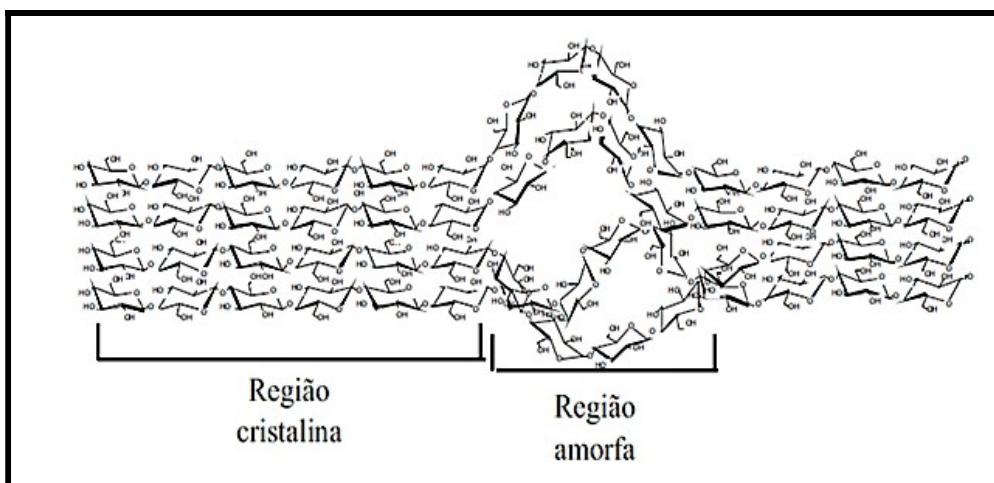
**Figura 2.3: Estrutura da celulose.**



Fonte: Adaptado de SANTOS-ROCHA (2017).

Sua estrutura composta por hidroxilos permite a ocorrência de ligações pontes de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares, além de interações de van der Walls entre as unidades de glicose, contribuindo para a formação de uma estrutura bifásica (SILVA, 2016). Possui ainda uma estrutura cristalina que é mais organizada, conferindo resistência e proteção à célula contra agentes externos, e uma região amorfã, onde há menor organização e por isso é mais suscetível a degradação pelo reagente (CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011), como mostra a Figura 2.4.

**Figura 2.4: Estrutura da celulose destacando as regiões cristalinas e amorfas.**



Fonte: Adaptado de SUN & CHENG (2002).

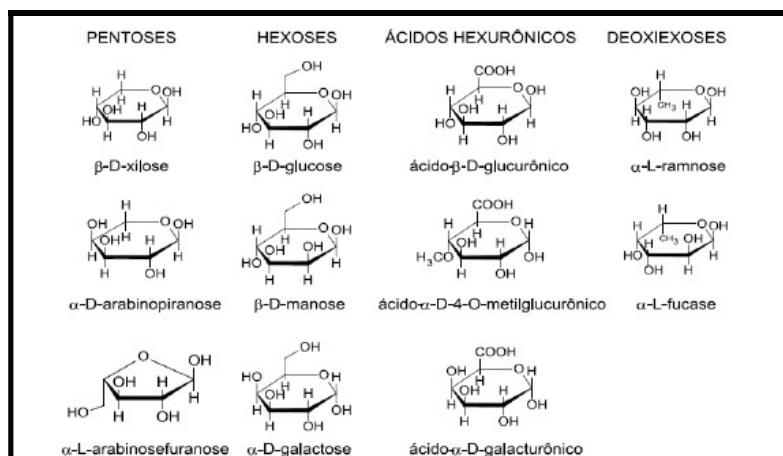
## 2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é definida como heteropolímero formada por monossacarídeos em cadeia ramificada compondo quatro grupos: as pentoses (xilose, arabinose), as hexoses

(manose, glicose, galactose), os ácidos hexourônicos (ácido galacturônico, ácido metilgalacturônico e ácido glicurônico) e as desoxi-hexoses (fucose e ramnose) (CHEMMÉS *et al.*, 2013; MAICHE; HUBER, 2010), como mostra a Figura 2.5.

De acordo com Corrêa (2016) a hemicelulose atua fazendo ligações entre a lignina e as fibras de celulose atribuindo rigidez e promovendo a integração dos três polímeros, celulose-hemicelulose-lignina.

**Figura 2.5: Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.**

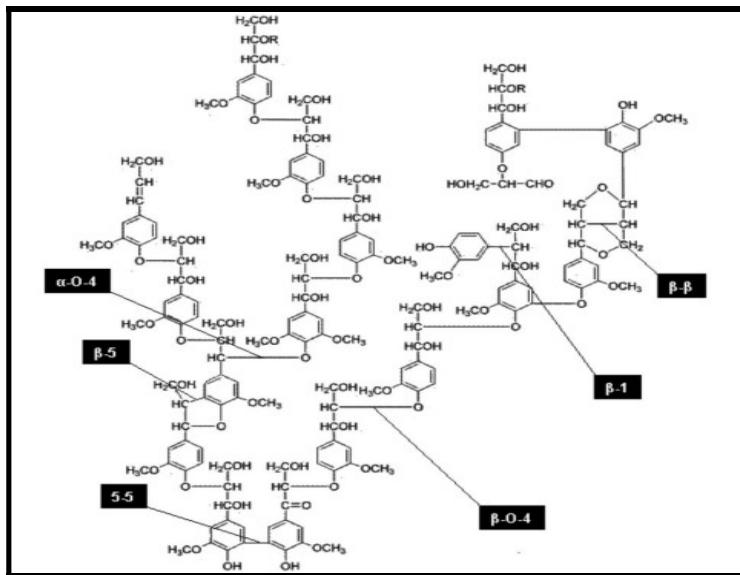


Fonte: Adaptado de MORAIS; NASCIMENTO; MELO (2005)

### 2.2.3 Lignina

A lignina é, depois da celulose, o segundo mais abundante biopolímero terrestre e é responsável por aproximadamente 30% do carbono orgânico na biosfera (GOMES, 2015). Sua estrutura química é hidrofóbica e complexa. É formada por unidades de fenilpropano derivadas da polimerização oxidativa de três precursores: os álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (GROSSI, 2015). A Figura 2.6 mostra a estrutura complexa e os tipos de ligações entre as unidades básicas de lignina.

**Figura 2.6: Esquema da estrutura da lignina com suas principais ligações.**



Fonte: Adaptado de CARVALHO et al. (2009).

Do ponto de vista da característica da fibra, a lignina representa um dos principais entraves para o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos, pois é responsável pela resistência mecânica dos vegetais, causando elevada rigidez. Sendo assim, ela precisa ser retirada da biomassa lignocelulósica, para facilitar o acesso à celulose.

#### 2.2.4 Compostos Orgânicos e Inorgânicos

Os compostos orgânicos e inorgânicos ficam próximo à parede celular da biomassa lignocelulósica, pertencente à classe muito diferente em termos de composição química denominada: extrativos e cinzas. Os extrativos são constituintes orgânicos que não fazem parte da estrutura da parede celular. São solúveis em água ou em solventes orgânicos neutros e estão presentes principalmente na casca. De baixa massa molecular e somando pequenas quantidades, eles englobam óleos essenciais, resinas, taninos, graxas e pigmentos. As cinzas, que compreendem os componentes inorgânicos da matéria lignocelulósica, são constituídas principalmente por sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005; PITARELO, 2013).

### 2.3 O coqueiro e O coco

O coqueiro é uma planta pertencente à família *Palmae*, da classe *Monocotyledoneae*. Sendo que todos os coqueiros cultivados pertencem à espécie *Cocos nucifera* L. que é uma cultura tropical, largamente distribuída na Ásia, África, América Latina e região do Pacífico. Esta cultura pode ser classificada como uma das frutíferas mais importantes mundialmente, provocando ampla circulação econômica. Isso se deve, a sua produção de óleo e também por se apresentar como cultura de subsistência para pequenos produtores. Além disso, o coqueiro tem um papel importante na contribuição para a sustentabilidade do meio ambiente, sendo disseminado ao longo da faixa costeira (CABRAL, 2014; ESTEVES, 2014; SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002).

No Brasil a cultura foi introduzida em 1553, no estado da Bahia (daí coco-da-baía), originária do sudeste Asiático foi trazido pelos portugueses. O coqueiro se adaptou aos solos arenosos, ao clima e vegetação da faixa litorânea do nordeste brasileiro, como mostra a Figura 2.7, permitindo assim o aparecimento de uma nova classe produtora. Em 1985, a área colhida com coqueiro no Brasil situava-se em torno de 166 mil hectares, nesse período verificou-se um deslocamento das áreas tradicionais de produção de coco em direção às demais regiões do país, principalmente para o norte e sudeste (FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002).

**Figura 2.7: Fotografia ilustrando a vegetação de coqueiros predominante da faixa do litoral norte de Alagoas.**



Fonte: Acervo do autor (2018).

Quando comparado à área colhida dos frutos do ano de 1985 com os dados da Tabela 2.2 é possível observar o aumento, em torno 12,3%, até 2021. Ainda é importante comparar os anos de 2017 e 2021, a maior produção dos frutos e o crescente aumento ocorre nas regiões onde foi iniciado o plantio no país: nordeste, sudeste e sul, respectivamente. O mesmo não é verificado nas regiões norte e centro-oeste. Essa importância acontece quando segundo Rocha; Almeida; da Cruz, (2017) tal distribuição geográfica interfere na distribuição dos resíduos agroindustriais.

**Tabela 2.2: Área plantada, área colhida e produção por região no Brasil – 2017/2021.**

Regiões	Área plantada (ha)		Área Colhida (ha)		Produção (mil frutos)	
	Ano da safra		Ano da safra		Ano da safra	
	2017	2021	2017	2021	2017	2021
Norte	20.528	18.863	20.569	18.833	186.528	176.892
Nordeste	173.217	152.800	172.547	151.904	1.067.193	1.235.042
Sudeste	14.996	14.628	14.625	14.443	200.684	212.580
Sul	239	218	235	218	1.493	1.591
Centro-Oeste	1.578	1.140	1.430	994	17.528	12.468
Brasil	210.558	187.649	209.406	186.392	1.473.426	1.638.573

\*ha: hectares

Fonte: Adaptado do IBGE (2021).

Essa produção crescente ocupando um ecossistema com poucas possibilidades, como semiárido nordestino, sem recursos de outras explorações comerciais estão embasadas em dois segmentos diferenciados: a produção de coqueiro destinada ao consumo de coco seco e a produção de coco fresco destinado à água de coco. A produção está dividida entre as variedades de Typica (coqueiro gigante), Nana (coqueiro anão) e híbrido (CASTRO, 2007; MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011; SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002).

Segundo Martins & Jesus Junior, (2011), as três variedade apresentam finalidades diferentes:

- Coqueiro anão: apresenta porte pequeno podendo atingir de 10 a 12 m de altura. Inicia a produção mais precoce em média com 2 a 3 anos após o plantio, tendo uma vida útil de 30 a 40 anos. Sua principal finalidade é a produção de água de coco, com a qualidade sensorial superior às demais e podendo armazenar em torno de 300 mL de água. A produtividade é em média 150 a 200 frutos/planta/ano. O coqueiro anão apresenta as

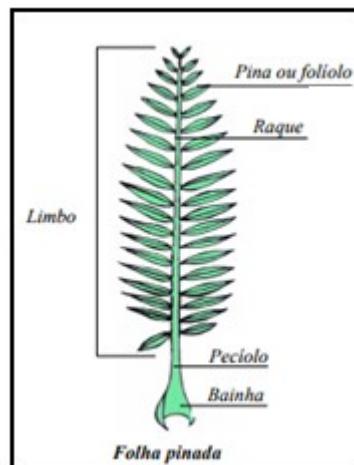
cultivares: anão verde, anão amarelo e anão vermelho. No Brasil a variedade mais utilizada comercialmente é a verde para o consumo de água de coco, popularmente chamado coco verde.

- Coqueiro gigante: apresenta porte grande podendo atingir até 35 m de altura na maturidade produtiva. Inicia a produção em condições ideais com 5 a 7 anos de vida podendo atingir até 70 anos. Sua principal finalidade é o fornecimento da polpa tanto para o uso *in natura* quanto à industrialização, na obtenção de produtos como coco ralado, leite de coco, doce, óleo de coco, farinha, fibras, entre outros produtos e subprodutos. A produtividade é em média 60 a 80 frutos/planta/ano. É popularmente conhecido como coco maduro ou seco.
- Coqueiro híbrido: resultado do cruzamento das variedades Anã e Gigante apresenta porte intermediário podendo atingir 20 m de altura. Inicia a produção com 3 a 4 anos após o plantio, tendo vida útil de 50 a 60 anos. Apresenta dupla finalidade, devido ao seu potencial de utilização tanto de forma *in natura* como no processamento industrial. A produtividade é em média 130 a 150 frutos/planta/ano.

A estrutura morfológica do coqueiro consiste em cinco partes: raiz, caule, folha, inflorescência e fruto. A raiz possui sistema radicular com grande número de raízes grossas, dentre elas as primárias de 8 mm a 10 mm de diâmetro, dessas partem as secundárias e sucessivamente as terciárias que produzem as radicelas com 1 mm a 3 mm de diâmetro. As raízes primárias têm como função principal a fixação do coqueiro ao solo. Enquanto as radicelas são responsáveis pela absorção de água e nutrientes. O caule ou troncos é do tipo estipe, cilíndrico, não ramificado, exibindo regiões lisas e ásperas, que são as cicatrizes que as folhas deixaram ao caírem. Seu desenvolvimento é ereto, porém o vento e a luz podem deformá-lo com curvas (CINTRA; RESENDE; LEAL, 2008).

A folha é do tipo pinada, ou seja, estrutura em forma de pena que apresenta formas multi-divididas insertas num eixo comum e possui bainha seguida do pecíolo, que continua pela raque ou ráquis, onde se prendem numerosos folíolos, como mostra a Figura 2.8. Uma folha madura de coqueiro gigante tem aproximadamente 6 m de comprimento, com média de 200 a 300 folíolos de 90 a 130 cm de comprimento, dando 12 a 14 folhas por ano. Enquanto as folhas do coqueiro anão têm em torno de 4 a 5 m de comprimento, contendo cerca de 200 folíolos que podem atingir entre 120 e 130 cm, apresentando de 16 a 24 folhas por ano (FONTES; FERREIRA, 2006).

**Figura 2.8: Desenho esquemático das partes que compõem a folha pinada.**



Fonte: Adaptado do SODRÉ (2005).

Em condições climáticas adversas como o solo pouco úmido, a desnutrição da planta, e até mesmo o ataque de pragas e/ou doenças, o número de folhas vivas é reduzido. Sendo assim, o aspecto geral das folhas mostra uma clorose generalizada exibindo um amarelecimento das folhas que adquirem o aspecto de folhas secas que devem ser cortadas, como mostra a Figura 2.9 (FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002).

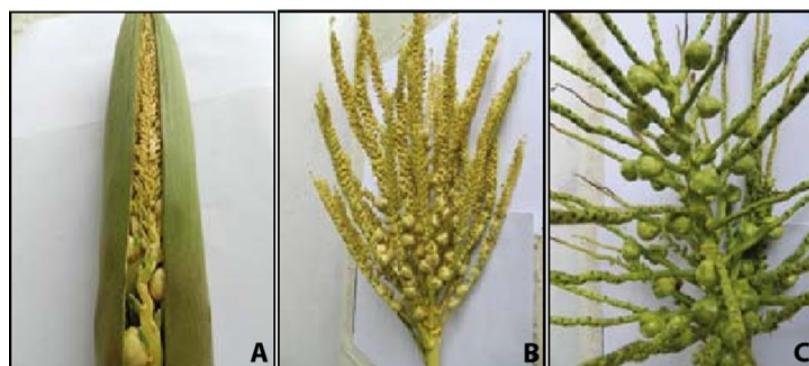
**Figura 2.9: Fotografia ilustrando folhas secas de coqueiro em processo de clorose.**



Fonte: Acervo do autor (2018).

A inflorescência é um dos principais órgãos do coqueiro, pois nela são produzidos os frutos que geram os produtos. O coqueiro é uma planta monoica, ou seja, apresenta flores dos dois sexos masculinas e femininas reunidas numa mesma inflorescência, essa se forma entre a base da folha e o caule envolvida pelas espatas (estrutura que protege o desenvolvimento das flores). Ao completar o desenvolvimento se abre liberando a inflorescência, onde ocorre a fecundação e a posterior formação do fruto (PEDROSO; SANTOS; ARAGÃO, 2007). O desenvolvimento da inflorescência é ilustrado na Figura 2.10, na fase (A) inflorescência do coqueiro-anão-verde alojada no interior das espatas, na fase (B) inflorescência do coqueiro-anão-verde recém aberta com suas flores masculinas e femininas e na fase (C) a inflorescência com os frutos em início de crescimento.

**Figura 2.10: Fotografia ilustrando o desenvolvimento da inflorescência.**



\*Inflorescência do coqueiro-anão-verde alojada no interior das espatas (A) e (B).

Inflorescência recém aberta (C).

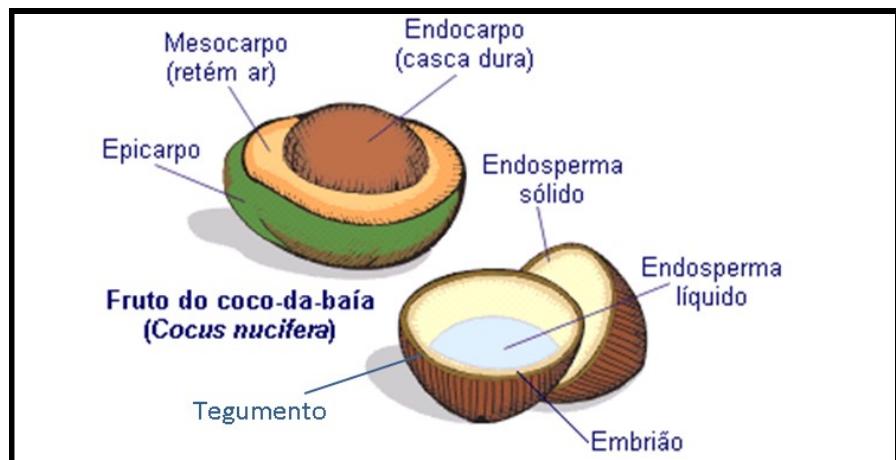
Fonte: Adaptado do BENASSI (2013).

O fruto do coqueiro é botanicamente uma drupa, ou seja, fruto carnoso com apenas uma semente, sendo esta aderida ao endocarpo de maneira que só pode ser separada mecanicamente. Com relação à estrutura do coco, como mostra a Figura 2.11, Benassi (2013) descreve as principais partes do coco observando de fora para dentro, da seguinte forma:

- Epicarpo – película fina, com diferentes colorações, que envolve externamente o fruto.
- Mesocarpo – camada espessa e fibrosa.
- Endocarpo – camada muito dura, de coloração escura no fruto maduro.

- Tegumento – camada fina de coloração marrom, localizada entre o endocarpo e o albúmen sólido.
- Endosperma ou Albúmen sólido – polpa do fruto, camada branca e muito oleosa.
- Endosperma ou Albúmen líquido – água de coco.
- Embrião – estrutura localizada próximo a um dos três orifícios do endocarpo.

**Figura 2.11: Representação esquemática do coco.**



Fonte: Adaptado do site EducaBras

Segundo CARVALHO et al. (2006) todas as suas partes, como raiz, caule, folha, inflorescência e fruto são empregados para fins artesanais, alimentícios, nutricionais, agroindustriais, medicinais e biotecnológicos, entre outros. E ainda analisando a demanda de preocupação quanto ao meio ambiente que tem impulsionado o uso de recursos não agressivos ao planeta, o uso das fibras vegetais é uma perspectiva promissora, por ser um material biodegradável (CARDOSO; GONÇALEZ, 2016).

### 2.3.1. Geração de Resíduos Provenientes do Coqueiro

O coco é conhecido como uma oleaginosa, sendo convertido quando maduro em óleo de coco e outros produtos. Segundo Dauber (2015), em especial o óleo de coco vem se destacando no combate à obesidade devido ao seu efeito termogênico atuando como coadjuvante para perda de gordura corporal. Além das propriedades antibacteriana, antiviral e antifúngica que acentuam o consumo. No Brasil, o coco imaturo é consumido em larga escala

na forma da água de coco. Anualmente, a cocoicultura gera um resíduo, em que 1,5 bilhão são cascas, mais de 300 milhões de folhas que caem naturalmente e mais de 300 milhões de cachos com ramos florais e brácteas, o que representa mais de 2 milhões de toneladas de resíduos, acarretando sérios problemas ambientais, como mostra a Figura 2.12 (CABRAL *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2006; FONTES *et al.*, 2021).

**Figura 2.12: Fotografia mostrando os resíduos do coqueiro e do coco no calçadão da Praia de Ponta Verde em Maceió-AL.**



\*Casca de coco verde em diferentes pontos de descarte (A), (B) e (C).

Fonte: Acervo do autor (2018).

Segundo o IBGE (2022) o mercado brasileiro do coco imaturo ou verde produziu em torno de 1.638.573 milhões de frutos, em 2021. De acordo com ROSA (2002) a casca do coco verde representa 80% a 85% do peso bruto do fruto e cerca de 70% de todo lixo gerado nas praias brasileiras representa cascas de coco verde. Esse volume substancial das cascas do fruto gera um problema nos grandes centros urbanos, onde o material é de difícil descarte, sendo distribuídos nos aterros sanitários e vazadouros. Como se trata de matéria orgânica contribui na formação de gases do efeito estufa, no aumento de vetores, no mau cheiro, na poluição visual e ainda demora mais de oito anos para se decompor completamente (CABRAL, 2014; CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002).

Na indústria do coco maduro, as cascas são utilizadas como combustível de caldeiras ou destinadas ao beneficiamento de fibras. Nesse caso “coir” é o nome atribuído ao mesocarpo ou casca do coco, o processamento é feito em pó, ou seja, “coir pith” ou “coir dust” (ROSA *et al.*, 2002). Já nas propriedades rurais produtoras de coco, nos grandes centros urbanos e nas praias os resíduos da casca de coco, as folhas e os cachos do coqueiro são

denominados lixo verde, esses são descartados em lixões e as margens de estradas de forma inadequada contribuindo para proliferação de insetos vetores de doenças e animais peçonhentos, como mostra a Figura 2.13 (CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002). Ou ainda quando queimados, produzem substâncias poluidoras ao meio ambiente.

**Figura 2.13: Fotografia ilustrando o lixo verde composto por casca, folha e cachos de coqueiro.**



\*Folha do coqueiro e casca de coco seco em diferentes pontos de descarte (A), (B) e (C).

Fonte: Acervo do autor (2018).

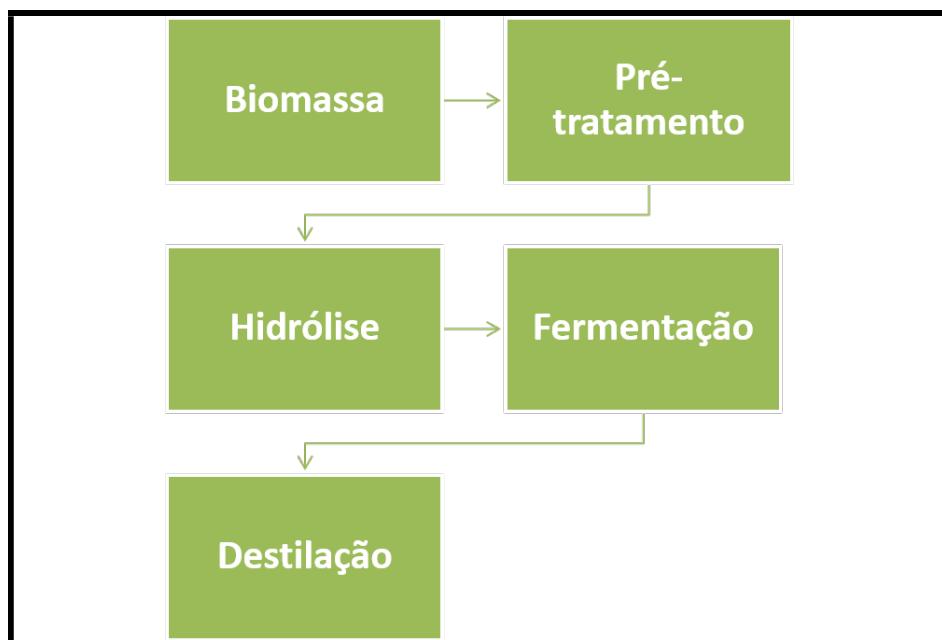
Diante dessa realidade, estão sendo descartadas matérias-primas, infinitas e renováveis, de alto valor para a agricultura sendo necessário o desenvolvimento de alternativas para o aproveitamento dos resíduos do coqueiro. A composição química dessas fibras vegetais constituídas a base de Hidrogênio (H) e Carbono (C), sendo os principais componentes a celulose, a hemicelulose e a lignina direcionam seu potencial para produção de etanol de segunda geração.

#### 2.4 Etapas da produção de etanol de segunda geração

A tecnologia de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para produção de bioetanol enfrenta alguns desafios, dentre estes a estrutura da biomassa (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014). A celulose apresenta estrutura bastante recalcitrante, difícil de ser desestruturada e convertida em monômeros de glicose devido à alta complexidade das interações entre os componentes da biomassa (SILVA, 2016). A principal diferença na produção de E1G e E2G é adicionar duas etapas, são elas, o pré-

tratamento e a hidrólise, quando se trata de E2G, além das etapas de fermentação e destilação já existentes, quando se trata de E1G, conforme a Figura 2.14 (SANTOS-ROCHA, 2017).

**Figura 2.14: Representação das etapas de conversão da biomassa em etanol 2G.**



Fonte: Acervo do autor (2017).

Efetivamente os açúcares não se encontram diretamente disponíveis, como no caso das matérias-primas sacarídeas, sendo o pré-tratamento responsável por tornar as cadeias poliméricas de celulose acessíveis para posterior etapa de hidrólise, na qual acontecerá a obtenção dos monômeros de glicose fermentescíveis (SANTOS *et al.*, 2014). Como mostra a Figura 2.14, o processo de produção utilizado pelo etanol de segunda geração (E2G) envolve quatro etapas:

- (1) Pré-tratamento, para aumentar a acessibilidade aos carboidratos (celulose e hemicelulose);
- (2) Hidrólise enzimática, para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares monoméricos;
- (3) Fermentação, para converter os açúcares em etanol;
- (4) Destilação, que visa à separação do etanol, de acordo com a volatilidade relativa dos componentes.

Conforme visto pela descrição das etapas de processo, numerosas opiniões podem ser encontradas sobre o assunto, a respeito dos obstáculos tecnológicos enfrentados para conversão da biomassa, o primeiro deles é mensurar uma etapa de pré-tratamento eficiente que não comprometa as etapas posteriores, levando em consideração a diversidade de

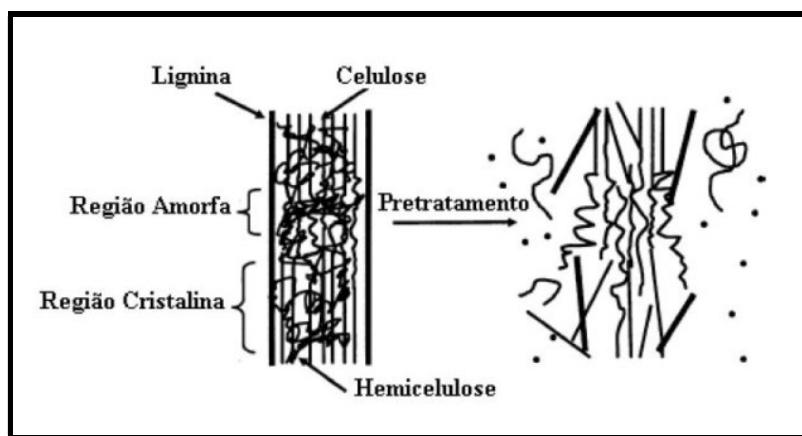
biomassas, inclusive aquelas relacionadas aos resíduos de processamento de alimentos (SILVA et al., 2015). E a segunda é a produção de enzimas eficientes para hidrolisar a celulose, a um custo competitivo ao etanol de primeira geração E1G (BARBOSA, 2017). Sendo assim, explicita-se a necessidade na continuidade dos estudos voltados ao processo de E2G. Inicia-se pela etapa crucial que influencia diretamente na sequência do processo, o pré-tratamento.

#### 2.4.1. Pré-Tratamento

O pré-tratamento é o estágio mais importante, uma vez que tem impacto em todas as demais etapas do processo. Sua função é diminuir a recalcitrância da biomassa e aumentar o rendimento das etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação, em termos de digestibilidade da celulose e toxicidade da fermentação (LORENCINI, 2013).

Essa etapa é necessária para separar a lignina e solubilizar hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a fração amorfã da mesma. Isso acontece promovendo solubilizações que aumentam a porosidade da biomassa e facilita o ataque enzimático (MIGUEL, 2013), como mostra a Figura 2.15.

**Figura 2.15: Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.**



Fonte: Adaptado do MOSIER et al. (2005)

No entanto, a etapa de pré-tratamento deve desempenhar as seguintes condições: ser eficiente em termos de rendimento; ser seletiva; produzir poucos resíduos tóxicos ou contaminantes; ter um consumo reduzido de insumos químicos e resultar na recuperação da maioria dos componentes lignocelulósicos (SILVA, 2016).

Segundo Murakami; Bombana; Affonso, (2016) os diferentes métodos de pré-tratamento possuem diferentes ações sobre o material lignocelulósico. O pré-tratamento pode ser físico (redução mecânica e irradiação), químico (utilizando ácidos, bases ou solventes orgânicos) e biológico (fungos e bactérias que produzem enzimas capazes de degradar a lignina), e ainda associado.

Os pré-tratamentos físicos são baseados no uso de irradiação (GROSSI, 2015) e na separação ou na redução do tamanho das partículas, através do moinho de bola ou martelo e do peneiramento, para obter uma maior superfície de contato. As condições de energia para trituração mecânica da biomassa dependem do tamanho das partículas podendo assim tornar o tratamento caro (CHEMMÉS *et al.*, 2013).

O método químico se difere na utilização de compostos inorgânicos ou orgânicos que podem ser ácidos, bases e solventes orgânicos e podem ser diluídos ou concentrados. O processo que utiliza ácido, solubiliza a hemicelulose e aumenta a digestibilidade da celulose (RABELO, 2010). Já as bases utilizadas como hidróxidos de sódio, peróxido de hidrogênio, potássio, cálcio e hidróxido de amônio modifica a estrutura da lignina des cristalizando a celulose (MACEDO, 2016). Enquanto que com solventes orgânicos como etanol, propanol, metanol e acetona ocorre a deslignificação (NOVO, 2012). Uma das preocupações na utilização do método químico é o controle de temperatura e da concentração do solvente utilizado, pois temperaturas e concentrações altas podem degradar os açúcares e formar produtos contaminantes à levedura na etapa posterior de fermentação (GOMES *et al.*, 2015).

Segundo Ogeda & Petri (2010) os pré-tratamentos biológicos normalmente utilizam fungos e algumas bactérias (actinomicetes). Durante o processo, estes microrganismos secretam enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa. No entanto um dos fatores que desfavorecem esse método é o tempo dispendioso.

De acordo com Lorencini (2013) e Singh *et al.*, (2015) o tratamento mecânico por moagem também é bastante utilizado em combinação com o pré-tratamento químico, ou ainda a combinação do tratamento químico com o enzimático. Os tratamentos físico-químicos incluem explosão a vapor e hidrotérmico. No pré-tratamento de explosão a vapor com e sem adição de catalisadores, a biomassa é submetida, por segundos a minutos, a uma atmosfera de vapor saturado de alta pressão em temperaturas entre 160°-240°C e seguida de uma descompressão súbita que provoca a solubilização da fração hemicelulósica e modificações na lignina. O processo ocorre em duas etapas, autohidrólise e descompressão (SILVA, 2017). Já

o hidrotérmico através do uso de água à temperatura e pressão elevadas provoca a hidrólise e degradação das hemiceluloses seguido por re-condensação da lignina (SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016).

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos. O pré-tratamento ácido atinge altos rendimentos de açúcares a partir do material lignocelulósico, em contrapartida aumenta a quantidade de compostos tóxicos do meio (CORRÊA, 2016). Enquanto o hidrotérmico chama atenção, por não fazer uso de reagentes químicos, que é interessante do ponto de vista ambiental e econômico (SANTOS *et al.*, 2014). No entanto, estudos apontam que a fonte lignocelulósica e a intensidade do pré-tratamento interferem na geração dos compostos tóxicos (FUJITOMI *et al.*, 2012; KUDAHETTIGE NILSSON *et al.*, 2016).

#### **2.4.1.1Pré-Tratamento ácido**

O pré -tratamento com ácido diluído é um dos mais antigos e amplamente estudados, sendo conhecido desde 1819 (GALBE & ZACCHI, 2002). Essa etapa faz uso de baixas concentrações de ácido sulfúrico - tipicamente, 0,5% a 5,0% (v/v) - sob temperaturas moderadas (120 °C a 160 °C) e tempos de reação que variam de 15 a 40 minutos, quando o intuito é solubilizar as hemiceluloses e deixar a celulose mais acessível para a etapa de sacarificação enzimática (GRASEL, 2017).

Na literatura é possível encontrar o tratamento com ácido sulfúrico numa variedade de biomassas, dentre elas: bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, resíduos alimentares, sabugo e palha de milho e casca do coco verde.

Schultz *et al.* (2010) testaram no bagaço de cana-de-açúcar diferentes condições de pré-tratamento ácido, variando-se o tempo em minutos de reação (14; 20; 35; 50 e 56) e a concentração em porcentagem de ácido sulfúrico (0,1; 0,5; 1,5; 2,5 e 2,9), visando obter o maior rendimento na obtenção de glicose. O melhor resultado, em termos de glicose, foi alcançado com 1,5% de ácido e 56 min: 29,0 g/L.

Vieira *et al.* (2014) testaram aproximadamente 1,0g de palha de cana-de-açúcar que foram tratados com 10mL da solução contendo ácido sulfúrico 0,5%, à 150°C/ 15 min obtendo 1,03g ART/100g de fibra.

Enquanto Silva *et al.* (2015) testaram em resíduos alimentares cítricos o ácido sulfúrico em diferentes concentrações (1-9%), e constatou o aumento de 25 a 65% em ART na concentração de 1% (m/v) a 120°C/120 min em autoclave.

Já Santos-Rocha et al. (2016) testaram o sabugo e a palha do milho e obtiveram a eficiência fermentativa 70,8% para o sabugo e 92,9% para a palha de milho, em autoclave a 120°C/15 min e 0,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (m/v).

Em se tratando do comportamento da casca do coco verde em meio ácido, Cabral (2014) observou que a maior quantidade de açúcar liberado no pré-tratamento com ácido sulfúrico foi na condição de 5% (m/v) a 121°C/40 min em autoclave, apresentando valores médios de 34,67g ART/100g de fibra, quando *in natura* apresentava 14,2g ART/100g. Ainda conforme esse estudo, constatou-se que o pré-tratamento ácido em condições severas de concentração e temperatura provoca a produção de inibidores. Em altas temperaturas e pressões, glicose e xilose podem ser degradadas em hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente. Quando esses inibidores são degradados, ocorre formação de ácido levulínico.

Já Nascimento (2016) analisou a casca do coco verde comparando o ácido sulfúrico 2% (v/v) a 121°C/30 min com o ácido fosfórico 0,2% (m/v) a 186°C/10 min em reator autoclave e observou uma redução significativa do teor de hemicelulose. Inicialmente a fibra *in natura* apresentava 8,28% de hemicelulose e ao final do pré-tratamento continha 2,81% e 2,45%, respectivamente.

O principal viés do pré -tratamento com ácido diluído é a dificuldade de controle das condições de processo, em decorrência, principalmente, de uma estreita janela de operação, o que pode favorecer a degradação dos açúcares solubilizados, gerando, assim, produtos como furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácidos carboxílicos, dentre outros. (REZENDE *et al.*, 2011). Geralmente os ácidos utilizados são o sulfúrico, clorídrico e o fosfórico (CHEMMÉS *et al.*, 2013).

#### **2.4.1.2Pré-Tratamento hidrotérmico**

O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) é um pré-tratamento termoquímico promissor aplicado utilizando a água como solvente para converter a biomassa em produtos valiosos ou biocombustíveis. O PTH é classificado em diferentes categorias que variam de acordo com a temperatura, pressão e os produtos desejados (RUIZ *et al.*, 2021). O processo que é conhecido como extração de fracionamento atua em temperaturas de 150°C a 220°C. O processo conhecido como carbonização hidrotérmica as temperaturas variam entre 180°C e 250°C. O principal produto é um combustível sólido limpo denominado hidrocarvão e biocarvão. Em

temperaturas entre 250 e 375°C, o processo é conhecido como liquefação hidrotérmica produzem principalmente um líquido orgânico insolúvel em água chamado de bio-óleo, como subprodutos um resíduo sólido, uma fase aquosa (alto teor de carbono orgânico) e um gás leve ( $\text{CO}_2$  com menores teores de  $\text{CH}_4$ , CO e  $\text{H}_2$ ). Finalmente, em temperaturas e pressões acima ponto crítico, as reações de radicais livres são governadas, e o processo é denominado de gaseificação hidrotérmica produzindo gás de síntese rico em  $\text{H}_2$ , ou  $\text{CH}_4$  e menores teores de  $\text{CO}_2$  e CO (RUIZ *et al.*, 2023).

O PTH utiliza pressão para manter a água no estado líquido a elevadas temperaturas e apresenta a vantagem de não utilizar reagentes químicos poluentes (BRODEUR *et al.*, 2011; CHEMMÉS *et al.*, 2013; CORRÊA, 2016; NASCIMENTO, 2016). Isso reduz os impactos ambientais e os custos além de resultar em um produto com alta digestibilidade enzimática, que são os principais benefícios para uma operação bem-sucedida em escala industrial (SILVA, 2016).

O mecanismo de ação é parecido ao pré-tratamento ácido gerando fibras reativas a partir da solubilização das pentosanas presentes na estrutura da hemicelulose liberando ácido acético e outros ácidos orgânicos (MOSIER *et al.*, 2005). O aparecimento desses ácidos potencializa a hidrólise da hemicelulose, em pentoses e hexoses, que submetidos à alta pressão e temperatura podem ser degradadas em aldeídos. Os principais aldeídos formados a partir da degradação dos açúcares monoméricos é o furfural proveniente da degradação das pentoses e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) proveniente a partir das hexoses (GOMES, 2015; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Esses dois últimos apresentam caráter inibitório a etapa subsequente de fermentação. No caso do pré-tratamento hidrotérmico ocorre uma menor formação desses inibidores, pois a reação não é catalisada por nenhuma substância química e a maioria dos açúcares removidos está na forma de oligossacarídeos (SILVA, 2016). Santos-Rocha *et al.* (2016) relataram através da velocidade da reação que a temperatura utilizada influencia na conversão dos oligossacarídeos, visto que para celulose e hemicelulose as temperaturas de 180 e 195°C favorecem a formação de oligômeros e monômeros, respectivamente, e a temperatura de 210°C favorece a formação de produtos de degradação como HMF e furfural. Ao término desse processo temos o solubilizado constituído de oligossacarídeos de hemicelulose (remoção total) e lignina (35- 60%) e uma pequena quantidade de celulose (4 - 15%) e a fração sólida composta majoritariamente de celulose (CHEMMÉS *et al.*, 2013).

Diversos estudos foram realizados utilizando este método de pré-tratamento em diferentes biomassas. Com o bagaço de cana-de-açúcar, Silva (2015) realizou o pré-tratamento hidrotérmico na proporção de 1:10 (m/v) nas condições de 170°C/15min, 195°C/10min e 195°C/60min com agitação de 200rpm. O pré-tratamento a 195°C/10min apresentou a melhor condição para açúcares fermentescíveis para produção de E2G. Os resultados mostraram o teor de 55,7% de celulose e remoção de 83,7% de hemicelulose.

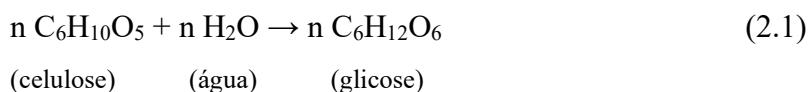
No caso da palha da cana-de-açúcar, Pratto (2015) testou o pré-tratamento hidrotérmico (195°C/10 min e 200 rpm) e pré-tratamento hidrotérmico seguido de um pré-tratamento alcalino (PA) (NaOH/30min 4% m/v, 121°C). Obtendo, pós tratamento, 58,04% e 82,78%, em celulose e 8,23% e 0,46%, em hemicelulose, respectivamente.

Para a casca do coco, Gonçalves (2014) realizou o pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS) apresentou rendimentos de sólidos entre 21,64 e 60,52%, com aumento de celulose entre 28,40 e 131,20%, redução de hemicelulose entre 43,22 e 69,04%, redução de lignina entre 8,27 e 89,13%.

Já para a casca do coco verde, Nascimento (2016) realizou o pré-tratamento hidrotérmico a 186°C/10min com carga de 5%(m/m) de biomassa. Apresentando uma composição química 38,95% de celulose, 2,4% de hemicelulose e 42,15% de lignina, que comparado aos pré-tratamentos ácido e alcalino foi o mais eficiente na remoção de hemicelulose.

#### 2.4.2 Hidrólise

Após o pré-tratamento, a celulose e a hemicelulose ficam mais acessíveis à etapa subsequente chamada de hidrólise ou sacarificação. Essa é responsável por quebrar os polissacarídeos em açúcares menores (glicose e xilose). Dois processos são frequentemente empregados, a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática (PRATTO, 2015). Independente de qual rota escolhida, ambas realizam a conversão de celulose a glicose, conforme a equação 2.1:



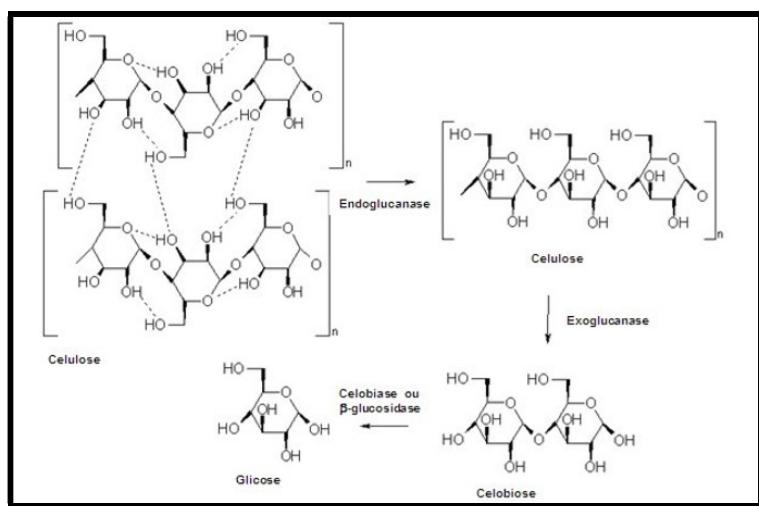
As reações catalisadas por ácidos diluídos ou concentrados ocorrem mais rapidamente comparado às reações enzimáticas. Porém a hidrólise ácida apresenta alguns inconvenientes como a geração de produtos tóxicos ao microrganismo utilizado na etapa de fermentação

(HMF e furfural) e também a preocupação com a utilização de reatores resistentes a corrosão (KIIPER, 2009).

Já na hidrólise enzimática são utilizadas enzimas específicas, somente uma vez, pois são solúveis em água e acabam sendo descartadas no fim do processo. Essas enzimas são as celulolíticas e as hemicelulolíticas caracterizadas por um complexo enzimático que possuem a capacidade de atuar eficientemente sobre os monômeros de glicose e xilose, respectivamente (SARROUH; SILVÉRIO, 2008)

Segundo, Silva (2017) a hidrólise da celulose ocorre pela ação de celulases que são classificadas em: endoglucanases que clivam as ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4) da cadeia de celulose originando novas extremidades redutoras e não redutoras; exoglucanases ou cellobiohidrolase que atuam na extremidade não redutora da celulose formando unidades de cellobiose e as  $\beta$ -glicosidases ou celobiases, que clivam a cellobiose formando monômeros de glicose, conforme a Figura 2.16. Já a hemicelulose requer uma série de enzimas uma vez que estas apresentam uma estrutura complexa e heterogênea, as principais enzimas envolvidas são as  $\beta$ -xilanases que quebram as ligações glicosídicas internas da cadeia de xilana reduzindo o grau de polimerização do substrato e as  $\beta$ -xilosidase que hidrolisam pequenos xiloooligossacarídeos e cellobiose a partir da extremidade não redutora, liberando xilose.

**Figura 2.16: Ação de celulases na cadeia polimérica de celulose.**

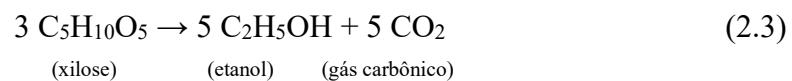
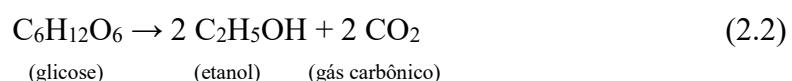


Fonte: Adaptado de FARINAS (2011).

#### 2.4.3 Fermentação Alcoólica

A etapa de fermentação visa à conversão dos monossacarídeos oriundos da hidrólise da fração celulósica e hemicelulósica (glicose e xilose, respectivamente) em etanol. Na

conversão da glicose é comumente empregada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida e utilizada pela sua elevada eficiência na fermentação dos açúcares com seis unidades de carbono. No caso da fermentação dos açúcares com cinco unidades de carbono tem sido empregada a levedura *Kluyveromyces marxianus* (BARBOSA *et al.*, 2015; KULYOYO *et al.*, 2014). A bioconversão dos açúcares monoméricos a etanol é representada nas equações 2.2 e 2.3, para glicose e xilose, respectivamente:



Segundo, Carmo (2013) dentre as leveduras termotolerantes, as pertencentes à espécie *Kluyveromyces marxianus* têm apresentado relatos de uma boa produção de etanol, atuando em temperaturas de 40°C e crescimento até 47°C, enquanto que a *Saccharomyces cerevisiae* atua numa temperatura ótima de 32,3°C. Por outro lado, sabe-se que a levedura *S. cerevisiae* é naturalmente mais tolerante a altas concentrações de etanol do que a *K. marxianus* (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Diante dos dados apresentados na revisão de literatura, cabe destacar que as principais contribuições do presente estudo para o estado da arte na produção de E2G, concernem em utilizar como biomassa a casca do coco e folha do coqueiro pré-tratado hidrotermicamente e acidamente para estimar as variáveis de tempo, temperatura e rotação das etapas sacarificação e fermentação.

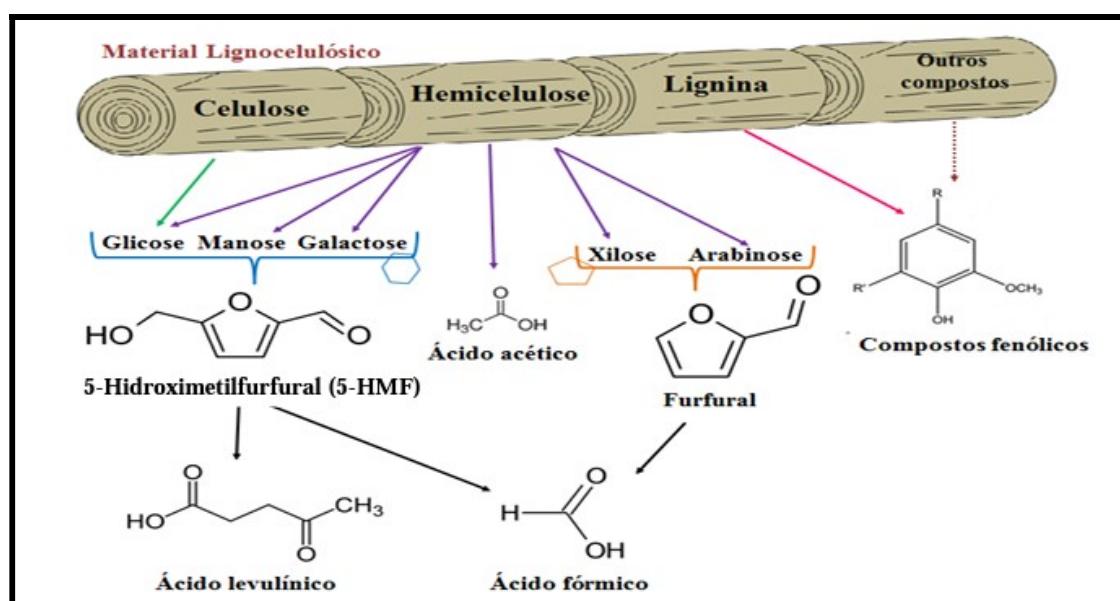
#### 2.4.4 Inibidores e Métodos de Detoxificação

A sacarificação e a fermentação podem ser afetadas por inibidores gerados durante o pré-tratamento (CHEN *et al.*, 2020; OLIVA *et al.*, 2006). A formação de inibidores depende da fonte lignocelulósica, do tipo e da intensidade do pré-tratamento (PRASAD *et al.*, 2018). Os compostos tóxicos oriundos dos pré-tratamentos podem ser divididos em quatro grupos:

produtos de degradação de açúcares, produtos de degradação da lignina, compostos derivados da estrutura lignocelulósica e íons de metais pesados (JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B. A.; NILVEBRANT, N., 2013; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Os principais produtos e subprodutos são obtidos da desorganização da matriz celulósica (PRASAD *et al.*, 2018). Com a quebra da celulose tem-se glicose, bem como a quebra da hemicelulose tem-se os monômeros de xilose, arabinose, manose, galactose e ácido acético. A depender do pré-tratamento utilizado quando o complexo celulósico é submetido à alta pressão e temperatura os açúcares como glicose e xilose são degradados a 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente (FREITAS; NOGUEIRA; FARINAS, 2019; TIAN *et al.*, 2009). Ácido levulínico e ácido fórmico são gerados pela degradação de HMF e compostos fenólicos são gerados a partir da degradação parcial de lignina, como siringaldeído, ácido p-hidroxibenzólico, ácido vanilínico, vanilina e ácido ferúlico (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). A Figura 2.17 mostra a procedência de cada um dos inibidores provenientes dos diferentes constituintes da biomassa.

**Figura 2.17: Formação dos compostos inibitórios.**



Fonte: Adaptado de JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B. A.; NILVEBRANT, N., 2013.

Uma outra forma de inibição é através do próprio etanol produzido durante a fermentação que pode resultar em perda da viabilidade celular, redução do crescimento e transporte de glicose (NOGUEIRA *et al.*, 2019). Os efeitos sinergéticos também fazem a diferença, como o efeito combinado do ácido acético e furfural que afeta a taxa de crescimento celular. As cepas da levedura *S. cerevisiae* apresenta maior sensibilidade ao

etanol em relação a *K. marxianus*, visto que à inibição de enzimas metabolicamente à inibição de enzimas metabolicamente (LI; QI; WAN, 2020; VITORINO *et al.*, 2021).

A etapa de detoxificação propõe transformar inibidores em compostos inativos ou reduzir suas concentrações (FREITAS; NOGUEIRA; FARINAS, 2019). Segundo Taherzadeh *et al.*, (2000), existem quatro abordagens diferentes para minimizar a presença de inibidores de hidrolisados lignocelulósicos:

- (1) evitar formação de inibidores durante a hidrólise;
- (2) desintoxicar hidrolisado antes da fermentação;
- (3) desenvolver espécies de MO's capazes de resistir a inibidores;
- (4) converter compostos tóxicos em produtos que não interfiram no metabolismo microbiano.

Os métodos de destoxificação se dividem em três classes: físicos (evaporação, separação por membranas), químicos (ajuste de pH, overliming, tratamento com carvão ativado e com resinas de troca iônica) e biológicos (uso de enzimas) (MOUTTA, 2009). Dentre os mais utilizados está o ajuste de pH que é geralmente associado a outros métodos, e consiste na correção do pH do hidrolisado para um valor adequado ao crescimento microbiano.

O carvão ativo vem sendo utilizado para tratamentos como, purificação, detoxificação, desodorização, filtração, descoloração, decolorificação, remoção ou modificação de sabor e concentração de uma infinidade de materiais e substâncias líquidos e gasosos. Recortes da literatura mostram que a descontaminação com carvão ativo tem se mostrado altamente eficiente na remoção de compostos que transmitem cor e odor, e na remoção de metais e compostos orgânicos de baixa massa molar (PAN *et al.*, 2019; VILLARREAL, M. L. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; CANETTIERI, E. V.; IZARIO FILHO, 2004).

**CAPÍTULO 3 – RESÍDUOS AGRÍCOLAS DO CULTIVO DO COCO COMO  
MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO PELA  
*KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

Este capítulo foi publicado na revista *Waste Biomass Valor* 12, 4943–4951 (2021), e está disponível na forma de short communication. O capítulo apresenta parte do trabalho de doutoramento utilizando os resíduos do coco como fonte de carbono para produção de etanol lignocelulósico. As biomassas como casca de coco verde (CCV), folíolo da folha do coqueiro (FFC) e raque da folha do coqueiro (RFC) foram submetidas a pré-tratamento hidrotérmico (PTH) e ácido (PTA). A hidrólise enzimática foi realizada utilizando Cellic® Ctec2 suplementado com 10% de Cellic® Htec, baseada principalmente na identificação de glicose e xilose. Verificou-se que a hidrólise enzimática após PTH promoveu melhores resultados quando comparada ao PTA. As concentrações de glicose obtidas para as biomassas submetidas ao PTH foram: 31,85 g/L para o CCV, 21,31 g/L para o FFC e 45,39 g/L para o RFC. Para a xilose, a maior concentração obtida foi de 7,93 g/L para RFC. Durante a etapa de fermentação utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus*, as concentrações de etanol (g/L) dos licores hidrolisados e pré-tratados por PTH e PTA foram: 8,83 e 9,71 g/L para CCV, 10,26 e 7,01 g/L para FFC e 12,99 e 7,44 g/L para RFC, respectivamente. Este estudo identificou o potencial energético dos resíduos do coco na produção de biocombustíveis, especificamente etanol, a partir de *K. marxianus*, espécie pouco explorada comercialmente e capaz de fermentar glicose e xilose.

# **AGRICULTURAL COCONUT CULTIVATION WASTES AS FEEDSTOCK FOR LIGNOCELLULOSIC ETHANOL PRODUCTION BY *KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

## **3.1 Introduction**

The use of lignocellulosic wastes as a renewable source of fermentable sugars presents a promising way to increase biofuel production, since these materials do not contribute to food competition and there is no need for cultivated areas (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015; ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017; ZHUANG *et al.*, 2009). Additionally, this type of biomass reduces the petroleum dependency and environmental pollution due the ethanol production be from agricultural wastes.

Coconut-tree is a crop distributed in over 200 countries. Associated with the large-scale coconut production, and consequently, a high amount of not used agroindustrial residues are generated. Therefore, these wastes are a potential feedstock to convert lignocellulosic materials into liquid fuels such as ethanol (DA COSTA NOGUEIRA *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2014; HARMAN-WARE *et al.*, 2015).

Green coconut shell represents 80–85 % of the total fruit weight and is the residue from coconut-tree more widely produced (CABRAL *et al.*, 2016; CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2014). This material has already been applied for industrial activated carbon production, in cementitious matrix, agriculture and for bioethanol production (CABRAL *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2001; VAITHANOMSAT *et al.*, 2011).

Coconut-tree leafs have a feather-shaped structure, with a common axis, called stalk, where many leaflets are attached. In adverse climatic conditions such as low soil moisture, plant malnutrition, and even pest and/or disease attack, the number of live leaves is reduced exhibiting a generalized chlorosis and must be cut (FONTES & FERREIRA, 2006; SIQUEIRA, 2002).

When employed for lignocellulosic ethanol production, such as green coconut shell, coconut-tree leaflet and coconut-tree leaf stalk, some steps are necessary: the pretreatment and saccharification that configures the main bottleneck of this process (CARDONA *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2017). Several works presented in the literature have studied the hydrothermal and dilute acid pretreatments, however using other types of biomass such as sugarcane bagasse, wood and fruit peel (ABDULLAH; UEDA; SAKA, 2014; BALAT, 2011;

BOUSSARSAR; ROGÉ; MATHLOUTHI, 2009; DA CRUZ *et al.*, 2012; KULOYO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2013).

The saccharification generally uses cellulases and hemicellulases to disrupt pretreated lignocellulosic biomass (BEHERA *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014). The fermentation step is widely conducted by *Saccharomyces cerevisiae*, however; this strain cannot metabolize for example, pentoses; as xylose and arabinose. On the other hand, *Kluyveromyces marxianus* can use these sugars and produce ethanol (BEHERA *et al.*, 2014; KULOYO *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2014).

Regarding coconut-tree biomasses application, some studies are proposed in the literature for green coconut shell, using only cellulases and *S. cerevisiae* for hydrolysis and fermentation steps, respectively (CABRAL *et al.*, 2017; DA COSTA NOGUEIRA *et al.*, 2018; JNAWALI *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2014; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016; VAITHANOMSAT *et al.*, 2011). However, for coconut leaves, specially leaflet and leaf stalk, literature was not found.

The aim of the present study was to evaluate lignocellulosic ethanol production from coconut cultivation wastes (coconut shell, leaflet and leaf stalk) applying hydrothermal and acidic pretreatment, cellulases and hemicellulases in hydrolysis step and the yeast *Kluyveromyces marxianus* to produce bioethanol relating the efficiency of each step.

### 3.2 Materials and Methods

#### 3.2.1 Raw Material

The green coconut shell used to carry out the experiments was collected at the disposal of coconut water sellers at the Federal University of Alagoas (Maceió-Alagoas-Brazil). The dwarf coconut-tree leaves were collected at the Marruá site, located in São José da Tapera (Alagoas-Brazil), removed in the natural state of aging (senescence), result of the chlorosis process. The leaves were then sectioned according to their structure, obtaining two more parts from the coconut-tree employed in this study: coconut-tree leaflets and coconut-tree leaf stalk. The raw materials were washed with distilled water at room temperature for removal of residual compounds (PEREIRA *et al.*, 2015; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016). Then, the coconut-tree biomasses were dried in an oven at 45 °C until constant weight containing about

10 % of moisture. After, they were milled in a Willey type mill to a particle size of 30 mesh (0.6 mm), put into plastic bags, and kept in a freezer ( $-8^{\circ}\text{C}$ ) to prevent contamination.

### 3.2.2 Lignocellulosic Characterization

Raw and pretreated materials were characterized with regard to their chemical composition, according to analytical procedures described by Sluiter *et al.*, (2008), modified from the study of Rocha *et al.*, (1997) and validated by Gouveia *et al.*, (2009).

### 3.2.3 Hydrothermal Pretreatment (HPT)

The hydrothermal pretreatment of the coconut-tree biomasses was carried out in a 5.5-L stainless steel reactor (model 4584, Parr Instrument Company, Moline, IL, USA) equipped with propeller agitator, heater and temperature controller. According to Santos-Rocha *et al.* (2016), samples of coconut-tree biomasses were mixed with distillate water in a solid/liquid ratio of 1:15 (w/v) inside the reactor. The reactions were performed under  $195^{\circ}\text{C}$  for 10 min and the system was agitated at 200 rpm. When the process finished, the reactor was cooled down to  $40^{\circ}\text{C}$ . The solid was then separated from the liquid fraction by filtration. Solid fraction was washed with distilled water to remove the solubilized contents, until neutral pH.

### 3.2.4 Acid Pretreatment (APT)

The acid pretreatment of the coconut-tree biomasses was carried out by a chemical pretreatment method using dilute acid. This process employed a sulfuric acid solution and a solid loading of 10 % (w/v) for 60 min in an autoclave. In this case, each biomass was submitted to different conditions of acid concentration and temperature (chosen by experimental design, data not shown): 1 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at  $100^{\circ}\text{C}$  for green coconut shell, 2 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at  $120^{\circ}\text{C}$  for coconut-tree leaflets and 2 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at  $100^{\circ}\text{C}$  for coconut-tree leaf stalk. After the pretreatment, the liquid and solid fractions were separated by filtration. The pretreated solid materials were thoroughly washed with distilled water to remove the soluble components and used directly for the hydrolysis step. This procedure was based on Pereira *et al.*, (2015).

### 3.2.5 Enzymatic Hydrolysis Using Cellulases and Hemicellulases

The enzymatic hydrolysis was performed with the biomass solid fraction submitted to HPT and APT. The assays were carried out in 100 mL Erlenmeyer flasks, incubated for 72 h at 50 °C and 125 rpm using 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8). All experiments were conducted at solid loading of 7.5 % (w/v), and Cellic® Ctec2 (58 FPU/mL) loading of 20 FPU/gdry pretreated biomass, supplemented with 10 % of Cellic® Htec (7326 IU/mL) (in relation to the Cellic® Ctec2 employed volume) (cellulases and hemicellulases enzymatic complexes). Liquor samples were obtained at 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 h of hydrolysis, and the content of glucose, xylose and ethanol was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) as made for lignocellulosic characterization of the biomasses (“Lignocellulosic Characterization” section and described in fermentation substrates and products quantification later). The enzymatic complexes used in the assays was donated by Novozymes Latin America (Araucária, Paraná, Brazil). The enzymatic activity of the commercial extract, in terms of filter paper units (FPU), was determined according to Ghose (1987). All hydrolysis experiments were carried out in independent duplicates.

### 3.2.6 Fermentation Step by *Kluyveromyces marxianus*

The microorganism used for the ethanolic fermentation was the yeast *Kluyveromyces marxianus* MM III-41, obtained from the microbiological collection of University of São Paulo. The strain was cultivated in YEPD containing 20 g/L of glucose, 10 g/L of yeast extract and 20 g/L of peptone. After cultivation, the medium was centrifugated (10,000 rpm, 10 min, 4°C) and cells (approx. 5 g/L dry cell weight) were resuspended in the hydrolyzed. The fermentation was conducted for 24 h incubated at 37°C and 75 rpm using 100 mL of reactional medium. Samples were collected at 2, 4, 6, 8 and 24 h of fermentation and carbohydrate and ethanol concentrations were determined by HPLC. All the fermentation experiments were performed in independent duplicates.

### 3.2.7 Glucose, Xylose, Ethanol, Acetic Acid and Glycerol Quantification

Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (SCL-10 A chromatograph, Shimadzu) with refractive index detection (RID-10 A, Shimadzu) for

determination of glucose, xylose, ethanol, acetic acid and glycerol. The column used was Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm; Bio-Rad) and the mobile phase was sulfuric acid solution (5.0 mM) at a flow rate of 0.6 mL/min at 45°C.

The cellulose-to-glucose conversion and hemicellulose-to-xylose conversion were calculated using Equations. (3.1) and (3.2), as described by Pereira et al., (2015).

$$\text{cellulose - to - glucose conversion (\%)} = \frac{C_G}{C_B \cdot f_C \cdot 1.11} \cdot 100 \quad (0.1)$$

$$\text{hemicellulose - to - xylose conversion (\%)} = \frac{C_X}{C_B \cdot f_H \cdot 1.14} \cdot 100 \quad (0.2)$$

where  $C_G$  and  $C_X$  (g/L) is the glucose and xylose concentrations, respectively, released at a given time during the enzymatic hydrolysis;  $C_B$  (g/L) is the dry biomass concentration;  $f_C$  and  $f_H$  is the cellulose and hemicellulose content, respectively, of the *in natura* biomass; and 1.11 and 1.14 is the stoichiometric factor for conversion of cellulose-to-glucose and hemicellulose-to-xylose, respectively.

The ethanol yield was calculated using Equation (3.3), as described by Pereira *et al.* (2015).

$$\text{Ethanol yield (\%)} = \frac{C_E}{C_S \cdot 0.511} \cdot 100 \quad (0.3)$$

where  $C_E$  (g/L) is the ethanol concentration (g/L);  $C_S$  is the sugars (glucose + xylose) concentration (consumed) (g/L); 0.511 is the stoichiometric factor for conversion of glucose or xylose to ethanol.

### 3.3 Results and Discussion

In this paper a systematic study regarding the use of coconut cultivation wastes to produce lignocellulosic ethanol was carried out. Sequentially, it will be presented the characterization of the biomass, the effects of hydrothermal and acidic pretreatments, hydrolysis and fermentation steps and their respective efficiencies.

### 3.3.1 Characterization of the Raw and Pretreated Coconut - Tree Biomasses

The chemical composition of the raw and pretreated materials is presented in Table 3.1. In relation to the GCS in natura, the results are in good agreement with those reported by Santos-Rocha *et al.*, (2016), that presented 24.70 % of cellulose, 12.26 % of hemicellulose, 40.10 % of lignin and 2.56 % of ashes when characterized raw coconut husk fibers.

Considering the raw coconut-tree leaf, the results obtained are difficult to compare, since studies with this coconut-tree part have not been founded in the literature. Comparing with GCS, a coconut part exploited in some works present in literature (CABRAL *et al.*, 2017; CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016), it is possible to conclude that CLL presents slightly lower cellulose, hemicellulose and lignin contents while CLS, higher cellulose, hemicellulose and lignin contents, as showed in Table 3.1.

**Tabela 3.1: Chemical composition of the raw and pretreated coconut-tree biomasses**

Constituent	GCS* ( <i>In natura</i> )	GCS (HPT)*	GCS (APT)*	CLL* ( <i>In natura</i> )	CLL (HPT)*	CLL (APT)*	CLS* ( <i>In natura</i> )	CLS (HPT)*	CLS (APT)*
(%)									
Cellulose	23.34 ± 2.30	37.13 ± 2.30	19.66 ± 1.30	19.44 ± 0.52	14.4 ± 1.70	20.89 ± 1.98	25.84 ± 1.20	39.03 ± 0.96	30.02 ± 1.45
Hemicellulose	12.23 ± 1.10	6.14 ± 0.57	7.01 ± 0.10	8.18 ± 1.23	3.52 ± 0.55	2.70 ± 1.16	14.37 ± 0.24	8.16 ± 1.54	9.13 ± 1.17
Lignin	40.01 ± 1.20	48.97 ± 1.60	32.87 ± 1.7	36.21 ± 0.15	57.12 ± 0.82	34.03 ± 0.39	56.96 ± 0.07	41.89 ± 1.2	46.39 ± 1.89
Ashes	1.89 ± 0.20	0.55 ± 0.90	0.6 ± 0.4	10.11 ± 0.85	6.91 ± 0.01	12.90 ± 0.30	3.66 ± 0.66	1.44 ± 0.22	0.37 ± 0.01
Mass yield	–	57.51	98.31	–	58.07	89.69	–	55.92	70.67

\*GCS green coconut shell, CLL coconut-tree leaflet, CLS coconut-tree leaf stalk, HPT hydrothermal pretreatment, APT acid pretreatment

It is also observed that the GCS submitted to HPT presented 37.13 % (± 2.30) of cellulose. Gonçalves *et al.*, (2014), studied the autohydrolysis of green coconut shell (pretreatment at 200 °C for 50 min) and 41.96% of cellulose content was reached. Similar result was obtained for HPT CLS which showed 39.03% of cellulose content.

A similar behavior is observed between GCS and CLS, even when HPT and APT are considered: low degradation of the cellulosic fraction and high solubilization of the hemicellulose and lignin fractions. HPT presented higher effect than APT, in accordance with the literature which affirms that hydrothermal pretreatment has little effect on cellulose

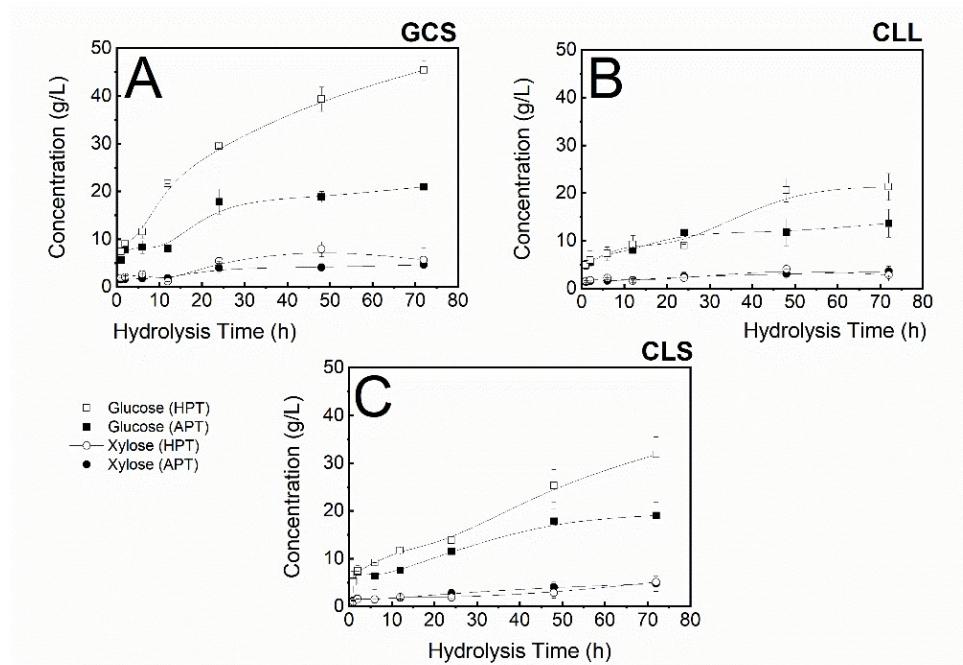
hydrolysis and promotes a significant hemicellulose removal (ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017; SANTUCCI *et al.*, 2015). Regarding CLL biomass, pronounced hemicellulose removal is also verified in the pretreatments (to GCS and CLS) and similar effect on cellulose and lignin removal.

On the other hand, an unusual result was observed for CLL treated hydrothermally (HPT) in relation to cellulosic fraction. It was seen that a severe cellulose removal was promoted, indicating that this coconut-tree biomass could present more content of amorphous cellulose than the other coconut-tree wastes, since it is more sensitive to thermal removing (PARDO; MENDOZA; GALÁN, 2019), as showed in Table 3.1.

### 3.3.2 Enzymatic Hydrolysis

Regarding monosaccharides releasing in the hydrolysis liquor from the pretreated biomass, Figure 3.1, shows the profiles of glucose and xylose concentrations at each hydrolysis time. After 72 h of reaction, the glucose concentrations reached 31.85 and 19.07 g/L for the hydrolysis of GCS submitted to HPT and APT, respectively (Fig. 3.1a). Concerning CLL hydrolysis, 21.31 and 13.65 g/L of glucose concentrations were achieved when this biomass was submitted to HPT and APT, respectively (Fig. 3.1b). For CLS, it was obtained 45.39 and 21.01 g/L of glucose, after HPT and APT, respectively (Fig. 3.1c). These results showed that the enzymatic hydrolysis using hydrothermal pretreatment was more efficient than those results obtained for the acidic pretreated biomasses. It is known that hydrothermal pretreatment has high potential to improve cellulose digestibility and, consequently, to extract more glucose from cellulose. Also, pentose recovery is improved, and reduced fermentation inhibition compounds are generated (LIMAYEM & RICKE, 2012; PÉREZ, J.A., GONZÁLEZ, A., OLIVA, M.J., BALLESTEROS, I.; P., 2008).

**Figura 3.1: Glucose and xylose concentrations during the enzymatic hydrolyses of GCS (A), CLL (B) and CLS (C). Squares and circles represent glucose and xylose concentration, respectively. White and Black symbols represent hydrothermal and acidic pretreatments, respectively.**



Fonte: Acervo do autor (2020)

The maximum xylose concentration obtained was 7.93 g/L (CLS submitted to HPT, after 48 h of reaction) (Fig. 3.1c). For a more precise analysis of the enzymatic hydrolysis step of the coconut-tree biomasses pretreated with dilute acid and hot-compressed water, the data in terms of enzymatic conversion of cellulose-to-glucose and hemicellulose-to-xylose are presented in Table 3.2.

Analyzing the results, it is possible to verify that CLL showed the best results in terms of higher monosaccharides obtained in the hydrolysis step (88.88 and 77.32% of cellulose-glucose conversion and hemicellulose-xylose conversion, respectively) (Table 3.2).

Santos-Rocha *et al.*, (2018), achieved 80.51% of cellulose-to-glucose conversion after 72 h of hydrothermally pretreated sugarcane straw enzymatic hydrolysis. In addition, Pereira *et al.*, (2015), reached 52.53% of cellulose-to-glucose conversion after 24 h of enzymatic hydrolysis using sugarcane straw submitted to acid pretreatment. Sassner, Martensson and Zacchi (2008) achieved 56 % of cellulose-to-glucose conversion after 24 h of enzymatic hydrolysis of Salix plant hydrothermally pretreated.

**Tabela 3.2: Enzymatic conversion of cellulose-to-glucose and hemicellulose-to-xylose after 72 h of hydrolysis**

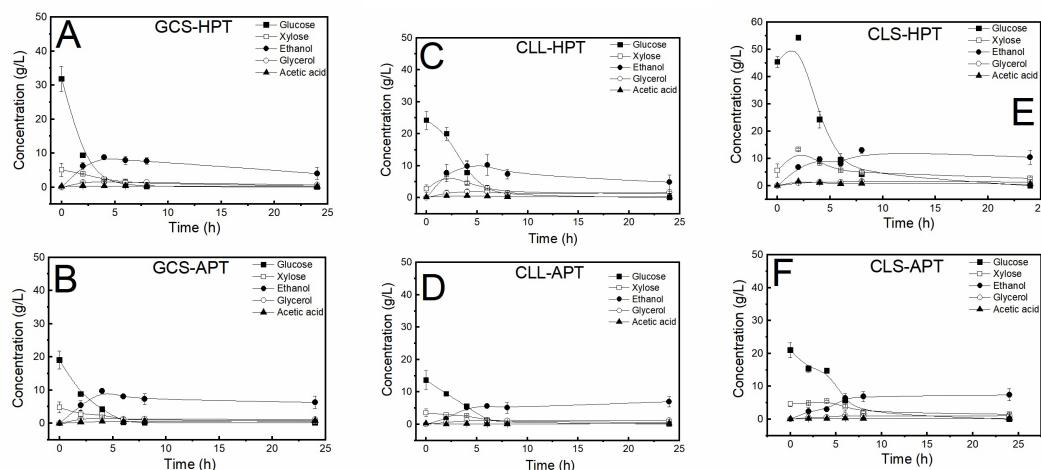
Pretreatment	%	GCS*	CLL*	CLS*
APT*	Cellulose-glucose conversion	58.26 ± 1.74	39.24 ± 1.61	42.03 ± 1.66
	Hemicellulose-xylose conversion	39.62 ± 1.21	77.32 ± 2.06	29.91 ± 1.02
HPT*	Cellulose-glucose conversion	51.52 ± 1.07	88.88 ± 1.85	69.85 ± 2.17
	Hemicellulose-xylose conversion	48.57 ± 1.32	47.02 ± 1.35	40.63 ± 1.74

\*GCS green coconut shell, CLL coconut-tree leaflet, CLS coconut-tree leaf stalk, HPT hydrothermal pretreatment, APT acid pretreatment

### 3.3.3 Fermentation Step

In the fermentation step is possible to verify that practically all glucose and xylose contents were consumed by *K. marxianus* and ethanol was produced showing its advantage in relation to *S. cerevisiae* in metabolize both hexoses and pentoses from lignocellulosic liquors, specially, coconut cultivation wastes which were focused in this research, as showed in Figure 3.2.

**Figura 3.2: Glucose (■), xylose (□), ethanol (●), glycerol (○) and acetic acid (▲) concentrations during the fermentation step of GCS, CLL and CLS submitted to HPT (a, c and e) and APT (b,d and f), respectively**



Fonte: Acervo do autor (2020)

However, ethanol yield reached values between 47 and 80% (Table 3.3), showing three possible problems: The consumption of part of the sugars to metabolic requirements such as maintenance and reproduction (SASSNER *et al.*, 2008), the production of secondary

compounds such as glycerol which is visualized in Figure 3.2, or some inhibitory compound such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF).

**Tabela 3.3: Kinetic parameters obtained when the time of maximum ethanol concentration is considered**

Biomass	Pretreatment	Time (h)	Ethanol yield (%)	Ethanol concentration (g/L)	Ethanol productivity (g/L h)
GCS*	APT*	4	79.75 ± 1.03	9.71 ± 0.13	2.43 ± 0.15
CLL*		24	79.66 ± 1.67	7.01 ± 0.13	0.29 ± 0.03
CLS*		24	56.70 ± 1.03	7.44 ± 0.26	0.31 ± 0.01
GCS*	HPT*	4	46.76 ± 1.72	8.83 ± 0.19	2.21 ± 0.14
CLL*		6	74.16 ± 1.33	10.26 ± 0.11	1.71 ± 0.10
CLS*		8	49.79 ± 1.64	12.99 ± 0.32	1.62 ± 0.08

Reactions of fuel-ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using coconut-tree biomasses pretreated by dilute acid and hot-compressed water

\*GCS green coconut shell, CLL coconut-tree leaflet, CLS coconut-tree leaf stalk, HPT hydrothermal pre-treatment, APT acid pretreatment

Acetic acid is considered a degradation product from hemicellulosic fraction (ROCHA; ALMEIDA; DA CRUZ, 2017). The literature, generally, indicates that the presence of organic acids at concentrations larger than 6 g/L can affect the ethanol production (CABRAL et al., 2016). The maximum concentration of acetic acid visualized in the experiments was 1.64 g/L. According to Freitas (2011) who studied the effect of acetic acid addition in ethanolic fermentation using *Saccharomyces carlsbergensis* noted that up to 2.2 g/L of acetic acid, inhibition of the ethanol production did not occur.

Oliva *et al.*, (2006) used 4 % (v/v) of the yeast *Kluyveromyces marxianus* obtaining 43 % of ethanol yield when 2 g/L of acetic acid and 0.4 g/L of furfural were present. For Sarawan *et al.*, (2019) who used *Saccharomyces cerevisiae* verified that higher values than 1.5 g/L exhibited inhibitory effect. Based on these works, it is possible to conclude that the effect of acetic acid depends on its concentration and the strain used.

Glycerol is considered as a secondary metabolite of alcoholic fermentation. The maximum value obtained was 1.67 g/L. Cabral *et al.*, (2016) obtained 2.13 g/L of glycerol

during the fermentation of coconut husk fiber, similar to this work and that affects the ethanol yield of the process.

It was verified that the ethanol concentration decreased in higher fermentation time (Fig. 3.2). Kuloyo *et al.*, (2014), presented this same behavior when a fermentation of *Opuntia ficus-indica* cladodes liquor with *K. marxianus* was applied. Silva *et al.*, (2017), verified that ethanol concentration decreased after 5 h of fermentation. For this reason, in Table 3.3, the maximum ethanol yield, concentration and productivity are shown.

The fermentation yield changes between 0 and 100 % because takes account the biochemical yield. When soluble substrates such as sucrose is used, high fermentation yields are obtained, and inhibitory effects are minimized. Examples are 92.2% of biochemical yield during sugarcane broth fermentation (RIVERA *et al.*, 2017), as well as 77.31% for palm juice (RUIZ *et al.*, 2013). As aforementioned, values between 47 and 80% of ethanol yield were achieved, and even the presence of acetic acid and glycerol interfering in this parameter, decreasing it, they cannot explain lonely the significant reduction observed. One reasonable explanation is that other inhibitory compounds were generated (CABRAL *et al.*, 2017; LIMAYEM & RICKE, 2012; SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001). Sarawan *et al.*, (2019) perceived that only the presence of furfural (mainly) and HMF in the broth significantly affected the ethanol yield obtained with *S. cerevisiae*. Phenolic compounds can be also formed during pretreatment as a result of partial degradation of lignin (CHIARAMONTI *et al.*, 2012; RUIZ *et al.*, 2013).

Maximum ethanol productivities during the fermentations changed between 0.29 and 2.43 g/(L h). Silva *et al.*, (2015), (SILVA, G. M. *et al.*, 2015)using *K. marxianus* in the fermentation step of sugarcane bagasse liquor found ethanol productivity between 0.20 and 0.48 g/(L h). Hydrothermally pretreated CLS achieved the maximum concentration of ethanol (12.99 g/L) and high ethanol productivity (1.62 g/(L·h)), when compared to the other fermentations (Table 3.3).

### 3.3.4 Potential of Coconut-Tree Residues for Ethanol Production

Based on the yield obtained (hydrothermal pretreatment, enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation) and in the coconut production from Brazilian market in 2017 (according to IBGE (<http://www.ibge.gov.br>), the Brazilian market produced about 1.8 million tons of

fruits (241,386 ha) in 2017), the potential of coconut-tree residues for ethanol production was determined.

A value of 617.76 L of ethanol/ha was estimated from coconut-tree biomasses (GCS, CLL and CLS), considering cellulosic and hemicellulosic fractions in the hydrolysis liquor. Santos-Rocha et al., (2017), studied the use of several biomasses for ethanol production considering theoretical values in each step (pretreatment, hydrolysis and fermentation). As a comparison, corn stover presented 770.26 L of ethanol/ha and a value of 3148.93 L of ethanol/ha for the green coconut shell. However, it is concluded that this value probably was overestimated showing the importance of this work for this type of biomass.

### 3.4 Conclusions

Hydrothermal and acidic pretreatments were applied in the coconut cultivation wastes and showed reactivity to destructure the biomass. The combination between cellulases and hemicellulases was positive to saccharify the pretreated biomass reaching between 30–77 % and 40–88 % for xylose and glucose, respectively (depending of the pretreatment type and the biomass used). *K. marxianus* showed ability to metabolize both hexose (glucose) and pentose (xylose) reaching ethanol fermentation yield up to 80 %. On the other hand, some fermentations reached low fermentation yield that was not justified with the acetic acid and glycerol concentrations and can be associated to another inhibitory compounds (furfural, HMF and phenolic compounds) and can be an important perspective to investigate.

### 3.5 References

- ABDULLAH, R.; UEDA, K.; SAKA, S. Hydrothermal decomposition of various crystalline celluloses as treated by semi-flow hot-compressed water. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 278–286, 2014.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>.
- BEHERA, S. *et al.* Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic

biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 36, p. 91–106, 2014.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>.

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 6537–6542, 2009. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.019>.

CABRAL, M. M. S. *et al.* Bioethanol production from coconut husk fiber. **Food Technology**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 1872–1877, 2016.

CABRAL, M. M. S. *et al.* Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 99, 2017.

CARDONA, M. J. *et al.* A process for energy-efficient high-solids fed-batch enzymatic liquefaction of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 198, p. 488–496, 2015.

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S. De; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 533–535, 2002.

CHIARAMONTI, D. *et al.* Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 46, p. 25–35, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020>.

DA COSTA NOGUEIRA, C. *et al.* Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber—Pretreatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 112, n. September 2017, p. 734–740, 2018. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.047>.

DA COSTA NOGUEIRA, C. *et al.* Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 130, n. September 2018, p. 259–266, 2019.

DA CRUZ, S. H. *et al.* Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 439–447, 2012.

DOS SANTOS-ROCHA, M. S. R. *et al.* Assessment of different biomass feeding strategies

for improving the enzymatic hydrolysis of sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 125, n. August, p. 293–302, 2018. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.005>.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S. **A cultura do coco**. 1<sup>a</sup>ed. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. **Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro**. 1<sup>a</sup>ed. Aracaju: SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002-. ISSN 1678-197x.

FREITAS, C. S. da S. **Utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização da resposta fisiológica da levedura lev Saccharomyces carlsbergensis em presença de ácido acético ético na produção de bioetanol** Cláudia Sofia da Silv. 2011. [s. l.], 2011.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 2, 1987. Disponível em:  
<https://www.degruyter.com/view/j/pac.1987.59.issue2/pac198759020257/pac198759020257.xml>.

GONÇALVES, F. A. *et al.* Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, [s. l.], v. 131, p. 66–76, 2014

GOUVEIA, E. R. *et al.* Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

HARMAN-WARE, A. E. *et al.* Characterization of Endocarp Biomass and Extracted Lignin Using Pyrolysis and Spectroscopic Methods. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 350–368, 2015.

IBGE: Ibge. Levant Sist Da Produção Agrícola **30**, 115 (2017).  
<https://doi.org/ISSN0103-443X>

JNAWALI, P. *et al.* Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Brown Coconut Husk Treated with Sodium Hydroxide. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1757–1766, 2018.

KULOYO, O. O. *et al.* *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 3173–3183, 2014.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.

OLIVA, J. M. *et al.* Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 1223–1228, 2006.

PARDO, L. M. F.; MENDOZA, J. G. S.; GALÁN, J. E. L. Influence of pretreatments on crystallinity and enzymatic hydrolysis in sugar cane residues. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 131–141, 2019.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 161, p. 431–440, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>.

PEREIRA, S. C. *et al.* 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015.

PÉREZ, J.A., GONZÁLEZ, A., OLIVA, M.J., BALLESTEROS, I., M.; P. Wastewater treatment for production of H<sub>2</sub>S-free biogas. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 83, n. May, p. 1163–1169, 2008.

RIVERA, E. *et al.* Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 119, p. 42–51, 2017. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.002>.

ROCHA, G. J. M. *et al.* A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: **Proceedings of the V Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components 5**, [s. l.], p. 113–115, 1997.

ROCHA, M. V. P. *et al.* Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 243, p. 234–243, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.099>.

RUIZ, H. A. *et al.* Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 21, p. 35–51, 2013.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. dos S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; DA CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **Engevista**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017

SANTOS-ROCHA, M. S. R. *et al.* Acid pretreatment of corn stover for production of second generation ethanol. **Engevista**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 412–423, 2016.

SANTUCCI, B. S. *et al.* Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1778–1787, 2015.

SARAWAN, C. *et al.* Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 286, n. April, p. 121403, 2019. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121403>.

SASSNER, P. *et al.* Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated Salix for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 137–145, 2008.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M.C.R.: Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, W. et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Edgar Blücher, São Paulo, pp. 179–192 (2001).

SILVA, G. M. *et al.* Ethanol production from sugarcane bagasse using SSF process and thermotolerant yeast. **Transactions of the ASABE**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 193–200, 2015.

SILVA, J. DOS S., MALTA, DOS S, V.R., DOS SANTOS-ROCHA, M.S.R., ALMEIDA, R.M.R.G., GOMES, M.A., CECÍLIA, D. VICENTE, K.L.B. Hidrólise enzimática, fermentação e produção de biocombustíveis através da coroa de *Ananas comosus*. **Química Nova**, [s. l.], v. X, n. 00, p. 1–6, 2017.

SILVA, V. F. N. *et al.* Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 809–817, 2011.

SLUITER, a. *et al.* NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, [s. l.], n. April 2008, p. 17, 2008. Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.

TSAI, W. T. *et al.* Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO<sub>2</sub>. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 203–208, 2001.

VAITHANOMSAT, P. *et al.* The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. **Kasetsart Journal - Natural Science**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 159–164, 2011.

XIAO, L. P. *et al.* Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: Evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 135, p. 73–81, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.143>.

YAN, Y. H. *et al.* Xylo-sugars production by microwave-induced hydrothermal treatment of corncob: Trace sodium hydroxide addition for suppression of side effects. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 101, p. 36–45, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.024>.

ZHUANG, X. *et al.* Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 578–582, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.019>.

## **CAPÍTULO 4 – A EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO EXIBIDA PELA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NO HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO E DETOXIFICAÇÃO**

Este capítulo foi publicado na revista SEMINA: *Ciências Agrárias* 43, 2155 – 2170 (2022), o estudo apresenta parte do trabalho de doutoramento que avaliou a possibilidade de aumentar a eficiência de fermentação. Inicialmente, os ensaios foram feitos com bagaço de cana-de-açúcar pois era uma biomassa já conhecida, e também estudada pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Alagoas no laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos LTBA ((GOMES, 2015); ANTUNES *et al.*, 2017).

Os hidrolisados de bagaço de cana foram submetidos aos pré-tratamentos hidrotérmico (195 °C, usando 200 rpm por 10 min) e ácido (0,5% (v/v) de ácido sulfúrico a 121°C por 15 min) (carga de sólidos de 10% m/v). A hidrólise enzimática do material pré-tratado foi realizada utilizando o complexo enzimático CellicCtec® (60 FPU/gbiomassa seca, tampão citrato a 50 mM e pH 4,8) a 50°C usando 150 rpm por 72h. Antes do processo de detoxificação, realizou-se um teste com a espécie de *Saccharomyces cerevisiae* para verificar se os compostos furfural (1 e 4g.L-1) e ácido acético (1 e 5% v/v) exerciam significativa inibição na espécie testada. O processo de detoxificação avaliou a concentração de carvão ativado (1, 3 e 5% m/v) e o tempo do processo (30, 45 e 60 min) a 30 °C, 150 rpm por 24 h. Na biomassa *in natura*, a composição química foi (36,7, 22,2 e 21,2%) celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Enquanto que as amostras após o pré-tratamento hidrotérmico e ácido apresentaram (60,0, 4,4 e 27,7%) e (63,7, 12,0 e 28,7%), respectivamente, e com rendimento mássico em torno de 60%, para ambos pré-tratados. A presença de furfural e ácido acético exibiu forte influência na espécie considerada, chegando a prejudicar em mais de 90% o consumo de açúcares no meio. O processo de destoxificação aumentou 13% a eficiência de fermentação para o hidrolisado obtido hidrotermicamente, enquanto que para o ácido não houve diferença significativa. Obtendo assim uma fermentação com maior eficiência, tecnicamente viável e menos poluente.

Por falta de tempo devido a atividade paralela de docência no Instituto Federal de Alagoas, em parte, devido ao contexto pandêmico de COVID-19 não foi possível aplicar a técnica de detoxificação aos resíduos do cultivo de coco. No entanto, os resultados obtidos nesse capítulo podem subsidiar, em estudos futuros, a realização da etapa de detoxificação em outras biomassas, inclusive nos resíduos do coco.

**THE FERMENTATION EFFICIENCY EXHIBITED BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ON SUGARCANE BAGASSE HYDROLYSATE, BY ANALYZING THE EFFECTS OF PRETREATMENT AND DETOXIFICATION**

**4.1 Introduction**

Several studies have been conducted on the production of biofuels from renewable sources. In this context, lignocellulosic wastes composed of cellulose, hemicellulose and lignin are an important alternative (SHEN & AGBLEVOR, 2011; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016b; OGANDO *et al.*, 2016; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016a).

Sugarcane bagasse, an important residue from sugarcane processing, has been used for production of liquid biofuel in the past (YU *et al.*, 2013; DRIEMEIER *et al.*, 2015). However, sugars in this lignocellulosic waste are not readily available for fermentation because of the recalcitrance of this biomass. Therefore, to obtain biofuels from lignocellulosic materials additional steps such as pretreatment and enzymatic hydrolysis (SANTOS-ROCHA *et al.*, 2017) are necessary. When a pretreatment is applied (for example, steam explosion, liquid hot water or dilute acid), compounds that cause difficulties in later steps (hydrolysis and/or fermentation) are generated. These compounds are called inhibitors. These inhibitors interfere with fermentation efficiency because they are toxic to ethanol-producing microorganisms (ZENG *et al.*, 2021).

Inhibitors can include lignin degradation products (a wide range of aromatic compounds), organic acids (acetic and formic), and furan derivatives (hydroxymethylfurfural and furfural) (DENG & AITA, 2018; GURRAM & MENKHAUS, 2014; CARDONA *et al.*, 2015). For example, the degradation of furfural is an aldehyde-alcohol transformation reaction, which includes furfuralcohol and furoic acid (SUN *et al.*, 2020). To reduce the inhibitory effect of these compounds, the procedure of washing the biomass after pretreatment is most commonly used, thus using a reasonable amount of water, causing the production of another effluent and the probable loss of sugars found in the biomass (PAN *et al.*, 2019; FERNÁNDEZ-DELGADO *et al.*, 2019).

Several detoxification methods, such as the removal of inhibitors from lignocellulosic liquors, have been used to increase their fermentability. The adsorption process using charcoal treatment can achieve a high fermentation efficiency of the saccharified liquor by yeasts (KIM *et al.*, 2011; BEHERA *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015).

This study aimed to produce cellulosic ethanol by fermentation with *S. cerevisiae*

from sugarcane bagasse hydrolysate, which was obtained after hydrothermal and acid pretreatment and sequentially subjected to enzymatic hydrolysis and detoxification before the fermentation process, in order to remove inhibitors and obtain greater fermentation efficiency.

## 4.2 Materials and Methods

### 4.2.1 Raw material

Sugarcane bagasse was provided by the Coruripe Mill (Coruripe, Alagoas, Brazil). This feedstock was dried at room temperature until 10% of its moisture content in biomass was obtained. Then, it was milled in a Willey type mill to a particle size of 30 mesh, placed in plastic bags, and stored in a freezer (-8 °C) to prevent contamination.

### 4.2.2 Hydrothermal pretreatment

Hydrothermal pretreatment was carried out in a 5.5L stainless steel reactor (model 4584, Parr Instrument Company, Moline, IL, USA). Sugarcane bagasse was mixed with distilled water at a solid/liquid ratio of 1:10 (w/v) (10% of solid loading) inside the reactor. The reaction occurred under 195 °C for 10 min at 200 rpm. When the reaction was complete, the reactor was cooled to 40 °C and the solids were filtered from the liquids. The solid was then washed with water to remove dissolved contents until a neutral pH was reached.

### 4.2.3 Dilute sulfuric acid pretreatment

Acidic pretreatment with sulfuric acid solution (0.5%, v/v), at a solid to liquid ratio of 1:10 (w/w) (10% of solid loading), was carried out in an autoclave at 121 °C for 15 min. After returning to room temperature, the solids were filtered from the liquids. The solids were washed with water to remove dissolved content.

### 4.2.4 Chemical characterization of the biomass

Raw and pretreated (hydrothermal and acidic pretreatments) sugarcane bagasse were characterized with respect to their chemical composition, according to analytical procedures described by Sluiter *et al.*, (2008), modified by Rocha *et al.*, (1997) and validated by Gouveia *et al.*, (2009).

#### 4.2.5 Enzymatic hydrolysis of raw and pretreated biomass

The enzymatic complex used was Cellic®CTec2, donated by Novozymes, Latin America (Araucária, Paraná, Brazil). This complex presented 245 FPU.mL<sup>-1</sup> (filter paper units) enzymatic activity (GHOSE, 1987). Enzymatic hydrolysis was conducted with reaction volumes of 50 mL, 150 rpm, 72 h, at 50 °C in batches. Each batch was placed in sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) using a solid loading of 10% (w/v) and an enzyme dosage of 60 FPU.g<sup>-1</sup> dry matter. The hydrolysis efficiency was assessed by the release of Total Reducing Sugars (TRS), determined using the DNS method (MILLER, 1959).

#### 4.2.6 Testing the inhibitory effect of acetic acid and furfural on ethanol fermentation by *S. cerevisiae*

A 2<sup>3</sup> experimental design was used to evaluate the effect of acetic acid (1 (-1) and 5% (v/v) (+1)) and furfural (1 (-1) and 4 g.L<sup>-1</sup> (+1)) on ethanol fermentation at different yeast concentrations (0.2 (-1) and 1% (w/v) (+1)). A total of eight experiments were carried out in triplicate, as displayed in Table 4.1. Experiments were performed using a formulated synthetic hydrolysate and *Saccharomyces cerevisiae* yeast (Fermix®). Erlenmeyer flasks containing YPD medium (10 g.L<sup>-1</sup> yeast extract, 20 g.L<sup>-1</sup> peptone and 40 g.L<sup>-1</sup> glucose) were stirred in a shaker incubator at 30 °C, 150 rpm for 24 h. Sugar consumption was the response evaluated from the experiments. Sugar concentration before and after fermentation were measured using total reducing sugars (TRS), which were determined using the DNS method (MILLER, 1959). Statistical analyses were performed using the STATISTICA® software (7.0 version).

**Tabela 4.1: Sugar consumption during fermentation by *S. cerevisiae***

Assay	Yeast mass (%) (Dry weight)	Acetic acid content (%)		Furfural concentration (g.L <sup>-1</sup> )	Sugar consumption (%)
		X1	X2		
1	0.2		1	1	30.0
2	1		1	1	42.5
3	0.2		5	1	16.3
4	1		5	1	12.5

5	0.2	1	4	22.5
6	1	1	4	30.0
7	0.2	5	4	11.3
8	1	5	4	5.0

Note. \*Experimental result deviations were lower than 3%, and for this reason were not represented in the Table.

#### 4.2.7 Fermentation of bagasse liquor obtained by hydrothermal and acidic pretreatment and enzymatic hydrolysis and the effect of detoxification step

After the previous study and confirmation of the inhibitory effect of acetic acid and furfural on the strain used in this study (*S. cerevisiae*), another experimental design was set up to evaluate a suitable detoxification condition that could improve ethanol yield. This experimental design involved the  $2^2$  experimental designs with three replications in the central point. A total of seven experiments were carried out in triplicate. Statistical analysis was performed using the STATISTICA® software (7.0 version). Hydrolysate samples from both hydrothermally pretreated and dilute acid pretreated sugarcane bagasse were subjected to detoxification using milled activated charcoal with a particle size of 2 mm. The variables of the detoxification process were the adsorbent (charcoal) concentration (1, 3, and 5% (w/v), -1, 0, and +1 conditions, respectively) and the time (30, 45, and 60 min, -1, 0, and +1 conditions, respectively). Fermentation was performed as described by Wolf (2011) in a shaker incubator at 30 °C and 150 rpm for 24 h. The TRS were measured using the DNS method (MILLER, 1959). Ethanol concentration was determined using the dichromatic method (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS [AOAC], 2005; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2016b). The efficiency of the process (based on the response variable) was evaluated based on sugar consumption (%) in the medium (reducing sugars). Fermentation efficiency was calculated as follows, as the Equation 4.1:

$$\text{Fermentation efficiency (\%)} = \frac{\text{Ethanol (g)}}{(\text{TRS}_{\text{initial}} - \text{TRS}_{\text{final}}) \cdot 0.511} \cdot 100 \quad (4.1)$$

where TRS is the total reducing sugar and 0.511 is the stoichiometric factor for the conversion of monosaccharides in ethanol.

## 4.3 Results and Discussion

### 4.3.1 Chemical characterization of the raw and pretreated biomass

Raw and pretreated lignocellulosic biomass were chemically characterized in terms of cellulose, hemicellulose, lignin, and ash contents, as shown in Table 4.2. Cellulose was found to be the main component. Significant removal of hemicellulosic fraction was reached after the hydrothermal (88.9%) and acidic (65.9%) pretreatments. This behavior corroborates with that in previous studies, in which hydrothermal pretreatment caused the auto-ionization of water, which acted as a catalyst, decreasing the pH of the medium and stimulating the depolymerization of hemicellulose (RUIZ *et al.*, 2020). Studies in which time, temperature, and pH were varied, carried out by Chotirotsukon *et al.* (2021) demonstrated the removal of around 52.0% of hemicellulose (170 °C, 40 min, pH = 7.0) from sugarcane bagasse. Santos-Rocha *et al.* (2017) indicated that an increase in the reaction temperature contributed to a higher percentage of 86.9% hemicellulose (195 °C, 10 min, pH = 7.0) being removed. Similarly, the dissolution of hemicellulose is also characteristic of acidic pretreatments. During thermochemical reactions, sulfuric acid acts as a catalyst, cleaving the glycosidic bonds and releasing hemicellulose monomers (KULOYO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016; SANTOS-ROCHA *et al.*, 2017). With respect to lignin content, a lower but important percentage was removed (26.9 for hydrothermal and 14.5% for acidic pretreatments). It has been pointed out that in both pretreatments, there is also a modest removal of the lignin fraction (CHOTIROTSUKON *et al.*, 2021).

**Tabela 4.2: Chemical characterization of the raw sugarcane bagasse and in pretreated biomass (in dry matter)**

Components (%)	Raw material	Hydrothermal pretreatment	Acidic pretreatment
Cellulose	36.7 ± 0.2	60.0 ± 0.1	63.7 ± 0.1
Hemicellulose	22.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	12.0 ± 0.2
Total Lignin	21.2 ± 0.1	27.7 ± 2.1	28.7 ± 0.7
Ashes	13.8 ± 0.1	6.3 ± 0.3	2.3 ± 0.2
Mass Yield	—	55.96	63.13

#### 4.3.2 Effect of inhibitor presence on *S. cerevisiae* fermentation activity

Table 4.1 shows the results for each condition as indicated by the experimental design. Sugar consumption was achieved between the values 5.0-42.5%, showing clearly that the presence of these inhibitors affects the fermentation process by *S. cerevisiae*. Jönsson & Martín (2016), observed that these compounds (inhibitors) hinder growth and metabolism of the cell complex during fermentation. In assay 8, it was identified that the severity of their effect increases with their concentrations, by applying 1% yeast, 5% acetic acid and 4 g.L<sup>-1</sup> furfural. Wikandari *et al.* (2010), observed that during fermentation with 1.5 g. L<sup>-1</sup> of acetic acid, the activity of *S. cerevisiae* was completely inhibited. The same effect was observed when furfural concentration was above 1 g.L<sup>-1</sup> (RICHARDSON *et al.*, 2011). The effects of these parameters, acetic acid and furfural, were better visualized when there was a higher consumption of sugars, in Experiment 2, where the fermentation conditions had the lowest concentrations of inhibitors, in which 1% of yeast, 1% of acetic acid and 1 g.L<sup>-1</sup> of furfural were used.

To confirm the results obtained, a verification of the model was carried out. To do this, it was necessary to adapt our model to a linear, quadratic or even cubic model. A linear model was initially tested for simplicity (Equation 4.2), using analysis of variance, which was verified through ANOVA (Table 4.3) showing good results with  $R^2 = 0.9993$  and  $Y$  being related with sugar consumption (%) and  $X1$ ,  $X2$  and  $X3$  for yeast concentration (%), acetic acid concentration (%) and furfural (g/L), respectively:

$$Y(X1, X2, X3)(\%) = 32.69 + 21.10.X1 - 2.95.X2 - 2,70.X3 - 4.70.X1.X2 \quad (4.2)$$

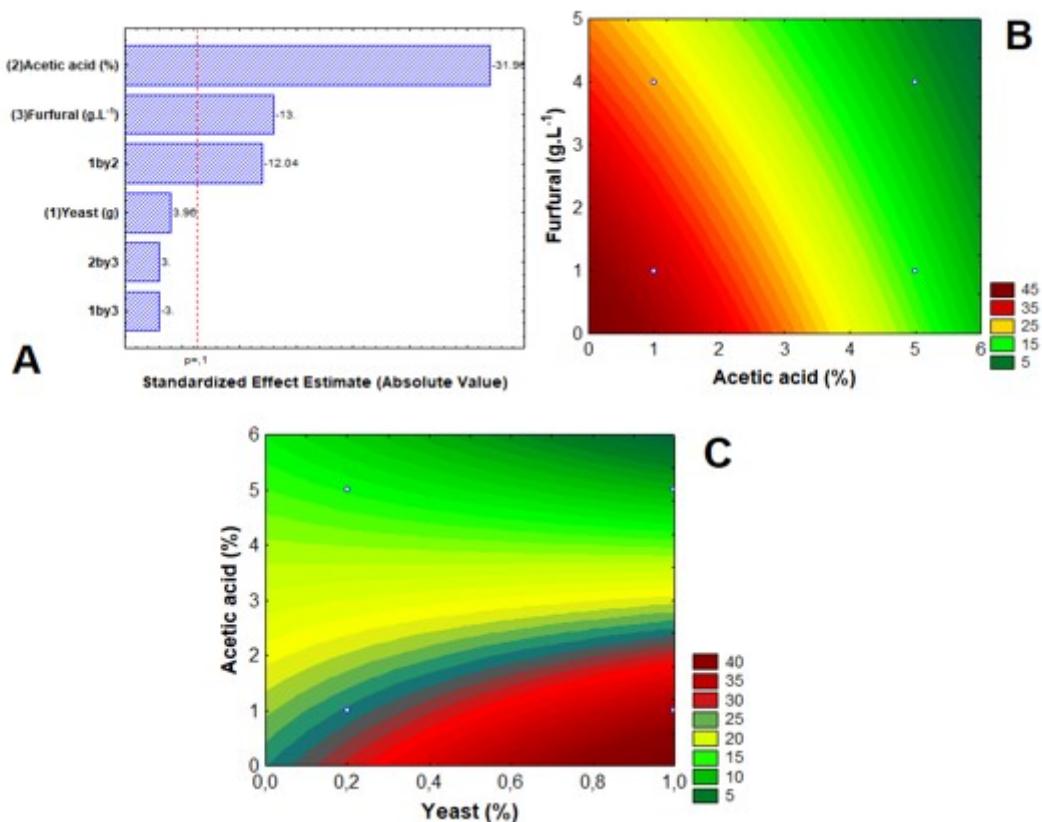
The F test was performed according to Box and Wetz (1973), taking into account the appropriate degrees of freedom. The ratio between the mean square of the regression (MSR) and that of the residue (MSr) must be greater than the distribution point F in order to have a greater degree of reliability, if possible, ten times greater. Thus,  $MSR/MSr = 122.43 > (10 \times F_{4,11})$ ;  $F_{4,11} = 3.36$  (for 90% confidence), showed that we have a highly significant fit and that it fits the linear model well.

**Tabela 4.3: ANOVA for the linear model of sugar consumption**

Factor	Sum of Square (SS)	Degrees of freedom	Mean of Square	F value	p-level (p = 0.01)
$R^2 = 0.9993$					
1	12.251	1	12.251	15.682	0.15747
2	<b>798.001</b>	<b>1</b>	<b>798.001</b>	<b>1021.442</b>	<b>0.01991</b>
3	<b>132.031</b>	<b>1</b>	<b>132.031</b>	<b>169.000</b>	<b>0.04888</b>
<b>1 by 2</b>	<b>113.251</b>	<b>1</b>	<b>113.251</b>	<b>144.962</b>	<b>0.05275</b>
1 by 3	7.031	1	7.031	9.000	0.20483
2 by 3	7.031	1	7.031	9.000	0.20483
Error	0.781	1	0.781		
Total SS	1070.379	7			

Figure 4.1A presents a Pareto chart, which graphically summarizes and displays the relative importance of a group of data. Effects which the rectangle are located on the right of the red line ( $p = 0.1$ ), are statistically significant (BARROS *et al.*, 2001). We observed that the main effects are acetic acid content and furfural and the interaction between acetic acid and *S. cerevisiae* concentration. In Figure 4.1B-C, the interaction between furfural and acetic acid, as well as acetic acid and yeast concentration, are shown (based on the relevance demonstrated in Figure 4.1A - Pareto chart). These indicated that better results were obtained when lower concentrations of acetic acid and furfural were used. In addition, lower yeast concentration was affected more by the presence and concentration of acetic acid, showing that higher yeast concentration can aid in minimizing the impact of acetic acid in the medium.

**Figura 4.1:** Figure showing the significance of the variables. The response variable is sugar consumption (%) in the medium represented by the numbers on the right of the graphs.



Fonte: Acervo do autor (2020).

Previous studies have shown that the presence of acetic acid and furfural affects the metabolism of sugars and, consequently the fermentation yield. Tian *et al.*, (2009) utilizing 2 g.L<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae* obtained better fermentation efficiency when furfural was present up to 2 g.L<sup>-1</sup>. The present study shows similarity with these prior studies with respect to the behaviour of *S. cerevisiae*, indicating a better performance in the presence of a greater amount of yeast. Also, Sarawan *et al.*, (2019) verified that better fermentation results were obtained at lower concentration of acetic acid and furfural, 0.82 and 0.17 g. L<sup>-1</sup>, respectively (fermentation with 1.2 g. L<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae*). Bezerra *et al.*, (2020) cite that acetic acid and furfural concentrations of 3 and 0.25 g. L<sup>-1</sup>, generally have a toxic effect on ethanol fermentation. The verified citations present a margin of conditions close to those of our study. This can be observed in test 8, where the combination of maximum conditions of acetic acid and furfural has a negative effect on the number of sugars consumed. This makes it possible to analyze interference in the microbial growth rate and consequently the product metabolism (OLIVA *et al.*, 2006).

#### 4.3.3 Detoxification and fermentation of sugarcane bagasse broth

The previous step showed that acetic acid and furfural were inhibitors of *S. cerevisiae*'s fermentation of the lignocellulosic broth. Next, a detoxification step (adsorption on activated carbon) was applied to verify if the fermentation efficiency could be improved. However, it is important to mention that the TRS content could not be significantly reduced during this process.

Table 4.4 shows the results for each condition as indicated by the experimental design for the hydrothermal and acidic pretreatments. The maximum recovery of sugars after detoxification was approximately 80% in both pretreatments and for assay 1, which used 1% of adsorbent for 30 min. In other words, only about 20% of the sugars in the broth were lost during this process. This behavior can be attributed to adsorption by activated charcoal, which can remove both inhibitors and sugars. Contact time is a crucial variable that affects adsorption during detoxification processes, and there is a reaction time in which an equilibrium between the adsorbent (active carbon) and adsorbate (inhibitor compounds or sugars) is reached (MUSSATTO & ROBERTO, 2004). Villarreal *et al.*, (2006) showed that an optimal pH (5.5) and contact time (60 min), were required for maximum removal of furfural (100%) from liquor from acid pretreatment of eucalyptus biomass. For sugarcane bagasse, in the Pareto chart (graph not shown), the variable that showed significant influence was time (confidence level of 95%), i.e., higher the reaction time, 60 min, higher the sugar loss. Figure 4.2 shows the effect of reaction time and adsorbent percentage on TRS recovery (g/L).

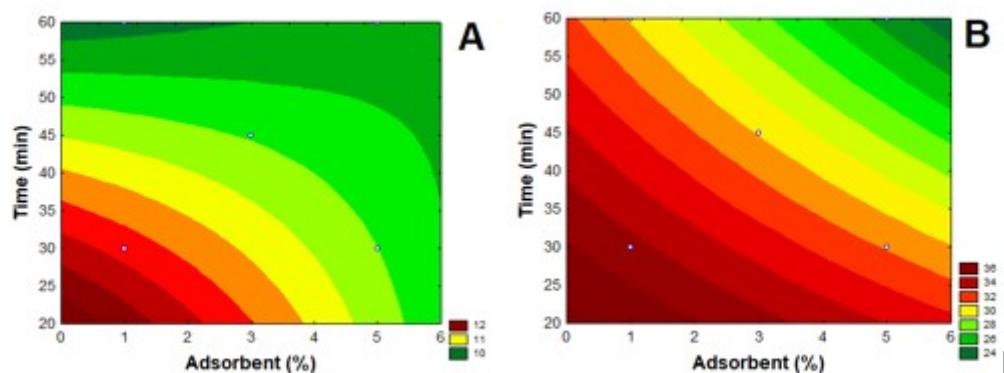
Detoxification conditions used were based on literature. For example, Freitas *et al.*, (2019) used 2% activated charcoal for the broth obtained from coconut husk pretreated by acid and after 24 h, only 2% of the sugars were lost. Li *et al.*, (2020) applied a detoxification process in a broth obtained from rice straw pretreated with acid using 1% activated charcoal for 5 h, and a loss of 5% sugars was observed by them. Prasad *et al.*, (2018), used a broth form corn straw treated by acid and conducted detoxification using 5% of activated charcoal for 30 min, to obtain a sugar loss of 15%, which is similar to our work.

**Tabela 4.4: Total reducing sugars (TRS) for hydrothermal and acid pretreatment after detoxification process**

Assay	Adsorbent (%)	Time (min)	TRS (g.L <sup>-1</sup> )	TRS (g.L <sup>-1</sup> )
			hydrothermal	acidic
1	1	30	11.4 ± 0.3	34.3 ± 0.1
2	5	30	10.5 ± 0.4	30.9 ± 0.3
3	1	60	9.9 ± 0.3	29.9 ± 0.3
4	5	60	10.1 ± 0.1	24.6 ± 0.4
5	3	45	6.5 ± 0.3	32.9 ± 0.3
6	3	45	6.4 ± 0.3	32.5 ± 0.2
7	3	45	6.7 ± 0.2	31.2 ± 0.2

*Nota.* The initial concentration of sugars after enzymatic hydrolysis were 13.8 ± 0.2 and 41.8 ± 0.2 g.L<sup>-1</sup>.

**Figura 4.2: Relation between time and adsorbent dose to the total reducing sugars (TRS) (g/L) recovered from sugarcane hydrolysate A) for hydrothermal and B) for acidic pretreatment.**



Fonte: Acervo do autor (2020)

#### 4.3.4 Fermentation of non-detoxified and detoxified sugarcane bagasse broth

Finally, fermentation assays were carried out for sugarcane bagasse hydrolysates obtained after hydrothermal and acidic pretreatments and enzymatic hydrolysis. Table 4.5

shows the results for the raw and detoxified hydrolysates using 1% of adsorbent and 30 min of process time.

**Tabela 4.5: Ethanol concentration and fermentation efficiency obtained after the fermentation step**

Assay	Bioethanol (g.L <sup>-1</sup> )	Fermentation efficiency (%)
NHH*	7.17	75.33 ± 2.35 <sup>a</sup>
DHH*	7.41	87.94 ± 1.56 <sup>b</sup>
NHA*	4.92	70.41 ± 2.89 <sup>a</sup>
DHA*	5.11	75.50 ± 2.39 <sup>a</sup>

*Nota.* \*NHA, non-detoxified hydrolysate from acid pretreatment; DHA, detoxified hydrolysate from acid pretreatment; NHH, non-detoxified hydrolysate from hydrothermal pretreatment; DHH, detoxified hydrolysate from hydrothermal pretreatment. Same letters represent no statistical difference with 90% confidence level ( $p < 0.10$ ).

It is possible to verify an increase of 12.6% in fermentation efficiency for sugarcane bagasse hydrolysate obtained after hydrothermal pretreatments and detoxification process. There was no significant difference between the detoxified and non-detoxified acidic hydrolysate.

Rasika *et al.*, (2016) carried out fermentations using MDMC medium (with glucose and mannose), at 0.4 g. L<sup>-1</sup> of acetic acid and 0.6 g. L<sup>-1</sup> of furfural and obtained 94.7% (detoxified) and 56.13% (non-detoxified) of fermentation efficiency, showing the importance of detoxification in increasing ethanol yield. According to Freitas *et al.*, (2019), detoxified liquor obtained from coconut husk after acidic pretreatment increased fermentation efficiency from 60 to 84%.

A study carried out by Mussatto and Roberto (2004) indicated that the pH of the system influences the adsorption process of the inhibitor as a change in pH induces precipitation and causes instability of the toxic inhibitor compounds (Martinez *et al.*, 2001). pH has an influence on furfural by altering the structural stability (Sahu *et al.*, 2008). These studies suggest that, the low fermentative yield obtained from acid hydrolysate, before and after detoxification is due to the acid residues, that might have been retained from the acid pretreatment. On the other hand, for hydrothermal hydrolysate, a simple process of detoxification with activated charcoal was shown to be significant.

The pretreatment using sulfuric acid has been extensively studied because it destructures lignocellulosic biomass (BEHERA *et al.*, 2014). In addition, applying acidic solutions can generate more by-products, which could reduce the efficiency of consequent steps for obtaining biofuel. Hydrothermal pretreatment is particularly significant in this context as it just makes use of hot-compressed water (SANTOS-ROCHA *et al.*, 2017).

#### 4.4 Conclusions

These results emphasize that sugarcane bagasse is a potential lignocellulosic biomass for ethanol production. Acetic acid and furfural were toxic to the *S. cerevisiae* strain. A better performance was obtained for the liquor obtained from hydrothermally pretreated biomass after detoxification with activated carbon. This study, shows that detoxification of compounds produced during pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, which are inhibitors to fermentation by *S. cerevisiae*, improves the fermentation yield. It also showed that using hydrothermal pretreatment, eliminates the washing step of pretreated biomass, and eliminated the generation of new effluents.

#### 4.5 References

ANTUNES, D. P. C.; VIEIRA, R. C.; SANTOS-ROCHA, M. S. R.; BARBOSA, K. L.; SILVA, M. C. S ; GOMES, M. A.; ALMEIDA, R. M. R. G . Dilute Acid Pretreatment Optimization from Sugarcane Wastes by Experimental Design. **The International Journal of Engineering and Science**, v. 6, p. 1-8, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (2005). **Official methods of analysis of the association** (18nd ed.). AOAC.

BARROS, B. N., SCARMINIO, I. S., & BRUNS, R. E. (2001). **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Unicamp.

BEHERA, S., RICHA, A., NANDHAGOPAL, N., & KUMAR, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 36(2014), 91-106. doi: 10.1016/j.rser.2014.04.047

BEZERRA, P. X. O., SILVA, C. E. de F., SOLETTI, J. I., & CARVALHO, S. H. V. (2020). Cellulosic ethanol from sugarcane straw: a discussion based on industrial experience in the northeast of Brazil. **Bioenergy Research**, 14. (3), 761-773. doi: 10.1007/s12155-020-10169-w

BOX, G. E. P., & WETZ, J. (1973). Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. **University of Wisconsin Technical Report**, 9(1973), 95.

CARDONA, M. J., TOZZI, E. J., KARUNA, N., JEOH, T., POWELL, R. L., & MCCARTHY, M. J. (2015). A process for energy-efficient high-solids fed-batch enzymatic liquefaction of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 198(2015), 488-496. doi: 10.1016/j.biortech.2015.09.042

CHOTIROTSUKON, C., RAITA, M., YAMADA, M., NISHIMURA, H., WATANABE, T., LAOSIRIPOJANA, N., & CHAMPREDA, V. (2021). Sequential fractionation of sugarcane bagasse using liquid hot water and formic acid-catalyzed glycerol-based organosolv with solvent recycling. **BioEnergy Research**, 14(2021), 135-152. doi: 10.1007/s12155-020-10181-0

DENG, F., & AITA, G. M. (2018). Detoxification of dilute ammonia pretreated energy cane bagasse enzymatic hydrolysate by soluble polyelectrolyte flocculants. **Industrial Crops and Products**, 112(2018), 681-690. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.12.061

DRIEMEIER, C., MENDES, F. M., SANTUCCI, B. S., & PIMENTA, M. T. B. (2015). Cellulose co-crystallization and related phenomena occurring in hydrothermal treatment of sugarcane bagasse. **Cellulose**, 22(2015), 2183-2195. doi: 10.1007/s10570-015-0638-7

FERNÁNDEZ-DELGADO, M., PLAZA, P. E., COCA, M., GÁRCIA-CUBERO, M., GONZÁLEZ-BENITO, G., & LUCAS, S. (2019.) Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. **Industrial Crops and Products**, 130(2019), 409-419. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.12.087

FREITAS, J. V., NOGUEIRA, F. G. E., & FARINAS, C. S. (2019). Coconut shell activated carbon as an alternative adsorbent of inhibitors from lignocellulosic biomass pretreatment. **Industrial Crops and Products**, 137(2019), 16-23. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.018

GHOSE, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, 59(2), 257-268. doi: 10.1351/pac198759020257

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M., & ROCHA, G. J. DE M. (2009). Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, 32(6), 1500-1503. doi: 10.1590/S0100-40422009000600026

GURRAM, R. N., & MENKHAUS, T. J. (2014). Continuous enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass with simultaneous detoxification and enzyme recovery. **Appl Biochem Biotechnol**, 173(2014), 1319-1335. doi: 10.1007/s12010-014-0873-7

JÖNSSON, L., & MARTÍN, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, 199(2016), 103-112. doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.009

KIM, Y., XIMENES, E., MOSIER, N. S., & LADISCH, M. R. (2011). Enzyme and microbial technology soluble inhibitors / deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, 48(4-5), 408-415. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.01.007

KULOYO, O. O., PREEZ, J. C. du, GARCÍA-APARICIO, M. DEL P., KILIAN, S. G., STEYN, L., & GÖRGENS, J. (2014). Opuntia ficus-indica cladodes as feedstock for ethanol production by *kluyveromyces marxianus* and *saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(2014), 3173-3183. doi: 10.1007/s11274-014-1745-6

LI, Y., QI, B., & WAN, Y. (2020). Separation of monosaccharides from pretreatment inhibitors by nanofiltration in lignocellulosic hydrolysate: fouling mitigation by activated carbon adsorption. **Biomass and Bioenergy**, 136(2020), 105527. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105527

LIU, K., ZHANG, J., & BAO, J. (2015). Two stage hydrolysis of corn stover at high solids content for mixing power saving and scale-up applications. **Bioresource Technology**, 196(2015), 716-720. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.054

MARTINEZ, A., RODRIGUEZ, M., WELLS, M. L., YORK, S. W., PRESTON, J. F., & INGRAM, L. O. (2001). Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, 17(2001), 287-293. doi: 10.1021/bp0001720

MILLER, L. G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3), 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030

MUSSATTO, S. I., & ROBERTO, I. C. (2004). Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Food Science and Techonology**, 24(1), 94-100. doi: 10.1590/S0101-20612004000100018

OGANDO, I. F. B., SARTORI, J. A. de S., MAGRI, N. T. C., & AGUIAR, C. de. (2016). Pretreatment of sugarcane top leaves by ozonation as a promotion of susceptibility to hydrolysis. **Bioenergy**, 3(4), 192-200. doi: 10.18067/jbfs. v3i4.119

OLIVA, J. M., NEGRO, M. J., SÁEZ, F., BALLESTEROS, I., MANZANARES, P., GONZÁLEZ, A., & BALLESTEROS, M. (2006). Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, 41(5), 1223-1228. doi: 10.1016/j.procbio.2005.12.003

PAN, L., HE, M., WU, B., WANG, Y., HU, G., & MA, K. (2019). Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, 227(2019), 1185-1194. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.04.239

PEREIRA, S. C., MAEHARA, L., MACHADO, C. M. M., & FARINAS, C. F. (2016). Physical e chemical e morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2g ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques.

**Renewable Energy**, 87(1), 607-617. doi: 10.1016/j.renene.2015.10.054

PRASAD, S., MALAV, M. K., KUMAR, S., SINGH, A., PANT, D., & RADHAKRISHNAN, S. (2018). Enhancement of bio-ethanol production potential of wheat straw by reducing furfural and 5-hydroxymethylfurfural (hmf). **Bioresource Technology Reports**, 4(2018), 50-56. doi: 10.1016/j.biteb.2018.09.007

RASIIKA, L., NILSSON, K., HOLMGREN, M., MADAVI, B., NILSSON, R. T., & SELLSTEDT, A. (2016). Adaptability of *trametes versicolor* to the lignocellulosic inhibitor's furfural, hmf, phenol and levulinic acid during ethanol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, 90(2016), 95-100. doi: 10.1016/j.biombioe.2016.03.030

RICHARDSON, T. L., HARNER, N. K., BAJWA, P. K., TREVORS, J. T., & LEE, H. (2011). Approaches to deal with toxic inhibitors during fermentation of lignocellulosic substrates. **American Chemical Society**, 1067 (7), 171-202. doi: 10.1021/bk-2011-1067

ROCHA, G. J. M., SILVA, F. T., CURVELO, A. A. S., & ARAÚJO, G. T. (1997). A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by hplc. **Proceedings of the V Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components**, 5(2), 113-115. doi: 10.1186/cc10280

RUIZ, H. A., CONRAD, M., SUN, S., SANCHEZ, A., ROCHA, G. J. M., ROMANÍ, A., CASTRO, E., TORRES, A., RODRÍGUEZ-JASSO, R. M., ANDRADE, L. P., SMIRNOVA, I., SUN, R., & MEYER, A. S. (2020). Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: from batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. **Bioresource Technology**, vol. (299), 122685. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122685

SAHU, A. K., SRIVASTAVA, V. C., MALL, I. D., & LATAYE, D. H. (2008). Adsorption of furfural from aqueous solution onto activated carbon: kinetic, equilibrium and thermodynamic study. **Separation Science and Technology**, 43(5), 1239-1259. doi: 10.1080/01496390701885711

SANTOS-ROCHA, M. S. R., PRATTO, B., SOUSA, R. de, Jr., & ALMEIDA, R. M. R. G.,

& CRUZ, A. J. G. da. (2016a). A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, vol. (228), 176-185. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.087

SANTOS-ROCHA, M. S. R., SILVA, M. C. S., PIMENTEL, W. R. de O., & ALMEIDA, R. M. R. G. (2016b). Acid pretreatment of corn stover for production of second-generation ethanol. **Engevista**, 18(2), 412-423. ISSN online: 2317-6717

SANTOS-ROCHA, M. S. R., SOUZA, R. B. A., SILVA, G. M., CRUZ, A. J. G., & ALMEIDA, R. M. R. G. (2017). Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração **Scientia Plena**, 13(3), 1-13. doi: 10.14808/sci.plena.2017.034202

SARAWAN, C., SUINYUY, T. N., SUKAI, Y. S., & KANA, E. B. G. (2019). Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. **Bioresource Technology**, 286(2019), 121403. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121403

SHEN, J., & AGBLEVOR, F. A. (2011). Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 34(2011), 33-43. doi: 10.1007/s00449-010-0444-4

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., & CROCKER, D. (2008). Analytical procedure - determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, 12(2008), 17. doi: NREL/TP-510-42618

SUN, C., LIAO, Q., XIA, A., FU, Q., HUANG, Y., ZHU, X., & WANG, Z. (2020). Degradation and transformation of furfural derivatives from hydrothermal pretreated algae and lignocellulosic biomass during hydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. (131), 109983, 405-435. doi: 10.1016/j.rser.2020.109983

TIAN, S., ZHOU, G., YAN, F., YU, Y., & YANG, X. (2009). Yeast strains for ethanol

production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**, 27(5), 656-660. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.008

VILLARREAL, M. L. M., PRATA, A. M. R., FELIPE, M. G. A., & ALMEIDA-SILVA, J. B. (2006). Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(1), 17-24. doi: 10.1016/j.enzmicro.2005.10.032

WIKANDARI, R., MILLATI, R., SYAMSIYAY, S., MURIANA, R., & AYUNINGSIH, Y. (2010). Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigenous microbial isolate bioethanol production. **Agricultural Journal**, 5(2), 105-109. doi: [10.3923/aj.2010.105.109](https://doi.org/10.3923/aj.2010.105.109)

WOLF, L. D. (2011). **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol obtenção de xiooligômeros**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, SP, Brasil.

YU, Q., ZHUANG, X., YUAN, Z., QI, W., WANG, W., WANG, Q., & TAN, X. (2013). Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, 144(2013), 210-215. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.078

ZENG, X., XIAN, X., HU, L., TAO, S., ZHANG, X., LIU, Y., & LIN, X. (2021.) Efficient short-time hydrothermal depolymerization of sugarcane bagasse in one-pot for cellulosic ethanol production without solid-liquid separation, water washing, and detoxification. **Bioresource Technology**, 339 (2021), 125575. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125575

## CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Diante do que foi exposto no conteúdo dessa tese, apresentam-se as seguintes conclusões:

- Este trabalho constatou a possibilidade de utilizar os resíduos do cultivo de coco (resíduos do fruto e do coqueiro), ainda não explorados na literatura, como biomassa lignocelulósica promissora na geração de energia, especificamente, obtenção de E2G;
- O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) apresentou efeito superior ao pré-tratamento ácido, em relação, a todas as partes do cultivo de coco: casca do coco verde (CCV); folíolos da folha do coqueiro (FFC) e raque da folha do coqueiro (RFC). Além de promover uma remoção significativa da hemicelulose, em concordância com a literatura;
- A hidrólise enzimática utilizando o pré-tratamento hidrotérmico foi mais eficiente do que os resultados obtidos para as biomassas ácidas pré-tratadas;
- Os ensaios de fermentação enzimática realizados com a *K. marxianus* mostrou-se capaz de metabolizar tanto a hexose (glicose) quanto a pentose (xilose) atingindo rendimento de fermentação etanólica de até 80 %.
- Por outro lado, algumas fermentações atingiram baixo rendimento fermentativo e podem estar associadas a outros compostos inibitórios (furfural, HMF e compostos fenólicos).
- A associação de baixo rendimento fermentativo aos compostos tóxicos tornou-se difícil devido à escassez de trabalhos científicos que utilizassem os resíduos do cultivo de coco;
- O estudo dos compostos tóxicos foi realizado com bagaço de cana-de-açúcar, biomassa lignocelulósica conhecida e consolidada. E o ácido acético e o furfural foram tóxicos para a cepa de *S. cerevisiae*;

- Uma melhor eficiência de fermentação foi obtida no licor a partir de biomassa pré-tratada hidrotermicamente após destoxificação com carvão ativado;
- Este estudo mostra que a detoxificação de compostos produzidos durante o pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, que são inibidores da fermentação por *S. cerevisiae*, melhora o rendimento da fermentação.

## CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudo dos compostos inibitórios nos resíduos do cultivo de coco abrangendo todas as biomassas utilizadas neste trabalho;
- Aplicar a metodologia de detoxificação com carvão ativo, desenvolvida neste trabalho, aos resíduos do cultivo de coco. Visto que, a viabilidade técnica e econômica da produção de E2G está associada à obtenção de condições que permitam atingir elevado teor de açúcar.
- Realizar estudos fermentativos que utilizem a *S. cerevisiae* associada a *K. marxianus*, na tentativa de elevar o teor alcoólico. E assim conseguir fermentar uma maior quantidade de hexoses e pentoses presentes no hidrolisado.
- Realizar estudos para avaliar a viabilidade técnica, geográfica e econômica dos resíduos do cultivo do coco na produção de etanol lignocelulósico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, R.; UEDA, K.; SAKA, S. Hydrothermal decomposition of various crystalline celluloses as treated by semi-flow hot-compressed water. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 278–286, 2014.
- ANDRADE, E. T. De; CARVALHO, S. R. G. De; SOUZA, L. F. De. Programa do proálcool e o etanol no brasil. **Engevista**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 127–136, 2009. Disponível em: <http://www.uff.br/engevista/seer/index.php/engevista/article/view/236>.
- ANEEL. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3<sup>a</sup>ed. Brasília: Centro de Documento - CEDOC, 2008.
- AQUINO, A. F.; BIDÔ, É. S.; OLIVEIRA, M. L. M. G. V. N. O etanol da cana de açúcar : possibilidades energéticas da região de Ceará-Mirim-RN. **Holos**, [s. l.], v. 01, p. 105–125, 2014.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>.
- BARBOSA, K. L. **Avaliação do desempenho de celulase bacteriana: estratégia de bioprospecção para enzimas celulolíticas**. 2017. 1–113 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, [s. l.], 2017.
- BARBOSA, K. L. *et al.* Efeito do pré-tratamento ácido da Palma Opuntia Ficus Indica Mill na produção de etanol 2G. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, [s. l.], p. 1–6, 2015.
- BEHERA, S. *et al.* Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 36, p. 91–106, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>.
- BENASSI. **O cultivo do coqueiro-anão-verde**. Vitória: Biblioteca do Incaper, 2013. *E-book*. Disponível em: <https://incaper.es.gov.br/fruticultura-coco>.
- BONASSA, G. *et al.* Subprodutos Gerados na Produção de Bioetanol Bagaço Torta de Filtro água de Lavagem e Palhagem. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [s. l.], n. 4, p. 144–166, 2015.
- BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, n. 24, p. 6537–6542, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.019>.
- BRODEUR, G. *et al.* Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, [s. l.], v. 2011, p. 1–17, 2011. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011/787532/>.
- CABRAL, M. M. S. **Aproveitamento da casca do coco verde para produção de etanol de segunda geração**. 2014. 72 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, [s. l.], 2014.

- CABRAL, M. M. S. *et al.* Bioethanol production from coconut husk fiber. **Food Technology**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 1872–1877, 2016.
- CABRAL, M. M. S. *et al.* Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 99, 2017.
- CARDONA, M. J. *et al.* A process for energy-efficient high-solids fed-batch enzymatic liquefaction of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 198, p. 488–496, 2015.
- CARDOSO, M. S.; GONÇALEZ, J. C. Aproveitamento da casca do coco-verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de polpa celulósica. **Ciencia Florestal**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 321–330, 2016.
- CARMO, J. R. do. **Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus CCT 4086* utilizando resíduos do processamento do café ( *Coffea arabica L.* ).** 2013. 253 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, [s. l.], 2013.
- CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S. De; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 533–535, 2002.
- CARVALHO, J. M. de *et al.* Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 437, 2006. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2472>.
- CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.
- CASTRO, C. P. **Comportamento de cultivares de coqueiro anão ( *Cocos nucifera L.* ) nos tabuleiros costeiros do norte de Sergipe.** 2007. 30 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, [s. l.], 2007.
- CCOPA RIVERA, E. *et al.* Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 119, p. 42–51, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.002>.
- CHEMMÉS, C. S. *et al.* Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. **XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, UNIFACS**, [s. l.], p. 58–72, 2013.
- CHEN, C. *et al.* A method for concentration of monosaccharide and removal of inhibitors during hydrolysate pretreatment for improved bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 260, p. 120999, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120999>.
- CHIARAMONTI, D. *et al.* Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 46, p. 25–35, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020>.
- CINTRA, F. L. D.; RESENDE, R. S.; LEAL, M. de L. da S. Distribuição de raízes de coqueiro anão sob volumes de água em solo coeso dos tabuleiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 614–619, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-)

43662008000600007&lng=pt&tln=pt.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. Amorphous Cellulose – Structure and Characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, [s. l.], v. 45, n. 1–2, p. 13–21, 2011. Disponível em: [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT1-2\(2011\)/p.13-21.pdf](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT1-2(2011)/p.13-21.pdf).

CORRÊA, L. J. **Estudos de melhorias no processo de hidrólise enzimática de biomassas para produção de etanol**. 2016. 132 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, [s. l.], 2016.

DA COSTA NOGUEIRA, C. *et al.* Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber—Pretreatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 112, n. September 2017, p. 734–740, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.047>.

DA COSTA NOGUEIRA, C. *et al.* Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 130, n. September 2018, p. 259–266, 2019.

DA CRUZ, S. H. *et al.* Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 439–447, 2012.

DAUBER, R. A. **Óleo de Coco : Uma revisão sistemática**. 2015. 47 f. - Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, [s. l.], 2015.

DELGADO, F.; EVANGELISTA, M.; ROITMAN, T. Biocombustíveis. **Cadernos FGV Energia**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1–115, 2017.

DE MIRANDA, R. L.; MARTINS, E. M.; LOPES, K. A potencialidade energética da biomassa no Brasil. **Revista Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 94–106, 2019. DOI: 10.18616/rdsd.v5i1.4829.

DIRCEU, J. M. J. **Fibras de sisal : estudo de propriedades e modificações químicas visando aplicação em compósitos de matriz fenólica**. 2006. 267 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, [s. l.], 2006.

DOS SANTOS-ROCHA, M. S. R. *et al.* Assessment of different biomass feeding strategies for improving the enzymatic hydrolysis of sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 125, n. August, p. 293–302, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.005>.

ESTEVES, M. R. L. **Estudo do potencial energético e aproveitamento das cascas de coco verde para a produção de briquete em Maceió-AL**. 2014. 78 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, [s. l.], 2014.

FARINAS, C. S. A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação. **Embrapa Instrumentação**, [s. l.], p. 13, 2011.

FERRARI, R.; OLIVEIRA, V.; SCABIO, a. Biodiesel from soybean: characterization and consumption in an energy generator. **Química Nova**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 19–23, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100->

40422005000100004&script=sci\_arttext.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S. **A cultura do coco**. 1<sup>a</sup>ed. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. **Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro**. 1<sup>a</sup>ed. Aracaju: SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002-. ISSN 1678-197x.

FONTES, H. R.; NUNES, M. U. C.; COSTA, E. N.; RIBEIRO, F. E. **Cultivo do coco**. Revista Campo&Negócio on line. Artigos Hortifrutí. m03, 2021.

FREITAS, J. V.; NOGUEIRA, F. G. E.; FARINAS, C. S. Coconut shell activated carbon as an alternative adsorbent of inhibitors from lignocellulosic biomass pretreatment. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 137, n. April, p. 16–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.018>.

FUJITOMI, K. *et al.* Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 111, p. 161–166, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.161>.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, n. 6, p. 618 -628, 2002.

GOMES, M. A. **Destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos visando à obtenção de etanol 2G**. 2015. 94 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, [s. l.], 2015.

GOMES, M. A. *et al.* Estudo da eficiência de fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos destoxificados visando à obtenção de etanol 2G. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**, [s. l.], p. 1–6, 2015.

GONÇALVES, F. A. **Avaliação do potencial da fibra e casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto pré-tratados visando à produção de etanol**. 2014. 224 f. - Tese de doutorado - RENORBIO, Natal, [s. l.], 2014.

GONÇALVES, F. A. *et al.* Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, [s. l.], v. 131, p. 66–76, 2014.

GOUVEIA, E. R. *et al.* Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GRASEL, F. S. *et al.* Inovação em Biorrefinarias I. Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*) e Bagaço de Cana-de- Açúcar (*Saccharum officinarum*). **Revista virtual de química**, Paraná, v. 9, n. 1, 2017.

GROSSI, E. C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. 2015. 77 f. - Dissertação de mestrado - Universidade de Brasília, Brasília, [s. l.], 2015.

GUERI, M. V. D.; SCHIRMER, W. N.; TORRES, L. M. G.; FURTADO, A. C. Pretreatments

of lignocellulosic waste to increase methane production in anaerobic digestion processes: a review. **Scientific Journal of Environmental Sciences and Biotechnology**. 7 (3): 13-27, 2021.

HARMAN-WARE, A. E. *et al.* Characterization of Endocarp Biomass and Extracted Lignin Using Pyrolysis and Spectroscopic Methods. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 350–368, 2015.

IWAGAKI, F. *et al.* Pretreatment of sugarcane top leaves by ozonation as a promotion of susceptibility to hidrolysis Pré-tratamento de ponteiro de cana de açúcar por ozonização como Pretreatment of sugarcane top leaves by ozonation as a promotion of susceptibility to hidrolysis. **Bioenergy**, [s. l.], p. 192–200, 2016.

JERONIMO, C. E.; SILVA, G. O. Estudo de alternativas para o aproveitamento de resíduos sólidos da industrialização do coco. **Revista Monografias Ambientais**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2193–2208, 2013. Disponível em: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/remoa/article/view/6935>.

JNAWALI, P. *et al.* Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Brown Coconut Husk Treated with Sodium Hydroxide. **Waste and Biomass Valorization**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1757–1766, 2018.

JÖNSSON, L. J. ; ALRIKSSON, B. A. ; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 6, n. 16, p. 40, 2013.

JUMELICE DOS S. SILVAA, VALÉRIA R. DOS S. MALTA, MARTHA S. R. DOS SANTOS-ROCHA, RENATA M. R. G. ALMEIDA, MÁRCIA A. GOMES, CECÍLIA D. VICENTE, K. L. B. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA, FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS ATRAVÉS DA COROA DE Ananas comosus. **Química Nova**, [s. l.], v. X, n. 00, p. 1–6, 2017.

KIIPER, P. G. **Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcólica do mosto de xilose por Pachysolen tannophilus**. 2009. 100 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, [s. l.], 2009.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, [s. l.], v. 24, n. 68, p. 223–253, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142010000100017&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000100017&lng=pt&nrm=iso&tlang=pt).

KUDAHETTIGE NILSSON, R. L. *et al.* Adaptability of *Trametes versicolor* to the lignocellulosic inhibitors furfural, HMF, phenol and levulinic acid during ethanol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 90, p. 95–100, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.03.030>.

KULOYO, O. O. *et al.* *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 3173–3183, 2014.

LEITE, R. C. de C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no brasil. **Novos Estudos - CEBRAP**, [s. l.], v. 78, p. 15–21, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/nec/n78/03.pdf>.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 165, n. C, p. 3–8, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>.

LI, Y.; QI, B.; WAN, Y. Separation of monosaccharides from pretreatment inhibitors by nanofiltration in lignocellulosic hydrolysate: Fouling mitigation by activated carbon adsorption. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 136, n. December 2019, p. 105527, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105527>.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.

LINO. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL DA LIGNINA E LIPÍDIOS DO BAGAÇO E PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR Tese. [s. l.], 2015.

LORA, J. H.; GLASSER, W. G. Recent industrial applications of lignin a sustainable. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 10, n. April, p. 39–40, 2002.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. 2013. 74 f. - Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, [s. l.], 2013.

LUCY, T.; PETRI, D. F. S. Hidrolise Enzimática De Biomassa. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

MACEDO, L. C. V. **Estudo Da Eficiência Do Pré-Tratamento Do Bagaço De Abacaxi Com Peróxido De Granulometrias Na Obtenção De Açúcares Redutores Totais**. 2016. 176 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, [s. l.], 2016.

MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos : um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**, [s. l.], v. 07, n. 02, p. 1–19, 2010.

MARTINEZ., D. G.; ARMIN, F. Potencial do Resíduo do Processamento da Mandioca para Produção de Etanol de Segunda Geração. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 141–148, 2017.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. De. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010. **Documentos Embrapa**, [s. l.], v. 164, p. 32, 2011. Disponível em: [http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2011/doc\\_164.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf).

MIGUEL, J. V. P. **Produção integrada de bioetanol de cana-de-açúcar de primeira e segunda geração: análises energética, ambiental e econômica**. 2013. 61 f. - Trabalho de conclusão de curso - Universidade de São Paulo, São Carlos, [s. l.], 2013.

MORAIS, S. A. L. De; NASCIMENTO, E. A. Do; MELO, D. C. De. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extractivos voláteis. **Revista Árvore**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 461–470, 2005. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-67622005000300014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622005000300014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).

MOSIER ET AL. Features of Promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2005.

MOUTTA, R. D. O. Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização e. 2009. 1–101 f. [s. l.], 2009.

MURAKAMI, L. S. N. A.; BOMBANA, G. A.; AFFONSO, G. S. Processo produtivo do etanol de segunda geração usando bagaço de cana-de-açúcar. **X Encontro de Engenharia de Produção Agronômica**, [s. l.], p. 1–6, 2016.

NASCIMENTO, R. J. A. **Tempo real de coco verde por espectroscopia no infravermelho próximo (Nirs)**. 2016. 132 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, [s. l.], 2016.

NOVO, L. P. **Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 139 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, [s. l.], 2012.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OLIVA, J. M. *et al.* Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of Kluyveromyces marxianus. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 1223–1228, 2006.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PAN, L. *et al.* Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 227, p. 1185–1194, 2019.

PARDO, L. M. F.; MENDOZA, J. G. S.; GALÁN, J. E. L. Influence of pretreatments on crystallinity and enzymatic hydrolysis in sugar cane residues. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 131–141, 2019.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 161, p. 431–440, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>.

PEDROSO, G. T.; SANTOS, H. C. Á. C. dos S.; ARAGÃO, W. M. Características da Inflorescência de Cultivares de Coqueiro nas Épocas Seca e Chuvosa do Ano. **Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa**, [s. l.], p. 1–59, 2007. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/4779/1/Bp-023.pdf>.

PEREIRA, S. C. *et al.* 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015.

PEREIRA, C. L. **Aproveitamento do resíduo do coco verde para produção de compósitos destinados à construção rural**. 2012. 1–137 f. - Tese de doutorado - Universidade de São Paulo, Pirassununga, [s. l.], 2012.

PEREIRA, S. C. *et al.* Physical-chemical-morphological characterization of the whole sugarcane lignocellulosic biomass used for 2G ethanol production by spectroscopy and microscopy techniques. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 87, p. 607–617, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.054>.

PÉREZ, J.A., GONZÁLEZ, A., OLIVA, M.J., BALLESTEROS, I., M.; P. Wastewater treatment for production of H<sub>2</sub>S-free biogas. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 83, n. May, p. 1163–1169, 2008.

PITARELO, A. N. A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. 2013. 162 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, [s. l.], 2013.

PRASAD, S. *et al.* Enhancement of bio-ethanol production potential of wheat straw by reducing furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF). **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 4, n. July, p. 50–56, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.09.007>.

PRATTO, B. **Hidrólise Enzimática Da Palha De Cana-De-Açúcar : Estudo Cinético E Modelagem Matemática Semi- Mecanística**. 2015. 130 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, [s. l.], 2015.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de Campinas, Campinas, [s. l.], 2010.

Etanol de segunda geração: potencial e oportunidades. **Raízen**, 2023. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/blog/etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em: 06 de junho de 2023.

REZENDE, C. A. *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 54, n. November, p. 1–18, 2011.

RIZZI; SILVA; MAIOR. Mamona como biocombustível. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, [s. l.], v. 1, p. 317–320, 2010.

ROCHA, G. J. M. *et al.* A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: **Proceedings of the V Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and Other Wood Components 5**, [s. l.], p. 113–115, 1997.

ROCHA, M. V. P. *et al.* Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 243, p. 234–243, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.099>.

ROCHA, M. S. R. dos S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; DA CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **Engevista**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 217–235, 2017.

RODRIGUES FILHO, S.; JULIANI, A. J. Sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, [s. l.], v. 27, n. 78, p. 195–212, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142013000200013&lng=pt&nrm=iso&tlang=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000200013&lng=pt&nrm=iso&tlang=en).

ROSA, M. de F. *et al.* Utilização da Casca de Coco como Substrato Agrícola. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, n. April, p. 1–24, 2002.

ROSO, V. R. *et al.* Consumo de combustível e emissões de poluentes em um motor Diesel convertido a etanol para geração térmica de energia elétrica. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 131, 2016. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/22359>.

RUIZ, H. A. *et al.* Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 21, p. 35–51, 2013.

RUIZ, H. A. *et al.* Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept: A review. **Bioresource Technology**, v. 342, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125961>.

RUIZ, H. A. *et al.* Advances in process design, techno-economic assessment and environmental aspects for hydrothermal pretreatment in the fractionation of biomass under biorefinery concept: A review. **Bioresource Technology**, v. 369, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128469>.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. *et al.* A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416317655>.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. *et al.* Acid pretreatment of corn stover for production of second generation ethanol. **Engevista**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 412–423, 2016.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. **Estudo integrado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. 2017. 143 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, [s. l.], 2017.

SANTOS-ROCHA, M. S. R. *et al.* Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração. **Scientia Plena**, [s. l.], v. 13, p. 1–13, 2017.

SANTOS, F. A. *et al.* Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014.

SANTOS, F. a *et al.* Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Química nova**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SANTUCCI, B. S. *et al.* Autohydrolysis of Hemicelluloses from Sugarcane Bagasse During Hydrothermal Pretreatment: a Kinetic Assessment. **Bioenergy Research**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1778–1787, 2015.

SARAWAN, C. *et al.* Optimized activated charcoal detoxification of acid-pretreated lignocellulosic substrate and assessment for bioethanol production. **Bioresource Technology**,

[s. l.], v. 286, n. April, p. 121403, 2019. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121403>.

SARROUH, B. F.; SILVÉRIO, S. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Residues : a Promising Technology for Ethanol Production. **XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, [s. l.], p. 1–4, 2008.

SASSNER, P. *et al.* Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated Salix for the production of bioethanol. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 137–145, 2008.

SCHULTZ, E. L. *et al.* Otimização de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentescíveis. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, [s. l.], p. 1–8, 2010.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess Biosyst Eng**, [s. l.], p. 33–43, 2011.

SILVA, G. M. da. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol 2G**. 2015. 1–74 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, [s. l.], 2015.

SILVA, T. A. L. **Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 70 f. - Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, [s. l.], 2017.

SILVA, B. *et al.* Bioprospecção de linhagens de trichoderma sp . na degradação de resíduos lignocelulósicos de sabugo de milho. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [s. l.], p. 252–258, 2015.

SILVA, G. M. *et al.* Ethanol production from sugarcane bagasse using SSF process and thermotolerant yeast. **Transactions of the ASABE**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 193–200, 2015.

SILVA, V. F. N. *et al.* Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 809–817, 2011.

SILVA, I. F. da. **Potencial do pseudocaule de bananeira (cultivar prata anã) para a produção de etanol de segunda geração**. 2016. 136 f. - Tese de doutorado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, [s. l.], 2016.

SILVA ET AL. Citric waste saccharification under different chemical treatments. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 387–395, 2015.

SINGH, A. *et al.* Biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technology and sustainability. **Energies**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 13062–13080, 2015.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **Introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica histórica e agronômica**. Aracaju: SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. v. 47

SLUITER, a. *et al.* NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, [s. l.], n. April 2008, p. 17, 2008. Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.

**SODRÉ. MORFOLOGIA DAS PALMEIRAS COMO MEIO DE IDENTIFICAÇÃO E USO PAISAGÍSTICO** José. 2005. [s. l.], 2005.

SOUZA, O. *et al.* Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 915–921, 2012. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662012000800015&lng=pt&tlang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662012000800015&lng=pt&tlang=pt).

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. **Bioresouce technology**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>.

TAHERZADEH, M. J. *et al.* Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 701–708, 2000.

THUMÉ, M. A. *et al.* Níveis críticos foliares de nutrientes de três cultivares de batata-doce, selecionados para a produção de etanol. **Revista Ceres**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 863–875, 2013.

TIAN, S. *et al.* Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 656–660, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.008>.

TSAI, W. T. *et al.* Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO<sub>2</sub>. **Bioresouce Technology**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 203–208, 2001.

VAITHANOMSAT, P. *et al.* The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. **Kasetsart Journal - Natural Science**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 159–164, 2011.

VIEIRA, R. C. *et al.* Pré-Tratamento De Bagaço E De Palha De Cana De Açúcar Visando a Deslignificação Para Produção De Etanol. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, [s. l.], p. 1–8, 2014. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0558-24959-175877.pdf>.

VILLARREAL, M. L. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; CANETTIERI, E. V.; IZARIO FILHO, H. J. AVALIAÇÃO DA DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE APARAS DE EUCALIPTO COM CARVÃO ATIVO. Villarreal., In: , 2004. **ICTR 2004 - CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM RESÍDUOS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL**. [S. l.: s. n.], 2004.

VITORINO, L. C.; VANIN, L. G. S.; BESSA, L. A.; BRAGHIROLI, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model for teaching toxicology to high school students. **Scientia Plena**. v. 17, p. 012702, 2021.

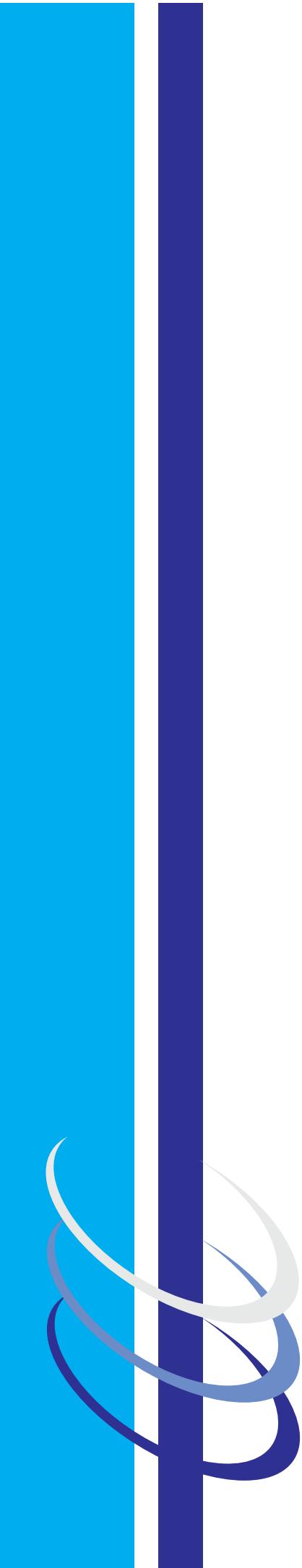
XIAO, L. P. *et al.* Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: Evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept. **Bioresouce Technology**, [s. l.], v. 135, p. 73–81, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.143>.

YAN, Y. H. *et al.* Xylo-sugars production by microwave-induced hydrothermal treatment of corncob: Trace sodium hydroxide addition for suppression of side effects. **Industrial Crops**

**and Products**, [s. l.], v. 101, p. 36–45, 2017. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.024>.

ZENG, X., XIAN, X., HU, L., TAO, S., ZHANG, X., LIU, Y., & LIN, X. (2021.) Efficient short-time hydrothermal depolymerization of sugarcane bagasse in one-pot for cellulosic ethanol production without solid-liquid separation, water washing, and detoxification. **Bioresource Technology**, 339 (2021), 125575. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125575

ZHUANG, X. *et al.* Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 578–582, 2009. Disponível em:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.019>.



**UFBA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA POLITÉCNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI**

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA  
CEP: 40.210-630  
Telefone: (71) 3283-9800  
E-mail: [pei@ufba.br](mailto:pei@ufba.br)  
Home page: <http://www.pei.ufba.br>