

GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO

**AVALIAÇÃO DO APROVEITAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Botucatu

2021

GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO

**AVALIAÇÃO DO APROVEITAMENTO DA CASCA DO COCO VERDE PARA A
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Energia na Agricultura

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Cesarino

Coorientador: Prof. Dr. Alcides Lopes Leão

Botucatu

2021

B869a	<p>Bronzato, Giovana Roberta Francisco Avaliação do aproveitamento da casca de coco verde para a produção de etanol 2G / Giovana Roberta Francisco Bronzato. – Botucatu, 2021 108 p. : tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu Orientadora: Ivana Cesarino Coorientador: Alcides Lopes Leão</p> <p>1. Coco. 2. Etanol. 3. Pré-tratamento. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO APROVEITAMENTO DA CASCA DE COCO VERDE PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

AUTORA: GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO

ORIENTADORA: IVANA CESARINO

COORIENTADOR: ALCIDES LOPES LEÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Ivana Cesarino

Prof.ª Dr.ª IVANA CESARINO (Participação Virtual)
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Ivana Cesarino

Prof.ª Dr.ª SARITA CÂNDIDA RABELO (Participação Virtual)
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Ivana Cesarino

Prof. Dr. SAULO PHILIPPE SEBASTIÃO GUERRA (Participação Virtual)
Engenharia Rural e Socioeconomia / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Ivana Cesarino

Pesquisador Dr. GEORGE JACKSON DE MORAES ROCHA (Participação Virtual)
Laboratório Nacional de Biorenováveis / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Ivana Cesarino

Prof. Dr. MICHEL BRIENZO (Participação Virtual)
Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia de Rio Claro - UNESP

Botucatu, 19 de maio de 2021.

*Dedico esse trabalho para as pessoas
que sempre me apoiaram e incentivaram:
aos meus pais, Marinêz e Renato.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, a Santa Rita de Cássia, a Santa Catarina de Alexandria, a São Tarcísio e aos meus Guias espirituais por toda a proteção e ajuda em minha vida.

Aos meus pais por todo o incentivo, apoio e ajuda, pelos conselhos e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por todo amor e carinho de vocês.

Aos meus familiares, especialmente a minha avó Zefa e as minhas tias, pelo carinho, conselhos, orações e por sempre torcerem por mim. E, a minha avó Wanda (*in memoriam*) deixo registrado todo o meu amor e gratidão.

A professora Dra. Ivana Cesarino e ao professor Dr. Alcides Leão pela oportunidade, pela orientação e pelo compartilhamento de conhecimento.

Aos colegas do laboratório RESIDUALL, pelos momentos e conhecimentos compartilhados. Aos alunos de IC e TCC pelo aprendizado e pelos ensinamentos que vocês me proporcionaram. E, ao Victor (Mirra), pela amizade e por toda a ajuda, física e emocional, durante o doutorado, e principalmente pela dedicação na realização deste estudo.

Ao Prof Dr. Rafael Simões pela ajuda com o planejamento experimental e com o software Matlab.

À banca de qualificação e de defesa, Profa. Dra. Sarita Rabelo, Prof Dr. Rafael Simões, Prof Dr. Saulo Guerra, Prof Dr. Michel Brienzo e Prof Dr. George Jackson da Rocha pelas sugestões de melhoria para este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia pela colaboração na realização desse trabalho. E, aos funcionários da Secretária de Pós Graduação, especialmente a Débora, pela paciência, explicações e ajuda com os documentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

E, a todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho, o meu muito obrigada!

“(...) Pode a dor uma noite durar; Mas um novo dia sempre vai raiar; E quando menos esperar, clareou (...)”

LEITE, R; MERITI, S. **Clareou**.

Disponível em: <https://www.lettras.mus.br/diogo-nogueira/clareou/>.

Acesso em: Julho de 2021

“(...) Sei que mudei; Sonhei, sorri, caí, Depois eu me levantei; Tudo que sofri; Me fez mais forte, eu sei (...)”,

DE SOUZA, A. C.; CALO, A.; CIVELLO, C. **Mais Forte**.

Disponível em: <https://www.vagalume.com.br/ana-carolina/mais-forte.html>.

Acesso em: Julho de 2021

RESUMO

O Brasil, anualmente, produz aproximadamente 2 bilhões de cocos verdes, sendo que 70% desses frutos são utilizados no comércio de água de coco. Com isso é gerada uma grande quantidade de resíduos. O seu descarte, mesmo que na forma correta em aterros, causa problemas devido ao grande espaço que esse resíduo ocupa e, além disso, sua decomposição é lenta, levando aproximadamente uma década. Esta biomassa residual tem cerca de 35% de celulose em sua composição, o que faz da casca do coco verde uma matéria-prima alternativa interessante para a produção de etanol de segunda geração (E2G). Neste trabalho, foram estudadas as etapas de pré-tratamento e de hidrólise enzimática do processo de produção de E2G a partir do resíduo do coco verde. Para isso, a casca do coco foi quimicamente tratada com clorito de sódio 10% em meio de ácido acético. Os parâmetros temperatura, tempo, quantidade de adição de reagentes e concentração do ácido acético, estudados no pré-tratamento, foram avaliados por métodos matemáticos de otimização de funções, resultando em uma diminuição de 68% de lignina, em comparação com a fibra *in natura*. Na etapa de hidrólise enzimática foram estudados a quantidade de enzima e o tempo de reação. Sendo assim, a casca do coco pré-tratada foi hidrolisada por 24 horas e foram utilizados 155 µL de enzima por grama de biomassa seca, resultando em 13,8 g/L de glicose, a qual foi fermentada para a produção do etanol. Com esses resultados, calculou-se que com apenas 1 coco verde é possível produzir 6 mL de etanol. Sendo assim, a casca do coco verde apresenta-se como uma matéria-prima alternativa para a produção de E2G com todas as vantagens ambientais e econômicas da utilização desse resíduo.

Palavras-chave: casca de coco; economia circular; etanol 2G; pré-tratamento químico; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Brazil produces approximately 2 billion green coconuts annually, 70% of which are used for coconut water production. This generates a large amount of waste in the form of coir husk. Its disposal, even if correctly performed in landfills, causes problems due to the large space that this waste occupies, and its slow decomposition may take about a decade. This residual biomass has about 35% of cellulose in its composition, a fact that renders the green coconut husk as an interesting and alternative raw material for second-generation ethanol (E2G) production. In this work, the pretreatment and enzymatic hydrolysis steps of the E2G production process from the green coconut residue were studied. Husk from coconut waste was chemically treated with 10% sodium chlorite in acetic acid medium. Parameters such as temperature, time, amount of reagent addition and acetic acid concentration, studied in the pretreatment were evaluated by mathematical methods of function optimization, this resulted in a 68% lignin decrease when compared to the fiber in natura. In the enzymatic hydrolysis step, the amount of enzyme and the reaction time were studied. The pre-treated coconut husk was hydrolyzed for 24 hours, and 155 μL of enzyme per gram of dry biomass were used, resulting in 13.8 g / L of glucose, later, fermented for ethanol production. From these results, calculations indicated that a single green coconut could produce 6 mL of ethanol. Thus, green coconut husk presents itself as an alternative interesting raw material for the production of E2G with all the environmental and economic advantages using this residue.

Keywords: coconut husk; circular economy; ethanol 2G; chemical pretreatment; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes do coco verde.....	24
Figura 2 – Imagens de Cocoiculturas em Alagoas / Brasil	25
Figura 3 – Cascas de cocos verdes descartadas na praia.....	26
Figura 4 – Representação do complexo lignina-hemiceluloses-celulose.....	29
Figura 5 – Atuação do coquetel enzimático na degradação da celulose.....	33
Figura 6 – Perfil cinético da hidrólise enzimática da celulose.....	34
Figura 7 – Fluxograma dos processos e análises utilizadas neste trabalho.....	44
Figura 8 – Fluxograma da análise de caracterização química: Cinzas, Extrativos, Lignina, Hemiceluloses e Celulose.....	46
Figura 9 – Processo de pré-tratamento da casca do coco verde.....	52
Figura 10 – Processo de hidrólise enzimática.....	56
Figura 11 – Fluxograma do processo de fermentação alcoólica.....	59
Figura 12 – Representação gráfica da granulometria da casca de coco verde moída.....	62
Figura 13 – Gráfico bidimensional da Equação E1* $\rightarrow x = \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}); y = \text{tempo (min)}$	71
Figura 14 – Gráfico bidimensional da Equação E2* $\rightarrow x = \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}); y = \text{acidez } (\%)$	72
Figura 15 – Gráfico bidimensional da Equação E3* $\rightarrow x = \text{Temperatura } (^{\circ}\text{C}); y = \text{reagente (vezes)}$	72
Figura 16 – Gráfico bidimensional da Equação E4* $\rightarrow x = \text{tempo (min)}; y = \text{acidez } (\%)$	73
Figura 17 – Gráfico bidimensional da Equação E5* $\rightarrow x = \text{tempo (min)}; y = \text{reagente (vezes)}$	73
Figura 18 – Gráfico bidimensional da Equação E6* $\rightarrow z = \text{Kappa}; x = \text{acidez } (\%); y = \text{reagente (vezes)}$	74
Figura 19 – Representação gráfica da comparação da granulometria.....	81
Figura 20 – Curva Padrão da Análise de Açúcares Redutores.....	82
Figura 21 – Comparação das análises dos volumes do complexo enzimático... ..	84
Figura 22 – Gráfico da análise de ART conforme o tempo de hidrólise enzimática.....	86
Figura 23 – Esquema do teor de conversão da biomassa.....	88

Figura 24 – Resultados na análise de cromatografia do líquido hidrolisado.....	90
Figura 25 – Fluxograma da produção de etanol 2G a partir do coco verde.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de alguns estudos com a casca do coco verde.....	39
Tabela 2 – Mesh e abertura das peneiras da série Tyler.....	47
Tabela 3 – Metodologias utilizadas nos pré-testes separadas em 4 grupos: A, B, C e D.....	49
Tabela 4 – Parâmetros variáveis e fixos utilizados no pré-tratamento da casca de coco verde.....	50
Tabela 5 – Soluções padrões de glicose.....	55
Tabela 6 – Parâmetros da hidrolise enzimática.....	56
Tabela 7 – Caracterização química da casca do coco verde.....	60
Tabela 8 – Comparação dos resultados de caracterização química com os encontrados na literatura.....	61
Tabela 9 – Granulometria da casca de coco verde moída.....	62
Tabela 10 – Resultados dos Pré-testes.....	64
Tabela 11 – Síntese dos resultados das análises de caracterização química e do número Kappa.....	66
Tabela 12 – Parâmetros utilizados na etapa de pré-tratamento.....	67
Tabela 13a – Resultados do Pré-tratamento para as Amostras de 1 a 27.....	68
Tabela 13b – Resultados do Pré-tratamento para as Amostras de 28 a 54.....	69
Tabela 13c – Resultados do Pré-tratamento para as Amostras de 55 a 81.....	70
Tabela 14 – Síntese das informações das Gráficos 12 a 17.....	74
Tabela 15 – Limites dos parâmetros.....	75
Tabela 16 – Resultados da Otimização.....	75
Tabela 17 – Parâmetros utilizados no processo de pré-tratamento da casca do coco verde.....	77
Tabela 18 – Rendimento em Massa do Pré-tratamento.....	77
Tabela 19 – Teor de Extrativos.....	77
Tabela 20 – Teor de Cinzas.....	78
Tabela 21 – Teor de Lignina.....	78
Tabela 22 – Teor de Hemiceluloses.....	78
Tabela 23 – Teor de Celulose.....	78

Tabela 24 – Número Kappa.....	79
Tabela 25 – Resumo das Análises de Caracterização Química e Número Kappa.....	79
Tabela 26 – Granulometria da casca do coco verde pré-tratada.....	80
Tabela 27 – Comparação das análises granulométricas.....	80
Tabela 28 – Dados da Curva Padrão.....	82
Tabela 29 – Teor de Conversão da Celulase conforme a quantidade de enzima.....	83
Tabela 30 – Análise de açúcares redutores totais.....	83
Tabela 31 – Teor de conversão da celulase conforme o tempo de hidrólise enzimática.....	85
Tabela 32 – Concentração de ART conforme o tempo de hidrólise enzimática..	85
Tabela 33 – Teor de conversão da hidrólise enzimática.....	87
Tabela 34– Comparação dos teores de celulose.....	88
Tabela 35 – Quantidade de açúcares redutores totais no líquido hidrolisado.....	89
Tabela 36 – Análise de macros e micronutrientes do hidrolisado enzimático.....	91
Tabela 37 – Teor de etanol.....	92
Tabela 38 – Comparação dos estudos citados no item 4 Resultados e Discussão.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Enzimas de atividades auxiliares
ART	Açúcares redutores totais
E2G	Etanol de segunda geração
FPU	Unidade de papel filtro
LPMOs	Mono-oxigenases líticas de polissacarídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Coqueiro.....	23
1.1.1	Casca do Coco Verde.....	25
1.2	Etanol de Segunda Geração.....	26
1.2.1	Pré-tratamento.....	28
1.2.2	Hidrólise Enzimática.....	30
1.3	Utilização da Casca do Coco Verde.....	34
1.3.1	Produção de Materiais.....	34
1.3.2	Produção de Etanol 2G.....	36
2	OBJETIVO	40
2.1	Objetivos Específicos.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Material.....	41
3.1.1	Reagentes.....	41
3.1.2	Equipamentos.....	42
3.2	Métodos.....	43
3.2.1	Coleta do Casca do Coco Verde.....	44
3.2.2	Processamento da Biomassa.....	45
3.2.3	Caracterização Química.....	45
3.2.4	Granulometria.....	46
3.2.5	Pré-testes.....	47
3.2.6	Pré-tratamentos.....	48
3.2.7	Determinação das Equações Objetivas.....	50
3.2.8	Otimização das Equações Objetivas.....	51
3.2.9	Realização do Pré-tratamento.....	51
3.2.10	Hidrólise Enzimática.....	53
3.2.10.1	Determinação do volume do complexo enzimático.....	53
3.2.10.2	Análise de Açúcares Redutores.....	54
3.2.10.3	Determinação do Tempo da Hidrolise Enzimática.....	55
3.2.10.4	Processo de Hidrolise Enzimática.....	55
3.2.11	Fermentação Alcoólica.....	58
3.2.11.1	Preparo do Inóculo.....	58

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Caracterização Química.....	60
4.2	Granulometria.....	62
4.3	Pré-testes.....	63
4.4	Pré-tratamentos.....	67
4.4.1	Determinação das Equações Objetivas.....	70
4.4.2	Otimização das Equações Objetivas.....	75
4.4.3	Resultados do Processo de Pré-tratamento.....	77
4.5	Hidrólise Enzimática.....	81
4.5.1	Análise de Açúcares Redutores.....	81
4.5.2	Determinação do Volume do Complexo Enzimático.....	82
4.5.3	Determinação do Tempo da Hidrólise Enzimática.....	84
4.5.4	Processo de Hidrólise Enzimática.....	87
4.5.5	Fermentação Alcoólica.....	91
5	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	98
	ANEXO A – Tabela 5.1 da Estatística Aplicada à Química	108

1 INTRODUÇÃO

Devido à elevada demanda energética, há necessidade de novas metodologias para a geração de combustíveis sustentáveis, como o etanol de segunda geração (E2G), que além de ser uma fonte renovável, não utiliza alimentos para a sua produção. Um exemplo de matéria-prima para o E2G é a casca do coco verde, que após o consumo da sua água, se torna um resíduo de difícil descarte, por causa do seu volume e do seu alto tempo de decomposição.

1.1 Coqueiro

O *Cocos nucifera* L., uma planta popularmente chamada de coqueiro, é uma monocotiledônea da família *Palmae*. O seu fruto, o coco ou coco-da-baía, é constituído por uma epiderme lisa, o epicarpo, seguida de uma parte fibrosa e espessa, o mesocarpo, após tem o endocarpo que é rígido e que envolve o albúmen sólido, conhecido como polpa. Essa camada branca e carnosa, no coco verde, reveste o albúmen líquido, popularmente chamada de água de coco (SIQUEIRA et al., 2002; FONTES e FERREIRA, 2006) . Na Figura 1 estão identificadas as partes do coco.

O coqueiro é uma cultura tropical cultivada em uma área de 12,3 milhões de hectares dividida em 90 países, com uma produção mundial de mais de 60 milhões de toneladas de coco. Segundo o IBGE, o Brasil, em 2018, teve uma safra de 1,5 bilhões de frutos em uma área de aproximadamente 200 mil hectares, resultando em uma produtividade de quase 8 mil frutos/ha. Esses valores correspondem a 3,8% da produção mundial, tornando o país o 5º principal produtor de coco (SIQUEIRA et al., 2002; BRAINER, 2018; FAOSTAL, 2019; IBGE, 2019).

A maioria dos países utilizam o coco como matéria-prima para a produção de óleo, entretanto, no Brasil a sua produção é destinada a outros itens do setor alimentício, tais como, coco seco *in natura*, coco ralado, leite de coco e, principalmente, a água de coco, um isotônico natural. A grande demanda por este último produto, fez com que a cocoicultura crescesse e se espalhasse em outras regiões do país, além do Nordeste (SIQUEIRA et al., 2002; FONTES e FERREIRA, 2006; BRAINER, 2018).

Figura 1 – Partes do coco verde



Há três variedades de coqueiros e suas características influenciam no produto final, sendo elas, gigante, anão e híbrido, este último sendo o cruzamento das duas primeiras. O coqueiro gigante pode chegar a mais de 20 m de altura, com um ciclo de vida de 70 anos. Em 1 ano cada planta pode chegar a produzir 80 frutos, de tamanhos médios a grandes. No Brasil, essa cultura é utilizada para a produção de alimentos como o coco ralado, o leite de coco, entre outros. Entretanto, o cultivo do coqueiro anão é destinado principalmente para o comércio da água de coco. Essa variedade pode atingir até 12 m de altura, e tem um ciclo economicamente produtivo em torno de 40 anos, com uma produtividade maior que a do coqueiro gigante. Uma planta de coqueiro anão pode produzir 200 frutos pequenos por ano. A variedade híbrida, mistura as características das duas anteriores e seus frutos podem ser comercializados para ambos os setores. Independentemente da variedade do coqueiro, para a produção do coco seco, a colheita deve ser feita com o fruto maduro, entre 11 e 12 meses de idade, contudo, para a produção da água de coco, que é extraída do coco verde, a sua colheita deve acontecer entre 5 a 7 meses após a abertura das flores. Nesse período as características sensoriais, como os teores de glicose e frutose são maiores (SIQUEIRA et al, 2002; FONTES e FERREIRA, 2006). Na Figura 2 são apresentadas duas plantações de coco, ambas localizadas no estado de Alagoas.

Figura 2 – Imagens de Cocoiculturas em Alagoas/Brasil

Praia do Patacho – Porto de Pedras / Alagoas

Praia do Gunga – Maceió / Alagoas

As partes não comestíveis do fruto maduro, como a casca, também têm importância comercial, pois podem ser utilizadas em outros setores, como o têxtil, na produção de vestuários e sacarias, no automobilístico, em enchimentos de banco, além da produção de artesanatos. A sobra do processamento desse material pode ser utilizada como adubo, para a própria cocoicultura. Ou seja, todas as partes do coco tem algum valor econômico (FERREIRA, 1997; SIQUEIRA et al., 2002; BRAINER, 2018). Por ser colhido antes do processo completo de maturação, a casca do coco verde não apresenta as mesmas características do fruto maduro, e por isso, não é aproveitada como um coproduto, tornando-se um resíduo (ROSA et al., 2001).

1.1.1 Casca do Coco Verde

O aumento populacional e a busca crescente por alimentos saudáveis elevaram o consumo da água do coco e, também, o impacto ambiental causado principalmente pela eliminação inadequada de cascas, que levam cerca de uma década para se decompor e representam aproximadamente 80% do peso do fruto (ROSA et al., 2001). Quando descartados, de forma correta em aterros sanitários, o seu volume ocupa um grande espaço o que diminui a vida útil dos aterros. Em muitas cidades são descartados pelas prefeituras em lixões, e contribuem para propagar doenças. Quando descartados pelos consumidores nas praias, como na Figura 3, além de ser um problema ambiental também é um problema econômico, pois será necessário a retirada desse resíduo poluente das areias, pois ao se decompor causa mal cheiro e se torna um criador de insetos (ROSA et al., 2001; SILVA, 2014).

Figura 3 – Cascas de cocos verdes descartadas na praia



Por causa desses problemas é necessário encontrar novas formas de descartar, ou de utilizar, essa biomassa residual. A melhor maneira para isso é usando esse material fibroso como matéria-prima para a geração de um produto com valor econômico.

Por ser uma fibra vegetal, a casca do coco verde pode ser utilizada para a produção de painéis (MATTOS et al., 2011) e por sua capacidade em reter água e sua razão C/N, esse material pode ser utilizada como substrato agrícola (ROSA et al., 2001; CARRIJO et al., 2006; SILVA, 2014).

Outras características químicas importantes dessa fibra são os teores de celulose (25 a 40%), de lignina (26 a 44%) e de hemiceluloses (12 a 30%) (VERDE et al., 2009; VAITHANOMSAT et al., 2011; GONÇALVES et al., 2014; CABRAL, et. al., 2017). Portanto, a casca do coco verde foi alvo desse estudo pelos motivos citados anteriormente e, também, visando a busca por novas tecnologias, ou de novas matérias-primas, para a produção de bioenergia, como o E2G, um combustível renovável produzido pelo processo de fermentação alcoólica de açúcares fermentescíveis proveniente de biomassas lignocelulósicas.

1.2 Etanol: Primeira e Segunda Geração

O mundo tem a necessidade de um aumento na produção de energia, essencialmente a renovável. Um tipo de biocombustível é o etanol, líquido produzido na conversão de açúcares fermentescíveis, hexoses e pentoses, provenientes de vegetais, pelo processo bioquímico da fermentação alcoólica. Porém, há a preocupação em torno de impactos sociais da produção em larga escala, por causa da competição pelo uso da terra para produção de combustível ou de alimentos (NYKO et al., 2010; PACHECO, 2011).

Entretanto, dependendo da matéria-prima sacarídea, amilácea ou lignocelulósica, há diferenças no processo de geração de açúcares fermentescíveis. Para a cana de açúcar, biomassa sacarídea, é necessário apenas um processo de moagem para a produção do açúcar. Já para o milho, uma amilácea, é preciso fazer dois processos consecutivos, a sacarificação e a hidrólise enzimática, por enzimas amilolíticas, para a produção da glicose (MUSSATTO et al., 2010).

Para as matérias primas lignocelulósicas usualmente é necessário, antes do processo de fermentação, a realização de etapas para transformar os polissacarídeos, celulose e hemiceluloses, em açúcares fermentescíveis, como a glicose, xilose, arabinose, entre outros. (MUSSATTO et al., 2010; OLIVEIRA, 2012):

- 1- Processo mecânico, como a moagem, com a intenção de diminuir o tamanho das partículas, deixando os componentes lignocelulósicos mais acessíveis;
- 2- Pré-tratamento, processo que pode ser físico, químico, biológico, ou uma combinação entre eles, com o propósito de romper a fibra, quebrar as ligações do complexo lignina-hemiceluloses-celulose, e isolar, ou solubilizar a celulose;
- 3- Hidrólise enzimática da celulose e/ou das hemiceluloses, processo que é realizado por um complexo enzimático, as celulasas e hemicelulasas, que hidrolisam os polissacarídeos em açúcares simples.

Os processos que utilizam as biomassas sacarídeas e amiláceas são chamados de primeira geração e suas tecnologias foram estudadas por muitos anos e hoje estão bem estruturadas. O etanol proveniente das biomassas lignocelulósicas é de segunda geração, e também pode ser chamado de etanol lignocelulósico (MUSSATTO et al., 2010; NYKO et al., 2010; PACHECO, 2011; OLIVEIRA, 2012; LENNARTSSON et al., 2014).

Dos três tipos, o E2G possui o método de produção mais complexo e, atualmente, o mais caro. Entretanto, é a única metodologia que utiliza resíduos agroflorestais e industriais ao invés de alimentos, mitigando assim problemas sociais, ambientais e econômicos (ALVIRA et al., 2010; NYKO et al. 2010; PACHECO, 2011; VIIKARI; VEHMAANPERÄ; KOIVULA, 2012). Em 2030, é estimado que a produção brasileira da biomassa vegetal residual agropecuária possa chegar a 1 gigatoneladas, mas normalmente são subutilizadas, deixados no campo para decomposição, o que pode acarretar em pragas ou prejuízos ao solo, ou seja, a energia química presente nessa promissora matéria-prima não é aproveitada. (MORAES et al., 2017).

1.2.1 Pré-tratamento

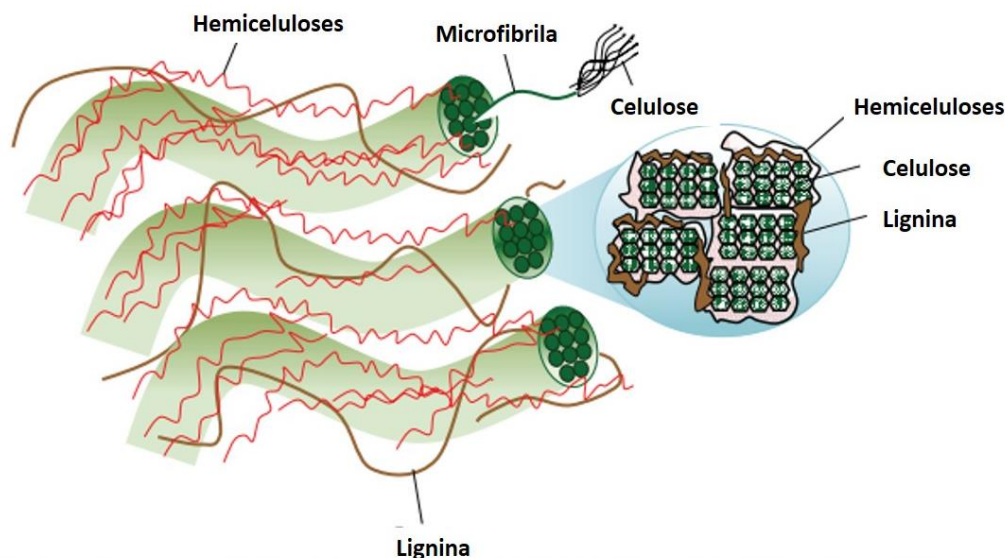
A biomassa lignocelulósica, um material biodegradável e renovável, é o recurso orgânico mais abundante no planeta (SILVA et al., 2009; ABRIL e NAVARRO, 2012). A energia acumulada nos componentes químicos das plantas, como a glicose, é proveniente da energia solar convertida pelo processo de fotossíntese realizado pelas células vegetais (ABRIL e NAVARRO, 2012). Quimicamente, a biomassa vegetal é constituída por macro e micromoléculas, sendo esta última composta por materiais orgânicos, como ceras, óleos, pigmentos, chamados de extrativos e as substâncias inorgânicas, as cinzas (FENGEL e WEGENER, 1989; KLOCK et al., 2005).

As macromoléculas são constituídas por três componentes, a lignina, as hemiceluloses e a celulose. Essas substâncias são interligadas por meio de ligações covalentes e de hidrogênio, que formam o complexo lignina-hemiceluloses-celulose. A Figura 4 mostra uma representação esquemática dos componentes da parede celular vegetal (FENGEL e WEGENER, 1989; KLOCK et al., 2005; SILVA et al., 2009; PACHECO, 2011; ABRIL e NAVARRO, 2012; LEE et al., 2014).

Em todas as biomassas lignocelulósicas, a constituição da celulose é a mesma: cadeias poliméricas, de diferentes tamanhos, formadas por monômeros de glicose unidos entre si por ligações β -1,4-glicosídicas. As cadeias poliméricas fazem ligações de hidrogênio inter e intramoleculares e por isso, a celulose tem regiões cristalinas, que são altamente ordenadas, alternadas com regiões menos ordenadas, chamadas de amorfas (FENGEL e WEGENER, 1989; KLOCK et al., 2005; SILVA et al., 2009).

Em comparação com a celulose, as hemiceluloses são mais complexas, pois sua estrutura é formada por vários polissacarídeos de baixo peso molecular como a xilose, arabinose, manose, entre outros. Essa poliose é um heteropolissacarídeo, e sua composição e a quantidade de cada açúcar varia conforme as características da biomassa vegetal. Esses carboidratos tem características amorfas, não apresentando regiões cristalinas, por isso, reagem mais facilmente que a celulose com substâncias químicas e são hidrofílicas (KLOCK et al., 2005).

Figura 4 – Representação do complexo lignina-hemiceluloses-celulose



As fibrilas de celulose são envolvidas pelas hemiceluloses e os espaços entre as duas polioses são preenchidas pela lignina

Fonte: Adaptado de LEE et al., 2014.

A lignina é uma macromolécula aromática e amorfa, que não tem unidades repetidas definidas, e é formado por três diferentes fenilpropanos, os álcoois *p*-cumarílico, coferílico e sinapílico. E como as hemiceluloses, a composição dessas moléculas variam conforme a origem e as espécie do vegetal. Essa macromolécula funciona, nas plantas, como um elemento estrutural, conferindo uma resistência a ataques mecânicos e biológicos, de fungos e bactérias (FENGEL e WEGENER, 1989; KLOCK et al., 2005; SILVA et al., 2009; SANTOS et al. 2012; LEE et al., 2014).

Para a produção do E2G é necessário que as enzimas hidrolisem a celulose em açúcar fermentescível, porém as barreiras causadas pela associação dos componentes lignocelulósicos, afetam a atuação da celulase (SILVA et al., 2009; ALVIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2012; LEE et al., 2014). Por esse motivo, é preciso uma metodologia para romper as ligações químicas entre o complexo lignina-hemiceluloses-celulose separando a celulose dos outros componentes. O procedimento ideal seria o que conseguisse remover totalmente a lignina e as hemiceluloses sem degradar a celulose, porém, por causa das ligações químicas, não é possível nem a separação total dos componentes e nem a recuperação de toda a celulose. (KLOCK et al., 2005; LEE et al., 2014).

Como cada material lignocelulósico tem características físico-químicas distintas não é possível ter uma metodologia de pré-tratamento geral que possa ser utilizada para qualquer biomassa, ou seja, não é possível utilizar as mesmas condições

operacionais para todas as biomassas (ALVIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2012; LEE et al., 2014). Por isso, há vários tipos de pré-tratamento, sendo alguns exemplos (SANTOS et al., 2012):

- Físico: moagem, trituração;
- Químico: hidrólise ácida e alcalina, oxidação, halogenação, entre outros;
- Biológico: degradação por fungos lignocelulósicos;
- Combinado: combinação entre os pré-tratamentos anteriores, como a explosão a vapor.

Cada pré-tratamento tem um efeito específico nos componentes do complexo lignocelulósico e, portanto, é necessário utilizar processos baseados nas propriedades químicas e físicas da biomassa. Os resultados tem um alto impacto nas etapas seguintes, pois pode haver a formação de substâncias inibidoras para a hidrólise enzimática e para a fermentação alcoólica (ALVIRA et al., 2010).

Para ser considerado eficiente, o pré-tratamento precisa ser economicamente viável, não formando substâncias inibidoras e principalmente, separando a celulose dos outros componentes lignocelulósicos, reduzindo ao máximo as partes cristalinas e aumentando as amorfas, com uma mínima degradação desse biopolímero, para que a enzima consiga acessá-lo e convertê-lo em açúcares fermentescíveis, como a glicose e a xilose (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; ABRIL e NAVARRO, 2012).

1.2.2 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é um processo bioquímico, realizado por diferentes enzimas que convertem o material lignocelulósico pré-tratado em açúcares fermentescíveis. Essas proteínas são altamente específicas e para atuarem no seu desempenho máximo necessitam de parâmetros bem controlados, sendo o pH e a temperatura os principais fatores (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

Para que esse processo seja eficiente é necessário que as várias enzimas, que formam um coquetel, atuem de forma sinérgica, ou seja, o efeito combinado das ações delas é maior que o efeito de cada uma agindo separadamente, e isso acontece por causa da complexidade da parede celular vegetal (ABRIL; NAVARRO, 2012; VIIKARI; VEHMAANPERÄ; KOIVULA, 2012; CHYLENSKI et al., 2017). Atualmente, um dos melhores coquetel enzimático comercial é composto por pelo menos 17 enzimas (PEREIRA, 2019).

O coquetel de enzimas, geralmente, é composto por enzimas essenciais, como as celulasas, por proteínas acessórias e por enzimas de atividades auxiliares (AA), como as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs) (HORN et al., 2012; LEVASSEUR et al., 2013; FRANDBSEN et al., 2016; CHYLENSKI et al., 2017; FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017).

As enzimas acessórias, não atuam de forma direta na hidrólise da celulose, mas auxiliam na acessibilidade do substrato para as celulasas, facilitando a formação do complexo enzima/substrato, que acontece por interações hidrofóbicas e eletrostáticas repulsivas e atrativas. Um exemplo de enzima acessória é o módulo de ligação ao carboidrato (CBM) que permite a adsorção da enzima sobre o substrato. Outro exemplo, é a enzima expansiva que auxilia entumecendo as cavidades da parede celular vegetal, interferindo na estrutura das ligações químicas da celulose. Também, é possível encontrar nos coquetéis glicosiltransferase, polissacarídeos liases, carboidrato esterase, entre outras (SHALLOM; SHOHAM, 2003; ARANTES; SADDLER, 2010; HORN et al., 2012).

No material pré-tratado, além da celulose, pode ter hemiceluloses e lignina residual. Para um bom rendimento da produção de etanol de segunda geração é necessário que esse material também seja hidrolisado, pois as hemiceluloses são formadas por monômeros de diferentes açúcares fermentescíveis e a lignina atrapalha o processo de conversão da celulose. Além disso, tem o fenômeno da adsorção improdutiva, no qual as enzimas essenciais se ligam de forma irreversível a lignina. Para a despolimerização das hemiceluloses, por causa da sua composição, são necessárias diferentes enzimas. Endoxilanasas, β -xilosidades, arabinofuranosidasas, β -glucoromidasas e esterases são alguns exemplos da possível variedades de enzimas que auxiliam nessa hidrólise (SHALLOM; SHOHAM, 2003; RAHIKAINEN et al., 2011; LEVASSEUR et al., 2013).

A celulase é o principal componente do processo de hidrólise enzimática. Ela é um complexo constituído por três enzimas, a endoglucanase, a celobiohidrolase e a β -glicosidase, que atuam de forma conjunta para hidrolisar as ligações glicosídicas da celulose (ABRIL e NAVARRO, 2012; VIIKARI; VEHEMAANPERÄ; KOIVULA, 2012). O mecanismo de atuação das celulasas, de uma forma sucinta, pode ser explicado da seguinte maneira: A endoglucanase é responsável por hidrolisar as ligações glicosídicas internas, de forma aleatória, criando novos terminais nas cadeias de celulose amorfa e nas celulasas solúveis, que são as que foram modificadas

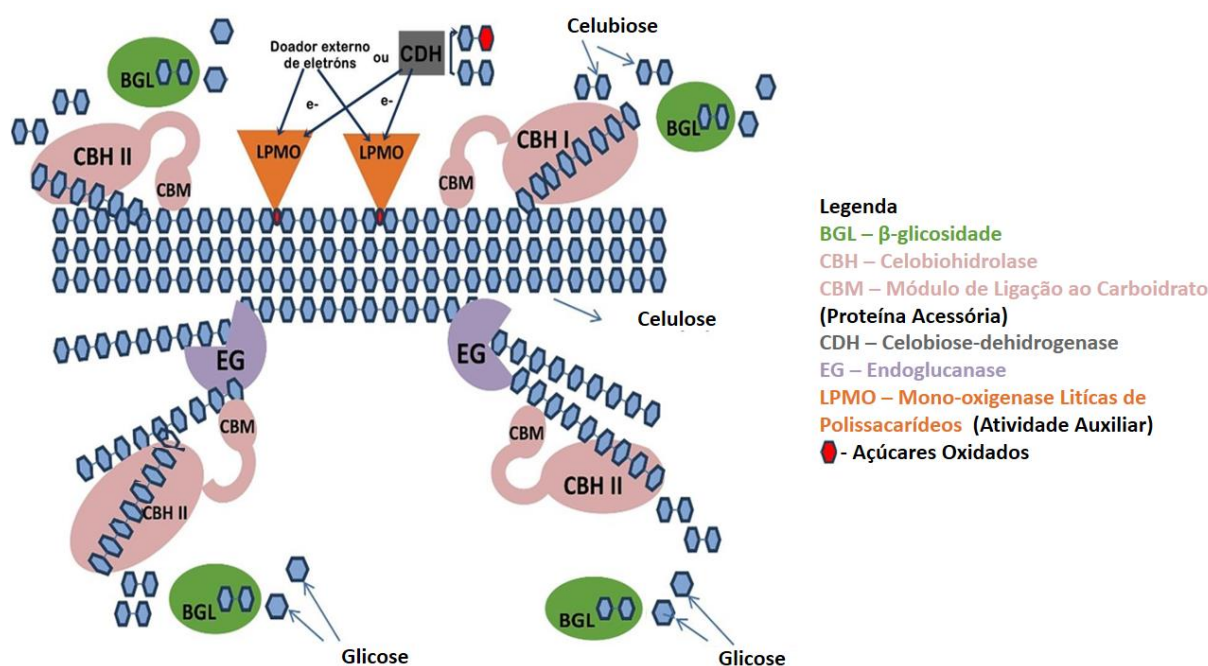
quimicamente. A celobiohidrolase atua nas terminações livres da cadeia polimérica, produzindo unidade de celobiose, que são unidades de dímeros de glicose. Essas duas enzimas conseguem modificar as características da superfície da celulose. A β -glicosidase, na fase líquida do meio finaliza a hidrólise por meio da clivagem de celobiose em monômeros de glicose. Toda essa síntese é induzida pela celulose no meio e limitada pela presença de celobiose e de glicose, pois o acúmulo de açúcares inibe a atuação da celulase, diminuindo os rendimentos e a eficiência do processo (SUN; CHENG, 2002; OGEDA; PETRI, 2010; ABRIL; NAVARRO, 2012; VIKARI; VEHMAANPERÄ; KOIVULA, 2012; ZANCHETTA, 2013). A atividade da celulase pode ser medida em Unidade de Papel de Filtro (FPU), unidade que representa, de uma forma simplificada, a quantidade de celulose presente no papel de filtro que a enzima consegue converter em glicose em um período determinado de tempo (ADNEY; BAKER, 2008).

As enzimas de atividades auxiliares (AA) atuam na hidrólise da celulose auxiliando as enzimas essenciais, como a celulase, porém necessitam de algumas condições específicas. As LPMOs conseguem oxidar as ligações da cadeia de celulose em determinados carbonos (C1, C4 e C6) formando novos terminais, que as celobiohidrolases conseguem hidrolisar. Entretanto, essas AAs são dependentes da presença no meio reacional de íons cobre, de oxigênio molecular e de um doador externo de elétrons, que pode ser a lignina, pois há liberação de elétrons em sua degradação (HARRIS et al., 2010; VAAJE-KOLSTAD et al., 2010; QUINLAN et al., 2011; HORN et al., 2012; LEVASSEUR et al., 2013; BISSARO et al., 2016; FRANDSEN et al., 2016; CHYLENSKI et al., 2017).

A Figura 5 é uma representação gráfica da atuação de um coquetel enzimático na hidrólise da celulose.

Portanto, para que o rendimento nesta etapa seja eficiente é necessário o uso de um coquetel com uma ampla variedades de enzimas que maximize a conversão do substrato lignocelulósico em açúcares fermentescíveis, preferencialmente com um baixo custo operacional e de produção (ZHOU et al., 2009), visto que, os valores de eficácia e rendimento desta etapa tem um alto impacto no custo total da produção de etanol lignocelulósico (ZHOU et al., 2009).

Figura 5 – Atuação do coquetel enzimático na hidrólise da celulose

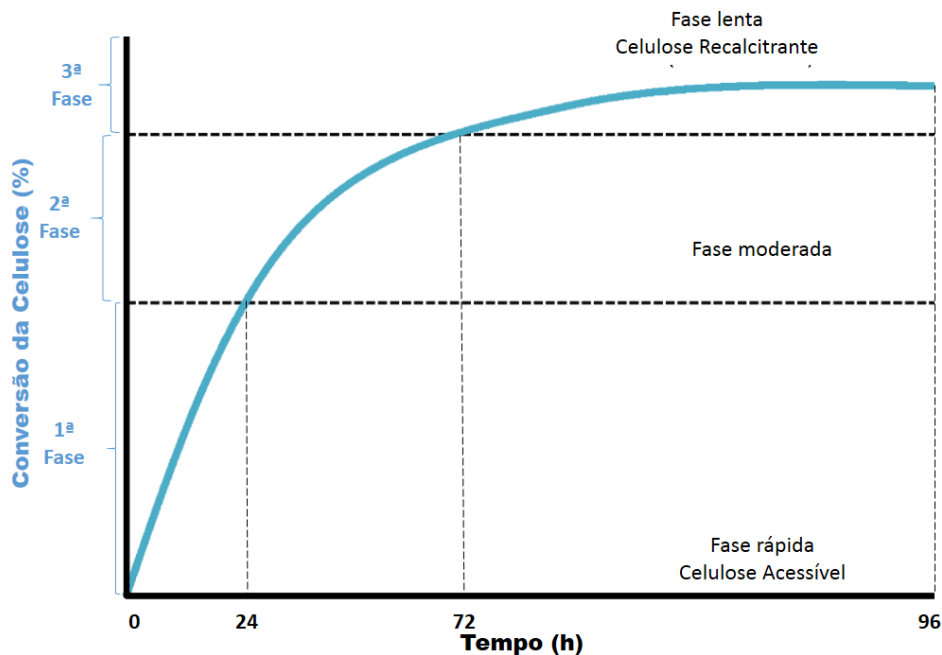


Fonte: Adaptado de (HORN et al., 2012; SINGH et al., 2017)

Outro fator determinante no rendimento desta etapa é a concentração de enzimas. Porém, a relação da quantidade de enzimas e a eficiência da hidrólise não é linear, ou seja, uma grande concentração do coquetel no meio reacional não resulta em altos conversões de glicose e xilose. Ao contrário, elevadas concentrações de enzimas podem causar competições pelo substrato, adsorção improdutiva e aumento de produtos com ação inibitória, como a celubiose (XIAO et al., 2004).

O perfil cinético da hidrólise enzimática, apresentado na Figura 6, corresponde a taxa de conversão do material lignocelulósico em monômeros de açúcares pelo tempo de reação, o qual é caracterizado por uma curva logarítmica com três fases distintas. Na primeira fase ocorre a adsorção das enzimas na superfície da celulose e se inicia o processo de hidrólise. Nesta etapa há uma alta taxa de conversão em um período pequeno de reação. Após aproximadamente 24 horas começa a segunda fase, na qual a taxa da hidrólise diminui para um nível moderado. Com 72 horas de processo, aproximadamente, 70% do substrato inicial foi hidrolisado e se inicia a terceira fase. Nesta última etapa, a taxa de conversão diminui constantemente até o finalizar o processo e sobrar no meio reacional apenas produtos que as enzimas não conseguem hidrolisar, como a celulose recalcitrante. O processo de hidrólise enzimática de uma biomassa lignocelulósica tem uma duração aproximada de 96 horas de reação (ARANTES; SADDLER, 2011).

Figura 6 – Perfil cinético da hidrólise enzimática da celulose



Fonte: Adaptado de (ARANTES; SADDLER, 2011)

1.3 Utilização da Casca do Coco Verde

Nas últimas duas décadas, pesquisadores têm estudado tecnologias e metodologias que utilizam a casca do coco verde como matéria-prima para a produção de um bem de valor, com a intenção de diminuir os problemas ambientais e econômicos causados pelo descarte correto desse resíduo nos aterros sanitários, ou de forma incorreta, nas areias das praias após o consumo da água de coco.

1.3.1 Produção de Materiais

Por meio de procedimentos físicos, a casca do coco verde pode ser separada em dois materiais de propriedades distintas, a fibra e o pó do coco. Com esses materiais, 30% de fibra e 70% de pó, é possível produzir painéis, sem a utilização de aglutinantes pelo processo de prensagem a 140 °C. Esse procedimento ocorre devido a propriedade plastificante da lignina (MATTOS et al., 2011). Entretanto, também é possível utilizar a casca do coco sem pré-tratamento para a produção de painéis em

conjunto com resíduos de pinus, 25% de casca de coco verde e 75% de madeira (FIORELLI et al., 2015).

Corradini *et al.* (2009) analisaram a casca do fruto de várias espécies de coqueiro com diferentes tempos de maturação e concluíram que todas as amostras tinham propriedades térmicas e mecânicas semelhantes. Outra observação foi que esse material tinha potencial para ser utilizado como reforço em matrizes poliméricas. Em outro estudo, que está sendo realizado no Laboratório Residual da FCA/UNESP, por meio de um processo de mistura a alta temperatura, seguida de prensagem, foi produzido um biocompósito com 60% de casca do coco moída e 40% de polímero ABS (Acrilonitrila Butadieno Estireno) e, este novo material, não apresentou alterações de propriedades em estudos sobre biodegradabilidade.

A casca do coco verde, suas fibras e seu pó, podem ser utilizados como substrato agrícola. Porém, esse material pode apresentar altos níveis de tanino, cloreto de potássio e de sódio, substâncias fitotóxicas. Por isso, antes da sua aplicação é necessário a lavagem com água corrente da biomassa residual. Esse substrato, nem sempre tem todos os nutrientes necessários para a planta que será cultivada, por isso, a sua quantidade e a adição de outros componentes, como adubo, dependem da necessidade do cultivo (ROSA et al., 2001; CARRIJO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2016).

O mesocarpo e o epicarpo do coco verde, após serem triturados e lavados para a remoção dos sólidos solúveis totais, podem ser utilizados como substrato para a produção da enzima celulase (CMCase), uma endoglucanase produzida pelos fungos da espécie *Aspergillus* (COELHO et al., 2018).

Cardoso e Gonçalves (2016) pesquisaram a produção da polpa celulósica pelo processo Kraft utilizando a casca do coco verde como matéria-prima. Porém, essa metodologia não se mostrou viável. Machado *et al.* (2014) conseguiram produzir nanocristais de celulose com alto grau de cristalinidade por meio de hidrólise ácida e Mendes (2014), utilizando um pré-tratamento com NaOH 5%, seguido de uma etapa de branqueamento e, de uma hidrólise com H₂SO₄ 64%, isolou nanocristais com uma coloração escura, por causa do alto teor de lignina residual.

No setor energético, a casca do coco verde pode ser utilizado para a produção de briquetes, com um poder calorífico superior de 18,24 MJ/Kg (PADILLA et al., 2016). Esse material, também tem potencial para a obtenção de carvão, bio-óleo e biogás por meio do processo de pirólise (PAZ et al., 2017).

1.3.2 Produção de Etanol 2G

Na última década, a casca do coco verde vem sendo estudada como matéria-prima para a produção de E2G (VAITHANOMSAT et al., 2011; SILVA, 2014; GONÇALVES et al., 2014, 2018; FATMAWATI e AGUSTRIYANTO, 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016; SOARES et al., 2016, 2017; CABRAL et al., 2017; EBRAHIMI et al., 2017; BOLIVAR-TELLERIA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018) e, nos próximas linhas e na Tabela 1 estão descritos os resultados de alguns desses trabalhos.

O pré-tratamento alcalino é o processo mais estudado, e o que apresenta melhores resultados, para a deslignificação da casca do coco verde (VAITHANOMSAT et al., 2011; SOARES et al., 2016, 2017; CABRAL et al., 2017; BOLIVAR-TELLERIA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018). A segunda metodologia mais pesquisada, é a hidrólise ácida, com ácido diluído, normalmente utilizada para comparação dos resultados com outros métodos. (CABRAL et al., 2017; BOLIVAR-TELLERIA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018). Outras possíveis metodologias são os pré-tratamentos combinados, ou realizados em mais de uma etapa, com a intenção de removerem diferentes componentes da biomassa em cada etapa (GONÇALVES et al., 2014, 2018; SOARES et al., 2017; BOLIVAR-TELLERIA et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018).

Procedimentos que utilizam condições severas de processos, como concentração de NaOH, temperatura e tempo de reação, produziram substâncias inibidoras que afetam o rendimento da hidrólise enzimática e da fermentação alcoólica. Por esse motivo, é indicado uma lavagem das fibras após o pré-tratamento, para a retirada dessas substâncias inibidoras. Porém, esse procedimento, também elimina uma quantidade de açúcares (FATMAWATI e AGUSTRIYANTO, 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016; SOARES et al., 2017; BOLIVAR-TELLERIA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018).

Para a hidrólise enzimática, os estudos utilizam os coquetéis enzimáticos comerciais e para o processo de fermentação alcoólica a maioria utiliza a levedura mais usual em produção de etanol, a *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, há pesquisas que utilizam outros microrganismos como *Pichia stipitis* e *Zymomonas mobilis* (VAITHANOMSAT et al., 2011; GONÇALVES et al., 2014; FATMAWATI e

AGUSTRIYANTO, 2015; ALBUQUERQUE et al., 2016; SOARES et al., 2016; BOLIVAR-TELLERIA et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2018).

Cabral *et al.* (2017) estudaram a atuação dos pré-tratamentos alcalino e ácido nos componentes da biomassa. O procedimento com NaOH apresentou uma perda de massa de 75%, solubilizando a lignina em aproximadamente 80%, entretanto resultou em uma maior perda de celulose, em comparação com os resultados do H₂SO₄.

Vaithanomsat *et al.* (2011) utilizaram para o pré-tratamento altas concentrações de NaOH (20, 25 e 30%) sobre pressão a 100 °C com 2 a 3 h de tempo de reação. O melhor pré-tratamento foi o de NaOH 25% por 3h, pois, estatisticamente, apresentou os mesmos rendimentos que outros tratamentos severos e conseguiu uma alta separação das fibras lignocelulósicas. As etapas de hidrólise enzimática e de fermentação alcoólica foram estudadas de duas formas: simultânea e separada. Porém, não houve diferenças significantes nos resultados, ambos apresentaram aproximadamente 20% de rendimento de etanol.

Gonçalves *et al.* (2014) pré-trataram a casca do coco verde com 7,35% de H₂O₂ em meio alcalino, seguido de uma deslignificação com 4% de NaOH. Esse processo sequencial resultou em uma degradação de 71% da lignina. A hidrólise enzimática produziu 0,56 g de glicose/g de biomassa, valor que equivale a um rendimento de 70 %.

Teixeira *et al.* (2018) analisaram a eficiência do pré-tratamento por explosão a vapor em três diferentes temperaturas (160, 205 e 215 °C) e em três diferentes tempos de reação (2, 6 e 10 minutos). Essa metodologia tem o objetivo de solubilizar as hemiceluloses, por isso a redução da lignina foi de apenas 14%, entretanto, nas temperaturas de 205 e 215 °C, independentemente do tempo de reação, aproximadamente 90% das hemiceluloses foram solubilizadas.

Soares *et al.* (2016) estudaram o pré-tratamento alcalino com NaOH em baixas concentrações, de 1 a 4%, resultando em 3,7% (v/v) de etanol. NOGUEIRA *et al.* (2019) estudaram o pré-tratamento hidrotérmico pressurizado e concluíram que mesmo aumentando a porcentagem de lignina na biomassa pré-tratada, essa metodologia favorece a produção de açúcares fermentescíveis.

Gonçalves *et al.* (2018) pesquisaram duas metodologias para o pré-tratamento da biomassa com NaClO₂-C₂H₄O₂. Antes dos procedimentos, a biomassa foi lavada cinco vezes com água a 70 °C, seca por 24 h e moída. A reação química ocorreu por 4 h em um banho a 75 °C. Após a filtração, a parte sólida foi lavada com acetona 20%.

No segundo procedimento, após essa metodologia a biomassa pré-tratada sofreu uma auto-hidrólise. Em um reator, a biomassa foi misturada com água (10:1 líquido/sólido) e o mesmo foi colocado em um banho de óleo a 200 °C por 50 minutos. No procedimento que tratou a casca do coco verde apenas com $\text{NaClO}_2\text{-C}_4\text{H}_4\text{O}_2$, houve uma redução do teor da lignina em aproximadamente 88%. E o procedimento com a auto-hidrólise, conseguiu solubilizar aproximadamente 82% das hemiceluloses. Em ambos os casos não houve alteração significativa nos teores de celulose.

PUTRINO *et al.* (2020) pré-trataram a casca do coco verde com CO_2 supercrítico. Foram estudadas metodologias com e sem modificadores de polaridade. As análises mostraram que aconteceu alterações na estrutura da biomassa, porém, os valores para a deslignificação não foram significativos. Os estudos da hidrólise enzimática desses materiais pré-tratados, também não indicaram aumento significativo na conversão de açúcares.

Tabela 1 – Resultados de alguns estudos com a casca do coco verde.

Estudos	Localidade	Pré-tratamento		Hidrólise Enzimática		Fermentação		
		Processo	Resultado	Enzimas	Resultado	Processo	Leveduras	Resultados
Vaithanomsat (2011)	-	Alcalino - NaOH 25%	Diminuição no teor de lignina em 1,26%	Celluclast 1,5 - 15FPU Novozymes 188 - 15IU/g de substrato	22,8g de glicose/L Conversão de 45,6%	SHF	<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	2,28% m/v de etanol Rendimento de 21,2%
Gonçalves (2014)	Brasil/Nordeste	Alcalino - H ₂ O ₂ 7,35% - seguido de uma deslignificação com NaOH 4%	Degradação da lignina em 70,64%	Cellic Ctec 2 - 30 FPU Htec 2 - 130 IU/mL	0,56g de glicose/L Rendimento 70,2%	-	-	-
Soares (2016)	-	Alcalino - NaOH 1%	30,2g de açúcar/100g de biomassa	Alterna Fuel CMAX - 15 FPU	51,6g de açúcar/100g de biomassa	SHF	<i>Sacchromyces cerevisiae</i>	3,73% v/v de etanol
Cabral (2017)	Brasil/Alagoas	Alcalino - NaOH 5%	75% de perda de massa 80% de degradação da lignina	-	-	-	-	-
Gonçalves (2018)	Brasil/Nordeste	NaClO ₂ - 0,93% - C ₂ H ₄ O ₂ - 0,31%	Diminuição no teor de lignina em 22,7% Diminuição do teor de hemiceluloses em 1,79%	Cellic Ctec 2 - 10 FPU e 30CBU Htec 2 - 40 IU/mL	Rendimento 90,03%	-	-	-
		NaClO ₂ - 0,93% - C ₂ H ₄ O ₂ - 0,31% seguido de autohidrolise	Diminuição no teor de lignina em 20,77% Diminuição do teor de hemiceluloses em 23,83%		Rendimento 90,36%	-	-	-
Teixeira (2018)	Brasil	Explosão a vapor 215°C por 2 min	Solubilização das hemiceluloses 87,77%	-	-	-	-	-
Nogueira (2019)	Brasil/Natal	Hidrotérmico pressurizado 150 bar	Diminuição no teor de hemiceluloses em 5% Aumento do teor de lignina em 12%	Coquetel enzimático - 20FPU, 20CBU e 10FXU	Aumento de 63,5% na produção de glicose	-	-	-
Putrino (2020)	Brasil/Fortaleza	CO ₂ Supercritico	Degradação da lignina em 2,7%	Coquetel enzimático - 30g de enzima/100g de celulose	5,6g de açúcar /100g de biomassa	-	-	-

– Etapa não realizada | *FPU – Unidades de Papel Filtro / CBU – Unidades de Celobiose / FXU – Unidades de Xilanase / IU – Unidade Internacional | ** SHF – Hidrólise e Fermentação Separadas

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o resíduo do coco verde na produção de etanol de segunda geração. Para isso, neste estudo, focou-se nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática do processo, visando a determinação dos melhores parâmetros para a otimização da produção de etanol.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Caracterização química da casca do coco verde;
- b) Estudo de uma metodologia de pré-tratamento;
- c) Determinação dos parâmetros ótimos, volume de enzima e tempo de processo, para a hidrólise enzimática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Neste item foram listados todos os reagentes e equipamentos, com os seus respectivos modelos e marcas, utilizados nesse trabalho.

3.1.1 Reagentes

- Acetona P. A. – ACS – C_3H_6O – Synth;
- Ácido 3,5 – Diitrosalicílico (DNS) P. A. – $C_7H_4N_2O_7$ – Êxodo Científica;
- Ácido Acético Glacial P. A. – CH_3COOH – Synth;
- Ácido Cítrico Anidro – $C_6H_8O_7$ – Dinâmica;
- Ácido Clorídrico P. A. – HCL – Impex;
- Ácido Sulfúrico P. A. – H_2SO_4 – Dinâmica;
- Açúcar Cristal – Guarani;
- Álcool Etílico 96° Comercial – C_2H_5OH – Chemco;
- Citrato de Sódio Tribásico Anidro P. A. – $C_6H_5NaO_7$ – Dinâmica;
- Cloreto de Potássio P. A. – A.C.S. – KCl – Dinâmica;
- Cloreto de Sódio P. A. – Vetec Química Fina;
- Clorito de Sódio P. A. 80% (RT) – $NaClO_2$ – Sigma Aldrich;
- Coquetel Enzimático – Cellic Ctec 3 – Doação Usina São Manoel;
- Extrato de Levedura – Acumeda Lab Neogen;
- Fenol Cristal P.A. – A.C.S– C_6H_5OH – Êxodo Científica;
- Fosfato de Potássio P. A. Monobásico Anidro – KH_2PO_4 – Impex;
- Fosfato de Sódio Dibásico Anidro P. A. – Na_2HPO_4 – Vetec Química Fina;
- Glicose-D Anidra – P. A. – $C_6H_{12}O_6$ – Nuclear;
- Hidróxido de Sódio P. A. – NaOH – Dinâmica;
- Iodeto de Potássio P. A. – ACS – KF – Dinâmica;
- Levedura *Saccharomyces cerevisiae* – Fermento biológico seco instantâneo Fleischmann;
- Metabissulfito de Sódio P. A. – $Na_2S_2O_5$ – Êxodo Científica;
- Permanganato de Potássio P. A. – ACS – $KMnO_4$ – Synth;

- Peróxido de Hidrogênio 35% – H_2O_2 – Êxodo Científica;
- Sulfato de Amônio P. A. – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – Synth;
- Sulfato de Magnésio P. A. – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Synth;
- Tartarato de Sódio e Potássio – $\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Êxodo Científica;
- Toluol P. A. – C_7H_8 – Dinâmica;

3.1.2 Equipamentos

- Agitador e chapa aquecedora – AGI1141002 – Ethiktechnology;
- Agitador de peneiras – 2790 – Berfel;
- Agitador de tubos – Biothec;
- Agitador mecânico – 713D – Fisatom;
- Balança analítica - AY220 – Marte;
- Balança de umidade – MOC36U – Shimadzu;
- Banho maria:
 - 500-ID – Ethiktechnology;
 - 55/90/PID – Adamo;
- Bombas a vácuo:
 - M100 Ex – Merson;
 - DVR – Dosivac;
 - 122 BCP – Prismatic;
- Câmera de fluxo e luz UV – Filtracom;
- Centrifuga de bancada – 4000RPM – Kasvi;
- Chapa aquecedora com 6 bocas – 502/6 – Fisatom;
- Densímetro Digital – DM45 DeltaRange – Mettler Toledo;
- Destilador de Etanol – MA012/1 – Marconi;
- Espectofotometro – UV-M51 – Bel Engineering;
- Estufa com circulação de ar:
 - Modelo desconhecido - Imarvil;
 - MA033 – Marconi;
- Forno mufla – Q318M24 – Químis;
- Incubadora shaker – SL 222 – Solab;
- Manta aquecedora – 3310 – Nalgon;

- Moinho de facas:
 - Willey com peneiras de 20 mesh (0,841 mm) – Marconi;
 - MGHS 6/230 – Seibt;
- Minicentrífuga – NanoSpin 8 – Locus;
- Peneiras – Bertel;
- pHmetro – mPA210 – Lucadema;
- Refratômetro Digital portátil – Ionlab;
- Sistema purificador de água – DG300 – Gehaka;
- Titulador automático – 905 Titrande – Metrohm;
- Ultrafreezer CL 580 – 86V – Coldlab.

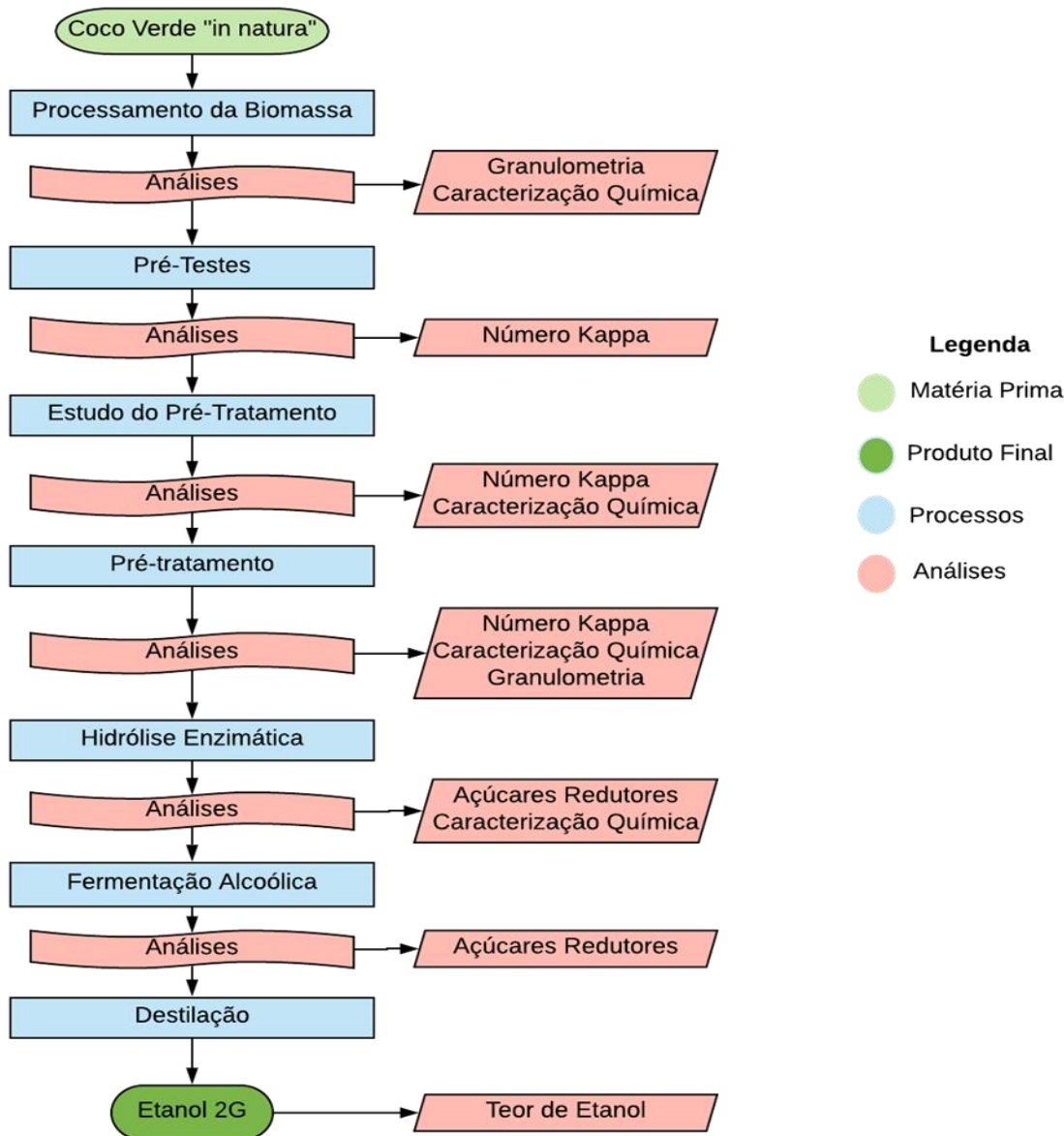
3.2 Métodos

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Resíduos Sólidos e Compósitos (RESIDUALL) localizado no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP/FCA.

Todos os experimentos foram realizados seguindo os procedimentos descritos nos próximos itens e subitens. Para confiabilidade dos resultados os dados foram avaliados pelo Teste Q, um teste estatístico de significância. Os números foram descartados ou não, com um limite de 95% de confiança conforme a Tabela 5.1, página 58 da Estatística Aplicada à Química – Anexo A (MOITA e MOITA NETO, 2010). A determinação dos valores considerados como resultados foram calculados por meio de uma média aritmética e o desvio padrão (dp) foi calculado para verificar o grau de variação entre as amostras.

O fluxograma da Figura 7 apresenta a metodologia empregada para a produção E2G a partir da casca do coco verde.

Figura 7 – Fluxograma dos processos e análises utilizadas neste trabalho



Os processos e as análises citados no fluxograma estão descritos nos próximos subitens.

3.2.1 Coleta da Casca do Coco Verde

A matéria-prima foi coletada na lixeira exterior da lanchonete da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Câmpus de Botucatu. As cascas do coco verde foram selecionadas por sua aparência, ou seja, as que não apresentavam indícios de decomposição, e que, possivelmente foram descartadas em menos de 24 h.

3.2.2 Processamento da Biomassa

Para facilitar a abertura manual dos cocos selecionados, estes foram colocados em estufa a 65 °C por 7 dias. Esse procedimento permite a diminuição da umidade das fibras. Após esse período, as cascas foram abertas e picadas, aumentando a superfície de contato e retornaram para a estufa, até que a umidade (base seca) atingisse o teor de 10%. Então, os pedaços de cocos secos foram moídos em “chips” em moinhos de facas e, em seguida, a pó em moinho de facas tipo Willey. O pó da casca de coco foi armazenado em sacos plásticos para ser caracterizado quimicamente e ser utilizado nas etapas seguintes.

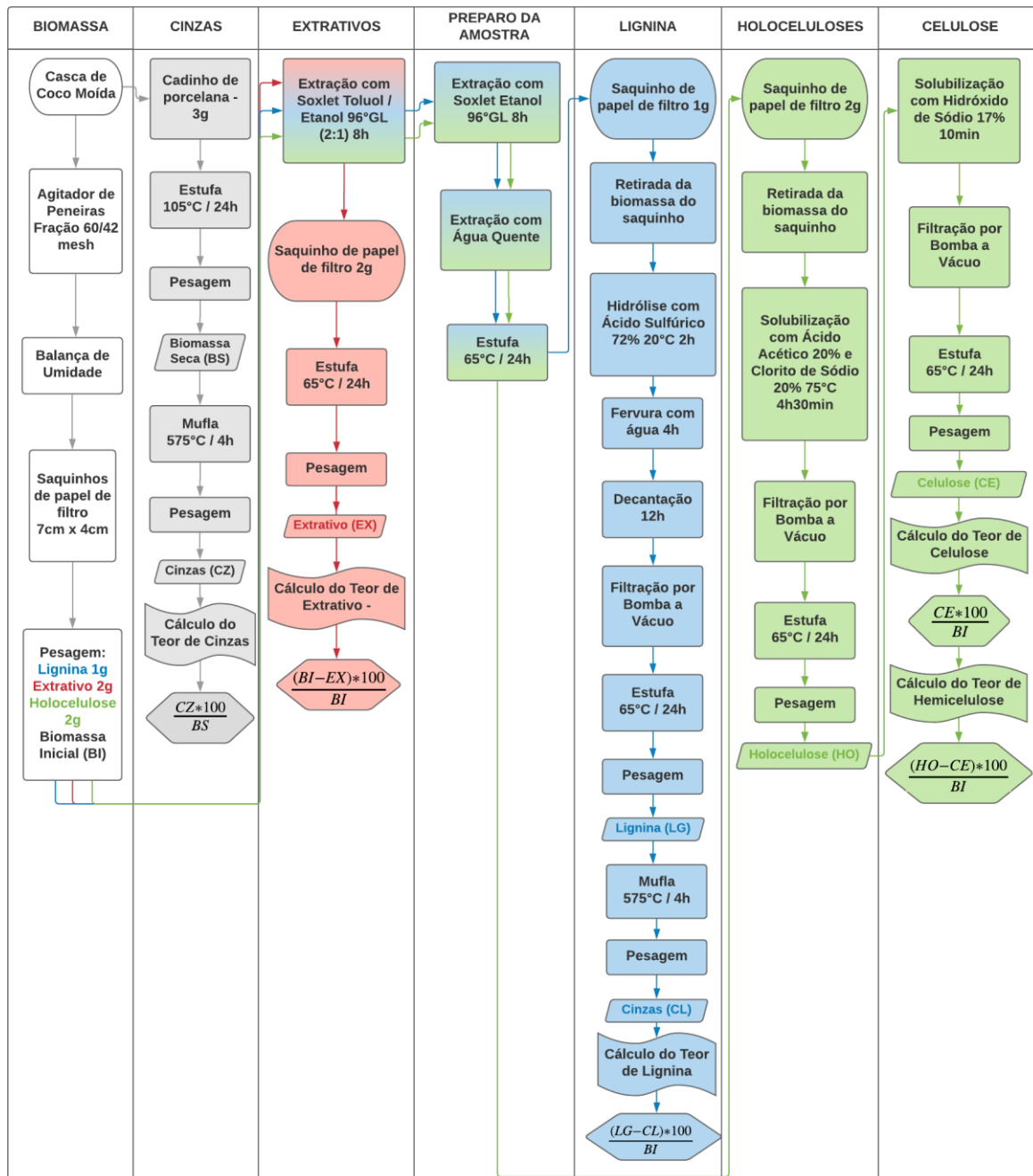
3.2.3 Caracterização Química

A análise de caracterização química é um conjunto de análises que determinam a composição da biomassa, ou seja, a quantidade de celulose, lignina, hemiceluloses, extrativos e cinzas presentes nas amostras.

Foram utilizadas metodologias baseadas nas normas da TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) e na da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) como descrito em Bronzato et al., (2017) e apresentado no fluxograma da Figura 8:

- a) Preparo de amostras para caracterização química: T264 cm 97 (1997);
- b) Teor de extrativo: TAPPI 204 om-97 (1997);
- c) Teor de cinzas: TAPPI T211 om-02 (2002);
- d) Teor de lignina: TAPPI 222 om-02 (2006);
- e) Teor de holocelulose: TAPPI T9-wd-75 (2015);
- f) Teor de celulose: Embrapa Documentos 236, item 2.7.1, página 42.

Figura 8 – Fluxograma da análise de caracterização química: Cinzas, Extrativos, Lignina, Hemiceluloses e Celulose



3.2.4 Granulometria

O ensaio granulométrico foi realizado para caracterizar o tamanho das partículas da biomassa do coco verde *in natura* e pré-tratada, após o processo de moagem em moinho de facas.

A metodologia dessa análise foi adaptada da norma NBR 7217 (1987) de BULLER; ORTEGA (2012) e JORDAN *et al.* (2016). A Tabela 2 apresenta o mesh,

que representa o número de fios por polegada, e a abertura de cada uma das 10 peneiras da série de Tyler utilizadas neste trabalho.

Tabela 2 – Mesh e abertura das peneiras da série Tyler.

Mesh	Abertura Livre (mm)
10	1,651
14	1,168
20	0,833
28	0,589
35	0,417
48	0,295
65	0,208
100	0,147
150	0,104
200	0,074

Para se obter uma agitação homogênea foi necessário a utilização de um agitador mecânico, porém, ele só comporta a panela e mais 5 peneiras. Por isso o ensaio foi dividido em 2 etapas, cada qual com um conjunto sequencial de peneiras:

- Conjunto A: 10, 14, 20, 28, 35 mesh e a panela A;
- Conjunto B: 48, 65, 100, 150, 200 mesh e a panela B.

Após a montagem do conjunto A no agitador, uma amostra de massa conhecida foi colocada de forma a preencher toda a peneira de 10 mesh. O conjunto foi tampado e o agitador funcionou na vibração 10 por 10 minutos. As amostras retidas em cada peneira e na panela A foram pesadas. O conjunto B foi colocado no equipamento e a amostra da panela A foi transferida para a peneira de mesh 48, e a metodologia foi repetida. Todo o ensaio foi feito em triplicata.

A fração (f_i) de cada amostra foi calculada conforme a Equação 1.

$$f_i = \frac{\text{massa retida}}{\text{massa total}} \quad (1)$$

3.2.5 Pré-testes

Para a determinação dos parâmetros utilizados no processo de pré-tratamento foram pesquisados possíveis metodologias na literatura e também em trabalhos semelhantes realizados no RESIDUALL, como a produção de etanol 2G utilizando como matéria-prima o aguapé (BRONZATO et al., 2017, 2018), o abacaxizeiro (SILVA

et al., 2020) e com a casca do coco verde (BRONZATO et al., 2019; DONINI et al., 2020). Com base nessas informações foram realizados uma série de testes, denominados de pré-testes, adaptados as condições do laboratório.

Após cada teste foi calculado o teor da biomassa degradada ou solubilizada, dependendo do processo químico realizado, conforme a Equação 2, e também, foi realizado a análise do número Kappa, (ABNT ISSO 302:2005), utilizando o titulador automático, 905 Titrando.

$$\text{Rendimento do Pré – tratamento} = \frac{(\text{biomassa inicial} - \text{biomassa final})}{\text{biomassa inicial}} * 100 \quad (2)$$

Para os testes foram utilizados a concentração de 10% massa/volume de biomassa (g) por solução (mL) e foram separados em 4 grupos, apresentados na Tabela 3, conforme as metodologias utilizadas.

3.2.6 Pré-tratamentos

Com os resultados dos pré-testes foi possível determinar uma metodologia para o pré-tratamento da casca do coco verde: Hidrólise química com NaClO_2 em meio de ácido acético com agitação mecânica.

Para aumentar a deslignificação da biomassa, ou seja, para melhorar o rendimento do processo, a metodologia foi submetida a um estudo de otimização. Foram escolhidos 4 parâmetros para serem estudados: temperatura, tempo, número de adições dos reagentes e concentração do ácido acético. A Tabela 4 mostra os parâmetros fixos e variáveis.

As combinações das 4 variáveis resultaram em 81 pré-tratamentos, que foram realizados em duplicata, totalizando 162 amostras.

Para determinar qual o pré-tratamento que deslignificou mais a biomassa, foram calculadas a quantidade de biomassa solubilizada no processo, conforme a Equação 2, e analisados os números Kappas da biomassa hidrolisada.

Tabela 3 – Metodologias utilizadas nos pré-testes separadas em 4 grupos: A, B, C e D

Grupo	Biomassa	Reagentes	Pré- tratamento	Principal componente degradado/solubilizado	Equipamentos	Parâmetros				
						Pressão (kgf/cm ²)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)	
A	A 1	Casca do Coco	Água	Tratamento com Vapor	Hemiceluloses	Autoclave com despressurização rápida	2	1	133	-
	A 2	Moída	NaOH 5%		Lignina					
B	B 1	Casca do Coco	Água	Auto-hidrólise	Hemiceluloses	Incubadora Shaker	-	1	60	150
	B 2	Moída	H ₂ O ₂ 15%	Oxidativo	Lignina					
	B 3		CH ₃ COOH 15%	Ácido	Hemiceluloses					
C	C 1	Casca do Coco	H ₂ SO ₄ 5%	Ácido	Hemiceluloses	Incubadora Shaker	-	3	60	150
	C 2	Moída	C ₃ H ₆ O 50%	Organossolv	Lignina					
	C 3		Água	Auto-hidrólise	Hemiceluloses					
D	D 1	Casca do Coco Moída	NaClO ₂ 10% + CH ₃ COOH 10%	Oxidativo	Lignina	Incubadora Shaker	-	3	60	150
	D C1	Produto do Grupo C								
	D C2									
	D C3									

Tabela 4 – Parâmetros variáveis e fixos utilizados no pré-tratamento da casca de coco verde

Parâmetros Variáveis			
Temperatura	Sem aquecimento	50 °C	70 °C
Tempo	0,5 h	1 h	3 h
Quantidade de adição de reagentes*	1 vez	2 vezes	4 vezes
Concentração do CH₃COOH	1%	5%	10%
Parâmetros Fixos			
Concentração m/v	10%		
Quantidade de biomassa	10 g		
Quantidade total de reagentes	100 mL = 50 mL de NaClO ₂ 10% + 50 mL de CH ₃ COOH		
Agitação	150 RPM		

* O tempo de cada adição foi determinada pela divisão do tempo total pela quantidade de adição. Exemplo - No experimento com 0,5 h e 4 adições: foram adicionados 12,5 mL de cada reagente a cada 7 min e 30 segundos.

3.2.7 Determinação das Equações Objetivas

O pré-tratamento se apresentou como um problema multivariado, com 5 variáveis, sendo estas, temperatura, tempo, concentração do ácido acético, adição dos reagentes e número Kappa. Para facilitar os cálculos de otimização foi proposto a divisão em várias equações com 3 variáveis [$z=f(x,y)$], sendo sempre o número Kappa em função dos outros parâmetros, ao invés de apenas 1 equação com 5 variáveis [$w=f(x,y,z,k)$]. Dessa forma, por meio do software foram determinadas as equações polinomiais, conforme o modelo apresentado na Equação 3, com 3 variáveis de 2^o grau, que foi escolhido por testes realizados no programa.

$$z = f(x, y) = ax^2 + bx + cxy + dy + ey^2 + f \quad (3)$$

Onde:

- z = número Kappa $\rightarrow k$;

E as variáveis x e y podem ser:

- Temperatura (°C) $\rightarrow T$;
- Tempo (min) $\rightarrow t$;
- Concentração do ácido acético (%) $\rightarrow a$;
- Adição dos reagentes (quantas vezes) $\rightarrow r$.

Os parâmetros foram relacionados em 6 equações, E1, E2, E3, E4, E5 e E6:

$$E1 \rightarrow k(T,t);$$

$$E2 \rightarrow k(T,a);$$

$$E3 \rightarrow k(T,r);$$

$$E4 \rightarrow k(t,a);$$

$$E5 \rightarrow k(t,r);$$

$$E6 \rightarrow k(a,r).$$

3.2.8 Otimização das Equações Objetivas

Essa etapa foi realizada por meio da ferramenta “Optimization”, encontrada na aba “APPS” do Matlab. Foram inseridas no programa as equações objetivas E1, E2, E3, E4, E5 e E6 e os valores mínimos e máximos de cada parâmetros determinados para a realização dos experimentos do pré-tratamento.

3.2.9 Realização do Pré-tratamento

Após a análise dos resultados e a determinação dos parâmetros, o processo de pré-tratamento foi realizado da seguinte forma, conforme apresentado na Figura 9:

- Em um recipiente de vidro foram pesados 20 g, peso seco, de casca de coco verde moída;
- Após a estabilização da temperatura do banho-maria em 65 °C, o recipiente foi colocado na água quente, preso por garras em um suporte universal;
- A haste do agitador foi centralizada, com uma distância segura, aproximadamente 1 cm, do fundo do recipiente;
- Separadamente, em 2 provetas de 50 mL, foram medidos 34 mL de NaClO₂ 10 % e de CH₃COOH 10 %;
- Ambos os reagentes foram adicionados ao mesmo tempo ao recipiente de vidro e o mesmo foi tampado com papel alumínio;
- A agitação mecânica foi ajustada em 900 rpm;
- Após 40 minutos, a agitação foi reduzida para 150 rpm e repetiu-se a adição dos reagentes;

- Depois da estabilização dos reagentes, a agitação retornou para 900 rpm e após 40 minutos o processo de adição de reagentes foi repetido;
- Com 120 minutos de reação, o banho-maria foi desligado;
- A fibra foi lavada em água corrente, em uma peneira de 250 mesh, até o líquido filtrado sair transparente;
- A biomassa pré-tratada foi seca até atingir uma umidade inferior a 10% e a mesma foi armazenada em saco plástico;
- Esse processo foi realizado várias vezes até se ter uma quantidade suficiente de biomassa para as análises e para a etapa de hidrólise enzimática.

Para a confirmação dos resultados foi calculado a perda de massa, o número Kappa e foi realizado a caracterização química desta biomassa pré-tratada. Os valores encontrados foram comparados com os resultados da biomassa que apresentou o menor número Kappa entre os 81 experimentos.

Figura 9 – Processo de pré-tratamento da casca do coco verde



3.2.10 Hidrólise Enzimática

Essa etapa do processo foi dividida em duas metodologias sequenciais: determinação do volume do coquetel enzimático e determinação do tempo de processo.

3.2.10.1 Determinação do volume do complexo enzimático

Para se determinar qual intervalo de valores seria estudado foram realizados alguns pré-testes variando o volume da enzima de 10 a 1000 μL (1 mL) e, esses testes mostraram que a conversão da biomassa era mais eficiente no intervalo de 130 a 180 μL . Portanto, o estudo do volume foi feito com alíquotas de 130, 140, 150, 155, 160, 170 e 180 μL do complexo enzimático.

O experimento foi feito em triplicata para cada volume, e com amostras sem adição de enzimas (branco) para quantificar a hidrólise referente apenas ao processo enzimático. Em tubo falcon de 50 mL, foi pesado 1 g de biomassa pré-tratada, peso seco, e adicionado 10 mL de tampão citrato de sódio, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0,5 M pH 4,8. Todos os tubos foram colocados na incubadora a 50 °C, com agitação de 200 rpm por 20 minutos para homogeneização. Após esse tempo, a enzima foi adicionada. O processo de hidrólise enzimática foi encerrado com 24 h e as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. O líquido hidrolisado foi retirado e, a parte sólida, biomassa residual, foi lavada com água e seca até peso constante. A perda de massa foi calculada descontando os valores do branco, conforme as equações 4, 5 e 6. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur foram adicionados de 5 a 7 gotas do líquido hidrolisado em um refratômetro portátil para a leitura do grau Brix e, o restante do material foi congelado para posterior análise de açúcares redutores totais (ART).

$$\text{Biomassa perdida}_{(bp)} = \text{massa inicial branco}_{(mib)} - \text{massa final branco}_{(mfb)} \quad (4)$$

$$\text{Biomassa hidrolisada } (h) = \text{massa inicial}_{V_x} - \text{massa final}_{V_x} \quad (5)$$

$$\text{Teor de conversão } (\%) = 100 * \left(\frac{h}{miV_x} - \frac{bp}{mib} \right) \quad (6)$$

3.2.10.2 Análise de Açúcares Redutores

A determinação do ART foi realizada conforme as metodologias do Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da EMBRAPA (VASCONCELOS; PINTO; ARAGÃO, 2013) e adaptada de MILLER, (1959).

Inicialmente foi necessário preparar uma curva padrão, utilizando glicose anidra como padrão. Foram pesadas 500 mg da glicose e dissolvidos em água em um balão volumétrico de 50 mL, nomeada de solução estoque (SE). A partir dessa solução foram preparados 8 balões volumétricos de 10 mL, com diferentes concentrações de açúcares, nomeados de soluções padrões conforme a Tabela 5.

A análise das soluções padrões para o cálculo da curva e das outras amostras estudadas seguiram o seguinte procedimento:

- Em um tubo de ensaio foram pipetados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de DNS;
- O tubo foi agitado em um agitador de tubos, e colocado em banho-maria a 90 °C (± 2 °C) por 15 minutos;
- Para encerrar a reação do DNS, os tubos foram emergidos em um banho com água gelada, aproximadamente 5 °C;
- Após o banho gelado, foram pipetados 4 mL de água em cada tubo de ensaio;
- Em uma cubeta de plástico, de 4 mL, foram pipetados 3 mL de água e 0,8 mL de amostra, após agitação, provenientes do tubo de ensaio;
- A absorbância foi lida em $\lambda = 540$ nm.

Com os resultados das amostras padrão foi calculado a curva, $y = ab + x$, que foi utilizada em todas as análises de ART, nas etapas de hidrólise enzimática e de fermentação alcoólica.

Tabela 5 – Soluções padrões de glicose.

Amostra	Tampão	SE (mL)	Solução (mL)	SE (mg de glicose)	Concentração (mg/mL)
B	10,00	0,00	10,00		0,00
I	9,50	0,50	10,00		0,50
II	9,00	1,00	10,00		1,00
III	8,50	1,50	10,00		1,50
IV	8,00	2,00	10,00	10,0	2,00
V	7,00	3,00	10,00		3,00
VI	6,00	4,00	10,00		4,00
VII	5,50	4,50	10,00		4,50

3.2.10.3 Determinação do Tempo da Hidrólise Enzimática

Após determinar a quantidade de enzima (μL) por grama de biomassa foi necessário avaliar a duração, em horas, do processo de hidrólise enzimática. Para isso foi utilizado o mesmo procedimento do item 3.2.10.1, em triplicata para cada um dos 9 tempos estudados, totalizando 96 h em intervalos de 12 em 12 h.

Em um falcon de 50 mL foi pesado 1 g, em peso seco, de biomassa pré-tratada e adicionado 10 mL do tampão citrato de sódio. Após a homogeneização, foi adicionado, em cada tubo, 155 μL do complexo enzimático. Para encerrar a hidrólise enzimática, os tubos foram colocados em banho-maria a 90 °C por 20 minutos. Após, as amostras serem centrifugadas por 5 minutos, o líquido foi armazenado em outro tubo falcon para posteriores análises, de grau Brix e ART. A biomassa residual foi lavada e secada a 65 °C até peso constante e a perda de massa foi calculada.

3.2.10.4 Processo de Hidrólise Enzimática

Com os parâmetros determinados, conforme a Tabela 6, foi feito o processo de hidrólise enzimática com uma quantidade maior de biomassa, 15 g, e foi utilizado erlenmeyers de 250 mL como biorreatores, conforme esquematizado na Figura 10. Essa etapa seguiu os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.2.10.1 e 3.2.10.3, exceto a velocidade de agitação que foi reduzida para 100 rpm.

Tabela 6 – Parâmetros da hidrólise enzimática.

Parâmetros	Unidades
Temperatura	50 °C
Tempo	24 h
Enzima	155 µL/g biomassa
Concentração	10 % m/v biomassa/solução
pH	4,8
Agitação	100 rpm

Figura 10 – Processo de hidrólise enzimática

Para a separação das 2 frações, líquido e sólido, o volume de 150 mL dos erlenmeyers foram divididos em tubos falcons de 50 mL e centrifugados a 4000 rpm por 30 minutos. Esse recurso foi utilizado após tentativas de filtração, por bomba à

vácuo e em peneiras de 200 a 60 mesh, não apresentarem um resultado satisfatório por causa da viscosidade do líquido hidrolisado.

A biomassa residual foi lavada, seca até peso constante, foi analisado o teor de celulose, conforme o item 3.2.3, e armazenada com umidade inferior a 10 % para futuros experimentos. O líquido hidrolisado foi armazenado em um frasco, na geladeira, para ser utilizado na etapa de fermentação. Foram retiradas alíquotas para posteriores análises: ART, determinação de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise de material orgânico.

A análise dos açúcares (glicose, frutose, xilose e glicose) foi realizada por HPLC, pelo Laboratório de Análises Agrícolas e Ambientais Ltda, Agrilab, em Botucatu-SP, em um Cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10A, com um detector de índice de refração (IR) e uma coluna HEXIS – HI-PLEX PB 300 mm x 8 µm, na fase móvel foi utilizada água ultra pura em uma vazão de 0,6 mL/ min e, a temperatura de análise foi de 80 °C e o tempo de 25 minutos.

Com o teor de glicose foi calculado, conforme a Equação 4 (ERTAS et al., 2014; ZHOU et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2019), a conversão de celulose em glicose.

$$\text{Conversão de celulose: } \frac{[\text{glicose}]}{[\text{celulose inicial}]} * 0,9 * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo:

[glicose] – Concentração de glicose no líquido hidrolisado em g/L;

[celulose inicial] – Concentração da celulose na biomassa pré-tratada em g/L;

0,9 – Coeficiente de correção de hidratação.

A análise de nutrientes foi realizada pelo Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Solos e Recursos Ambientais, da UNESP/FCA – Botucatu-SP e conforme o laudo seguiu a metodologia do Manual de Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes e Corretivos, Brasília, DF, 2014. Essa análise determinou os macros e micronutrientes presentes no líquido hidrolisado, em gramas/litro: Nitrogênio (N), Pentóxido de Fósforo (P₂O₅), Óxido de Potássio (K₂O), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S) e Carbono (C); e em miligramas/litro: Sódio (Na), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn).

3.2.11 Fermentação Alcoólica

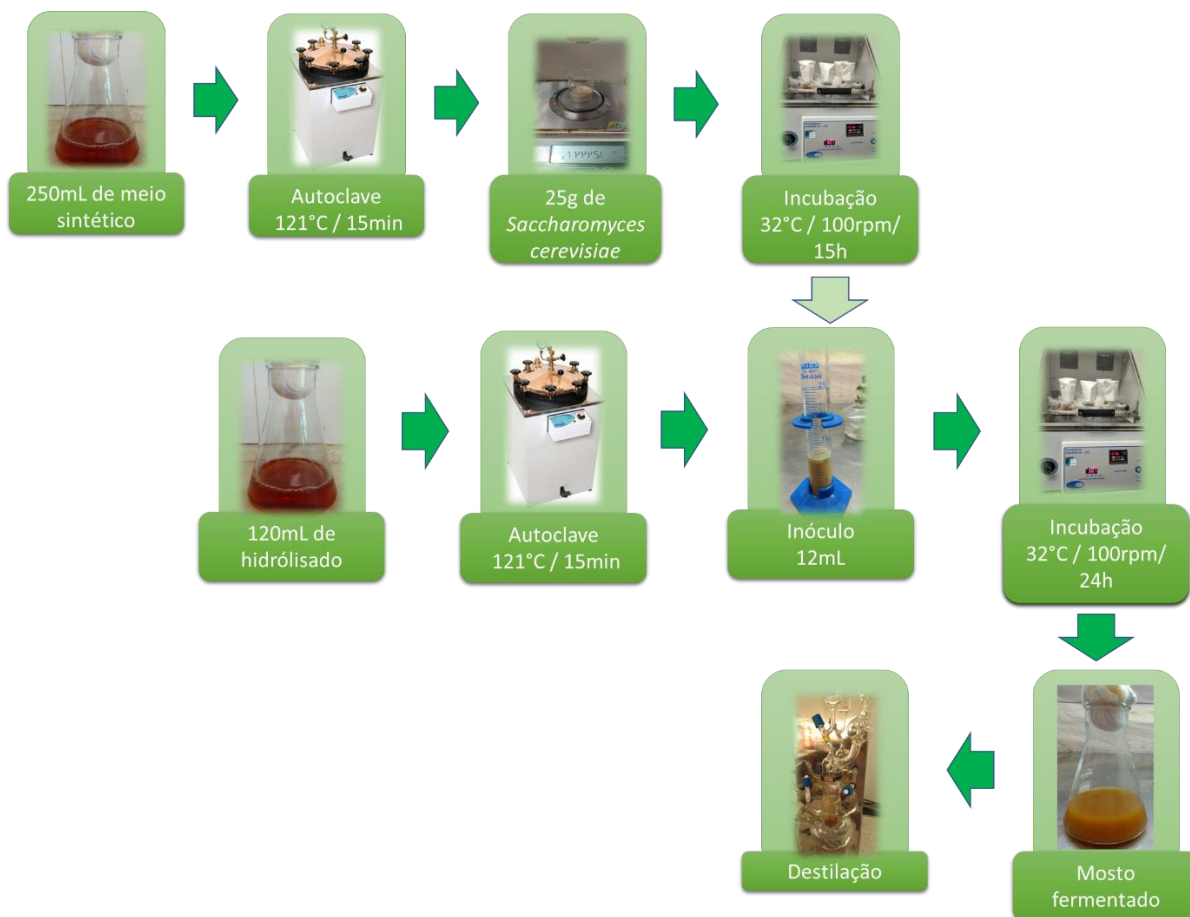
Após as leituras iniciais de grau Brix e pH, no líquido proveniente da hidrólise enzimática, foi realizado o processo de fermentação alcoólica em triplicata e com um branco, líquido sem a adição de inóculo. Em erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 120 mL de meio de cultura e todos erlenmeyers foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após, as amostras resfriarem foram inoculados 12 mL de inóculo, 10 % do volume inicial do mosto. A fermentação ocorreu em incubadora a 32 °C, com agitação de 100 rpm. Este processo está descrito no fluxograma da Figura 11. Após 24 h de processo, o mosto foi destilado em destilador de etanol e o teor alcoólico do destilado foi analisado em um densímetro digital.

3.2.11.1 Preparo do Inóculo

Para a produção do inóculo foi preparado um meio sintético conforme composição abaixo:

- Sacarose – 150,0 g/L
- Extrato de levedura – 10,0 g/L
- Sulfato de Amônio (NH₄)₂SO₄ – 1,85 g/L
- Cloreto de Potássio (KCl) – 1,0 g/L
- Sulfato de Magnésio (MgSO₄) – 1,0 g/L
- Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – 5 g/L

Após o ajuste do pH para 4,0 e do Brix, com água para 3,0, um volume de 250 mL do meio sintético foi adicionado em um erlenmeyer de 500 mL. Depois da esterilização em autoclave, foi pesado e adicionado ao meio 25 g da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esse processo ocorreu dentro da câmara UV com fluxo de ar. A fermentação ocorreu na incubadora com agitação de 100 rpm a 32 °C por aproximadamente 15 h.

Figura 11 – Fluxograma do processo de fermentação alcoólica

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Química

A casca do coco verde apresenta aproximadamente 80% de umidade e, após os procedimentos de secagem e moagem da biomassa, foi realizada a caracterização química deste material, apresentada na Tabela 7, que mostrou que a casca do coco é constituída principalmente por 28% de celulose, com 28%, e lignina com 23%.

Tabela 7 – Caracterização química da casca do coco verde

Componentes	Teores (%)	Média (%)	Desvio Padrão
Cinzas	4,4861	4,56	0,15
	4,4503		
	4,7295		
Extrativo	21,1174	19,26	1,61
	18,2069		
	18,4566		
Lignina	23,8790	23,21	0,58
	22,8564		
	22,8959		
Hemiceluloses	18,4023	18,09	0,38
	18,1900		
	17,6688		
Celulose	28,3707	28,34	0,06
	28,3691		
	28,2730		

A Tabela 8 mostra a comparação com a literatura dos valores encontrados neste trabalho. Os resultados da caracterização química deste trabalho são diferentes dos encontrados na literatura, entretanto, todos os teores ficaram dentro da faixa de resultados. Isso provavelmente se deve as diferenças no cultivo dos coqueiros, pois o clima e o solo onde as plantas cresceram e a idade em que a fruta foi colhida influenciam nas quantidades dos principais constituintes das biomassas vegetais.

Tabela 8 – Comparação dos resultados de caracterização química com os encontrados na literatura

Caracterização Química da Casca do Coco							
Trabalhos	Celulose	Hemiceluloses	Lignina %	Extrativos	Cinzas	Total	Local da coleta do coco
Noguera <i>et al.</i> , 2000	31,00	9,10	41,00	-	-	81,10	Costa Rica, Costa do Marfim, Índia, México, Sri Lanka
Vaithanomsat <i>et al.</i> , 2011	39,31	16,15	29,79	28,48	-	113,70	-
Gonçalves <i>et al.</i> , 2014	32,88	26,50	26,88	3,27	4,34	93,87	Nordeste - Brasil
Cardoso e Gonzalez, 2016		46,84*	19,47	33,68	-	99,99	Brasília - Brasil
Nascimento, 2016	27,77	8,28	45,45	-	-	81,50	Natal - Brasil
Cabral <i>et al.</i> , 2017	24,70	12,26	40,10	2,63	2,56	82,25	Alagoas - Brasil
Nogueira, 2017	32,79	15,97	35,70	16,47	3,63	104,60	Natal - Brasil
Teixeira, 2018	45,50	13,16	45,44	2,44	0,78	107,30	Brasil
Faixa de Resultados	24 – 45	8 – 26	19 - 45	2 – 33	0,8 - 4	81 – 113	
Presente estudo	28,34	18,09	23,21	19,26	4,56	93,46	Botucatu -Brasil

- Informação não descrita no trabalho

* Holocelulose: Celuloses e Hemiceluloses

Quando comparado os teores calculados para a caracterização química da fibra do coco verde com os de outras biomassas, como bagaço de cana e o eucalipto, utilizadas na produção de E2G, a casca do coco apresenta valores similares de lignina.

Mesmo com a quantidade de celulose menor que 30% a casca do coco verde pode ser utilizada como matéria prima a produção de E2G, pois é um resíduo problemático para ser descartado, além de estar presente em grande quantidade.

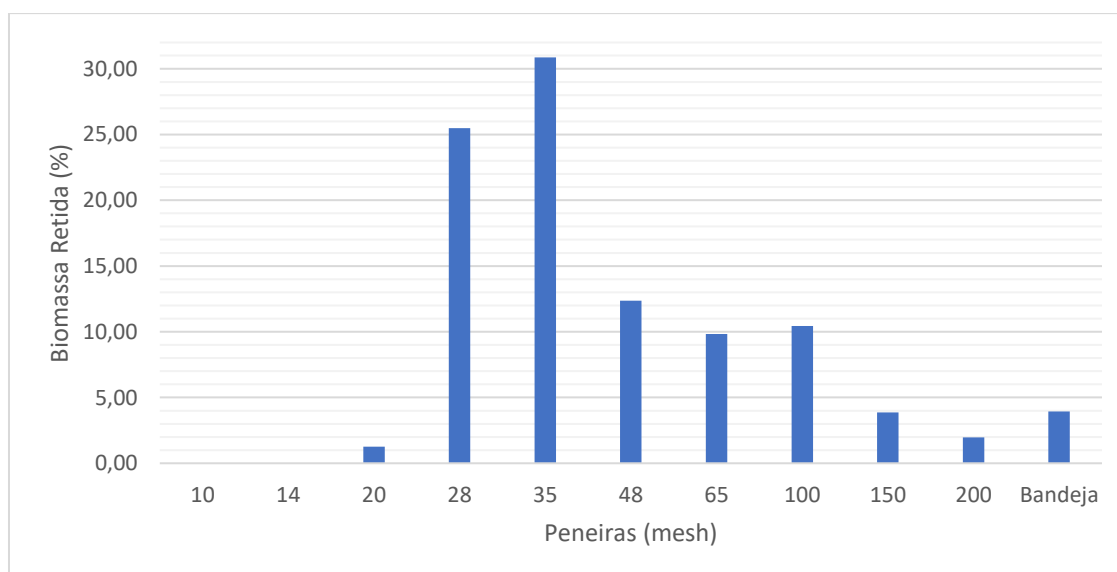
4.2 Granulometria

A análise de granulométrica foi realizada com o intuito de conhecer o tamanho médio das partículas da biomassa *in natura* moída. Os resultados deste experimento estão apresentados na Tabela 9 e na Figura 12.

Tabela 9 – Granulometria da casca de coco verde moída

Peneira Mesh	Abertura Livre (mm)	Fração				Desvio Padrão	Biomassa Retida (%)
		Repetição1	Repetição 2	Repetição 3	Média		
10	1,651	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	1,168	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,833	0,00	0,02	0,02	0,01	0,01	1,27
28	0,589	0,25	0,27	0,25	0,25	0,01	25,48
35	0,417	0,35	0,29	0,28	0,31	0,03	30,85
48	0,295	0,10	0,13	0,13	0,12	0,01	12,36
65	0,208	0,10	0,10	0,09	0,10	0,00	9,82
100	0,147	0,10	0,10	0,11	0,10	0,01	10,45
150	0,104	0,02	0,04	0,06	0,04	0,01	3,86
200	0,074	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	1,96
Bandeja	-	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	3,93

Figura 12 – Representação gráfica da granulometria da casca de coco verde moída



A casca do coco verde moída passou direto pelas primeiras peneiras, de 10 e 14 mesh, o que indica que não há partículas com diâmetro superior a 1 mm. Conforme mostrado na Figura 12 a maior quantidade do material, aproximadamente 55%, ficou retido nas peneiras intermediárias do conjunto, 28 e 35 mesh, portanto, o tamanho médio das partículas da biomassa utilizada neste trabalho é de 0,5 mm.

4.3 Pré-testes

As informações referentes aos grupos A, B, C e D estão descritas na tabela 3 - Metodologias utilizadas nos pré-testes separadas em 4 grupos: A, B, C e D., na página 49, no item 3.2.5 – Pré-testes.

Os testes do grupo A não apresentaram resultados satisfatório. A biomassa tratada com NaOH 5% transbordou em todas as tentativas. Foram testados béqueres e erlenmeyers de tamanhos variados e, também, quantidades diferentes de casca de coco verde, porém sem alterar a proporção de 10% m/v. No processo A2, no qual a biomassa foi tratada com água, não houve alteração visual na casca do coco, entretanto, o peso da biomassa diminuiu em 20%. Esta perda, é referente a solubilização de alguns componentes lignocelulósicos, principalmente das hemiceluloses. Como os experimentos foram realizados na autoclave, por motivos de segurança, não foi possível fazer outros testes, com valores maiores de temperatura e pressão, que poderiam apresentar melhores resultados.

Os pré-testes seguintes foram realizados em um shaker, equipamento que permite agitação e um melhor controle da temperatura do processo, entretanto, o valor máximo desse parâmetro continuou restrito, por causa das configurações do equipamento que não ultrapassa 60 °C.

Os resultados dos grupos B, C e D foram avaliadas conforme a quantidade de biomassa que o processo solubilizou (perda de biomassa) e pela análise do número Kappa, método utilizado para comparação da presença de lignina na casca do coco verde depois dos testes. Foi realizada a análise de caracterização química das amostras dos grupos C e D para saber os teores finais de lignina, celulose, hemiceluloses, cinzas e extrativos.

Os processos químicos do grupo B alteraram o aspecto e a cor da fibra, o que indica que houve solubilização de componentes lignocelulósicos, principalmente dos

relacionados a coloração da biomassa, como os extrativos e a lignina, que apresenta uma coloração escura. Os resultados de perda de massa comprovaram a solubilização, mas não foram melhores que os apresentados pelos processos do grupo A. Os processos B1 e B2, água e peróxido de hidrogênio respectivamente, perderam 22% da sua massa inicial e o B3, com ácido acético, não atingiu nem 15% de perda.

Em comparação com a casca do coco verde *in natura* os três procedimentos apresentaram diminuição do número Kappa, o que comprova que uma parte da lignina foi degradada, mesmo nas metodologias mais específicas para a solubilização das hemiceluloses. Porém, essa redução não chegou a 30%, o que indica que é necessário o uso de reagentes mais fortes e um aumento no tempo de processo.

Por ser a metodologia mais sustentável, a autohidrólise foi repetida no grupo C, mas com um tempo maior de reação. Para a hidrólise ácida, além do aumento do tempo, o ácido foi substituído por um mais forte, o ácido sulfúrico. E, também foi testado uma metodologia, o processo organosolv, que é mais utilizada para diminuir a quantidade da lignina na biomassa em comparação com os processos C1 e C2. No grupo D, foi utilizado um pré-tratamento mais severo que os anteriores e essa metodologia foi baseada em uma análise quantitativa de holoceluloses, que é realizada por meio da hidrólise, quase total, da lignina presente na biomassa amostral.

Os resultados das análises: perda de massa e número Kappa dos grupos C e D, são apresentados nas Tabela 10. Os dados mostraram que os tratamentos realizados em ambos os grupos podem ser uma opção para a remoção da lignina da casca de coco verde, uma vez que os valores para o número Kappa foram reduzidos. Entretanto, apenas nos tratamentos com NaClO_2 em meio ácido estes valores foram menores que 25, ou seja, uma redução de aproximadamente 80%.

Tabela 10 – Resultados dos Pré-testes

Grupo	Biomassa	Média Perda de Massa (%)	Desvio Padrão	Número Kappa	Média Kappa	Desvio Padrão
Casca do coco	<i>in natura</i>	-	-	127,2053	126,30	1,92
				124,0969		
				127,5969		
C 1		30,49	2,54	127,8928	109,89	15,84
				103,6495		
				98,1137		
C 2	Casca do Coco Moída	45,20	0,12	100,3705	95,37	9,32
				84,6211		
				101,1230		
C 3		44,39	0,48	73,1231	82,08	7,79
				87,2486		
				85,8781		
D 1		51,29	1,60	21,7209	22,35	0,66
				22,2818		
				23,0365		
D C1		34,28	0,66	16,1317	14,84	1,78
				15,5830		
				12,8193		
D C2	Produto do Grupo C	27,62	0,30	19,1743	20,12	1,46
				19,3901		
				21,8097		
D C3		25,09	0,20	17,4742	15,42	2,05
				15,4217		
				13,3750		

Na Tabela 11 estão sintetizados os resultados das análises de cinzas, extrativos, lignina, hemiceluloses e celulose realizadas nas amostras dos grupos C e D. Esses valores foram calculados conforme o rendimento (perda de massa) apresentada na Tabela 10.

Podemos observar, na Tabela 11, que os tratamentos realizados (C, D, DC) foram efetivos na diminuição dos teores de cinzas na biomassa da casca do coco verde, sendo o ácido sulfúrico 5%, tratamento C1, o reagente que apresentou a maior redução. Na comparação dos teores de extrativos, na maioria dos testes houve uma redução superior a 80%, porém nos tratamentos C2 e DC2, que utilizaram acetona 50%, os resultados foram inconclusivos. Provavelmente, aconteceu uma reação entre

as fibras tratadas nos pré-testes com os reagentes orgânicos utilizados no processo de extração.

Tabela 11 - Síntese dos resultados das análises de caracterização química e do número Kappa

Grupo	Cinzas	Extrativos	Lignina %	Hemiceluloses	Celulose	Número Kappa
Casca do Coco	4,6	19,3	23,2	18,1	28,3	126,3
C1	0,3	1,5	27,1	13,1	25,4	109,9
C2	1,1	-	16,9	16,6	17,5	95,4
C3	0,6	3,0	17,2	13,1	16,3	82,1
D1	1,9	3,6	5,9	16,5	24,5	22,3
DC1	1,0	2,6	11,2	20,4	30,7	14,8
DC2	1,0	-	6,4	29,1	33,8	20,1
DC3	1,9	1,9	8,8	23,4	31,6	15,4

Os resultados das análises de lignina, hemiceluloses e celulose, na Tabela 11, mostraram que a melhor metodologia é a utilização do clorito de sódio em conjunto com ácido acético, seja como etapa primária ou secundária. Os pré-testes DC3, DC2 e D1 foram os que resultaram nos menores teores de lignina, 8,8%, 6,4% e 5,9%, respectivamente. Podemos observar que as porcentagens de celulose e hemiceluloses aumentaram nos tratamentos DC em comparação com os valores encontrados na casca do coco verde sem tratamento. O pré-teste D1, com apenas 1 etapa de tratamento, apresentou a maior redução no teor de lignina, entretanto houve a perda de 4% de celulose. O que indica, que esse procedimento conseguiu deslignificar a casca do coco verde com o mínimo possível de perda da celulose.

Mesmo sendo a acetona o reagente que melhor deslignificou a biomassa, esta substância orgânica precisa de um processo de recuperação após o seu uso, encarecendo a metodologia. Sendo assim, esse reagente não foi escolhido para a próxima etapa. Comparando os outros 2 testes, com NaClO₂ e com água seguida de NaClO₂, o melhor é o procedimento com apenas 1 fase, pois isto reduz o custo e o tempo do processo.

Portanto, o melhor reagente para a hidrólise química da casca do coco verde é o clorito de sódio em meio de ácido acético. Sendo assim, esse processo será melhor estudado e otimizado na etapa seguinte, o pré-tratamento.

4.4 Pré-tratamentos

Com os pré-testes foi determinado os reagentes e alguns itens, como segue abaixo, da metodologia da etapa de pré-tratamento:

- NaClO₂ 10% em meio de ácido acético;
- 10% m/v – 10 g de biomassa seca para 100 mL de reagentes;
- Processo deve ser feito em agitação;
- Os reagentes devem ser adicionados em frações.

Porém, não foi possível determinar alguns parâmetros do processo como:

- Temperatura;
- Tempo;
- Acidez do meio;
- Quantidades de vezes que os reagentes devem ser adicionados.

Aparentemente, eles são interdependentes. Para determiná-los foi realizado uma série de procedimentos, associando os parâmetros e calculando o número Kappa para compará-los, pois o objetivo principal desta etapa é encontrar a metodologia que consiga degradar a maior quantidade de lignina da casca de coco verde sem prejudicar efetivamente o teor de celulose.

Para cada um dos 4 parâmetros foram escolhidos 3 valores, um inferior, um intermediário e um superior, conforme a Tabela 12, e foram relacionados em 81 procedimentos, feitos em duplicatas, totalizando 162 amostras. Os resultados são apresentados nas Tabelas 13a, 13b, 13c, separados pela variável tempo, apenas para facilitar a visualização. A amostra 81, com todos os parâmetros superiores, resultou no menor valor do número Kappa.

Tabela 12 – Parâmetros utilizados na etapa de pré-tratamento

Valores	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Adição dos Reagentes (vezes)	Concentração do Ácido Acético (%)
Inferior	30	25	1	1
Intermediário	60	50	2	5
Superior	120	70	4	10

As análises das Tabelas mostraram que, possivelmente, os valores ótimos eram intermediários aos escolhidos e que os parâmetros realmente estão associados,

porém, não foi possível determinar, apenas com esses resultados, as razões matemáticas. Para resolver esses 2 problemas foi necessário recorrer a métodos numéricos realizados no software Matlab R2016a.

Tabela 13a – Resultados do Pré-tratamento para as Amostras de 1 a 27

Amostras	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Adição dos Reagentes (vezes)	[Ácido Acético] (%)	Número Kappa		Média nº Kappa	Desvio Padrão
					Repetição 1	Repetição 2		
1				1	81,3050	83,5950	82,45	1,15
2			1	5	50,8992	52,2173	51,56	0,66
3				10	51,2286	49,8796	50,55	0,67
4				1	56,5402	61,9229	59,23	2,69
5		25	2	5	55,8116	45,7126	50,76	5,05
6				10	52,5763	44,4091	48,49	4,08
7				1	78,2487	76,0587	77,15	1,10
8			4	5	48,2462	56,7724	52,51	4,26
9				10	45,5079	53,3806	49,44	3,94
10				1	34,0508	46,4704	40,26	6,21
11			1	5	41,6938	38,4665	40,08	1,61
12				10	39,5097	39,0738	39,29	0,22
13				1	33,8705	36,3320	35,10	1,23
14	30	50	2	5	47,6419	48,8325	48,24	0,60
15				10	45,5128	43,0197	44,27	1,25
16				1	36,6373	33,7975	35,22	1,42
17			4	5	37,6634	42,8154	40,24	2,58
18				10	45,6227	39,4215	42,52	3,10
19				1	71,8572	88,0410	79,95	8,09
20			1	5	44,0820	45,5755	44,83	0,75
21				10	39,2368	36,4226	37,83	1,41
22				1	42,6703	45,5416	44,11	1,44
23		70	2	5	32,6668	39,9209	36,29	3,63
24				10	40,0043	34,3043	37,15	2,85
25				1	56,4481	61,5049	58,98	2,53
26			4	5	35,3034	36,7199	36,01	0,71
27				10	34,2257	30,3592	32,29	1,93

Tabela 13b – Resultados do Pré-tratamento para as Amostras de 28 a 54

Amostras	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Adição dos Reagentes (vezes)	[Ácido Acético] (%)	Número Kappa		Média nº Kappa	Desvio Padrão
					Repetição 1	Repetição 2		
28				1	68,3596	73,0917	70,73	2,37
29			1	5	40,3328	46,8825	43,61	3,27
30				10	39,6621	48,6344	44,15	4,49
31				1	66,7264	61,5396	64,13	2,59
32		25	2	5	57,3285	52,1209	54,72	2,60
33				10	54,7534	57,7137	56,23	1,48
34				1	53,8025	68,2168	61,01	7,21
35			4	5	60,5334	67,4132	63,97	3,44
36				10	51,4327	53,5093	52,47	1,04
37				1	38,5808	36,8042	37,69	0,89
38			1	5	46,1515	39,5222	42,84	3,31
39				10	30,0784	35,6452	32,86	2,78
40				1	41,8446	48,3873	45,12	3,27
41	60	50	2	5	50,0810	42,9628	46,52	3,56
42				10	40,0034	38,3152	39,16	0,84
43				1	34,1143	33,8369	33,98	0,14
44			4	5	35,5573	40,6812	38,12	2,56
45				10	36,2075	34,2194	35,21	0,99
46				1	41,8891	47,1295	44,51	2,62
47			1	5	44,4960	58,3819	51,44	6,94
48				10	41,1573	36,3944	38,78	2,38
49				1	25,6746	30,5019	28,09	2,41
50		70	2	5	43,3244	53,0304	48,18	4,85
51				10	30,5017	39,3334	34,92	4,42
52				1	38,2043	46,2111	42,21	4,00
53			4	5	29,2621	31,2954	30,28	1,02
54				10	26,8287	29,6703	28,25	1,42

Tabela 13c – Resultados do Pré-tratamento para as Amostras de 55 a 81

Amostras	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Adição dos Reagentes (vezes)	[Ácido Acético] (%)	Número Kappa		Média nº Kappa	Desvio Padrão
					Repetição 1	Repetição 2		
55				1	57,3865	57,3304	57,36	0,03
56			1	5	51,2767	47,9378	49,61	1,67
57				10	47,0335	44,6722	45,85	1,18
58				1	62,8809	61,7264	62,30	0,58
59		25	2	5	54,1007	54,7383	54,42	0,32
60				10	46,8451	37,5467	42,20	4,65
61				1	63,7938	69,4138	66,60	2,81
62			4	5	47,1383	48,7335	47,94	0,80
63				10	45,5062	43,3209	44,41	1,09
64				1	40,3517	31,8567	36,10	4,25
65			1	5	35,4253	37,1679	36,30	0,87
66				10	39,8449	47,2459	43,55	3,70
67				1	46,0619	39,7269	42,89	3,17
68	120	50	2	5	49,3824	48,9241	49,15	0,23
69				10	35,1508	34,9314	35,04	0,11
70				1	36,4123	41,9154	39,16	2,75
71			4	5	36,3438	37,8777	37,11	0,77
72				10	30,3662	34,3925	32,38	2,01
73				1	50,8446	49,7826	50,31	0,53
74			1	5	55,4127	47,7201	51,57	3,85
75				10	30,8206	33,1707	32,00	1,18
76				1	27,7448	28,9652	28,36	0,61
77		70	2	5	21,9918	26,4463	24,22	2,23
78				10	26,3463	27,0711	26,71	0,36
79				1	33,1799	40,8010	36,99	3,81
80			4	5	23,4140	22,7942	23,10	1,08
81				10	18,0446	20,2043	19,12	0,31

4.4.1 Determinação das Equações Objetivas

Para a otimização das condições operacionais do pré-tratamento foram considerados os valores do número Kappa (k), em função das variáveis: temperatura (T), tempo (t), concentração do ácido acético (c) e quantidade de adição de reagentes (a). Os resultados foram interpolados em funções polinomiais de 2º grau, com restrições limitadas aos ranges dos parâmetros de estudo, pela ferramenta CFTOOL do software Matlab. Os polinômios obtidos foram utilizados como funções objetivas para o processo de otimização pela ferramenta OPTIMIZATION do Matlab. Esse estudo resultou em 6 gráficos e determinou as melhores condições para o pré-

tratamento. Com esses dados foi realizado um novo pré-tratamento, calculado a perda de massa e analisado o número Kappa. Para a confirmação dos resultados, foi feita a caracterização química da amostra que apresentou o menor número Kappa entre os 81 experimentos e da biomassa otimizada.

Após serem inseridos os dados das Tabelas 13a, 13b e 13c no programa, a ferramenta “cftool” calculou as seguintes equações E1*, E2*, E3*, E4*, E5* e E6*, que resultaram nos gráficos das Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18 que são apresentados na forma bidimensional, no plano (x,y). Nos gráficos, as cores mostram as variações dos números Kappa, sendo o amarelo para os maiores valores e o roxo para os menores, ou seja, os melhores resultados.

Figura 13 – Gráfico bidimensional da Equação E1* → x= Temperatura (°C); y = tempo (min)

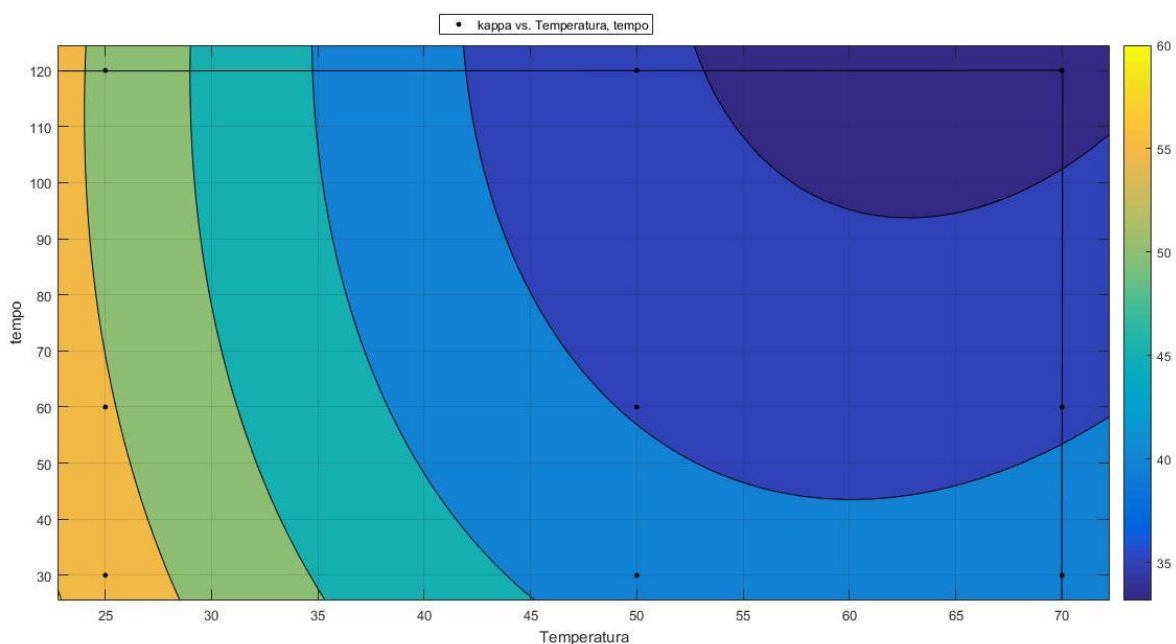


Figura 14 – Gráfico bidimensional da Equação E2* \rightarrow x= Temperatura ($^{\circ}$ C); y = acidez (%)

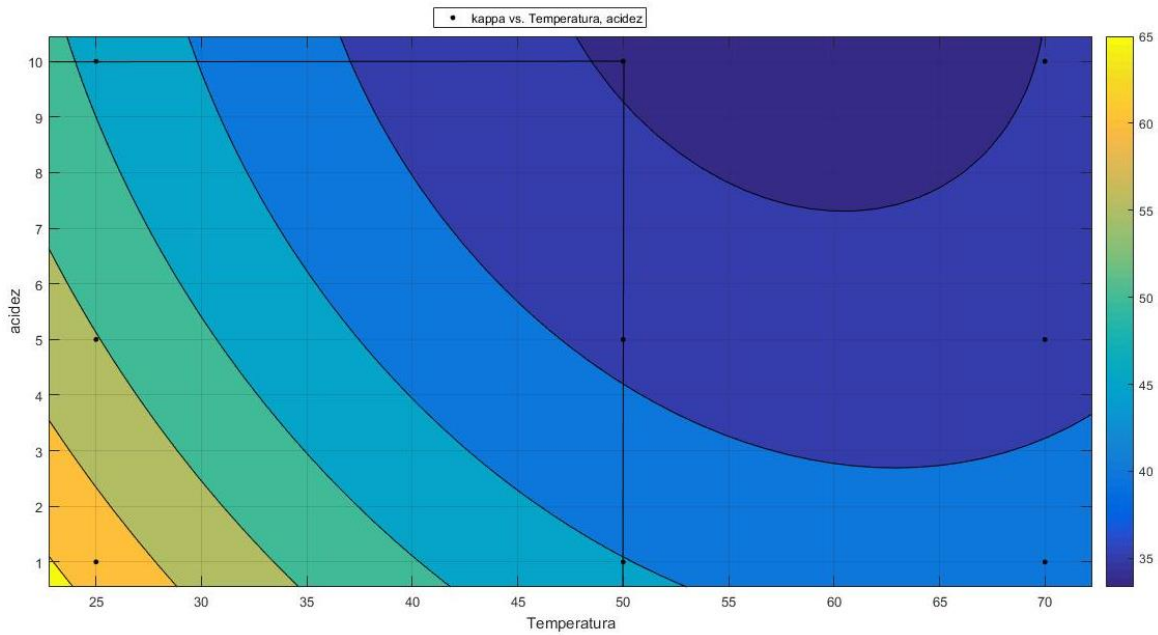


Figura 15 – Gráfico bidimensional da Equação E3* \rightarrow x= Temperatura ($^{\circ}$ C); y = reagente (vezes)

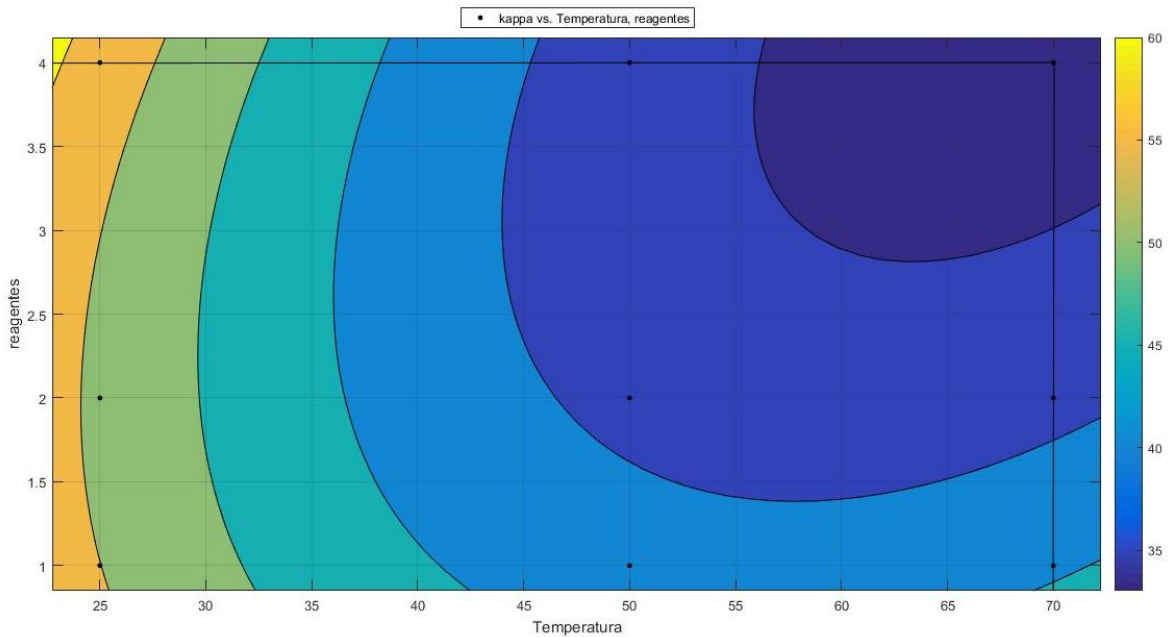


Figura 16 – Gráfico bidimensional da Equação E4* \rightarrow x= tempo (min) ; y = acidez (%)

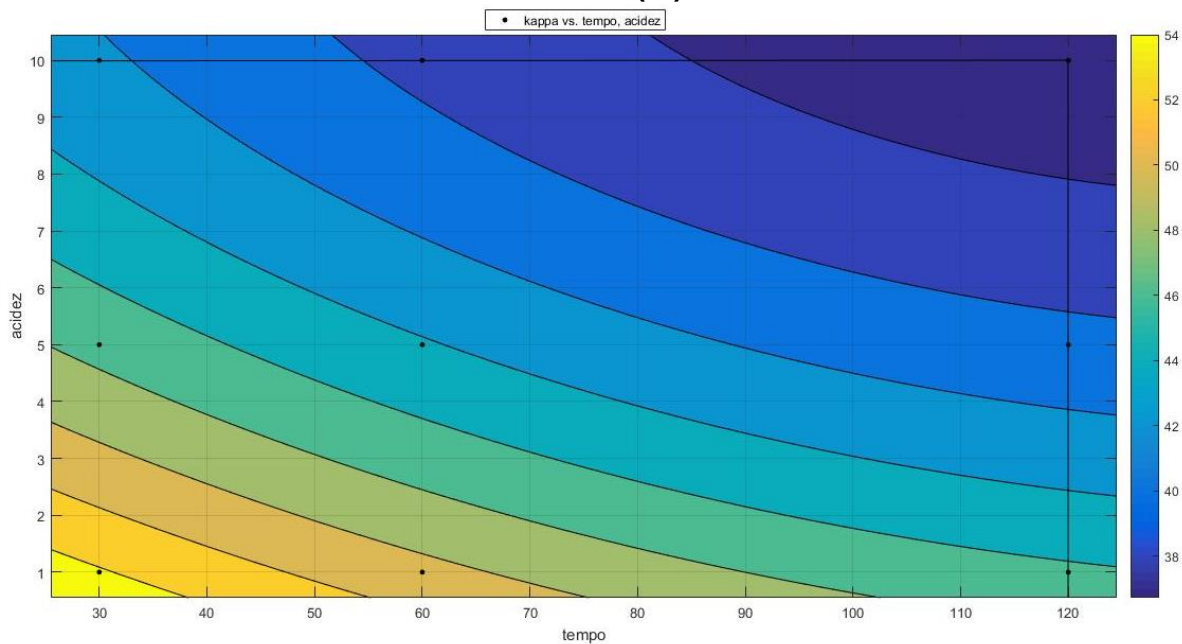


Figura 17 – Gráfico bidimensional da Equação E5* \rightarrow x= tempo (min); y = reagente (vezes)

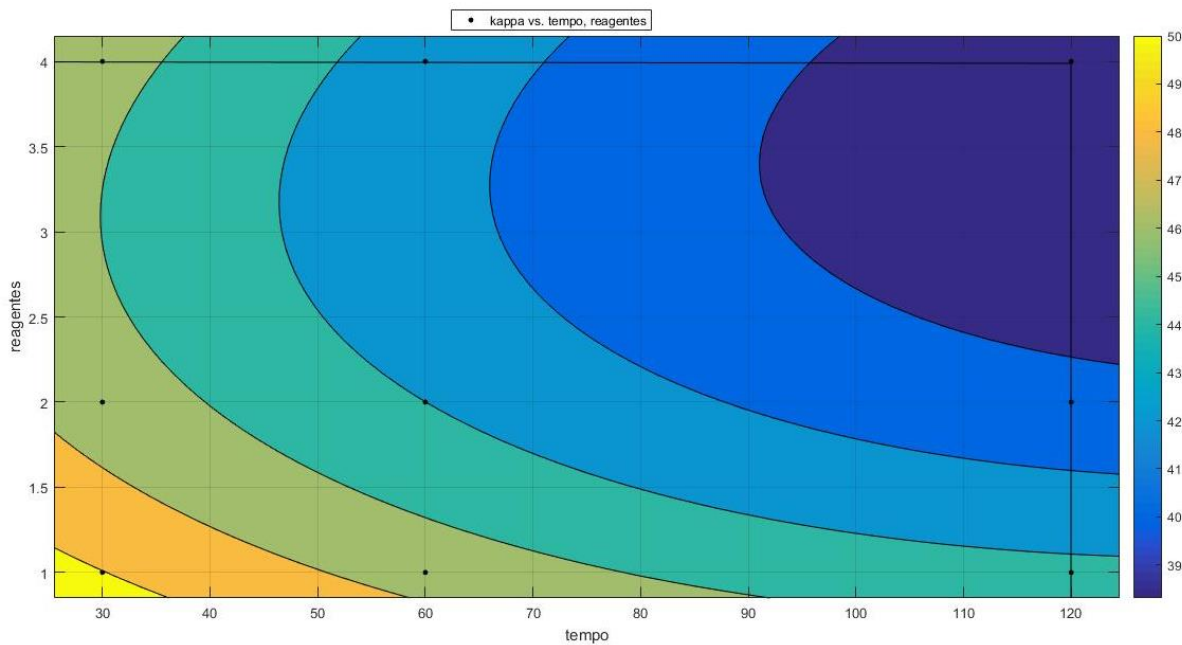
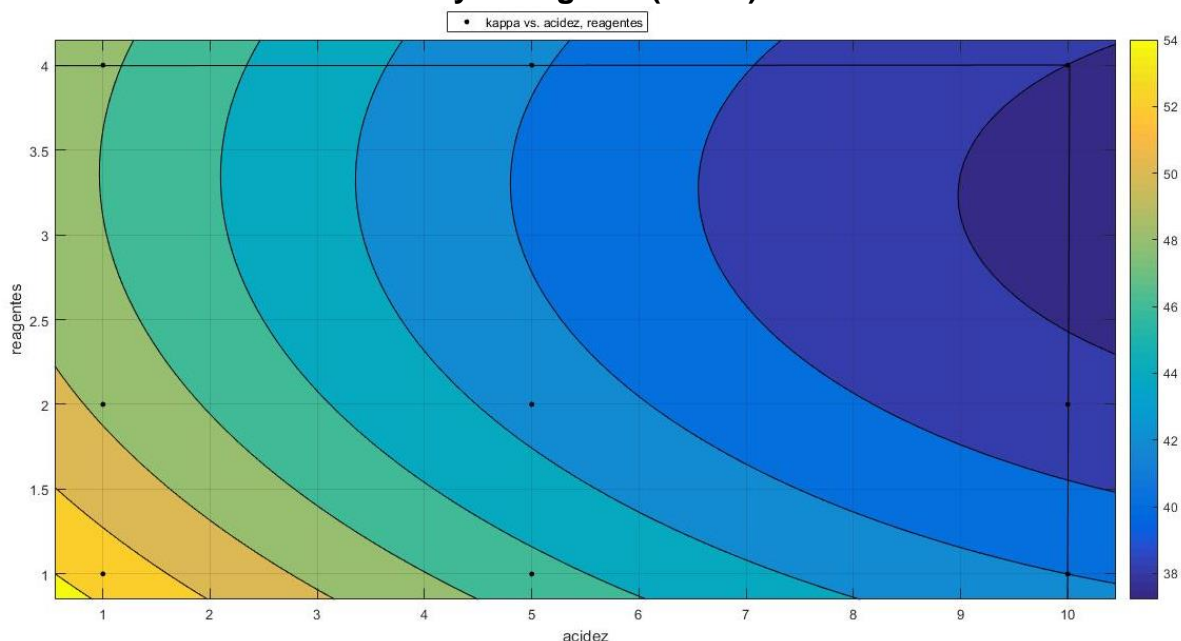


Figura 18 – Gráfico bidimensional da Equação E6* $\rightarrow z= \text{Kappa}$; $x= \text{acidez (\%)}$; $y = \text{reagente (vezes)}$



Os gráficos mostram o melhor par ordenado (x,y) para cada equação e também que há uma faixa, roxa, que contém outros resultados ótimos. Em todos os gráficos bidimensionais é possível determinar os limites inferiores da faixa ótima, porém em apenas dois casos os limites superiores aparecem nos gráficos. Essas informações estão sintetizadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Síntese das informações das Gráficos 12 a 17

Equação	Unidades (X,Y)	Melhor ponto (X,Y)	Limites de X Inferior - Superior	Limites de Y Inferior / Superior
E1 $\Rightarrow k= T \times t$	($^{\circ}\text{C}$, min)	(70,120)	52,7 - Indefinido	94,8 - Indefinido
E2 $\Rightarrow k= T \times a$	($^{\circ}\text{C}$, %)	(50,10)	47,5 - 70,19	7,3 - Indefinido
E3 $\Rightarrow k= T \times r$	($^{\circ}\text{C}$,adições)	(70,4)	55,8 - Indefinido	2,8 - Indefinido
E4 $\Rightarrow k= t \times a$	(min , %)	(120,10)	81,2 - Indefinido	7,9 - Indefinido
E5 $\Rightarrow k= t \times r$	(min , adições)	(120,4)	91,5 - Indefinido	2,2 - Indefinido
E6 $\Rightarrow k= a \times r$	(% , adições)	(10,4)	9,0 - Indefinido	2,3 - 4,1

Pelos gráficos das Figuras 13 a 18 e pela Tabela 14 é possível observar que os melhores pontos entre as 81 amostras são os parâmetros máximos. Porém, as faixas roxas e os limites mostram que há mais pontos onde os valores do número Kappa são mínimos, e por isso, há a necessidade de um processo de otimização.

4.4.2 Otimização das Equações Objetivas

O software indicou os valores ótimos de cada par ordenado (x,y), referente a equação selecionada, e calculou o número Kappa correspondente. Para confirmar que foram realmente encontrados os valores ótimos, os limites superiores foram extrapolados. Na Tabela 15 estão os limites utilizados para cada parâmetro e os valores das otimizações e, na Tabela 16 estão os resultados das otimizações.

Tabela 15 – Limites dos parâmetros

Equação	Limites		
	Inferior (X ,Y)	Superior (X,Y)	Superior Extrapolação (X,Y)
E1 => k= T x t	(25,30)	(70,120)	(100,180)
E2 => k= T x a	(25,1)	(70,10)	(100,20)
E3 => k= T x r	(25,1)	(70,4)	(100,6)
E4 => k= t x a	(30,1)	(120,10)	(180,20)
E5 => k= t x r	(30,1)	(120,4)	(180,6)
E6 => k= a x r	(1,1)	(10,4)	(20,6)

Tabela 16 – Resultados da Otimização

Equação Nomenclatura	Parâmetros	Resultados		
		Ótimos (O)	Extrapolados (OE)	Δk
E1 => k= T x t E1 → O1→OE1	k	33,32	32,07	1,25
	T	64,21	66,90	
	t	120,00	170,53	
E2 => k= T x a E2 → O2→OE2	k	33,51	33,06	0,45
	T	59,05	57,73	
	a	10,00	12,49	
E3 => k= T x r E3 → O3→OE3	k	33,09	32,91	0,18
	T	67,98	69,91	
	r	4,00	4,50	
E4 => k= t x a E4 → O4→OE4	k	36,90	36,46	0,45
	t	120,00	125,47	
	a	10,00	12,27	
E5 => k= t x r E5 → O5→OE5	k	38,47	37,75	0,72
	t	120,00	157,82	
	r	3,54	3,74	
E6 => k= a x r E6 → O6→OE6	k	37,41	36,63	0,78
	a	10,00	13,21	
	r	3,22	3,17	

Na comparação da O1 com OE1 houve uma diminuição de 1,25 no valor do número Kappa, porém isso representa uma melhoria pequena para justificar um aumento de aproximadamente 1 hora no processo.

Os resultados da O2 e OE2 mostraram que a temperatura e a concentração do ácido acético são parâmetros inversamente proporcionais, ou seja, quando a acidez utilizada for alta para uma maior eficiência, o processo deve ser realizado em uma temperatura mais baixa.

Os valores encontrados nos processos O3 e OE3 indicam que não há necessidade de um aumento na quantidade de vezes que os reagentes são adicionados.

A OE4 apresentou uma diminuição menor que 0,5 no valor do número Kappa, o que mostra que um aumento no tempo e na acidez não altera significativamente a deslignificação da biomassa.

Na OE5, novamente, a extrapolação mostrou que é interessante um aumento no tempo do processo, entretanto também calculou que essa mudança melhoria em apenas 0,7 o valor do número Kappa.

Na última otimização, os resultados de O6 e OE6 mostraram que é necessário reduzir a quantidade de vezes em que os reagentes são adicionados.

Após as comparações concluiu-se que:

- A faixa de temperatura ideal é de 57,8 °C a 69,9 °C;
- A duração do processo pode ser de 120 a 171 minutos;
- A concentração do ácido acético pode variar de 10 a 13,2%;
- Os reagentes podem ser adicionados entre 3,2 a 4,5 vezes.

Por meio da modelagem matemática foram determinados os parâmetros para a metodologia do pré-tratamento da casca do coco verde para a produção de E2G como apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 – Parâmetros utilizados no processo de pré-tratamento da casca do coco verde.

Parâmetros	
Temperatura	65 °C
Tempo	120 min
Quantidade de adição de reagentes	3
Reagentes	NaClO ₂ - 10% CH ₃ COOH - 10%
Concentração biomassa/volume	10%
Agitação	Sim

4.4.3 Resultados do Processo de Pré-tratamento

O processo otimizado foi repetido, em maior quantidade, em banho-maria e com agitação mecânica de 1500 rpm. O processo de pré-tratamento converteu 53,45% da massa inicial da casca de coco verde, como apresentado na Tabela 18. Isso mostra que este procedimento conseguiu modificar a estrutura química da fibra estudada, ou seja, aproximadamente metade da biomassa sofreu transformações químicas, foi solubilizada, conforme as suas características.

Tabela 18 – Rendimento em Massa do Pré-tratamento

Amostra	Massa Inicial (g)	Massa Final (g)	Perda de massa (g)	Teor de Conversão (%)	Teor de Conversão (%)	Rendimento em Solubilização (%)	Desvio Padrão
1	41,5	19,173	22,3271	53,8			
2	41,517	19,46	22,0579	53,1293	53,45	46,55	0,34
3	41,52	19,341	22,1793	53,4182			

A amostra otimizada foi analisada pela caracterização química e pelo número Kappa e, estes resultados são apresentados nas Tabelas 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Tabela 19 – Teor de extrativos

Amostras	Biomassa inicial (g)	Extrativo (g)	Teor de extrativo (%)	Média (%)	Desvio Padrão
COE1	2,0062	0,0180	0,8991		
COE2	2,0093	0,0036	0,1772	1,14	0,71
COE3	2,0093	0,0428	2,1281		
COE4	2,0130	0,0275	1,3637		

Tabela 20 – Teor de Cinzas

Amostras	Biomassa inicial (g)	Cinzas (g)	Teor de cinzas (%)	Média (%)	Desvio Padrão
COC1	1,3083	0,0215	1,712	1,69	0,05
COC2	1,3925	0,0226	1,703		
COC3	1,3184	0,0212	1,683		
COC4	1,3698	0,0225	1,724		
COC5	1,3839	0,0209	1,580		
COC6	1,3891	0,0232	1,751		

Tabela 21 – Teor de Lignina

Amostras	Biomassa inicial (g)	Lignina (g)	Teor de lignina (%)	Média (%)	Desvio Padrão
COL1	1,0050	0,1552	15,4422	16,09	1,30
COL2	1,0129	0,1462	14,4339		
COL3	1,0068	0,1744	17,3216		
COL4	1,0038	0,1738	17,3141		
COL5	1,0043	0,1465	14,5875		
COL6	1,0030	0,1747	17,4185		

Tabela 22 – Teor de Hemiceluloses

Amostras	Biomassa inicial (g)	Hemiceluloses	Teor de hemiceluloses (%)	Média (%)	Desvio Padrão
COH1	2,0084	0,4546	22,6352	26,21	2,93
COH2	2,0063	0,5841	29,1134		
COH3	2,0075	0,4432	22,0770		
COH4	2,0092	0,5883	29,2799		
COH5	2,0134	0,5231	25,9811		
COH6	2,0143	0,5671	28,1532		

Tabela 23 – Teor de Celulose

Amostras	Biomassa inicial (g)	Celulose	Teor de celulose (%)	Média (%)	Desvio Padrão
COH1	2,0084	0,8575	42,6962	39,44	2,73
COH2	2,0063	0,7307	36,4204		
COH3	2,0075	0,8680	43,2374		
COH4	2,0092	0,7351	36,5862		
COH5	2,0134	0,8011	39,7886		
COH6	2,0143	0,7631	37,8835		

Tabela 24 – Número Kappa.

Amostras	Número Kappa	Média	Desvio Padrão
Repetição 1	28,1913	28,02	0,17
Repetição 2	27,8543		

As tabelas anteriores estão resumidas na Tabela 25, na qual os valores da caracterização química foram corrigidos conforme o rendimento de 46,55% (Tabela 18) e são comparados com os valores da casca do coco verde *in natura*.

Tabela 25 – Resumo das Análises de Caracterização Química e Número Kappa

Biomassa	Teores					Nº Kappa
	Extrativo (%)	Cinzas (%)	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	
Casca do Coco " <i>in natura</i> "	19,26	4,56	23,21	28,34	18,09	126,3
Casca do Coco pré-tratada	0,53	0,79	7,49	18,36	12,20	28,02

Em comparação com os valores da casca do coco *in natura*, a biomassa pré-tratada apresentou reduções significativas em todos os teores. Esses resultados mostram que o processo otimizado de pré-tratamento foi uma metodologia eficiente, pois conseguiu solubilizar 67,7 % da lignina.

A Tabela 26 apresenta os valores da análise granulométrica da casca do coco pré-tratada pelo processo otimizado e a Tabela 27 e a Figura 19 comparam esses valores com a análise realizada com a biomassa antes do pré-tratamento. A Tabela 27 mostra que nenhuma quantidade de biomassa ficou retida nas três primeiras peneiras, 10,14 e 20 mesh. Isso significa que o diâmetro da biomassa pré-tratada é inferior a 0,8 mm. Na peneira 48 ficou retido a maior quantidade da amostra peneirada, aproximadamente 32%. Em comparação com a biomassa *in natura*, Tabela 28, é possível notar que o pré-tratamento alterou o tamanho das partículas. Antes do processo químico, a maior parte das amostras ficaram retidas nas peneiras com aberturas superiores a 0,4 mm e, após o pré-tratamento, aproximadamente 85% da amostra tem diâmetro inferior a 0,3 mm.

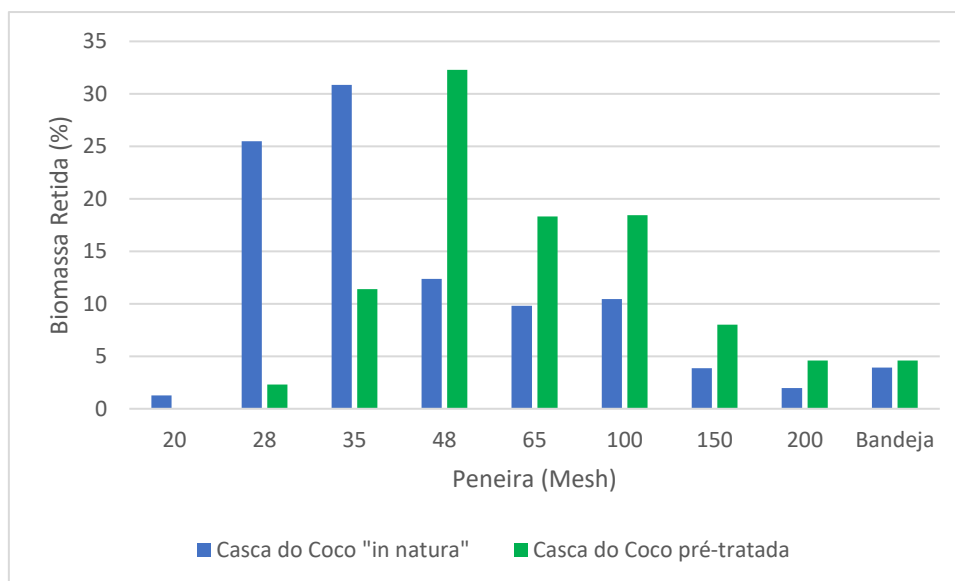
Tabela 26 – Granulometria da casca do coco verde pré-tratada.

Peneira Mesh	Abertura Livre (mm)	Fração			Desvio Padrão	Biomassa Retida (%)
		Repetição 1	Repetição 2	Média		
10	1,651	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	1,168	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,833	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,589	0,02	0,02	0,02	0,00	2,31
35	0,417	0,13	0,10	0,11	0,02	11,40
48	0,295	0,30	0,34	0,32	0,02	32,29
65	0,208	0,20	0,17	0,18	0,01	18,32
100	0,147	0,17	0,20	0,18	0,01	18,45
150	0,104	0,09	0,07	0,08	0,01	8,01
200	0,074	0,04	0,05	0,05	0,00	4,61
Bandeja	-	0,04	0,05	0,05	0,00	4,61

Tabela 27 – Comparação das análises granulométricas

Peneira Mesh	Abertura Livre (mm)	Fração		Biomassa Retida (%)	
		Casca do Coco "in natura"	Casca do Coco pré-tratada	Casca do Coco "in natura"	Casca do Coco pré-tratada
10	1,651	0,00	0,00	0,00	0,00
14	1,168	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,833	0,01	0,00	1,27	0,00
28	0,589	0,25	0,02	25,48	2,31
35	0,417	0,31	0,11	30,85	11,40
48	0,295	0,12	0,32	12,36	32,29
65	0,208	0,10	0,18	9,82	18,32
100	0,147	0,10	0,18	10,45	18,45
150	0,104	0,04	0,08	3,86	8,01
200	0,074	0,02	0,05	1,96	4,61
Bandeja	-	0,04	0,05	3,93	4,61

Figura 19 – Representação gráfica da comparação da granulometria



Pelos resultados apresentados, o processo matemático de otimização foi considerado eficiente e o pré-tratamento otimizado o ideal para ser utilizado como metodologia para a produção de E2G a partir da casca de coco verde. O material resultante desse processo foi usado na nova etapa, a hidrólise enzimática.

4.5 Hidrólise Enzimática

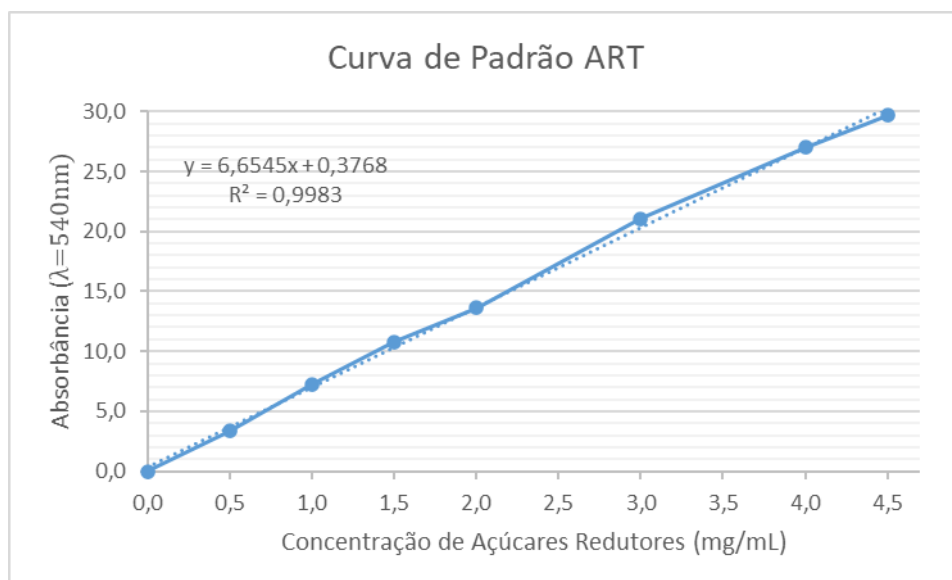
Nesta etapa, a celulose presente na biomassa pré-tratada é hidrolisada em glicose por meio de um processo enzimático. Para isso é necessário estudar a quantidade, ou o volume, do coquetel enzimático e o tempo de hidrólise, que são os principais parâmetros para se obter o melhor rendimento na conversão da celulose em glicose.

4.5.1 Análise de Açúcares Redutores

Para a análise de ART, inicialmente foi feita a curva padrão, apresentada na Figura 20 e, com os dados dessa curva e da Tabela 28, a Equação 5 foi calculada.

Tabela 28 – Dados da Curva Padrão

Concentração (mg/mL)	Abs ($\lambda=540\text{nm}$)
0,0	0,0
0,5	3,4
1,0	7,2
1,5	10,8
2,0	13,6
3,0	21,1
4,0	27,0
4,5	29,7

Figura 20 – Curva Padrão da Análise de Açúcares Redutores

Equações da reta da curva padrão ART

$$Y = 6,6545 * X + 0,3768$$

$$\text{Absorbância} = 6,6545 * [\text{ART}] + 0,3768$$

$$[\text{ART}] = \frac{(\text{Absorbância} - 0,3768)}{6,6545} \quad \text{Equação 5}$$

4.5.2 Determinação do Volume do Complexo Enzimático

Para calcular a quantidade de enzima, em μL , ideal para a hidrólise enzimática da casca do coco verde, foi preciso calcular o teor de conversão, ou a perda de massa, para diferentes volumes. Após alguns testes, foram escolhidos analisar os seguintes

valores: 130, 140, 150, 155, 160, 170 e 180 μL . Com os resultados das Equações 2, 3 e 4 descritas no item 3.2.9.1, foi construída a Tabela 29.

Tabela 29 – Teor de Conversão da Celulose conforme a quantidade de enzima

Enzima (μL)	Biomassa Convertida (g)	Desvio Padrão	Teor de Conversão (%)
130	0,354	0,0101	27,32
140	0,360	0,0123	27,95
150	0,361	0,0066	28,07
155	0,332	0,0085	25,11
160	0,337	0,0154	25,62
170	0,345	0,0034	26,48
180	0,362	0,0006	28,11

A melhor conversão, de 28,11%, foi com 180 μL de enzima por grama de casca de coco verde pré-tratada seca. Porém, apenas com esses dados não é possível afirmar que a enzima realmente converteu essa porcentagem de celulose em glicose, por isso foi necessário fazer mais análises do líquido resultante para descobrir o teor de glicose presente no meio.

Conforme a Tabela 30, a análise de ART do líquido hidrolisado não mostrou uma diferença significativa entre os volumes de 130 a 170 μL , entretanto, o volume de 180 μL apresentou a menor produção de açúcar, o que indica que essa quantidade é maior que o necessário e que causa uma inibição no processo.

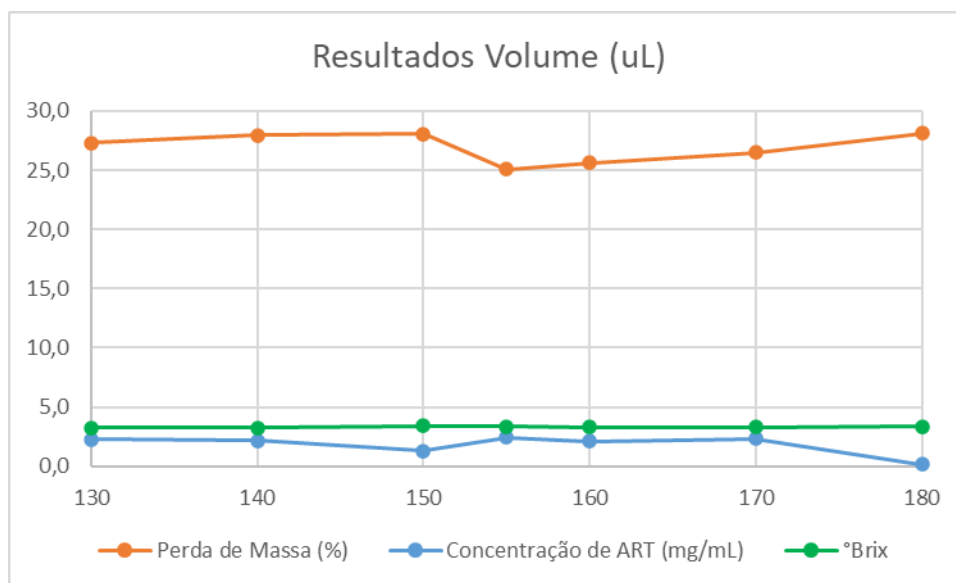
Tabela 30 – Análise de açúcares redutores totais.

Volume (μL)	Concentração de Açúcares Redutores Totais (mg/mL)	Desvio Padrão
0	1,4130	0,0600
130	3,6725	0,4648
140	3,5459	1,0024
150	2,6991	0,0976
155	3,8492	0,1236
160	3,4985	0,3248
170	3,7442	0,2763
180	1,5527	0,0962

O gráfico da Figura 21 apresenta a comparação entre as três análises, teor de conversão de biomassa, ART e grau Brix. Esses dados são as médias dos resultados

descontando os valores do branco. Os valores do grau Brix não apresentaram diferenças significativas, formando uma reta continua no valor de 3,3 Brix. Isso acontece devido o equipamento, refratômetro de bancada, não ter uma alta precisão, sendo apenas possível conhecer um valor aproximado dessa variável.

Figura 21 – Comparação das análises dos volumes do complexo enzimático.



Na comparação entre as análises de teor de conversão e de açúcares redutores, o volume de 155 μ L apresentou a maior concentração, 3,85 mg de glicose por mL de solução e a menor perda de massa, 32,99 %. Portanto, esse volume do complexo enzimático será utilizado nas etapas seguintes.

4.5.3 Determinação do Tempo da Hidrólise Enzimática

Após a determinação do volume do complexo enzimático, foi feito o mesmo procedimento para a determinação do tempo do processo de hidrólise. Os resultados das análises de teor de conversão estão detalhados na Tabela 31. Os intervalos de tempos a partir de 48 h apresentaram os melhores resultados, em torno de 30%, sendo que o tempo de 96 h atingiu a maior taxa de 32% de conversão.

Tabela 31 - Teor de conversão da celulase conforme o tempo de hidrólise enzimática

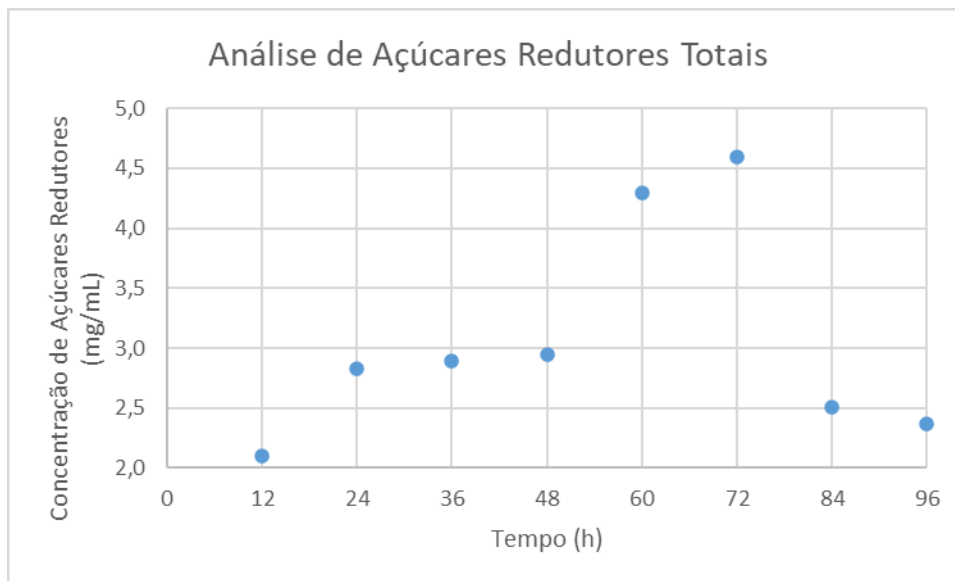
Tempo (h)	Biomassa Convertida (g)	Desvio Padrão	Teor de Conversão (%)
12	0,3029	0,014	25,69
24	0,3171	0,0074	26,32
36	0,3218	0,0149	26,79
48	0,3611	0,0136	31,43
60	0,358	0,0187	31,41
72	0,3747	0,0042	32,04
84	0,3485	0,0003	29,44
96	0,3871	0,0148	32,49

Na Tabela 32 e na Figura 20 estão os resultados da análise de açúcares redutores.

Tabela 32 – Concentração de ART conforme o tempo de hidrólise enzimática

Tempo (h)	Concentração de Açúcares Redutores Totais (mg/mL)	Desvio Padrão
12	2,097	0,274
24	2,832	0,057
36	2,899	0,157
48	2,942	0,425
60	4,298	0,015
72	4,591	0,035
84	2,503	0,408
96	2,372	0,201

Figura 22 – Gráfico da análise de ART em relação ao tempo de hidrólise enzimática.



A hidrólise enzimática com 72 h de processo apresentou o maior rendimento, 4,6 mg de açúcares redutores. Entretanto, o processo de hidrólise com 24 horas produziu 2,8 mg de ART, e 72 h correspondem a 3 dias, ou seja:

$$72 \text{ h} \text{ ----- } 3 \times 24\text{h}$$

$$4,6 \text{ mg} \text{ ----- } 3 \times 2,8 \text{ mg} = 8,4 \text{ mg}$$

Produção por tempo →

$$\frac{4,6}{72} = 0,06 \text{ mg de açúcares redutores totais por hora de hidrólise}$$

$$\frac{2,8}{24} = 0,12 \text{ mg de glicose por hora de hidrólise}$$

Portanto, como a produção em 24 h é maior do que em 72 h, decidiu-se utilizar esse tempo para a realização da etapa de hidrólise enzimática.

4.5.4 Processo de Hidrólise Enzimática

Com os melhores parâmetros avaliados, a etapa de hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se 155 μL do coquetel enzimático por grama de biomassa pré-tratada e um período de 24 horas.

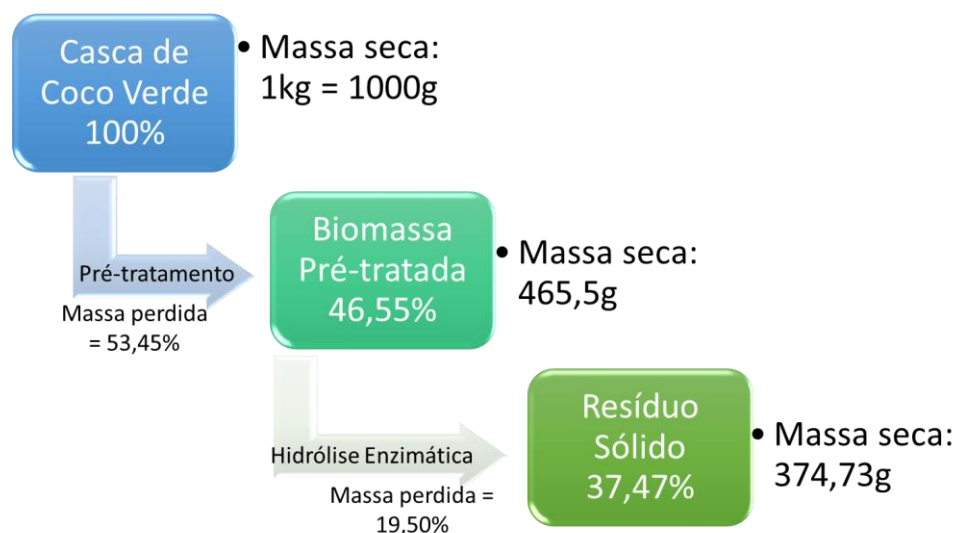
A Tabela 33 apresenta o teor de conversão desta etapa, 19,5%. Sendo assim, após a hidrólise enzimática, há a geração de um resíduo sólido, chamada de casca de coco hidrolisada, que representa 37,5% da casca de coco verde inicial, conforme esquema apresentado na Figura 21. De acordo com a análise de caracterização química, uma quantidade significativa desse resíduo é celulose, 14 %. Na Tabela 34 está a comparação dos teores de celulose na biomassa durante as etapas de produção de etanol 2G: casca de coco *in natura*, casca de coco pré-tratada e casca de coco hidrolisada. Esses resultados mostram que o coquetel enzimático hidrolisou apenas 4 % da celulose presente na casca de coco pré-tratada.

Pelas características químicas desse resíduo sólido, é possível utilizá-lo para a produção de outros materiais de alto valor econômico, formando uma economia circular. Alguns exemplos de processos biotecnológicos que podem utilizar a casca de coco hidrolisado como matéria-prima:

- Produção de nanocelulose vegetal;
- Produção de bio-óleo e de carvão ativado ou de biocarvão por pirólise;
- Utilização no processo de compostagem, em substituição ou em conjunto com a serragem para a manutenção da razão C/N;
- Utilização como reforço na produção de biocompósitos com matrizes poliméricas;
- Em uma opção menos sustentável, pode ser queimado para a geração de energia térmica.

Tabela 33 – Teor de conversão da hidrólise enzimática

Amostra	Massa Inicial (g)	Massa final (g)	Perda de Massa (g)	Teor de Conversão (%)	Desvio Padrão
1	15,2511	12,3008	2,9503	19,50	1,63
2	15,2758	12,6147	2,6610		
3	15,2604	11,9990	3,2614		
4	15,2999	12,2624	3,0376		

Figura 23 – Esquema do teor de conversão da biomassa**Tabela 34 – Comparação dos teores de celulose**

Biomassa	Teor de Celulose (%)
Casca do Coco <i>in natura</i>	28,34
Casca do Coco pré-tratada	18,36
Casca do Coco hidrolisada	14,00

Após a hidrólise enzimática, foi retirada uma alíquota de cada erlenmeyer para a análise de açúcares redutores totais e, esses resultados, são apresentados na Tabela 35.

Com a conversão de unidades, para comparação com outras pesquisas, no líquido hidrolisado da casca do coco verde há 44,5 mg de ART por litro. Fatmawati & Agustriyanto (2015), após pré-tratamento ácido seguido de uma hidrólise com duas enzimas, obtiveram 1152,5 mg/L de açúcares redutores totais. Ambos, Din et al. (2020) e Soares et al. (2017) trataram a fibra da casca do coco com NaOH, entretanto o primeiro utilizou a enzima Accelerase 1500 obtendo 2500 mg/L de ART e, o segundo, fez a hidrólise com o coquetel AlternaFuel e conseguiu 84 mg/L de ART. Com uma hidrólise enzimática de 48 h, também utilizando NaOH no pré-tratamento, Soares et al. (2016) obtiveram 70 mg/L, resultado inferior aos estudos anteriores. O melhor resultado com 13400 mg ART/L foi encontrado por Ferreira (2017), que utilizou H₂SO₄ no pré-tratamento seguido de um processo de desintoxicação por carvão ativado, e a hidrólise enzimática foi realizada utilizando um coquetel de celulasas e

várias hemicelulases. Para uma melhor visualização todos esses resultados estão na Tabela 43, ao final deste item.

Tabela 35 – Quantidade de açúcares redutores totais no líquido hidrolisado

Amostra	Absorbância	Concentração ART (mg/mL)	ART (mg/mL)	Desvio Padrão
1	32,3333	4,8022		
2	32,6190	4,8452		
3	30,0952	4,4659		
4	27,1429	4,0222		
5	31,2381	4,6377		
6	31,3333	4,6520	4,45	0,52
7	36,3333	5,4033		
8	22,6667	3,3496		
9	31,0952	4,6162		
10	27,9524	4,1439		
11	29,6667	4,4015		
12	27,3810	4,0580		

A análise cromatográfica do líquido hidrolisado, mostrada na Figura 22, detectou apenas 4 açúcares: sacarose, frutose, xilose e glicose, apresentando um teor de 1,382 g por 100 mL de solução. Com isso, o coquetel enzimático converteu 31,5 % da celulose em glicose.

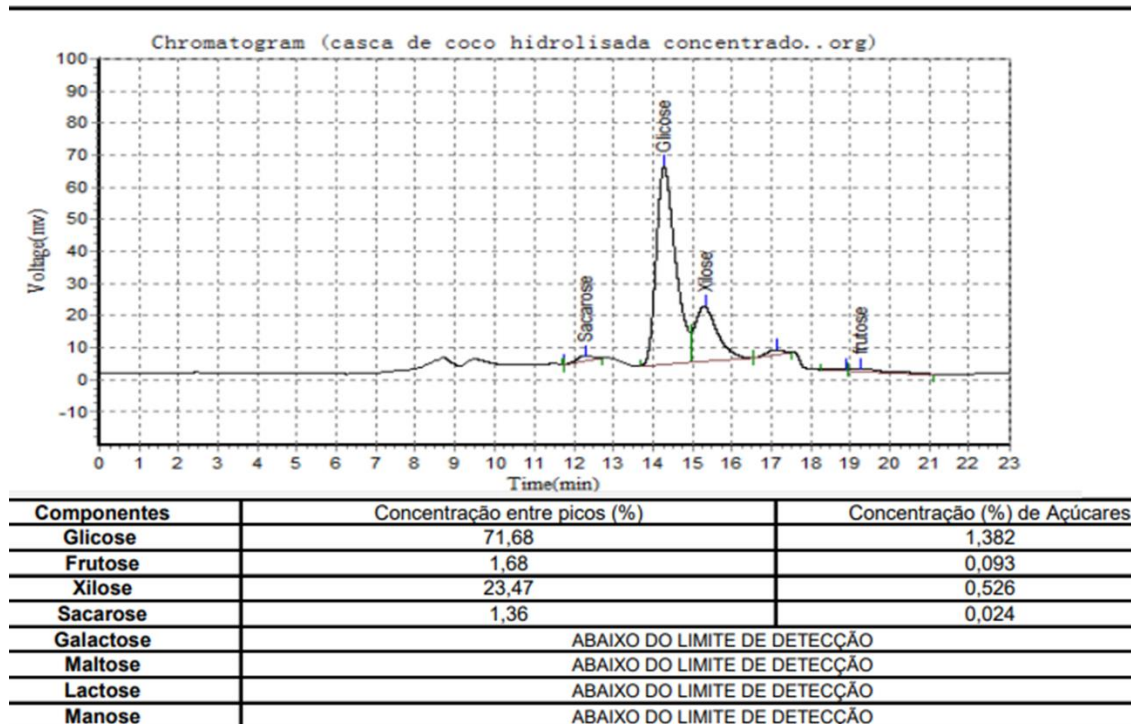
Esses resultados, teor de glicose e conversão de celulose, são inferiores aos encontrados na literatura. Em estudos com a casca do coco verde, Din et al. (2020) obteve 20 g/L de glicose e Vaithanomsat et al. (2011) atingiram 27 g/L. Em porcentagens, Soares et al. (2016 e 2017) conseguiram, respectivamente, 7% m/v e 4,5% m/v de glicose, e esses valores são três vezes superiores ao encontrado neste trabalho, 1,4 %.

NOGUEIRA et al. (2018) obtiveram uma conversão superior a 56% e EBRAHIMI et al. (2017), com um pré-tratamento organosolv acidificado seguido de hidrólise com uma celulase derivada do *Trichoderma reesei*, atingiram aproximadamente 82% de conversão.

GONÇALVES et al. (2018) usaram os mesmos reagentes utilizados neste estudo, clorito de sódio e ácido acético, porém em concentrações diferentes e a biomassa pré-tratada foi lavada com acetona, 20% m/v, e a hidrólise ocorreu com dois coquetéis enzimáticos Cellic Ctec 2 e Htec 2. Com essa metodologia a conversão da celulose

em glicose foi de 75%. Para melhor comparação, esses resultados são apresentados na Tabela 38, ao final deste item.

Figura 24 – Resultados na análise de cromatografia do líquido hidrolisado



Com esses dados é possível indicar que ocorreu algum problema no processo de hidrólise enzimática, e algumas possibilidades são:

- Alta taxa de lignina presente na casca do coco pré-tratada, 16 %;
- Produção de inibidores durante o pré-tratamento;
- Necessidade de um processo de lavagem das fibras, mais eficiente após o pré-tratamento;
- Perda da eficiência do coquetel enzimático utilizado na hidrólise;
- Inibição da enzima durante a hidrólise enzimática.
- Necessidade de um processo de detoxificação do líquido hidrolisado.

Entretanto, para a identificação e resolução desse problema são necessários mais testes e análises.

Os dados da análise dos nutrientes presentes no líquido hidrolisado estão na Tabela 36, e mostraram que esse material tem os mesmos macros e micronutrientes presentes no caldo da cana de açúcar. Souza (2012) estudou a influência dos minerais no metabolismo fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae* e concluiu que o cobre

(Cu) apresenta um efeito inibidor na produção de etanol, mesmo em baixas concentrações, e no líquido hidrolisado da casca do coco foram encontrados valores próximos ao limite máximo estabelecido pelo estudo. Um macronutriente muito importante para a produção de etanol, por participar das reações da glicólise é o potássio (K), e a sua concentração no hidrolisado não atingiu o limite mínimo estabelecido por Souza (2012), que é de 150 mg/L. Portanto, para melhorar a fermentação seria necessário o enriquecimento do meio de cultura com uma solução rica em potássio, como uma solução de KCl.

Tabela 36 – Análise de macros e micronutrientes do hidrolisado enzimático.

Macronutrientes	g/L	Micronutrientes	mg/L
N	0,78	Na	2790
P ₂ O ₅	0,09	Cu	0,8
K ₂ O	0,08	Fe	3,9
Ca	0,23	Mn	0,8
Mg	0,08	Zn	5,5
S	0,04		
C	26,67		

4.5.5 Fermentação Alcoólica

O processo de fermentação alcoólica produziu 0,46% v/v de etanol, conforme a Tabela 37. Esse resultado é inferior aos estudos da literatura, porém em todos os trabalhos pesquisados, Tabela 43, foram utilizado um período mínimo de 48 h para o processo fermentativo. Por exemplo, SOARES et al. (2017) fizeram o processo fermentativo em 8 dias (192 h) e produziram 3,8% v/v, ou seja, 8 vezes maior que o encontrado neste trabalho. EBRAHIMI et al. (2017) obtiveram a produção de aproximadamente 9,0 g de etanol/L com 72 h de processo simultâneo de hidrólise e fermentação. Ou seja, é possível que se o processo fermentativo não se encerrou com 24 h e a produção de etanol poderia ser maior que 4,62 g/L.

Tabela 37 – Teor de etanol.

Amostras	Teor de Etanol %v/v	Densidade g/cm³
1	0,4100	0,9976
2	0,5900	0,9973
3	0,3900	0,9976
Média	0,4633	0,9975
Desvio padrão	0,1102	0,0002

A Figura 23 apresenta um fluxograma mostrando que 1 unidade do fruto coco verde produz 0,006 L de etanol. A produção nacional em 2020 foi de 1951 milhões de frutos de coco verde, em uma área de 223057 hectares, o que resultou em um rendimento de 8747 frutos/ha. No setor econômico, são exportados apenas os produtos derivados do coco verde, como a água de coco, o coco ralado e o óleo de coco, além de movimentar o mercado interno com a venda do coco *in natura* para o consumo de sua água (BRAINER; XIMENES, 2020). Portanto, todo o resíduo dessa produção fica no país, ou seja, o Brasil tem a capacidade de produzir 11,7 milhões de litros de etanol de segunda geração proveniente da casca do coco verde.

Figura 25 – Fluxograma da produção de etanol 2G a partir do coco verde

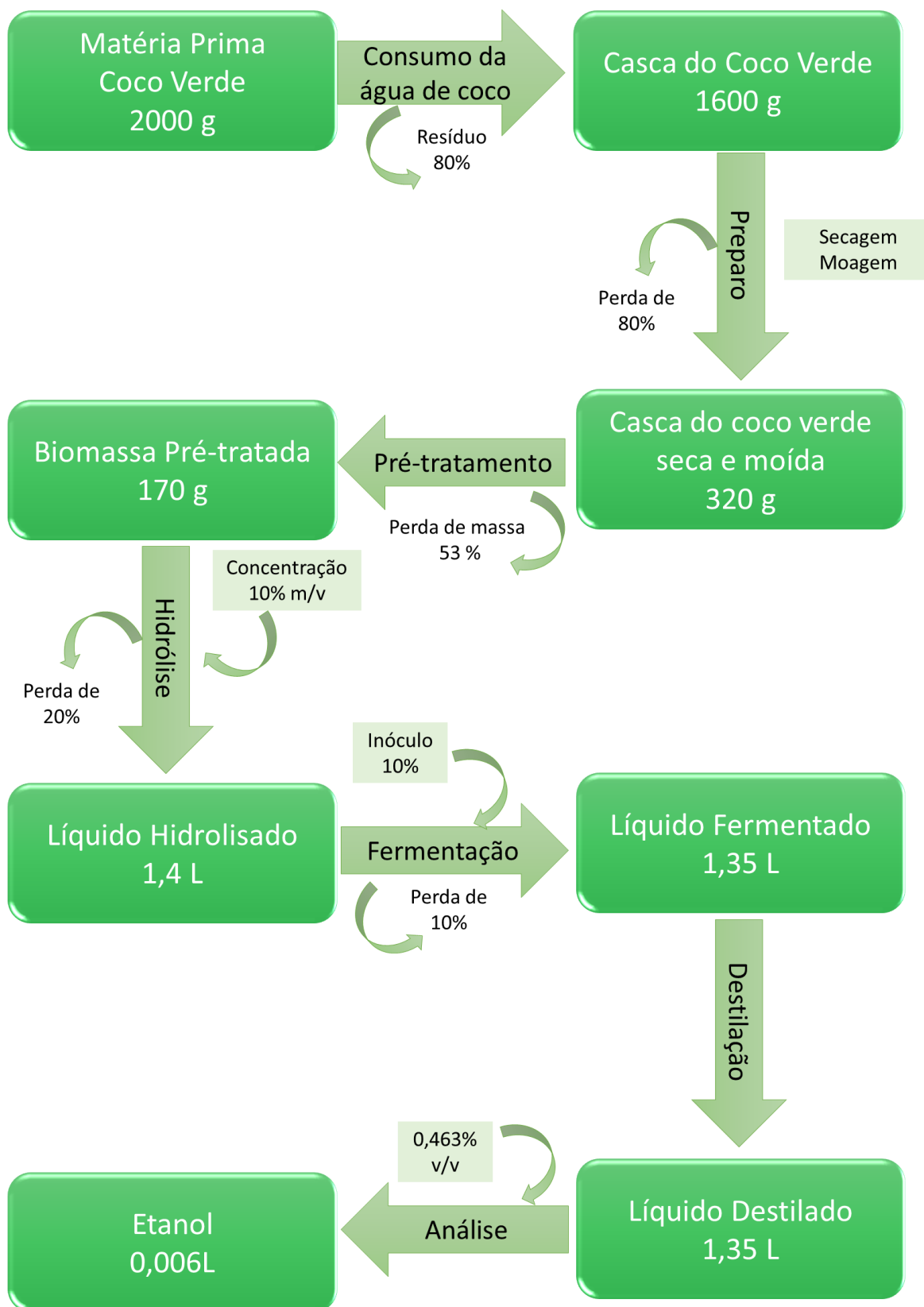


Tabela 38 – Comparação dos estudos com casca de coco verde citados no item 4 Resultados e Discussão

Estudos	Pré-tratamento			Hidrólise Enzimática					Fermentação			
	Processo	Resultado (%)		Enzimas	Tempo (h)	Resultado			Processo	Tempo (h)	Resultados	
		Celulose	Lignina			ART (mg/L)	Teor de Glicose (g/L)	Conversão de Celulose (%)			Teor de etanol (%v/v)	Teor de etanol (g/L)
Gonçalves (2018)	NaClO ₂ - 0,93% - C ₂ H ₄ O ₂ - 0,31%	54,8	2,9	Cellic Ctec 2 Htec 2	96	-	16 *12h de hidrólise*	90	-	-	-	-
	NaClO ₂ - 0,93% - C ₂ H ₄ O ₂ - 0,31% seguido de autohidrólise	74,2	4,7			-	22 *12h de hidrólise*	90,4	-	-	-	-
Nogueira (2018)	Alcalino - NaOH 2% combinado com Tween 80	44,4	25,3	celulase de <i>T. reesei</i> , β-glicosidade e xilanase	96	-	-	56	-	-	-	-
Din (2020)	Alcalino - NaOH 5%	55,6	22,3	Accellerase ® 1500	48	25	20 *24h de hidrólise*	-	-	-	-	-
Ferreira (2017)	Ácido - H ₂ SO ₄ 1,5% em autoclave com detoxificação com carvão ativado	-	-	Complexo enzimático com 7 enzimas	24	13,4	-	-	-	-	-	-
Fatmawati (2015)	Ácido - H ₂ SO ₄ 1,5% em autoclave	25,4	38,6	Celluclast 1,5 Novozymes 188	72	1153	-	-	-	-	-	-
Vaithanomsat (2011)	Alcalino - NaOH 25%	48,9	28,5	Celluclast 1,5 Novozymes 188	72	-	34	-	Separado	72	2,28	-
Soares (2016)	Alcalino - NaOH 1%	-	-	Alterna Fuel CMAX	96	-	50	-	Separado	72	3,73	-
Soares (2017)	Alcalino - NaOH 1% (batelada alimentada)	-	-	Alterna Fuel CMAX	96	-	45	-	Separado	192	3,8	-
Nogueira (2019)	Hidrotérmico pressurizado com detoxificação com PEG 400	26,1	32,7	Coquetel enzimático	96	-	-	23	Separado	48	-	7,87
Ebrahimi (2017)	Glicerol Aquoso Acidificado	48,6	32,8	Celulase comercial	72	-	-	-	Simultânea	72	-	8,97
Presente estudo	NaClO ₂ - 10% - C ₂ H ₄ O ₂ - 10%	39,5	16,1	Cellic Ctec3	24	44,5	13,8	31,5	Separado	24	0,46	4,62

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto, com base na economia circular, a utilização da casca do coco verde como matéria-prima para a produção de um bioproduto com valor agregado, o etanol 2G, como opção para minimizar os problemas ambientais e econômicos causados pelo descarte desse resíduo. Para isto foram estudadas as etapas da produção de etanol de segunda geração, com mais ênfase nos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Após testar algumas metodologias para o pré-tratamento foi escolhido utilizar clorito de sódio, 10 % m/v, em meio acidificado para tratar quimicamente a casca do coco verde. Para isso foi necessário o uso de métodos matemáticos de otimização de funções para a determinação das variáveis: tempo, temperatura, quantidade de adições de reagentes e concentração do ácido acético. Com isso, o pré-tratamento foi realizado com uma concentração de biomassa de 10 % m/v, com agitação mecânica, por 2 horas a 65 °C, com 3 adições de clorito de sódio e ácido acético 10 % v/v. Os resultados mostraram que o processo foi eficiente na deslignificação das fibras, pois diminuiu o número Kappa de 126 para 28 e reduziu em 68 % o teor de lignina, em comparação a biomassa *in natura*. Os teores de cinzas e extrativos também diminuíram, sendo ambos inferiores a 1 %. Entretanto, houve uma redução do teor de celulose, resultando em 18 % desse polímero na biomassa pré-tratada, e a mesma ficou mais acessível para a hidrólise enzimática, ou para ser utilizada na produção de nanocelulose vegetal.

Para a etapa de hidrólise enzimática foram inicialmente realizados testes com diferentes volumes de enzimas e em seguida foram analisados vários tempos de reação, utilizando o valor determinado na etapa anterior, 155 µL de coquetel enzimático por grama de biomassa pré-tratada. O período que mais produziu açúcares redutores totais foi de 3 dias, entretanto a produtividade de 1 dia foi superior à de 72 h. Por isso, essa etapa foi realizada a 50° C por 24 horas, e resultou em uma conversão de 2 % da celulose presente na casca de coco pré-tratada e produziu 13,8 g/L de glicose. Esses resultados, inferiores aos encontrados na literatura, mostraram que ocorreu algum problema na hidrólise enzimática da biomassa, e a provável causa indicada por alguns testes, foi a deterioração, ou desnaturação, do coquetel enzimático estocado no laboratório. Porém, com o resíduo sólido desta etapa é

possível produzir outros bioprodutos de valores agregados, como biocarvão, biogás e biocompósitos, entre outros.

Contudo, mesmo com o baixo rendimento da hidrólise enzimática foi realizada a etapa de fermentação alcoólica. O meio hidrolisado foi fermentado pela *Saccharomyces cerevisiae* a 32 °C por 24 h e produziu 0,46 % v/v de etanol de segunda geração. Com esse resultado foi calculado que é possível produzir 6 mL de etanol a partir de 1 unidade de coco verde.

Portanto, o Brasil, um dos maiores produtores e consumidores de coco verde, tem a capacidade de produzir anualmente mais de 10 milhões de etanol utilizando um resíduo sem valor econômico, a casca do coco verde.

REFERÊNCIAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 302**: Pastas celulósicas - Determinação do número Kappa. 1 ed. Rio de Janeiro: ABNT, p. 11, 2005.
- ABRIL, A. J.; NAVARRO, E. A. Etanol a partir de biomassa lignocelulósica. Aleta Ediciones. ISBN: 978-84-15225-50-8, 2012
- ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of Cellulase Activities**. Golden/Colorado. NREL/TP- 510-42628. 2008. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf>>. Acessado em fevereiro de 2019.
- ALBUQUERQUE, E. D. et al. Combined effects of high hydrostatic pressure and specific fungal cellulase improve coconut husk hydrolysis. **Process Biochemistry**, 2016. DOI:10.1016/j.procbio.2016.07.010
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–11, 2010. DOI: 10.1186/1754-6834-3-4
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. February, 2011. DOI: 10.1186/1754-6834-4-3
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Determinação da composição granulométrica NBR 7217. **ABNT- Associação Brasileira de Normas Tecnicas**. Rio de Janeiro, p. 3, 1987.
- BISSARO, B. et al. Fenton-type chemistry by a copper enzyme: molecular mechanism of polysaccharide oxidative cleavage. **bioRxiv**, p. 097022, 2016. DOI: 10.1101/097022
- BOLIVAR-TELLERIA, M. et al. Second-Generation Bioethanol from Coconut Husk. **Hindawi**, v. 2018, p. 20, 2018. DOI: 10.1155/2018/4916497 Review
- BRAINER, M. S. C. P. Produção de coco: o nordeste é destaque nacional. **Caderno**

Setorial ETENE, v. 3, n. 61, p. 1–25, 2018. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/80223/4296541/61_coco.pdf/c172dd8f-3044-f1db-5d0c-a94c5eb735e0

BRAINER, M. S. C. P.; XIMENES, L. F. Produção De Coco – Soerguimento Das Áreas Tradicionais Do Nordeste. **Caderno Setorial ETENE**. v. 5, n. 127, p. 1–15, 2020. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/80223/7724988/2020_CDS_127c.pdf/7fb2b558-1b93-b317-0b603e28e0f1fa2c#:~:text=NoBrasil%2Caprevisãopara,1%2C95bilhãodefrutos.&text=Em2019%2Cosaldoda,dequase todososprodutos.>.

BRONZATO, G. R. F. et al. Characterization of the pre-treated biomass of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) for the second generation ethanol production. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 655, n. 1, 2017. DOI: 10.1080/15421406.2017.1360696

BRONZATO, G. R. F. et al. Water hyacinth second-generation ethanol production: a mitigation alternative for an environmental problem. **Journal of Natural Fibers**, 2018. DOI: 10.1080/15440478.2018.1458000

BRONZATO, G. R. F. et al. Second generation ethanol made from coir husk under the biomass Cascade approach. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 693, n. 1, p. 107–114, 2019. DOI: 10.1080/15421406.2020.1723890

BULLER, S. L.; ORTEGA, E. **Sólidos Particulados**, 2012. Disponível em: <https://www.unicamp.br/fea/ortega/aulas/index631.htm>

CABRAL, M. M. S. et al. Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 10, 2017. DOI: 10.22409/engevista.v19i1.802

CARDOSO, M. S.; GONÇALEZ, J. C. Aproveitamento da casca do coco-verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de polpa celulósica. **Ciencia Florestal**, v. 26, n. 1, p. 321–330, 2016. DOI: 10.5902/1980509821126

CARRIJO, O. A.; LIZ, R. S. DE; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 533–535, 2006. DOI: 10.1590/s0102-05362002000400003

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000100031

CHYLENSKI, P. et al. Enzymatic degradation of sulfite-pulped softwoods and the role of LPMOs. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1186/s13068-017-0862-5

COELHO, G. D. et al. Produção e caracterização da celulase (cmcase) por fungo isolado da fase termofílica de um processo n compostagem em fermentação em estado sólido tendo bagaço de coco verde como substrato. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 323–338, 2018. ISSN: 2317-8469

CORRADINI, E. et al. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 837–846, 2009. DOI: 10.1590/s0100-29452009000 300030

DIN, N. A. S. et al. Bioconversion of coconut husk fibre through biorefinery process of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020. DOI: 10.1007/s13399-020-00895-8

DONINI, C. A. et al. Evaluation of a biosensor based on reduced graphene oxide and glucose oxidase enzyme on the monitoring of second-generation ethanol production. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, 2020. DOI: 10.1007/s10008-019-04471-7

EBRAHIMI, M. et al. Evaluation of Organosolv Pretreatment on the Enzymatic Digestibility of Coconut Coir Fibers and Bioethanol Production via Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Renewable Energy**, v. 109, p. 35, 2017. DOI: 10.1016/j.renene.2017.03.011

ERTAS, M. et al. Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed wheat straw followed by refining to produce fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 259–266, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.026

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **DOCUMENTOS 236**: Procedimentos para análise lignocelulósica. 2.7.1 Determinação de alfacelulose. Campina Grande: Embrapa Algodão, p 42 – 46, 2010. ISSN: 0103-0205. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/900898>.

FAOSTAL. **Coconuts Production**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>>. Acesso em: Setembro de 2019.

FATMAWATI, A.; AGUSTRIYANTO, R. Kinetic Study of Enzymatic Hydrolysis of Acid-Pretreated Coconut Coir. **ICCME**, v. 030012, 2015. DOI: 10.1063/1.4938297

FENGEL, D.; WEGENER, G.. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter: New York, 1989

FERREIRA, A. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. Importância econômica do coqueiro. In: EMBRAPA (Ed.). . **A Cultura do Coqueiro no Brasil**. 2. ed. Aracaju: EMPRAPA. p. 17–56, 1997. ISBN: 85-7383-025-5

FERREIRA, J. **Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus***. 2017. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto, 2017.

FIORELLI, J. et al. Painés de partículas monocamadas fabricados com resíduo de madeira e fibra de coco verde Monolayers particleboards manufactured with wood waste and green coconut fiber. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 105, p. 1–8, 2015. Disponível em: < www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura_impressao.asp?Article=17&Number=105&>. Acesso em: Outubro de 2019.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017. DOI: 10.21577/0100-4042.20170104

FONTES, H R; FERREIRA, J. M. S. **A cultura do Coco - Coleção Plantar, 48**. 1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 101. 2006. ISBN: 85-7383-353-X

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. Sistema de Produção para a Cultura do Coqueiro. **Sistemas de Produção 01 - Cultivares de coqueiro** (Embrapa Tabuleiros Costeiros, Ed.) Aracaju: EMBRAPA. 2002. Disponível em: <<http://www.cpa.tc.embrapa.br>>. Acesso em: Setembro de 2019.

FRANSEN, K. E. H. et al. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monoxygenases. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 298–303,

2016. DOI: 10.1038/nchembio.2029

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**, v. 131, p. 66–76, 2014. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.04.021

GONÇALVES, F. A. et al. Valorization , Comparison and Characterization of Coconuts Waste and Cactus in a Biorefinery Context Using - NaClO₂ – C₂ H₄ O₂ and Sequential - NaClO₂ – C₂ H₄ O₂ / Autohydrolysis Pretreatment. **Waste and Biomass Valorization**, 2018. DOI: 10.1007/s12649-018-0229-6

HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305–3316, 2010. DOI: 10.1021/bi100009p

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-45

IBGE. **Tabela 1613 - Produção de Coco-da-baía no Brasil**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>>. Acesso em: Setembro de 2019.

JORDAN, R. A. et al. Caracterização granulométrica de biomassa polidispersa pelo método de peneiramento mecânico. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 1, p. 102–113, 2016. DOI: 10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v36n1p102-113/2016

KLOCK, U. et al. Química da Madeira. 3ª Edição revisada. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p.86, 2005.

LEE, H. V; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 20, 2014. DOI: 10.1155/2014/631013

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**, v. 165, n. C, p. 3–8, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.127

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–14,

2013. DOI: 10.1186/1754-6834-6-41

MACHADO, B. A. S. et al. Obtenção de Nanocelulose da Fibra de Coco Verde e Incorporação em Filmes Biodegradáveis de Amido Plastificados com Glicerol. **Quimica nova**, v. 37, n. 8, p. 1275–1282, 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140220

MATTOS, A. et al. **Circular Técnica, 35 - Painéis Elaborados com Resíduos da Casca de Coco-Verde**. Fortaleza: EMPRAPA, 2011. ISSN 1679-2254

MENDES, J. M. **Obtenção de Nanocristais de Celulose a partir da Casca de Coco (*Cocos nucifera*)**. 2014. Trabalho de Graduação de Curso (Graduação em Engenharia de Energia). Universidade de Brasília - UnB, 2014.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M. **Estatística aplicada à química**. Teresina: EDUFPI. p. 89, 2010. ISBN: 978-85-746-3313-8

MORAES, S. L. et al. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista IPT**, v. 1, n. 4, p. 58–73, 2017.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817–830, 2010. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001

NASCIMENTO, R. J. A. **Monitoramento em tempo real da hidrólise enzimática do bagaço da casca de coco verde por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)**. 2016. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2016.

NOGUERA, P.; ABAD, M.; NOGUERA, V. Coconut coir waste, a new and viable ecologically - friendly peat substitute. **Acta Hort**, v. 517, p. 279 - 286, 2000. DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.517.34

NOGUEIRA, C. C. **Avaliação do uso de tensoativos nos pré-tratamentos ácido e alcalino diluídos da casca do coco verde e quantificação de água na pós-lavagem**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2017.

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 & Products**, v. 112, n. December 2017, p. 734–740, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.12.047

NOGUEIRA, C. C. et al. Pressurized water pretreatment to increase sugar production from green coconut. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 8, n. 3, p. 557–565, 2019a. DOI: 10.5380/rber.v8i3.65670

NOGUEIRA, C. 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**, v. 130, n. September 2018, p. 259–266, 2019b. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.091

NYKO, D. et al. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **Biocombustíveis - BNDES Setorial**, v. 32, p. 5–48, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000700023

OLIVEIRA, M. Entre açúcares e genes. **Revista Fapesp**, p. 86–91, 2012.

PACHECO, T. F. **Circular Técnica, 04 - Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?** Brasília: EMBRAPA, 2011. ISSN 2177-4420

PADILLA, E. R. D. et al. Produção e Caracterização Físico-Mecânica de Briquetes de Fibra de Coco e Palha de Cana-de-Açúcar Produção e Caracterização Físico-Mecânica de Briquetes de Fibra de Coco e Palha de Cana-de-Açúcar. **Revista Virtual de Química**, v. XX, n. 76, 2016. Disponível em: < <http://rvq.sbgq.org.br> > Acesso em: Outubro de 2019.

PAZ, E. C. S. et al. Alternativa de Exploração Sustentável dos Resíduos do Coco Verde para a Produção de Energia. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 6, n. 2, p. 318–345, 2017. DOI: 10.5380/rber.v6i2.49041

PEREIRA, M. B. **Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Engenharia de Processos, UFG, Goiânia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/9346>. Acesso em: Março de 2021.

PUTRINO, F. M. et al. Study of supercritical carbon dioxide pretreatment processes on green coconut fiber to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 309, n. February, p. 123387, 2020. DOI: /10.1016/j.biortech.2020.123387

QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 15079–15084, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1105776108

RAHIKAINEN, J. et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 108, n. 12, p. 2823–2834, 2011. DOI: 10.1002/bit.23242

RODRIGUES, L. A. et al. Qualidade de mudas de Moringa oleifera Lam. cultivadas em substratos com fibra de coco verde e compostos orgânicos. **Revista Ceres**, v. 63, n. 4, p. 545–552, 2016. ISSN: 0034-737X

ROSA, M. DE F. et al. **Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola** - Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical. v. 54. p.1 -6. Fortaleza: EMBRAPA. Disponível em: <www.cnpat.embrapa.br>. Acesso em Setembro de 2019.

SANTOS, F. A et al. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Quimica nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012000500025

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003. DOI: 10.1016/s1369-5274(03)00056-0

SILVA, A. C. DA. Reaproveitamento da casca de coco verde. **Revista Monografias Ambientais**, v. 13, n. 5, p. 4077–4086, 2014. DOI: 10.5902/2236130815186

SILVA, C. N. DA et al. Second-generation ethanol from pineapple leaf fibers. *Journal of Natural Fibers*, v. 17, n. 1, p. 113–121, 2020. DOI: 10.1080/15440478.2018.1469453

SILVA, R. et al. Aplicações de Fibras Lignocelulósicas na Química de Polímeros e em

Compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1436–1441, 2009 .

DOI: 10.1590/S0100-40422009000300010

SINGH, A. et al. Genetic modification : a tool for enhancing cellulase secretion. v. 14, p. 600–610, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2012.12.090

SIQUEIRA, L.A., ARAGÃO, W.M., TUPINAMBÁ, E. A. **Documentos 47 - A Introdução do coqueiro no Brasil**. Importância histórica e agrônômica. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. p. 24, 2002. ISSN 1678-1953 Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br>> Acesso em: Setembro de 2019.

SOARES, J. et al. Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 744–753, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.105

SOARES, J. et al. Fed-batch production of green coconut hydrolysates for high-gravity second- generation bioethanol fermentation with cellulosic yeast. **Bioresource Technology**, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.140

SOUZA, R. B. de. **Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta a composição mineral do meio**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Biotecnologia, UFPE, Recife, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/16666>. Acesso em: Março de 2021.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621–1651, 2008. DOI: 10.3390/ijms9091621

TAPPI 204 OM-97. **Solvent extractives of wood and pulp**. Atlanta, Georgia, USA. 1997.

TAPPI 222 OM-02. **Acid-insoluble lignin in wood and pulp**. Atlanta, Georgia, USA. 2006.

TAPPI 264 CM-97. **Preparation of wood for chemical analysis**. Atlanta, Georgia,

USA. 1997.

TAPPI T211 OM-02. **Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C**. Atlanta, Georgia, USA. 2002.

TAPPI T9 WD-75. **Holocellulose in wood**. Atlanta, Georgia, USA. 2015.

TEIXEIRA, G. M. et al. **Análise da Eficiência do pré-tratamento por Explosão a Vapor da Fibra do Mesocarpo do Coco**. UNIFACS, 2018. Disponível em: <<http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa>>. Acesso em Outubro de 2019.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 219–222, 2010. DOI: 10.1126/science.1192231

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

VASCONCELOS, N. M. DE; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. DE S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Embrapa**, v. 88, n. ISSN, p. 1679–6543, 2013.

VIIKARI, L.; VEHMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13–24, 2012. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.05.008

XIAO, Z. et al. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 115, n. 1–3, p. 1115–1126, 2004. DOI: 10.1385/abab:115:1-3:1115

ZANCHETTA, A. Celulases e suas aplicações. **Mundo das Leveduras**. UNESP: Rio Claro, 2013. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/mundoleveduras/2013/Celulases.pdf>>. Acesso em: Setembro de 2019.

ZHOU, J. et al. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 819–825, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.06.068

ZHOU, Y. et al. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 136–143, 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.137 0960-8524/Ó

ANEXO A – Tabela 5.1 da Estatística Aplicada à Química

Tabela 5.1 – Valor crítico para o quociente de Rejeição (Q) a diferentes níveis de confiança

N	Q₉₀	Q₉₅	Q₉₉
3	0,941	0,970	0,994
4	0,765	0,829	0,926
5	0,642	0,710	0,821
6	0,560	0,625	0,740
7	0,507	0,568	0,680
8	0,468	0,526	0,634
9	0,437	0,493	0,598
10	0,412	0,466	0,568

N = número de observações

Fonte: Tabela 5.1, página 58 da Estatística Aplicada à Química (MOITA e MOITA NETO, 2010)