



CENTRO UNIVERSITÁRIO SENAI CIMATEC  
MESTRADO EM GESTÃO E TECNOLOGIA INDUSTRIAL-GETEC

JOSÉ JULIO ARAÚJO RAMALHO

**ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA  
DA FIBRA DO COCO PARA PRODUÇÃO DO ETANOL 2G**

SALVADOR

2019

JOSÉ JULIO ARAÚJO RAMALHO

**ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA  
DA FIBRA DO COCO PARA PRODUÇÃO DO ETANOL 2G**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu do Centro Universitário SENAI CIMATEC como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Gestão e Tecnologia Industrial.

Orientadora: Dra. Lílian Lefol Nani Guarieiro  
Co-orientadora: Dra. Érika Durão Vieira

SALVADOR

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro Universitário SENAI CIMATEC

R165e Ramalho, José Júlio Araújo

Estudo do pré-tratamento alcalino e sacarificação enzimática da fibra do coco para produção do etanol 2g / José Júlio Araújo Ramalho. – Salvador, 2019.

98 f. : il. color.

Orientador: Profa. Dra. Lílian Lefol Nani Guarieiro.

Coorientador: Profa. Dra. Érika Durão Vieira.

Dissertação (Mestrado em Gestão e Tecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação, Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, 2019.

Inclui referências.

1. Etanol. 2. Fibra de coco. 3. Sacarificação. 4. Segunda geração - etanol. I. Centro Universitário SENAI CIMATEC. II. Guarieiro, Lílian Lefol Nani. IV. Vieira, Érika Durão. V. Título.

CDD: 333.794

JOSÉ JULIO ARAÚJO RAMALHO

**ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA  
DA FIBRA DO COCO PARA PRODUÇÃO DO ETANOL 2G**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Gestão e Tecnologia Industrial, Centro Universitário SENAI CIMATEC.

Aprovada em 05 de Março de 2018.

**Banca Examinadora**

---

Dra. Lílian Lefol Nani Guarieiro - Orientadora  
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia, Brasil.  
Centro Universitário SENAI CIMATEC

---

Dra. Érika Durão Vieira - Co-Orientadora  
Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil.  
Centro Universitário SENAI CIMATEC

---

Dra. Carine Tondo Alves - Examinadora Externa  
Doutora em Engenharia Industrial pela Universidade Federal da Bahia, Brasil.  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

---

Dr. Jeancarlo Pereira dos Anjos - Examinador Interno  
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia, Brasil.  
Centro Universitário SENAI CIMATEC

*Dedico este trabalho a minha esposa  
Claudenice e aos meus filhos: Judson,  
Cleijdane e Julycleid, que sempre  
incentivaram e apoiaram a minha  
vida acadêmica.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela sua proteção, força, coragem e determinação diante da vida.

A minha esposa Claudenice Borges Ramalho e aos meus filhos: Judson Borges Ramalho, Cleidjane Borges Ramalho Nunes e Julycleid Borges Ramalho, que sempre estão ao meu lado, apoiando minhas decisões.

As Professoras Dra. Lílian Lefol Guarieiro e Dra. Érika Durão Vieira pela orientação, difusão de seu conhecimento e esforços realizados nesse Trabalho.

Ao Professor Dr. Jeancarlo Pereira dos Anjos do SENAI CIMATEC e a Professora Dra. Carine Tondo Alves da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela participação na Banca Examinadora da Dissertação.

A Professora Bruna Aparecida S. Machado pela disponibilidade das análises no Laboratório de Alimentos do CIMATEC.

A Eliete Costa Alves, Ana Caroliny da Silva e Sento Sé e Janaína Nascimento Leite pela sua contribuição no desenvolvimento dos experimentos dessa pesquisa.

Aos Professores do Mestrado em Gestão e Tecnologia Industrial do SENAI CIMATEC pela transmissão dos seus conhecimentos.

Ao Senhor Marcelo de Souza Carvalho pela amizade, confiança e credibilidade que tem no meu profissionalismo.

A todos os colaboradores do SENAI - Alagoas, que sempre estão realizando com qualidade à educação profissional e tecnológica do Estado de Alagoas, através da busca constante pela melhoria contínua.

O **SENHOR** é o meu Pastor,  
nada me faltará.

Salmo 23:1

## RESUMO

O resíduo do coco verde, embora orgânico, apresenta lenta degradação, levando em média de 8 a 12 anos para se decompor. Esse fator se agrava à medida que o consumo da água de coco cresce e o resíduo é depositado em grande quantidade nas praias. O grande volume de casca de coco verde é levada aos aterros sanitários, tratadas como lixo, reduzindo o espaço do aterro e diminuindo a sua vida útil. Frente a este problema, surge a oportunidade do reaproveitamento desse resíduo para a produção do etanol de segunda geração (2G). O etanol 2G é obtido a partir da hidrólise das fibras de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na Terra. No entanto, sua molécula é bem protegida na parede celular e hidrolisá-la de forma eficiente é uma das barreiras a serem alcançadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento alcalino e sacarificação enzimática da fibra do coco verde para produção do etanol 2G. Os resultados das alterações de massa na fibra bruta, pré-tratada e sacarificada evidenciaram alterações no conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina desejáveis e compatíveis com o agente de hidrólise. As condições reacionais ótimas obtidas foram com concentração de peróxido de hidrogênio com média de 5,4%, a um tempo reacional de 2,5 horas e temperatura média de 80°C. Foi verificada a liberação de açúcares redutores totais, dentre eles açúcares fermentescíveis, na etapa de sacarificação utilizando o coquetel de enzimas ROHALASE®SEP.

**Palavras-chaves:** Pré-Tratamento; Fibra de coco; Sacarificação; Etanol de segunda geração.

## ABSTRACT

The residue of the green coconut presents slow degradation, taking in average 8 to 12 years to decompose. This factor is aggravated by the consumption of coconut water grows and the residue is deposited on the beaches in great quantity. The large volume of green coconut shells is taken to sanitary landfills, treated as waste, reducing landfill space and shortening her useful life. Facing this problem, there is an opportunity to reuse of this residue for the production of second generation ethanol (2G). Second generation ethanol is obtained from the hydrolysis of cellulose and hemicellulose fibers into fermentable sugars. Cellulose is the most abundant polysaccharide in Earth. However, this molecule is well protected in the cell wall and an efficient hydrolyses it is one of the barriers to be achieved. The objective of this work was to evaluate the effects of the alkaline pre-treatment and enzymatic saccharification of the green coconut fiber for production of the ethanol 2G. The results of the mass alterations in the rude fiber, pre-treated and saccharification evidenced alterations in the cellulose content, hemicellulose and desirable lignin and compatible with the hydrolysis agent. The conditions great reactional obtained were with concentration of peroxide of hydrogen with average of 5,4%, the a time reactional of 2,5 hours and medium temperature of 80°C. The liberation of sugars total reducers was verified, among them sugars fermentable, in the saccharification stage using the blend of enzymes ROHALASE®SEP.

**Keywords:** Pre-treatment; Coconut fiber; Saccharification; Second generation ethanol.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fluxograma do processo de obtenção do etanol 2G.....	29
<b>Figura 2</b> - Estrutura molecular da glicose $\beta$ -(1-4).....	32
<b>Figura 3</b> - Estrutura lignocelulósica da biomassa.....	33
<b>Figura 4</b> - Estrutura molecular da celulose.....	33
<b>Figura 5</b> - Estrutura molecular da xilose $\beta$ -D-(1,4).....	34
<b>Figura 6</b> - Estruturas químicas das moléculas básicas para a formação da lignina.....	34
<b>Figura 7</b> - Fração da estrutura da lignina.....	35
<b>Figura 8</b> - Efeito do pré-tratamento (sacarificação) sobre a estrutura lignocelulósica da biomassa .....	36
<b>Figura 9</b> - Patentes relacionadas à produção de biocombustíveis por país no período de 2014 a 2018.....	43
<b>Figura 10</b> - Estrutura do coco.....	52
<b>Figura 11</b> - Fluxograma das etapas da pesquisa.....	59
<b>Figura 12</b> - Preparo da amostra de fibra da casca de coco verde (a) amostra do coco verde; (b) fibra moída; (c) armazenamento das fibras.....	60
<b>Figura 13</b> - Procedimento experimental de deslignificação (a) agente químico; (b) fibra de coco; (c) início da hidrólise; (d) fim da hidrólise.....	61
<b>Figura 14</b> - Fibra após reação de hidrólise.....	61
<b>Figura 15</b> - Fluxograma da sacarificação enzimática.....	62
<b>Figura 16</b> - Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	67
<b>Figura 18</b> - Fotografia do material após análise de açúcares redutores totais ART.	70
<b>Figura 19</b> - Curva analítica da glicose.....	71
<b>Figura 20</b> - Padrão de glicose após reação com DNS.....	71
<b>Figura 21</b> - Aspectos visuais da fibra da casca de coco antes (a) e após o pré-tratamento (b) com $H_2O_2$ .....	72
<b>Figura 22</b> - Micrografias obtidas por MEV das amostras de fibra de coco verde.....	73
<b>Figura 23</b> - Curva termogravimétrica da fibra sem o pré-tratamento.....	74
<b>Figura 24</b> - Curva termogravimétrica para amostra de fibra de coco após o pré-tratamento alcalino.....	75
<b>Figura 25</b> - Curva termogravimétrica para amostra de fibra de coco após a sacarificação.....	76

<b>Figura 26</b> – Valores preditos versus observados do modelo quadrático para a resposta ARTFS.....	78
<b>Figura 27</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o modelo da resposta ARTFS.....	78
<b>Figura 28</b> – Superfície de Resposta do efeito das variáveis estudadas no pré-tratamento (a) tempo e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; (b) temperatura e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; e (c) temperatura e tempo.....	80
<b>Figura 29</b> – Valores preditos versus observados do modelo quadrático para a resposta % Perda Mássica.....	81
<b>Figura 30</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o modelo da resposta % Perda Mássica.....	81
<b>Figura 31</b> – Superfície de resposta do efeito das variáveis estudadas no pré-tratamento (a) tempo e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; (b) temperatura e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; e (c) temperatura e tempo.....	83
<b>Figura 32</b> – Composição da fibra da casca de coco verde bruta, pré-tratada e sacarificada.....	86
<b>Figura 33</b> – Cinética de sacarificação da casca de coco verde pré-tratada com ROHALASE®SEP.....	86
<b>Figura 34</b> – Cinética de sacarificação.....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Área colhida de cana de açúcar (hectares).....	21
<b>Tabela 2</b> - Principais países produtores de cana de açúcar em 2016.....	22
<b>Tabela 3</b> - Produção dos principais produtores de etanol em 2017.....	22
<b>Tabela 4</b> - Participação (%) da produção de etanol de cana de açúcar nos Estados do Brasil.....	23
<b>Tabela 5</b> - Classificação das matérias primas para produção de etanol segundo a complexidade do carboidrato.....	24
<b>Tabela 6</b> - Emissão de gases do efeito estufa na agricultura e industrialização da cana de açúcar.....	48
<b>Tabela 7</b> - Redução das emissões de CO <sub>2</sub> com base na matéria-prima do etanol por país.....	49
<b>Tabela 8</b> - Produção dos principais estados brasileiros produtores de coco, em 2017.....	53
<b>Tabela 9</b> - Área plantada, colhida e produção de coco das regiões do Brasil em 2017.....	53
<b>Tabela 10</b> - Estudo do pré-tratamento da casca do coco.....	56
<b>Tabela 11</b> - Planejamento experimental do pré-tratamento da fibra de coco verde (2 <sup>3</sup> + 3).....	63
<b>Tabela 12</b> - Concentrações das soluções padrão diluídas de glicose a partir de uma solução de concentração 1g/L.....	69
<b>Tabela 13</b> - Resultados do planejamento experimental da hidrólise da casca de coco verde.....	77
<b>Tabela 14</b> - Dados obtidos no pré-tratamento.....	84
<b>Tabela 15</b> - Dados obtidos na Sacarificação.....	84
<b>Tabela 16</b> - Balanço de massa da fibra nas etapas de pré-tratamento e sacarificação.....	85
<b>Tabela 17</b> - Dados da sacarificação da fibra pré-tratada do ensaio de Validação 1.87	

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Dados técnicos da enzima ROHALASE®SEP.....	62
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AEHC** - Álcool etílico hidratado carburante
- 1 G** - Primeira geração
- 2G** - Segunda geração
- FAO** - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
- RFA** - Associação dos Produtores de Combustíveis Renováveis
- UNICA** - União da Indústria de Cana de Açúcar
- UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas
- ISO** - Organização Internacional para Normalização
- PROÁLCOOL** - Programa Nacional do Álcool
- SHF** - Separação da hidrólise e fermentação
- SSF** - Sacarificação e Fermentação Simultânea
- SSCF** - Sacarificação e Co-Fermentação Simultânea
- SSSF** - Sacarificação e Fermentação Semi-Simultânea
- CBP** - Processamento Consolidado da Biomassa
- P&D** - Pesquisa e Desenvolvimento
- ATR** - Açúcares Totais Recuperáveis
- ART** - Açúcares Redutores Totais
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- ARTFS** - Açúcares Redutores Totais da Fibra Solubilizada
- FS** - Fibra Solubilizada
- GL** - Gay Lussac
- °C** - Grau Celsius
- t** - tonelada
- GEE** - Gases do Efeito Estufa
- MEV** - Microscopia Eletrônica de Varredura
- TGA** - Analisador Termogravimétrico
- DNS** - Dinitrosalicílico
- DSC** - Calorímetro Diferencial de Varredura
- TG** - Termogravimetria
- Eq** - Equivalente
- INPI** - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento

**DOE** - Planejamento Experimental

**sol.** - Solução

**RPM** - Rotação por Minuto

**FDN** - Fibra Detergente Neutra

**FDA** - Fibra Detergente Ácida

**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de Determinação

**g/L** – g/Litro



4.3.1	Pré-tratamento .....	60
4.3.2	Sacarificação.....	61
4.4	Ensaio de avaliação dos parâmetros do pré-tratamento.....	63
4.5	Ensaio de validação das condições de Pré-Tratamento.....	64
4.5.1	Ensaio 1 .....	64
4.5.1.1	Pré-tratamento.....	64
4.5.1.2	Sacarificação.....	65
4.5.2	Ensaio 2.....	65
4.5.2.1	Pré-tratamento.....	65
4.5.2.2	Sacarificação.....	66
4.5.3	Ensaio 3.....	66
4.5.4	Pré-tratamento .....	66
4.5.5	Sacarificação nos Ensaio de Validação 1, 2 e 3.....	66
4.6	Métodos Analíticos .....	67
4.6.1	Caracterização morfológica das fibras do coco verde por MEV .....	67
4.6.2	Análise Térmica.....	68
4.6.3	Análise Química das fibras .....	68
4.6.4	Análise Química de Açúcares Redutores Totais (ART).....	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
5.1	Sacarificação.....	70
5.2	Determinação de Açúcares redutores totais (ART).....	70
5.3	Microscopia.....	72
5.4	Análise Termogravimétrica.....	74
5.5	Determinação das condições ótimas de pré-tratamento.....	74
5.6	Validação do Resultado do Planejamento Experimental.....	84
5.6.1	Ensaio de Validação 1.....	84
5.6.2	Ensaio de Validação 2.....	85

5.6.3	Ensaio de Validação 3.....	87
6	CONCLUSÕES .....	89
7	DIVULGAÇÃO DA PESQUISA.....	90
8	SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	90
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de coco do mundo com a produção concentrada nos seguintes estados: Bahia, Sergipe, Pará, Ceará, Espírito Santo, Pernambuco, Alagoas, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro (IBGE, 2018).

Os materiais lignocelulósicos, como as fibras da casca de coco verde, são constituídos de estruturas muito resistentes, pois estes materiais têm função biológica estrutural cujo objetivo é manter a integridade do vegetal. Para cada matriz lignocelulósica, é necessário realizar um estudo do pré-tratamento para se obter melhores rendimentos (CABRAL, 2015).

A biomassa é uma alternativa para a geração de energia interessante por se tratar de materiais renováveis e constitui o principal resíduo da atividade agroindustrial. Neste panorama, a biomassa pode substituir algumas fontes não renováveis, como os derivados de petróleo (GROSSI, 2015).

O bioetanol é o etanol obtido por via bioquímica, considerado uma alternativa técnica e economicamente viável de biocombustível que pode ser utilizado em motores de automóveis. No Brasil o uso do bioetanol como combustível foi implementado pelo programa PROÁLCOOL no ano de 1975. Por meio deste programa, o Governo Federal ofereceu incentivos para a produção de etanol em larga escala com o objetivo de reduzir o consumo de combustíveis derivados do petróleo, como a gasolina (GROSSI, 2015).

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de bioetanol e utiliza o milho como matéria prima, enquanto, o Brasil é o segundo produtor e utiliza o caldo da cana de açúcar ou o melaço, que é subproduto da produção do açúcar. O bioetanol pode ser fabricado por outras fontes de carboidratos, como o milho em suas diferentes formas, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (UNICA, 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bioetanol e utiliza como matéria prima o caldo da cana de açúcar ou o melaço, que é subproduto da produção do açúcar. O bioetanol pode ser fabricado por outras fontes de carboidratos, como o milho em suas diferentes formas, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (UNICA, 2016).

O bioetanol oriundo de resíduos lignocelulósicos é denominado etanol de segunda geração (2G). Para produção de etanol 2G, podem ser aproveitados resíduos vegetais das atividades agrícolas (CHOFI e VALENÇA, 2009). Em geral, a agroindústria produz grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos, sendo estes renováveis, em grande disponibilidade e cada vez mais vem sendo aproveitado em diversas aplicações, como fertilização, produção de compósitos para a construção civil, na engenharia de materiais e atualmente biocombustível (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

Visando acompanhar a tendência mundial de se produzir biocombustíveis utilizando matérias primas de fontes renováveis e de menor impacto ambiental, a produção de etanol 2G a partir do aproveitamento de resíduos celulósicos aparece como uma alternativa sustentável.

Dentre as biomassas geradas no Brasil se destaca a casca de coco verde sendo esta uma alternativa para a produção de etanol 2G (CABRAL *et al.*, 2014). O consumo do coco *in natura* produz resíduos sólidos, descartados em locais inadequados onde são comercializados, como parques e calçadas, e/ou sendo amontoados em terrenos baldios como lixo urbano (PAZ *et al.*, 2017). Esta é uma solução racional para acompanhar o ritmo de crescimento populacional do país e do mundo que acarreta na maior demanda de energia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o pré-tratamento alcalino e posterior sacarificação enzimática da celulose da fibra da casca de coco verde para produção de etanol 2G utilizando a enzima ROHALASE®SEP.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Executar o pré-tratamento por hidrólise alcalina com peróxido de hidrogênio, através das principais variáveis (Temperatura, Concentração e Tempo de reação) utilizando o planejamento e análise de experimentos;
- Avaliar os efeitos (alterações na estrutura química da celulose) do pré-tratamento na fibra da casca de coco por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e Análise Termogravimétrica;
- Determinar a melhor condição do pré-tratamento por hidrólise alcalina para a produção do etanol 2G através da sacarificação enzimática com a enzima ROHALASE®SEP.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Indústrias Sucroalcooleiras do Brasil e do mundo

O setor sucroalcooleiro é de grande importância para o desenvolvimento da economia brasileira, pois é uma das principais atividades produtivas do país. As empresas que pertencem a esse setor sempre estão buscando aumentar sua área plantada. Assim, sempre estão investindo em pesquisas para desenvolver variedades de cana de açúcar que apresentem maior produtividade (UNICA, 2016).

Segundo o IBGE (2018), a área colhida com cana de açúcar do Brasil e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2017 foi estimada em 9.289.176 hectares, distribuídas em todos estados produtores conforme suas características. O estado de São Paulo permanece como o maior produtor com 50,9% (4.728.978 hectares) da área plantada, seguido por Minas Gerais 9,8% (912.059 hectares), Goiás com 10,1% (938.039 hectares), Mato Grosso do Sul com 7,6% (702.584 hectares), Paraná com 6,9% (645.353 hectares), Alagoas com 3,0% (282.289 hectares) e Pernambuco com 3,1% (291.237 hectares). Nos demais estados produtores, as áreas são menores, com representações abaixo de 3%.

O Brasil produziu 768,7 milhões de toneladas de cana de açúcar na safra de 2016, mas na safra seguinte apresentou uma redução de 10,52%, produzindo 687,8 milhões de toneladas de cana de açúcar em 2017. A produção de cana do país é atribuída principalmente a Região Centro-Sul. Na safra 2017, a Região Norte-Nordeste produziu 52,8 milhões de toneladas, enquanto a Região Centro-Sul atingiu 635 milhões de toneladas (IBGE, 2018).

Conforme a Tabela 1, a Região Centro-Sul apresentou em 2017, uma área colhida de 8,3 milhões hectares, superior à da Região Norte-Nordeste que apresentou 962,6 mil hectares de cana de açúcar colhidos.

**Tabela 1 - Área colhida de cana de açúcar (hectares)**

Região/Safra	2014	2015	2016	2017
Centro-Sul	9.181.892	9.101.423	9.167.946	8.326.544
Norte-Nordeste	1.255.675	1.184.552	1.058.259	962.632
<b>Brasil</b>	<b>10.437.567</b>	<b>10.285.975</b>	<b>10.226.205</b>	<b>9.289.176</b>

Fonte: IBGE (2018).

Além do Brasil outros países concorrem pelo mercado internacional de açúcar e álcool produzidos da cana de açúcar. A Tabela 2 apresenta dados dos principais países produtores desta matéria prima.

**Tabela 2** - Principais países produtores de cana de açúcar em 2016

<b>País</b>	<b>Produção anual (t)</b>
Brasil	768.678.382
Índia	348.448.000
China	123.059.739
Tailândia	87.468.496
Paquistão	65.450.704
México	56.446.821
Colômbia	36.951.213
Austrália	34.403.004
África do Sul	15.074.610
Cuba	18.890.972

Fonte: FAO (2018).

O Brasil mantém cerca de 366 usinas em operação, que adotam constantemente novas tecnologias que são empregadas desde o plantio até a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade. Esse setor da agroindústria brasileira é reconhecido mundialmente por seu pioneirismo na produção de biocombustíveis e sua eficiência produtiva (UDOP, 2017).

Segundo o acompanhamento realizado pela Associação de Combustíveis Renováveis - RFA (2018) sobre a produção de etanol 1G destacada na Tabela 3, o Brasil se situa na segunda posição perdendo apenas para os EUA que produz etanol 1G amiláceo a partir do milho.

**Tabela 3** - Produção dos principais produtores de etanol em 2017

<b>Países</b>	<b>Milhões de Galões</b>
Estados Unidos	15.800
Brasil	7.060
União Europeia	1.415
China	875
Canadá	450
Tailândia	395
Argentina	310
Índia	280
Resto do Mundo	465

Fonte: RFA - Renewable Fuels Association (2018).

Conforme a Tabela 4, os estados do Brasil que mais contribuem com a produção de etanol 1G derivado da cana de açúcar são: São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Mato Grosso, Alagoas, Paraíba e Pernambuco. Os estados da Região Centro-Sul são os que mais produzem etanol derivado da cana. No período de 2016/2017 a Região Centro-Sul foi responsável por cerca de 94,12% (Tabela 4) da produção de etanol realizada no país.

**Tabela 4 - Participação (%) da produção de etanol da cana de açúcar dos Estados do Brasil**

<b>Estado/Safra</b>	<b>2012/2013</b>	<b>2013/2014</b>	<b>2014/2015</b>	<b>2015/2016</b>	<b>2016/2017</b>
Acre	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01
Alagoas	2,34	1,75	1,95	1,25	1,41
Amazonas	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
Bahia	0,67	0,64	0,84	0,73	0,39
Ceará	0,02	0,03	0,03	0,05	0,02
Espírito Santo	0,76	0,66	0,59	0,50	0,22
Goiás	13,48	14,12	14,79	15,51	16,09
Maranhão	0,69	0,61	0,63	0,62	0,47
Mato Grosso	4,20	4,02	4,10	4,39	4,48
Mato Grosso do Sul	8,25	8,12	8,80	9,19	9,94
Minas Gerais	8,58	9,67	9,58	10,15	9,69
Pará	0,14	0,14	0,14	0,14	0,12
Paraíba	1,32	1,18	1,48	1,14	1,04
Paraná	5,59	5,41	5,74	5,21	4,97
Pernambuco	1,18	1,08	1,23	1,16	1,23
Piauí	0,14	0,12	0,11	0,11	0,08
Rio de Janeiro	0,16	0,31	0,31	0,19	0,30
Rio Grande do Norte	0,31	0,21	0,31	0,30	0,22
Rio Grande do Sul	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
Rondônia	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03
Santa Catarina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
São Paulo	50,94	50,75	48,18	48,22	48,42
Sergipe	0,48	0,38	0,49	0,37	0,24
Tocantins	0,68	0,71	0,62	0,70	0,60
<b>Região Centro-Sul</b>	<b>91,97</b>	<b>93,08</b>	<b>92,10</b>	<b>93,36</b>	<b>94,12</b>
<b>Região Norte-Nordeste</b>	<b>8,03</b>	<b>6,92</b>	<b>7,90</b>	<b>6,64</b>	<b>5,88</b>
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Fonte: Elaboração Própria utilizando-se de dados a UNICA (2018).

No Nordeste a produção de açúcar e álcool é uma das principais atividades econômicas da Região, que gera renda e emprego principalmente nos períodos de safra (CONAB, 2016). A colheita da cana de açúcar ocorre entre os meses de setembro a abril, enquanto na região Centro-Sul a produção é realizada entre abril a novembro. Esses períodos de safra ocorrem no período de maturação da cana que depende do sistema de cultivo adotado, variedade, região de cultivo e outros fatores, como as condições climáticas (ROSSETTO, 2016).

### 3.1.1 Matérias primas para a produção do etanol

A produção de etanol no Brasil é predominantemente por via fermentativa a qual é muito diversificada pela ampla quantidade de matérias primas que podem ser utilizadas (CABRAL, 2015). Dependendo da complexidade do açúcar, as matérias primas para a produção de etanol são classificadas conforme a Tabela 5:

**Tabela 5** – Classificação das matérias primas para a produção de etanol segundo a complexidade do carboidrato.

Classificação	Matérias Primas
Açucaradas	Suco de frutas, a cana de açúcar e seus derivados.
Amiláceas	Mandioca, batata doce, milho, arroz, dentre outras.
Lignocelulósicas	Palha da cana, palha do milho e casca de coco.

Fonte: Adaptado de Wolf (2011).

As matérias primas açucaradas são compostas basicamente de glicose, frutose e/ou sacarose, os quais estão praticamente disponíveis a ação dos agentes de fermentação etanólica, o que caracteriza como sua grande vantagem tecnológica tornando o processo muito mais simples para ser conduzido. No caso das matérias primas amiláceas são constituídas basicamente por amilose e amilopectina que juntos formam o amido, neste caso a desvantagem é a necessidade que se estabeleça a gelatinização do amido e posterior hidrólise por via ácida ou enzimática liberando as moléculas de glicose que sofrerão a conversão em etanol pela ação de leveduras. Para a obtenção do etanol a partir de material lignocelulósico, é preciso realizar as seguintes etapas para disponibilizar os açúcares fermentescíveis:

beneficiamento do vegetal, hidrólise química e hidrólise enzimática (SALLA e CABELLO, 2010). A desvantagem tecnológica é a rigorosa hidrólise que despende altos custos para solucionar os danos causados pelos ácidos ou pelo alto valor de mercado das enzimas.

De acordo com Macêdo (2012), o bagaço da cana, uma das biomassas mais abundantes da Terra, possui a seguinte composição: 48,11% C (carbono); 5,87% H (hidrogênio); 0,48% N (nitrogênio); 45,54 % O (oxigênio). Já a casca de arroz apresenta os seguintes teores: 47,30% de carbono; 6,08% de hidrogênio; 0,92% de nitrogênio; 45,70% de oxigênio.

O etanol elaborado pela utilização de mostos de matérias primas amiláceas e/ou açucaradas é conhecido como etanol 1G, enquanto que o produzido a partir de biomassa é o etanol 2G. Trata-se de um processo com drásticas condições físico-químicas, as quais requerem a utilização de agentes químicos como ácidos ou álcalis que causam corrosão nos equipamentos. Além disso, geram resíduos inibidores de enzimas que ocasiona em menores valores de rendimento (ANDRIETA e ANDRIETA, 2009).

O Brasil tem um grande potencial para utilizar a biomassa, bagaço e da palha da cana, para produzir etanol 2G, pois possui essa biomassa de forma abundante em seu território principalmente nas regiões que sobrevivem da monocultura da cana. Porém, não está descartada a possibilidade de utilização de outras biomassas residuais da atividade agroindustrial, como a casca de coco verde e entre outras (WOLF, 2011).

O aproveitamento dessas matérias-primas além de promover o desenvolvimento sustentável, permite a geração de renda, emprego e o crescimento sustentável da sociedade. Anualmente, 50 bilhões de toneladas de biomassa são produzidas no mundo (GROSSI, 2015), ocupando extensos espaços geográficos, que poderiam ter uma utilização viável, ambientalmente e economicamente.

A biomassa vegetal é uma matéria-prima que armazena energia, resultante de processos fotossintéticos, nas ligações de moléculas orgânicas como os polissacarídeos para posteriormente serem utilizadas nos processos biológicos (metabolismo energético) e termoquímicos (combustão).

### 3.1.2 Produção de Etanol 1G

Atualmente, o etanol consumido no mundo é produzido principalmente a partir da cana de açúcar, da beterraba e do milho (etanol de primeira geração - 1G). O consumo crescente de etanol 1G derivado da cana de açúcar tem causado a modernização do setor sucroalcooleiro do Brasil, pois as empresas estão investindo cada vez mais em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) para desenvolver novas variedades de cana de açúcar que apresentem maior produtividade. Ainda assim, a necessidade de expansão de terras agriculturáveis leva esta tecnologia a concorrer com a produção de alimentos (SALLA e CABELLO, 2010). A produção de etanol da cana de açúcar apresenta como gargalo, a prática da monocultura, ocupando extensas áreas que poderiam ser destinadas ao desenvolvimento da fauna e da flora. Para minimizar os impactos ambientais dessa atividade econômica, as empresas que pertencem ao setor sucroalcooleiro estão investindo em novas tecnologias, que permitem aproveitar os subprodutos oriundos do processo produtivo, como fonte de energia renovável (BIAGGI *et al.*, 2015).

A demanda por etanol 1G tem aumentado em consequência das políticas ambientalistas que incentivam a sua produção, como a inclusão no mercado de veículos que usam o etanol em substituição à gasolina, ou utilizam ao mesmo tempo a mistura destes combustíveis (CHOHFI; VALENÇA, 2009).

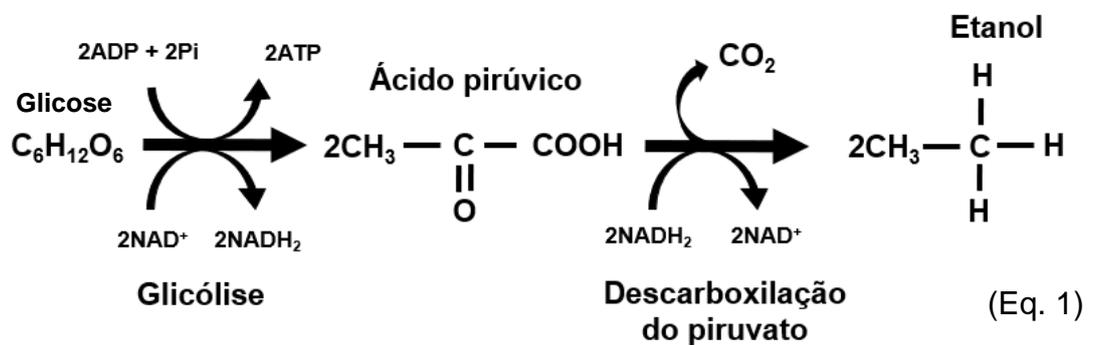
A utilização do etanol 1G derivado do milho apresenta as mesmas limitações que o derivado da cana de açúcar: sua plantação exige áreas de cultivo ainda mais extensas que as da cana de açúcar, causando assim um problema de desmatamento e gerando conflitos sobre o uso da terra para combustível e alimentos.

Outra fonte de etanol 1G que está sendo analisada é a mandioca, que apresenta menor dispêndio de energia no processo de produção do bioetanol quando comparado em relação ao milho e a cana de açúcar (SALLA e CABELLO, 2010).

A produção de etanol de primeira geração (1G) apresenta as seguintes etapas: beneficiamento, pré-tratamento, fermentação, centrifugação e destilação, originando o álcool hidratado à 96° GL.

### 3.1.3 Fermentação etanólica

A etapa de transformação dos carboidratos em etanol, seja ele 1G ou 2G, é a fermentação etanólica. De acordo com Martins e Jesus Júnior (2014) a fermentação etanólica consiste da quebra de uma molécula de glicose gerando como produtos duas moléculas de etanol e duas de dióxido de carbono, conforme mostrado pela equação estequiométrica da fermentação alcoólica descrita abaixo.



O agente da fermentação etanólica utilizado nos processos industriais é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que, a partir da oxidação parcial da glicose, produz o etanol como resíduo metabólico, assim como o  $\text{CO}_2$ . Esta atividade celular ocorre na ausência de oxigênio; portanto, constitui-se de um processo anaeróbico. Nos processos bioquímicos celulares, o etanol é um metabólito secundário da via glicolítica quando há ausência de oxigênio e ainda pode ser metabolizado na presença de oxigênio gerando energia celular na forma de ATP (ANDRIETA e ANDRIETA, 2009).

O processo industrial de produção de etanol pode ser conduzido de forma contínua ou em batelada. No processo contínuo, o mosto (caldo de cana ou melaço enriquecido) é continuamente alimentado na primeira dorna que é interligada a outras subsequentemente sendo retirado o vinho levedado na última, com grau alcoólico em torno de 7-9°GL.

No processo em batelada é adicionado mosto e a levedura em dornas isoladas e fermentadas individualmente e, após um período que varia para cada processo, o mosto fermentado é encaminhado para as centrífugas visando à separação da levedura do vinho. O vinho de levedado segue para a destilação onde ocorre o aumento do teor alcoólico com a consequente retirada de água, e o

fermento segue para as etapas de tratamento e recuperação para ser aproveitado em uma nova fermentação (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014).

### **3.2 Processos de Produção de Etanol de 2G**

O etanol 2G é um combustível renovável que resulta da utilização da biomassa lignocelulósica, como o bagaço da cana de açúcar, capim elefante, palhas e a fibra do coco verde. Além dessas biomassas lignocelulósicas, Santos *et al.* (2012) e dentre outros autores destacam as seguintes fontes para a produção de etanol 2G: madeira dura, madeira mole, talo de milho, espiga de milho, algodão, palha de trigo, sisal, palha de arroz, forragem de milho, fibra de bananeira e palha de cevada, que são compostos por carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio.

O processo de transformação da biomassa em etanol tem em vista duas etapas principais: o pré-tratamento químico, utilizado para a remoção da fração amorfa constituída de lignina e o tratamento enzimático, para conversão da fração hemicelulósica em açúcares fermentescíveis (a fração amorfa). Esta fração amorfa pode ser aproveitada como combustível em geradores de vapor por possuir um potencial poder calorífico e, posterior, aproveitamento da energia produzida pela própria planta industrial em seus acionamentos, aquecimento e produção de eletricidade (LIMA, 2011).

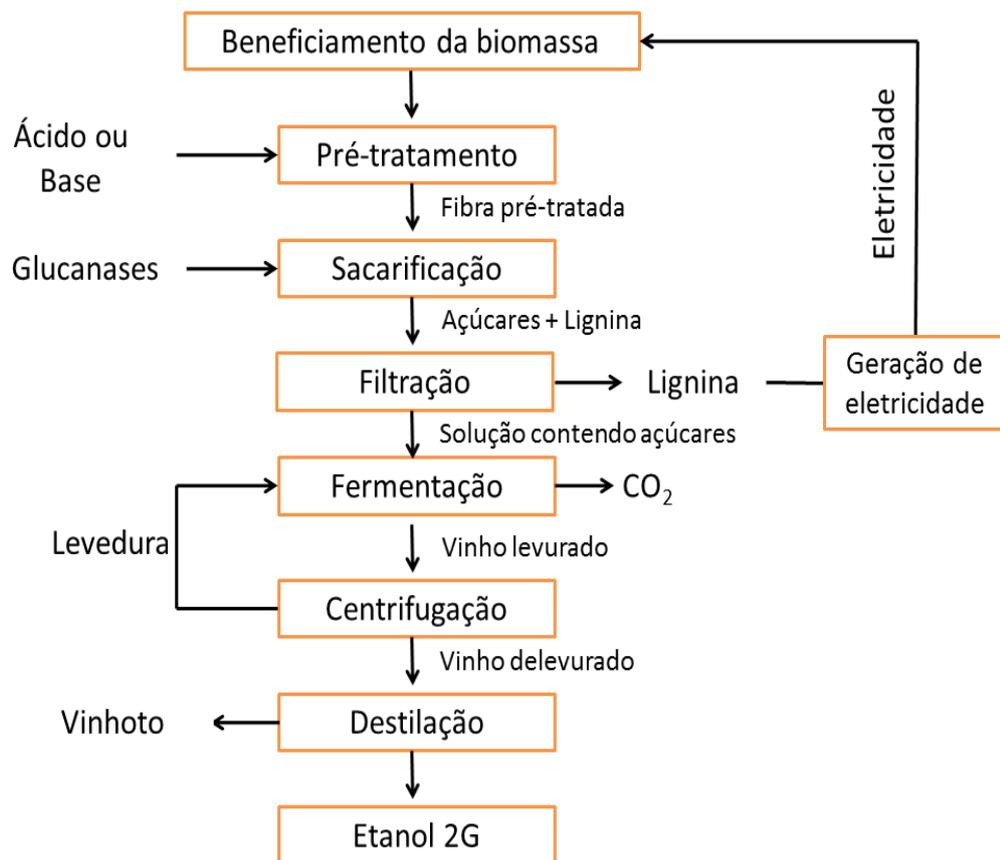
A primeira etapa da produção de etanol 2G consiste no uso de agentes químicos para quebrar as macromoléculas de lignina e expor as fibras de celulose. Este ataque químico não é seletivo e, a depender da concentração, tempo e temperatura empregados no processo, as moléculas de celulose e hemicelulose podem sofrer hidrólise parcial (CABRAL, 2015). Por esse motivo, é necessário estabelecer ótimas condições de processamento do material lignocelulósico.

Na etapa de hidrólise enzimática, Balat (2011) utilizou um complexo enzimático contendo diversos tipos de celulasas, permitindo a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis, em temperaturas medianas na faixa de 40°C a 60°C durante 6 a 12 horas. Os resultados mostraram conversão de 76% de glicose para SSF e 89 % com SSCF.

Sátiro *et al.* (2012) utilizou no pré-tratamento 5g da fibra de coco em solução NaOH, que obteve um precipitado escuro e na via ácida usou 0,1M em refluxo por 30 minutos, resultando uma solução alaranjada.

Após a hidrólise enzimática, submete-se a biomassa liquefeita à fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* e em seguida a destilação, sendo cada uma delas monitoradas por análises físico-químicas. Dependendo das necessidades, outras técnicas analíticas podem ser empregadas (CABRAL, 2015). A Figura 1 apresenta o fluxograma do processo de produção de etanol 2G.

**Figura 1** - Fluxograma do processo de obtenção do etanol 2G



Fonte: Adaptado de Wolf (2011).

Conforme Martis *et al.* (2014), as etapas do processo de obtenção do etanol 2G são:

- **Beneficiamento**: Processo de obtenção da fibra o qual é feito mecanicamente com a utilização de um conjunto de equipamentos de cisalhamento e pressão, utilizando-se de técnicas de separação

mecânica das fibras: trituração, prensagem e moagem. Quanto melhor for o condicionamento do resíduo lignocelulósico, ou seja, quanto menor for o tamanho da fibra, melhor será o rendimento líquido da conversão de celulose em glicose livre para a conversão em etanol. No processo de beneficiamento as fibras de coco são aquecidas em estufa, que permite a remoção da umidade, possibilitando a moagem no multiprocessador, que depois da fibra moída é peneirada para posterior armazenamento em recipiente plástico.

- **Pré-tratamento:** Visa quebrar a matriz da fibra, reduzir a cristalinidade da celulose, hemicelulose, hidrolisar a lignina, aumentar a porosidade dos materiais. No processo é utilizado o agente químico, alcalino, para promover a deslignificação da fibra. Esta etapa atualmente é uma das mais caras na tecnologia de produção de etanol de segunda geração e crucial para a viabilização de bons rendimentos em açúcares fermentescíveis.
- **Sacarificação:** A hidrólise ou sacarificação das fibras de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis pode ser efetuada por via química ou biológica. A via química é mais rigorosa, pois requer condições mais agressivas de processamento gerando compostos inibidores e de baixo rendimento. A hidrólise biológica, por outro lado, é conduzida em condições brandas de temperatura e apresenta alta seletividade e rendimento. A sacarificação tem a finalidade de hidrolisar as moléculas de celulose e de hemicelulose pela adição de ácido sulfúrico (hidrólise ácida) ou pela adição de enzimas (hidrólise enzimática) para obter açúcares fermentescíveis.
- **Fermentação:** Consiste no processo da transformação bioquímica dos açúcares fermentescíveis (glicose e outras hexoses e pentoses) em etanol pela ação de leveduras. Nesse processo é utilizado leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* que realiza a fermentação etanólica do hidrolisado, pois, as leveduras agiram sobre os açúcares fermentescíveis da solução.

- **Destilação:** Processo de separação de misturas líquidas em componentes puros e realização da vaporização e condensação, produzindo o etanol de 2G.

Existem muitos trabalhos publicados sobre a produção de etanol 2G a partir de materiais lignocelulósicos, em especial, resíduos agroindustriais e bagaço de cana de açúcar. Entre as pesquisas realizadas destaca-se Maugeri Filho e Atala (2006), Sant'Anna *et al.* (2007), Sant'Anna (2008), Nolasco Júnior *et al.* (2013), Gonçalves *et al.* (2014), Jessen *et al.* (2014), Karstens (2014), Martins *et al.* (2014), Cabral (2015), Narendranath e Carlson (2015), Silva Neto *et al.* (2015), Narendranath (2015), Retsina *et al.* (2016), Cabral (2017), Granbio (2017) e Raizen (2018). O processo de obtenção de etanol 2G não atingiu um padrão básico, ou seja, uma estratégia para conduzir as etapas de produção de modo a atingir resultados relevantes e economicamente viável.

Existem poucos estudos na literatura sobre o uso da fibra da casca de coco verde para produção de etanol 2G. Dentre tais estudos, pode-se destacar o desenvolvido por Cabral *et al.* (2014). Para avaliar a quantidade de açúcares liberados na fração líquida da solução para a obtenção de etanol de segunda geração, os autores avaliaram dois tipos de pré-tratamento químico (ácido e alcalino) na fibra da casca do coco. O melhor pré-tratamento foi o alcalino que utilizou hidróxido de sódio a 5% durante 40 minutos, apresentando concentração média de 44,72g de açúcar por 100g da amostra. No teste de capacidade fermentativa, os autores utilizaram dois tipos de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*) onde se observaram melhores resultados na fermentação com 0 e 5% de ácido sulfúrico, ambos inoculados com a levedura *Pichia stipitis*, indicando a liberação de pentoses no caldo pré-tratado. Além disso, estimou-se a necessidade das etapas de hidrólise enzimática para avaliar melhor qual tipo de pré-tratamento é o mais eficaz para a sacarificação da fibra da casca de coco verde.

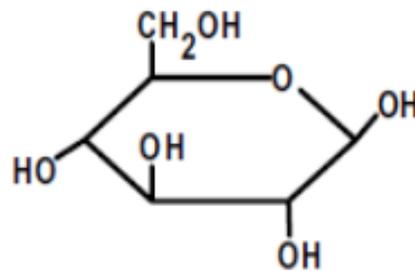
Sátiro *et al.* (2012), que realizou o pré-tratamento alcalino e ácido, obteve com a solução de NaOH um precipitado com aspecto de graxa e na via ácida um composto alaranjado. Brígida *et al.* (2010) utilizou três tipos de pré-tratamento:

NaOCl, NaOCl/NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo este último, o que apresentou maior eficiência na remoção das ceras e ácidos graxos.

### 3.2.1 Biomassa Lignocelulósica

Materiais lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um homopolímero de unidades de glicose β-(1,4) (Figura 2) e atinge uma fração de 24,70% da fibra da casca de coco verde (CABRAL, 2015).

**Figura 2** – Estrutura molecular da glicose β-(1,4).

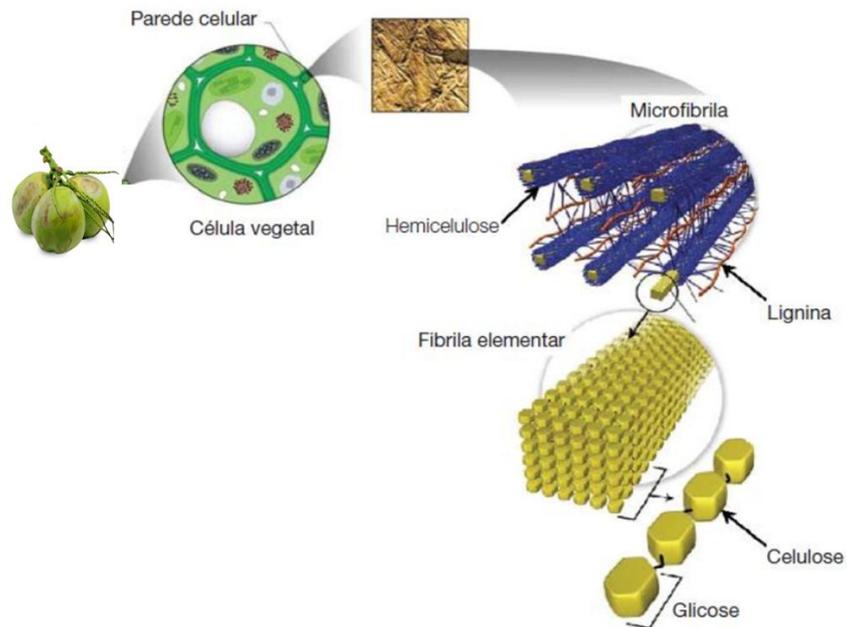


Fonte: Adaptado de WOLF (2011).

As cadeias lineares de celulose apresentam microfibrilas de alta cristalinidade sendo que sua estrutura está esquematizada na Figura 3, tendo por referência a biomassa da cana (CABRAL, 2015).

A celulose é um carboidrato complexo do tipo polissacarídeo que forma fibras alongadas que compõem as paredes das células vegetais, dando-lhes a resistência e rigidez peculiares (WOLF, 2011). A Figura 4 ilustra a molécula de celulose evidenciando as ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular que lhe confere a capacidade de formação de microfibrilas. É evidenciada também a subunidade de celobiose, um dissacarídeo que é gerado na sacarificação enzimática, uma das etapas da produção de etanol 2G.

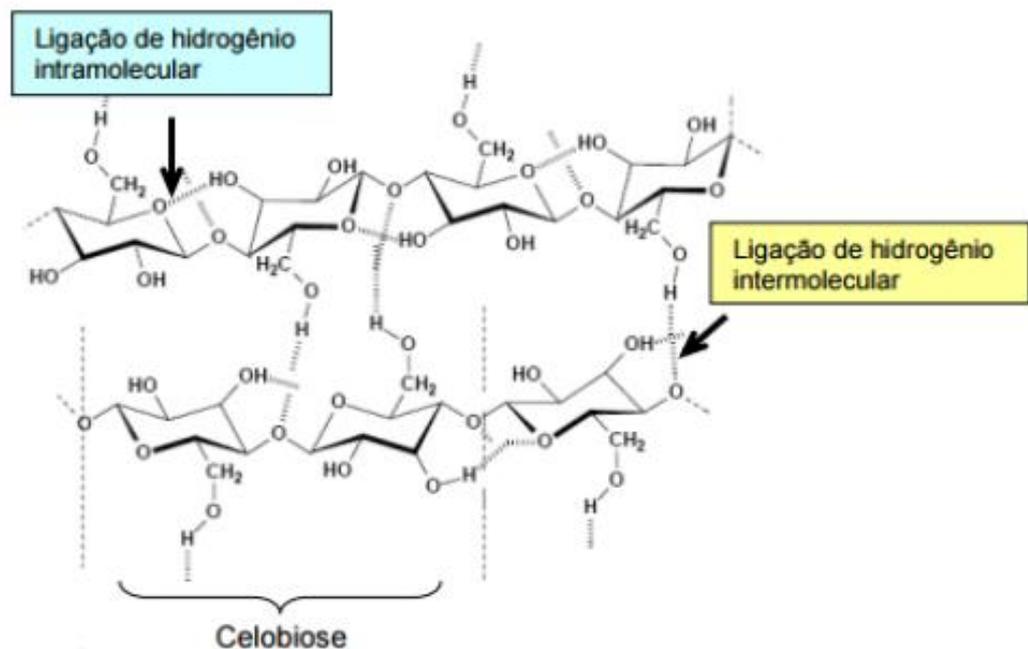
**Figura 3 - Estrutura lignocelulósica da biomassa.**



Fonte: Adaptado de WOLF (2011).

De acordo com Cabral *et al.* (2017), a fibra do coco verde é composta por 40,10 % de lignina e 24,70% de celulose, o que representa condições ideais para a produção de etanol derivado da biomassa.

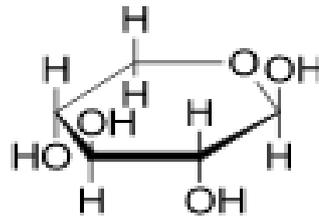
**Figura 4 - Estrutura molecular da celulose.**



Fonte: Silva Neto *et al.* (2015).

A hemicelulose é um polissacarídeo de cadeia principal constituída de monômeros de xilose  $\beta$ -(1,4) (Figura 5) com cadeias laterais de glicose, galactose e arabinose e compõe de 20 a 35% da biomassa lignocelulósica. As moléculas de hemicelulose são ligadas às microfibrilas de celulose por ligações hidrogênio (BALAT, 2011).

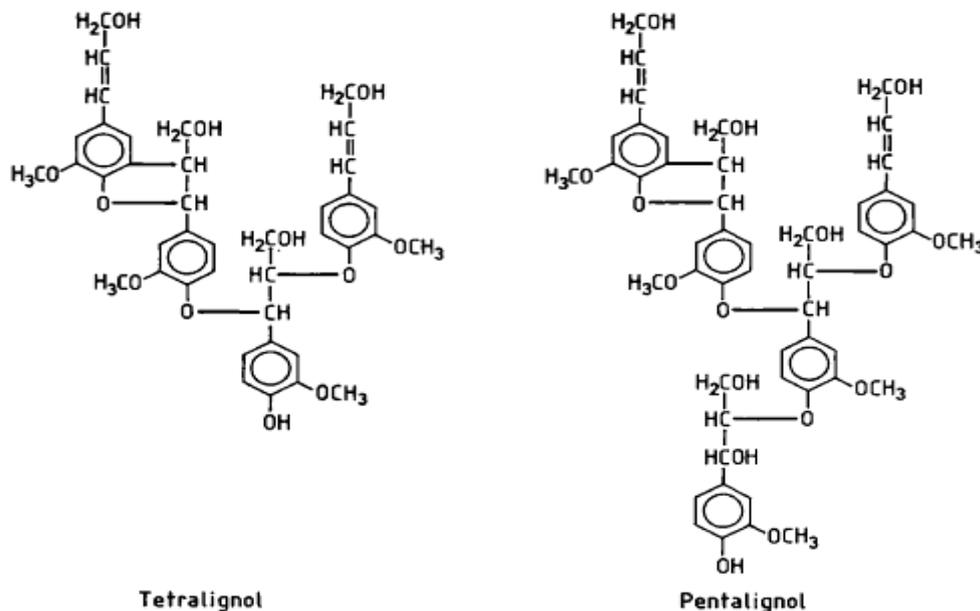
**Figura 5** - Estrutura molecular da xilose  $\beta$ -D-(1,4)



Fonte: Moraes *et al.* (2005).

A lignina é um composto fenólico formado pela polimerização de três monômeros (álcool *p*-coumaril, coniferil e sinapil), que representa uma massa amorfa rodeando as fibras de celulose e hemicelulose (HASUNUMA e KONDO, 2012). Na Figura 6 são apresentados exemplos das estruturas básicas para a formação da lignina (tetralignol e o pentalignol).

**Figura 6** - Estruturas químicas das moléculas básicas para a formação da lignina.



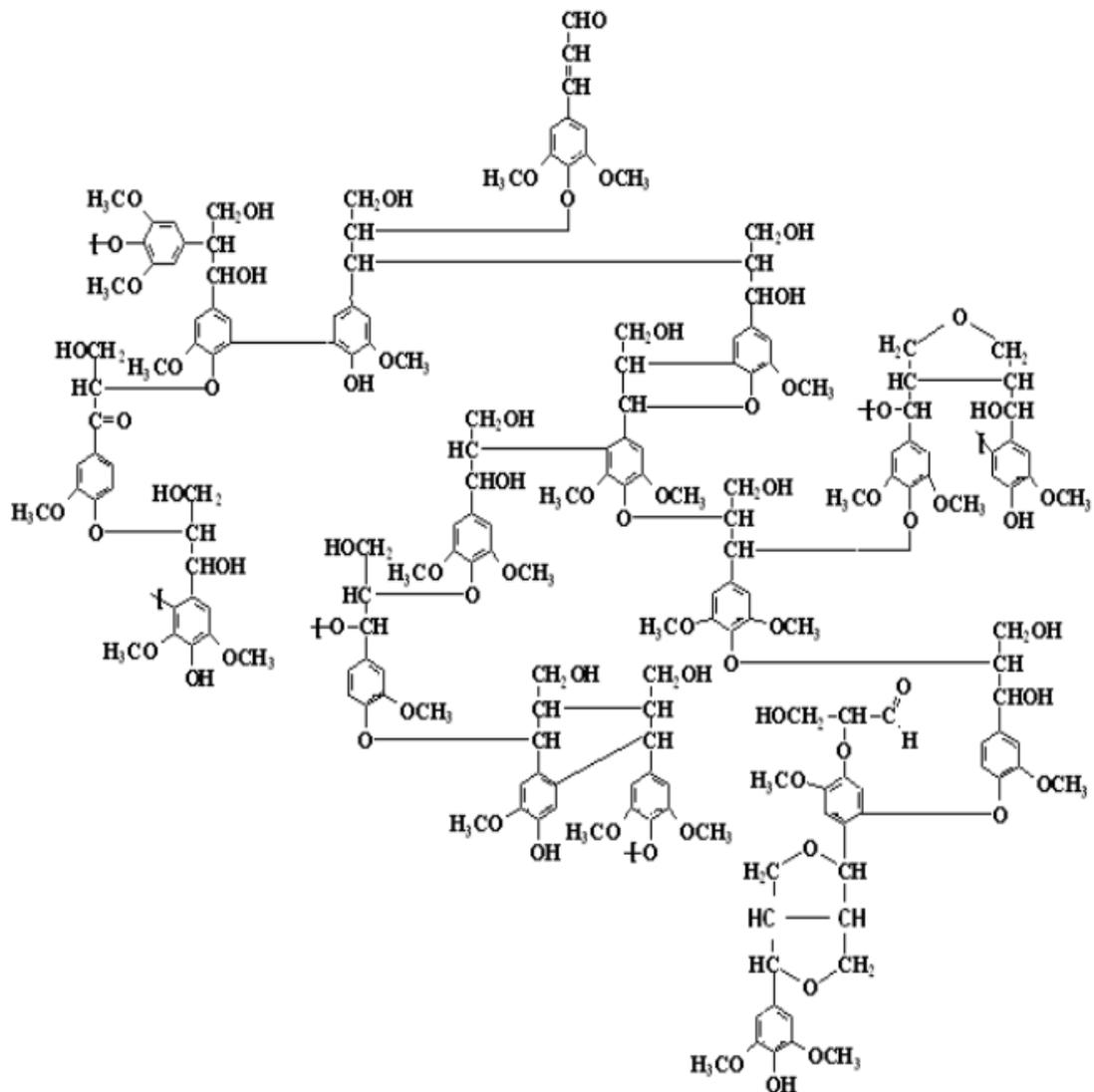
Tetralignol: guaiacilglicerol- $\beta$ -coniferil- $\gamma$ -dehidrodiconiferil álcool.

Pentalignol: guaiacilglicerol, éter de tetralignol.

Fonte: Fengel e Wegener (1989).

Na Figura 7 está disposta toda a cadeia complexa de lignina presente nas biomassas, caracterizada por uma estrutura formada por um polímero que possui ligações cruzadas (WOLF, 2011).

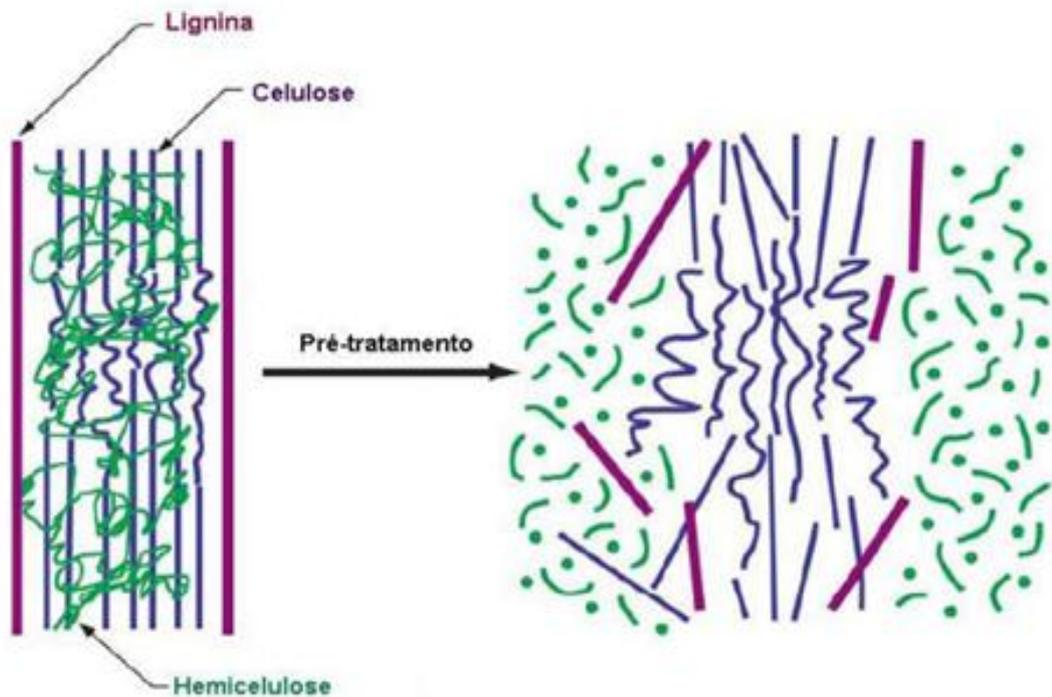
**Figura 7 - Fração da estrutura da lignina**



Fonte: Adaptado de WOLF (2011).

Fengel e Wegener (1989) destacam que para hidrolisar a celulose em açúcares solúveis que podem ser metabolizados por microrganismos (sacarificação), é necessário romper este emaranhado de lignina e hemicelulose, que recobrem as fibras de celulose, etapa conhecida como pré-tratamento da biomassa (Figura 8).

**Figura 8** - Efeito do pré-tratamento (sacarificação) sobre a estrutura lignocelulósica da biomassa



Fonte: WOLF (2011).

A celulose é um carboidrato complexo da classe dos polissacarídeos que formam fibras alongadas que compõem as paredes das células vegetais, dando-lhes a resistência e rigidez peculiares (CABRAL, 2015).

As ligações que unem as moléculas de glicose são dotadas de energia livre, as quais podem ser quebradas promovendo a liberação de açúcares fermentáveis, os monossacarídeos, e produzir bioetanol. Entretanto, essa molécula é muito bem protegida na parede celular, sendo necessário promover a hidrólise de forma eficiente para que se tenha acessibilidade aos açúcares fermentescíveis (GONÇALVES *et al.*, 2014).

### 3.2.1.1 Tecnologias de pré-tratamento para produção de etanol 2G

Com o desenvolvimento de motores a combustão, o etanol passou a ter outra importância na sociedade, passando a consolidar-se como combustível usado nos motores de veículos. Atualmente, para suprir esta demanda sem impactar na cadeia agroindustrial de produção de alimentos, a comunidade científica e industrial

incentivada por políticas públicas estão investindo no desenvolvimento de pesquisas sobre a produção de etanol 2G.

O tratamento para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis envolve processos físicos (moagem e trituração) e físico-químicos incluindo explosão a vapor, autohidrólise, hidrotermólise, oxidação, uso de solventes e reagentes químicos (álcali, ácido diluído, agentes oxidantes e solventes orgânicos) e bioquímicos (enzimas). Cabral (2015) afirma que o tratamento enzimático é um dos mais atrativos por apresentar condições mais brandas de operação, porém necessita de pré-tratamento para modificar a estrutura cristalina da fibra.

Os pré-requisitos para um pré-tratamento ideal são: (1) produção de fibra celulósica reativa ao ataque enzimático; (2) menor degradação da hemicelulose e celulose; (3) menor formação possível de compostos inibidores de enzimas e microrganismos; (4) reduzida demanda energética; (5) baixo custo para construção dos equipamentos; (6) redução da produção de resíduos; e (7) baixo consumo de produtos químicos e uso de produtos químicos de baixo custo (BALAT, 2011).

O pré-tratamento de explosão a vapor é realizado sem catalizador e denomina-se de auto-hidrólise, cuja eficácia do processo depende da combinação entre as variáveis: temperatura, tempo de exposição da fibra no reator e a umidade do composto lignocelulósico (PITARELO, 2013). No método de explosão a vapor a biomassa é submetida à alta pressão seguido de uma rápida descompressão causando o rompimento das fibras e a auto-hidrólise, e o material transformado é coletado em um tanque de expansão (SANTOS, 2014).

De acordo com Cabral (2015), o processo de hidrotermólise consiste na combinação dos pré-tratamentos: biológicos conhecido como enzimático; físicos que consiste na moagem; químicos por meio de ácido diluído ou alcalino.

O material lignocelulósico sofre oxidação pela ação de agentes alcalinos resultando na deslignificação de sua estrutura (SÁTIRO *et al.*, 2012). Nesse contexto, Cabral *et al.* (2017) concluiu que o pré-tratamento alcalino apresenta significativa solubilização de lignina (80%), sendo a estratégia mais viável para a produção do etanol 2G apesar da relevante perda de celulose.

No pré-tratamento enzimático são usadas enzimas, como por exemplo,  $\beta$ -glucanases, exoglucanases e endoglucanases (WOLF, 2011).

Dodo *et al.* (2017) comparou o pré-tratamento ácido com o alcalino e observou que após a fermentação, o processo enzimático apresentou maior rendimento quando comparado com o método de ácido diluído, sendo que a enzima celulase foi aplicada para hidrólise dos produtos obtidos após o pré-tratamento ácido diluído e álcali/oxidativo.

### 3.2.1.2 Deslignificação

Após o beneficiamento do material lignocelulósico, as fibras são submetidas à primeira etapa do pré-tratamento que consiste de tratamento físico, químico ou físico-químico a fim de remover a lignina das fibras e expor as moléculas de celulose para a próxima etapa de sacarificação. Os métodos físicos consistem da aplicação de vapor de água a altas pressões (9 a 17 bar). A explosão a vapor é um método utilizado para hidrólise de materiais lignocelulósicos, atuando de forma química e fisicamente na transformação da lignocelulose, sendo as reações químicas o principal parâmetro. Essa técnica tem sido amplamente utilizada por ser menos agressiva às fibras de celulose e promover uma boa separação das frações. O tratamento ácido apresenta a desvantagem de gerar muitos subprodutos indesejados que acabam atuando como inibidores na fermentação etanólica. O tratamento alcalino, por outro lado, tem se revelado também promissor por promover boa separação das frações e geração de baixa concentração de inibidores. O tratamento alcalino tem sido associado a agentes oxidantes (0, 5% e 10% de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio) a fim de se reduzir a concentração do álcali (CABRAL, 2015).

Ao analisar a composição química da fibra da casca de coco verde *in natura* e pré - tratada, Cabral *et al.* (2017) verificou que a biomassa lignocelulósica possui uma concentração de lignina de 40,10% que causa resistência do composto e 24,70% de celulose. Os resultados desse estudo mostraram que apesar da significativa perda de celulose, que apresentou maior solubilização de lignina em torno de 80%, demonstrando maior viabilidade para a produção de etanol 2G.

### 3.2.1.3 Sacarificação

O processo de sacarificação é conhecido na produção de etanol, como a etapa de hidrólise, que visa quebrar a estrutura cristalina dos polissacarídeos, reduzindo as macromoléculas de celulose e de hemicelulose em monômeros que são açúcares fermentescíveis (MARTINS *et al.*, 2014).

A sacarificação das fibras de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis pode ser efetuada por via química ou biológica (enzimática). A via química não é muito adequada, pois requer condições mais agressivas de processamento, gerando compostos inibidores e baixo rendimento. A hidrólise biológica, por outro lado, é conduzida em condições brandas de temperatura e apresenta alta seletividade e rendimento (BALAT, 2011). Nesse contexto, podem-se citar os resultados obtidos por Cabral (2015) em que os rendimentos foram obtidos a partir da hidrólise, ácida e alcalina, da fibra de coco com a utilização de ácido sulfúrico e com hidróxido de sódio. Nestas duas condições foram utilizados os reagentes químicos nas concentrações de 0, 5 e 10% com o tempo de exposição para cada concentração em 20, 40 e 60 minutos. Os melhores resultados foram obtidos em condições alcalinas utilizando hidróxido de sódio à 5% durante o intervalo de 40 minutos resultando em média 44,72g/100g de açúcares.

De acordo com Martins *et al.* (2014), durante o processo enzimático, a hidrólise é catalisada por enzimas, caracterizadas comercialmente como *endoglucanases* (atuam na catálise da hidrólise das cadeias de celulose, produzindo polissacarídeos de menor comprimento), *exoglucanases* (atuam principalmente nas extremidades não redutoras das cadeias mais curtas, denominadas celobiose) e  $\beta$ -*exoglucanases* (catalisam a hidrólise da celobiose e outros oligômeros à glicose).

Existem diversas formas ou estratégias para se conduzir o processo biotecnológico constituído da hidrólise enzimática (sacarificação) e fermentação. A biomassa pré-tratada pode ser sacarificada e, em seguida, fermentada ou pode ser sacarificada e fermentada simultaneamente. As configurações de processo conhecidas são denominadas em inglês como: *Separate Hydrolysis and Fermentation* - SHF (Hidrólise e Fermentação conduzidas em etapas distintas), *Simultaneous Saccharification and Fermentation* - SSF (Sacarificação e Fermentação, ocorrendo na mesma etapa e ao mesmo tempo), *Simultaneous*

*Saccharification and Co-Fermentation* - SSCF (Sacarificação e Co-Fermentação ocorrem na mesma etapa, mas em intervalos distintos) e *Consolidated Biomass Processing* - CBP (Bioprocesso Consolidado da Biomassa, permite que a sacarificação e a fermentação sejam realizadas ao mesmo tempo em condições ótimas) (MENON e RAO, 2012).

No SHF a fermentação acontece após o processo de hidrólise em reatores diferentes. Neste processo (a configuração tradicional), a biomassa é hidrolisada para formar os açúcares fermentescíveis numa primeira etapa e, em seguida, estes açúcares são fermentados gerando etanol, utilizando microrganismos de diferentes gêneros, tais como *Saccharomyces*, *Kluveryomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zymomonas*. A vantagem deste processo é que as etapas podem ser conduzidas em condições ótimas para cada um dos catalisadores biológicos: enzimas e microrganismos (MENON e RAO, 2012). No SSF o processo de sacarificação e fermentação são realizados de forma simultâneos, enquanto no SSCF já é a co-fermentação que é simultânea a sacarificação. Nesta pesquisa pretende-se utilizar o SHF, pois apresenta condições de trabalho mais brandas e também detalhadas.

A compatibilidade da sacarificação com a fermentação, portanto, é dependente das condições de pH, temperatura, concentração de substrato, etc. Conseguindo-se compatibilizar estas condições para os dois processos biológicos, a configuração SSF torna-se vantajosa, pois a eficiência da hidrólise enzimática aumenta na medida em que o produto final (açúcares fermentescíveis) é consumido pelo microrganismo reduzindo a inibição da enzima pelo produto. Além disso, há economia de tempo e no uso de equipamentos (MENON e RAO, 2012).

#### **3.2.1.4 Prospecção tecnológica sobre etanol de origem lignocelulósica**

A produção científica sobre o etanol em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Canadá e a Suécia tem sido mais intensiva que a de países em desenvolvimento como o Brasil. Os Estados Unidos utilizam o milho como matéria prima celulósica enquanto o Canadá e a Suécia usam resíduos de madeira. Assim, a rota tecnológica desses países não está relacionada ao bagaço ou palha da cana usada pelos pesquisadores brasileiros para produzir o etanol 2G. Tem-se observado que nos últimos 100 anos, diversos compostos celulósicos estão sendo

usados nos estudos de produção de etanol, tais como, cavaco de madeira, capins e hortaliças, que são testados em reatores de hidrólise enzimática (BIAGGI *et al.*, 2015).

A seguir serão destacados trabalhos patenteados que estão relacionados ao tema analisado nesse estudo por verificar a utilização da biomassa para produção de etanol 2G, assim como realizar as etapas do seu processo de obtenção que permite analisar essa linha de pesquisa em uma escala mundial.

No Brasil, os principais titulares de pedidos de patentes, com prioridade brasileira, que estão relacionados à produção de etanol são a Petrobras e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A Petrobras, com o trabalho intitulado “Processo de produção de etanol a partir do hidrolisado da fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar em reator do tipo prensa” (PI0505299-8), publicado em 07 de agosto de 2007, apresenta como etapas principais do processo de produção do etanol 2G, a hidrólise com ácido da fração hemicelulósica do bagaço da cana com extração do hidrolisado e em seguida a realização do processo de fermentação com a levedura *Pichia stipitis*. Foram realizados os experimentos em um reator do tipo prensa, que permitiu uma extração mais eficiente do hidrolisado e uma melhor performance no processo (SANT’ANNA, *et al.*, 2007).

Na pesquisa da Petrobras intitulada “Processo para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos por via enzimática” (PI0605017-4), publicado em 17 de julho de 2008, a hemicelulose foi submetida a uma hidrólise branda com ácido sulfúrico e depois o material sólido resultante foi submetido ao processo de sacarificação enzimática simultânea à fermentação alcoólica rápida em condições que permitiram aumentar a conversão em etanol com tempos reduzidos (SANT’ANNA *et al.*, 2008).

A UNICAMP, com a pesquisa “Processo fermentativo extrativo a vácuo para produção de etanol” (PI0500321-0), de 19 de setembro de 2006, propôs a obtenção de etanol do processo fermentativo através da extração a vácuo, que utilizou como microrganismo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e usou como substrato o melaço de cana de açúcar diluído em água (MAUGERI FILHO e ATALA, 2006).

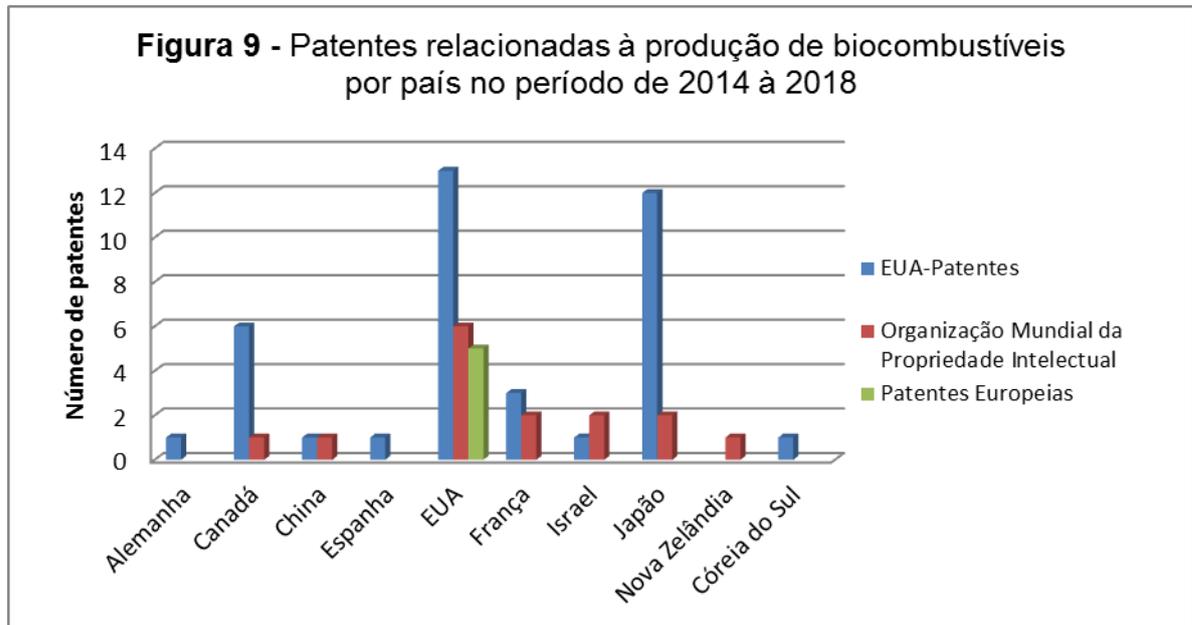
No trabalho da parceria entre a UNICAMP e a Dedini S/A Indústrias de Base, intitulado “Processo de fermentação para produção de bioetanol” (PI0706009-2),

publicado em 17 de março de 2009, foram utilizados como matéria prima, produtos que apresentam sacarose, glicose e frutose. Estes materiais são de fontes vegetais diretas ou por hidrólise (ANDRIETTA e ANDRIETTA, 2009).

Na base de dados do INPI pode ser encontrado o pedido de patente relacionado ao bioetanol derivado da casca de coco verde, depositado pela UFES (Universidade Federal do Espírito Santo) (PI 1104157-9 A2), intitulado “Processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática a partir de resíduos agroindustriais”, publicado em 16 de agosto de 2016. Tal processo utiliza enzimas celulasas em alta pressão hidrostática e uma temperatura moderada no processo de sacarificação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

A patente publicada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) intitulada “Processo e equipamento para conversão simultânea de biomassa utilizando reatores UHTST” (BR 132013017839-9) destaca o processo e equipamento para conversão de materiais lignocelulósicos, utilizando reatores contínuos UHTST, água superaquecida para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço. O pré-tratamento ocorreu em duas etapas em condições diferenciadas de tempo de resistência, temperatura e pressão otimizadas, com a finalidade da preservação máxima dos compostos, como açúcares monômeros ou oligômeros das frações da hemicelulose e celulose da biomassa, permitindo a formação mínima de inibidores (NOLASCO JUNIOR *et al.*, 2013).

Em uma pesquisa realizada por meio da plataforma de dados *Thomson Innovation* (2018) foi verificado que os documentos patenteados estavam registrados nas seguintes bases de dados: *United States Patent* (EUA-Patentes), *World Intellectual Property* (Propriedade intelectual mundial) e *European Patent Application* (Patentes Europeias), que destacam os Estados Unidos da América como o país que mais registrou patentes sobre o etanol da biomassa, demonstrando que o EUA está investindo em pesquisas sobre os combustíveis renováveis, conforme a Figura 9.



Fonte: Thomson Innovation (2018).

A Figura 9 mostra que nas plataformas: EUA-Patentes (*United States Patents*), Organização Mundial da Propriedade Intelectual (*World Intellectual Property Organization*) e a Patentes Europeias (*European Patent Specification*) estão depositados patentes sobre o etanol 2G. Nesse contexto, observa-se que os pesquisadores brasileiros que estudam a produção de bioetanol ainda não realizaram pedidos de patentes nessas bases de dados internacionais, visto que suas pesquisas estão patenteadas no Brasil, no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI (2016).

Verifica-se na Figura 9, que recentemente o Japão é o segundo país que mais investiu em pesquisas sobre o etanol da biomassa. Os trabalhos são realizados principalmente por universidades e foram publicadas no período recente compreendido entre 2014 à 2018 (THOMSON INNOVATION, 2018). Para Biaggi *et al.* (2015), as pesquisas sobre o etanol lignocelulósico são recentes em todo o mundo e seu desenvolvimento intensificou-se nas duas últimas décadas.

Entre os trabalhos encontrados na plataforma *Thomson Innovation* pode-se destacar:

- A POET *Research*, com o trabalho intitulado “Sistema para fermentação da biomassa para produção de etanol” (US 2015/0072390 A1), destaca que o

processo de tratamento da biomassa com a diluição de ácido para separar os primeiros componentes com pentoses pode dar acesso à fermentação e os segundos componentes com hexoses são disponibilizados principalmente para a fermentação. No trabalho, é enfatizado que as principais fontes de material lignocelulósico são: espigas de milho, folhas da plantação de milho e talos da plantação de milho (NARENDRANATH e CARLSON, 2015).

- A *POET Research*, com o trabalho intitulado “Sistema de tratamento da biomassa para facilitar a produção de etanol” (US 9,034,620 B2) destaca um método para realizar o pré-tratamento da biomassa que inclui a separação da glicose e dos açúcares através da utilização de enzimas (NARENDRANATH, 2015).
- *API Intellectual Property Holding*, com o trabalho intitulado “Conversão hidrotérmica e mecânica da biomassa lignocelulósica em etanol e outros produtos da fermentação” (US 2016/0244788 A1, 2016) destaca a separação mecânica entre a fase líquida e a fase sólida rica em celulose para realizar posterior hidrólise enzimática da mistura utilizando-se de um reator com enzimas celulasas para gerar açúcar fermentescível e, em seguida, a fermentação dos açúcares fermentescíveis visando produzir etanol (RETSINA *et al.*, 2016).
- Em outro documento de Patente publicado pela *Incorporated Cargill*, com o tema “Compósitos e métodos para aumentar a produção de etanol da biomassa” (US 2014/0038253 A1) foi utilizada uma série de células de leveduras geneticamente modificadas comprovando várias combinações das vias para fermentação de arabinose, vias da fermentação da xilose, via pentose-fosfato e/ou gene transportados de xilose e métodos de cultivo dessas células para produção de etanol em fermentação média contendo xilose (JESSEN *et al.*, 2014).
- No documento de patente intitulado “Método para produção do etanol por fermentação da biomassa lignocelulósica” (US 8,883,469 B2, 2014) o método é caracterizado no tratamento visando a ruptura da biomassa lignocelulósica utilizando alcanolamina para extração da lignina. A solução contendo lignina é

separada e o resíduo contendo celulose e hemicelulose é convertido em açúcar sem drenagem (KARSTENS, 2014).

### 3.3 Análise do Ciclo de Vida do Etanol

O Ciclo de Vida do Produto permite que seja feita uma análise e uma quantificação do impacto ambiental desse produto ou processo ao longo de sua vida. O estudo do Ciclo de Vida do Produto analisa as seguintes categorias gerais de impacto ambiental: recursos naturais, implicações sobre a saúde humana e consequências ecológicas (SILVA, 2012).

Assim, o Ciclo de Vida do Produto está relacionado à ideia de sustentabilidade em toda a sua cadeia produtiva, que visa que as gerações presentes satisfaçam suas necessidades sem comprometer a capacidade de atendimento de seus antecedentes.

Nesse contexto, o Ciclo de Vida do Etanol da fibra de coco está relacionado à utilização de recursos renováveis, que são encontrados abundantemente nas praias e aterros sanitários e que podem ter um destino apropriado através da geração de combustíveis. Dessa forma, a utilização desses resíduos como manufatura para produção de etanol 2G é uma alternativa para o aproveitamento dos resíduos sólidos do coco. Logo, a produção de bioetanol é uma alternativa para reduzir os impactos ambientais causados pelo consumo *in natura* da fibra do coco e dos resíduos produzidos no processo de manufatura, pois os resíduos da agroindústria é uma importante fonte de combustível renovável, que reduz os impactos ambientais causados pelo descarte das fibras de coco (ROSA *et al.* 2011).

Dessa forma, considerando a importância que a produção de etanol tem para a economia brasileira e sua utilização crescente como combustível, avaliar o seu Ciclo de Vida fornece informações sobre os impactos da utilização desse combustível renovável sobre a preservação ambiental.

As pesquisas sobre o etanol 2G derivado da fibra do coco verde ainda estão em desenvolvimento e assim, não foi padronizada. Dessa forma, para analisar o Ciclo de Vida do etanol será considerado o etanol produzido a partir da cana de açúcar.

O etanol produzido no Brasil tem sua origem no processo bioquímico de fermentação etanólica utilizando matérias primas açucaradas. A cana de açúcar é a matéria prima brasileira utilizada para este fim (BRASKEM, 2015).

O etanol, como todo produto obtido pelos fins industriais, apresenta em sua cadeia produtiva as etapas do seu Ciclo de Vida resumidas em: plantio, colheita, fabricação (produção), reciclagem, armazenamento, distribuição e utilização (GARCIA e SPERLING, 2010).

Garcia e Sperling (2010) ao verificar o ciclo de vida da produção do etanol, considerando as etapas da agricultura e industrialização de cana de açúcar em 11 destilarias de Minas Gerais, observou uma emissão total de 1.539,60kg CO<sub>2</sub>eq/ha.ano, sendo 50% dessas emissões resultado da queima de cana de açúcar e o consumo total de combustível.

Ometto (2005) ao analisar as etapas do processo produtivo do etanol, verificou que a atividade de colheita da cana tem um impacto maior no consumo de combustíveis renováveis, emissão de gases do efeito estufa, na transformação fotoquímica do gás ozônio, a acidificação e toxicidade humana.

Para o álcool combustível, advindo da cana de açúcar, a extração da matéria prima corresponde às atividades agrícolas do cultivo da planta; a produção, à fase de transformação industrial, desde a entrada da cana na usina até a produção do álcool combustível, incluindo a geração de energia elétrica e o vapor; a reciclagem que é realizada por meio da fertirrigação da vinhaça, subproduto da destilação do vinho; o armazenamento nos tanques de álcool; a distribuição, pelo transporte do álcool até os postos revendedores e a utilização, pela combustão do etanol usado como combustível em veículos automotores (SALLA e CABELLO, 2010).

A tecnologia de produção do etanol de cana já está consolidada no Brasil, que é o segundo maior produtor de cana de açúcar do planeta (UNICA, 2016).

O bioetanol é uma fonte renovável, pois gera mais energia do que consome, reduzindo a emissão de gases do efeito estufa e apresenta ganhos econômicos por ser uma biomassa de baixo custo (CATOLICO *et al.*, 2015). Assim, sua utilização está relacionada à sustentabilidade ambiental e econômica, visto que contribui com a preservação ambiental e reduz custos. Segundo estes mesmos autores, a biomassa lignocelulósica da cana pode ser aproveitada como fonte de energia

gerada nas caldeiras das usinas sucroalcooleiras. Outro sub-produto da produção de etanol da cana é o vinhoto que pode ser utilizado como fertilizante nos plantios.

De acordo com Díaz *et al.* (2010) para executar as atividades relacionadas a produção e comercialização do etanol é preciso utilizar a energia encontrada nos combustíveis fósseis de carbono.

### **3.4 Impactos ambientais do consumo de etanol**

O dióxido de carbono gerado na queima de atividades agroindustriais é reciclado pela fotossíntese no crescimento da biomassa do próximo ciclo produtivo. Entretanto, a parcela gerada na produção de bioetanol produz um acréscimo na quantidade de GEE - Gases do Efeito Estufa (CATOLICO *et al.*, 2015).

Na Tabela 6 é destacada a emissão de Gases do Efeito Estufa (GEE) oriundos da cadeia produtiva de etanol a partir da cana de açúcar. Os dados mostram que as atividades de operações agrícolas, transportes de insumos, fertirrigação são as que menos contribuem com a emissão de CO<sub>2</sub>. Entretanto, as atividades de queima de canavial e consumo de combustível são as que mais contribuem com a emissão de GEE.

Conforme a Tabela 6, cerca de 28% da emissão de gases do efeito estufa é derivado da queima do canavial e aproximadamente 22% resulta do consumo de combustível, que é utilizado no processo de agricultura e industrialização da cana de açúcar.

**Tabela 6** - Emissão de gases do efeito estufa na agricultura e industrialização da cana de açúcar

<b>Categoria</b>	<b>Emissão de GEE (kg CO<sub>2</sub> eq/ha-ano)</b>	<b>Contribuição de cada Categoria ao total de emissões</b>
Consumo de combustível	337,18	21,9 %
Operações agrícolas	69,77	-
Transporte de insumos	17,28	-
Fertirrigação	30,20	-
Colheita, carregamento e transporte de cana de açúcar	219,93	-
Consumo de cal e Fertilizantes	298,38	19,38 %
Consumo de defensivos Agrícolas	30,39	1,97 %
Queima do canavial	434,31	28,21 %
N <sub>2</sub> O liberado no solo	331,52	21,53 %
Produção de mudas	72,81	4,73 %
Produtos químicos Etapa industrial	35,01	2,27 %
<b>Total</b>	<b>1.539,60</b>	<b>100,00</b>

Fonte: Garcia e Sperling (2010).

O carbono é um elemento indispensável a todos os seres vivos. Ele participa da constituição dos compostos orgânicos inclusive das biomoléculas (carboidratos, lipídios e proteínas) que são necessárias à constituição das entidades biológicas. Sua presença no ambiente se destaca no ar atmosférico, superfícies de lagos, rios e mares (MARTINS *et al.*, 2003).

A principal fonte de carbono utilizada pelos seres vivos é o gás CO<sub>2</sub> presente na atmosfera, sendo este utilizado pelas plantas e usado nos processos fotossintéticos para produção de macromoléculas (carboidratos), que posteriormente serão aproveitadas em seu metabolismo energético. Além do CO<sub>2</sub> gasoso, as plantas também utilizam os carbonatos e bicarbonatos dissolvidos na água para realizar a fotossíntese.

Parte do gás carbônico estabelecido na atmosfera é originário de atividades humanas, incluindo as operações agrícolas. Todas as operações do processo de obtenção de etanol 1G de cana dispensa uma quantidade de dióxido para o meio ambiente. Dessas operações, a queima do canavial, procedimento de pré-colheita, é a que tem maiores valores de emissão de CO<sub>2</sub>. Em contrapartida, o canavial em seu

período de desenvolvimento, absorve grandes quantidades de CO<sub>2</sub> atmosférico para seus processos biológicos e bioenergéticos (OMETTO, 2005).

O etanol da cana é menos poluente que o derivado do petróleo, como a gasolina e comparado à gasolina. Por esta razão, o Brasil tem desenvolvido políticas públicas visando à adição de etanol anidro à gasolina. A lei 13.033/2014 permite a adição de etanol na gasolina entre 18 a 27,5%. Entretanto, o valor do teor de álcool na gasolina estabelecido pelo Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool (CIMA) e que deve ser praticado pelos distribuidores é de 27% (BRASIL, 2015).

Desde 2010, os Estados Unidos vêm adicionando 15% de etanol a gasolina com a finalidade de reduzir a emissão de CO<sub>2</sub> provocada pelo consumo dos combustíveis fósseis. O aumento do percentual do etanol de 10 para 15% nos EUA é resultado de uma decisão tomada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) em 2010 (UNICA, 2010). Na Europa, também é utilizada a mistura do etanol à gasolina, que corresponde a proporção de 10% da gasolina (BERTOA *et al.*, 2015).

Conforme a Tabela 7, dados comparando entre os países que praticam a mistura de etanol à gasolina e apresenta os respectivos percentuais de redução na emissão de CO<sub>2</sub> para a atmosfera.

**Tabela 7 - Redução das emissões de CO<sub>2</sub> com base na matéria prima do etanol por país**

<b>Matéria-prima/localidade</b>	<b>Redução das emissões de CO<sub>2</sub> com relação à gasolina pura</b>
Cana de açúcar (Brasil)	84 %
Beterraba (Europa)	40 %
Milho (Estados Unidos)	30 %

Fonte: Adaptado a Goldemberg e Guardabassi (2010).

As misturas de gasolina com etanol apresentam uma redução nos níveis de emissão de gás carbônico justificada pela presença de oxigênio na molécula de etanol (LIRA, 2015). Conforme a UNICA (2012) a adição de etanol a gasolina reduz em até 7% a emissão de Gases do Efeito Estufa.

O gás carbônico encontrado na atmosfera é resultado da queima de combustíveis fósseis, desmatamento da natureza e as frequentes trocas de carbono

entre a atmosfera, os oceanos e a biosfera continental (MARTINS *et al.*, 2003). Dessa forma, o incremento dos problemas ambientais está associado ao aumento da emissão de CO<sub>2</sub> que é formado principalmente de compostos inorgânicos.

A quantidade total estimada de carbono na Terra é de 26,1015 Mg, constituída de compostos inorgânicos (99,95%) e orgânicos (0,05%) (BARBOSA *et al.*, 2013). Portanto, para reduzir a emissão de gás carbônico na atmosfera, tem-se adotado como alternativa, os combustíveis derivados da biomassa.

Dessa forma, ao realizar um balanço energético do etanol da cana de açúcar, Díaz *et al.* (2010) observaram que um veículo que utiliza etanol da cana de açúcar emite 76,7% menos CO<sub>2eq</sub> quando comparado rodando a mesma distância usando a gasolina pura, como combustível. Dessa forma, tem se incentivado a produção do etanol visando à redução dos gases que contribuem com o aumento do efeito estufa.

As políticas públicas para adição de etanol na gasolina também são vistas como incentivo aos produtores do setor sucroenergético, que tem passado por dificuldades nos últimos anos inclusive com o fechamento de algumas unidades industriais que teve como reflexo o aumento do desemprego nas regiões que dependem dessa atividade econômica.

### **3.5 A Casca do Coco Verde como um Problema Urbano**

A água de coco é industrializada em larga escala para o mercado interno e externo e tem como resíduo a casca do coco verde que representa cerca de 80% a 85% do peso do fruto (EMBRAPA, 2004).

O coco é visto como uma oleaginosa, sendo consumido na forma madura. No Brasil e em alguns locais do mundo, há o hábito de se consumir a água de coco verde “*in natura*” onde este é visto como fruto muito popular nas praias (MARTINS e JESUS JÚNIOR, 2014).

Na extração do óleo do coco maduro, parte do resíduo gerado é queimado no processo (EMBRAPA, 2004). Já para o coco verde, existem poucas tecnologias adequadas para processamento desse resíduo. Assim, a elevação do consumo de água de coco verde nas praias brasileiras tem gerado um problema de grande

dimensão para os centros urbanos, devido ao seu grande volume, causado pelo acúmulo deste resíduo.

Cerca de 70% do lixo proveniente das praias brasileiras são compostos por casca de coco. Este problema se agrava à medida que as cascas são dispostas em locais inapropriados sem destinação final adequada, e assim sobrecarregam os aterros sanitários podendo provocar contaminação do solo e de corpos d'água. Estima-se que sejam descartados no Brasil cerca de 6,7 milhões de toneladas de coco por ano (MARTINS *et al.*, 2013).

Essa biomassa é comumente depositada em lixões e as margens das estradas e nas praias. É um material de difícil decomposição, podendo levar mais de 8 anos para se decompor no meio ambiente (CARRIJO *et al.*, 2002).

O Brasil possui um índice consideravelmente alto de produção de coco, com uma área colhida de cerca de 246.088 hectares, distribuídos no território nacional, sendo o Nordeste seu maior produtor (IBGE, 2016). Segundo Martins e Jesus Jr. (2014), o Brasil é o quarto produtor mundial de coco com uma produção de 1,8 milhões de toneladas.

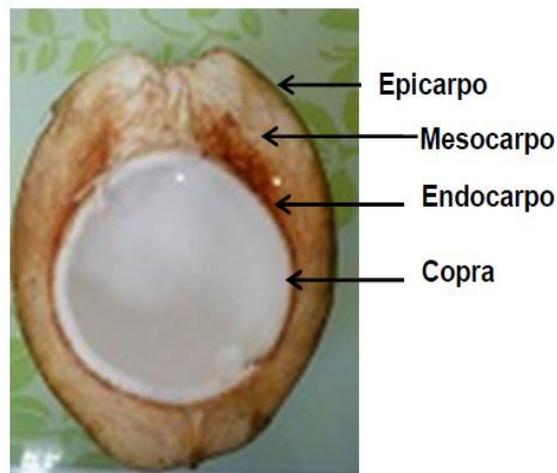
Existem muitas alternativas para o aproveitamento deste resíduo, já que o mesmo possui grande potencial de transformação para a indústria agrícola, a indústria alimentícia, indústria da construção civil e na geração de energia. Mas, infelizmente poucas ações são implementadas (CARRIJO *et al.*, 2002). Para reverter essa situação é necessário buscar novas aplicações para este material, propondo desenvolver novas tecnologias considerando suas propriedades, como por exemplo, o seu beneficiamento para a produção de combustíveis renováveis.

O Brasil tem uma agroindústria muito diversificada e, portanto, utiliza uma ampla variedade de matérias primas em seus processos, gerando resíduos. A cultura do coco é parte dessa agroindústria e tem se desenvolvido principalmente nas regiões Norte e Nordeste. A casca do coco é o principal resíduo gerado nessa atividade. Sua composição lignocelulósica se caracteriza como uma matéria-prima potencial para a produção de energia e biocombustíveis (SÁTIRO *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2014 e CABRAL, 2015).

### 3.5.1 Aspectos gerais do coco verde

O fruto do coqueiro, *Cocos nucifera*, é formado de pericarpo (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) e semente (tegumentos e albúmen líquido e sólido), conforme ilustração na Figura 10.

**Figura 10** – Estrutura do coco



Fonte: Acervo do autor.

No pericarpo, parte do fruto que envolve a semente, tem-se o epicarpo denominado de casca externa lisa do fruto; o mesocarpo denominado de parte fibrosa e o endocarpo denominado camada pétreia que envolve a parte comestível do coco. Na semente tem-se o tegumento que é a estrutura que reveste e protege uma parte do vegetal e o albúmen, tecido contendo substâncias nutritivas na semente (SILVEIRA, 2008).

A Indonésia é o maior país produtor de coco do mundo seguido pelas Filipinas, Índia e o Brasil, onde as condições climáticas favorecem seu cultivo localizado principalmente no Nordeste do país (MARTINS e JESUS JÚNIOR, 2014).

A produção de coco no Brasil tem aumentado em decorrência dos avanços tecnológicos no cultivo e no desenvolvimento de variedades melhoradas de coqueiros tipo Anãos e Híbridos, assim como a expansão do plantio em outras áreas, os quais intensificam a produtividade desse setor (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014).

O Estado da Bahia é o maior produtor de coco do Brasil (IBGE, 2018). Em 2017 sua produção anual foi superior a 500 mil toneladas de frutos, causando a geração de um resíduo (casca) de difícil degradação (Tabela 8).

**Tabela 8** - Produção dos principais estados brasileiros produtores de coco, em 2017.

Estado	Produção (t)
Bahia	542.448
Sergipe	237.308
Pará	197.387
Ceará	186.733
Espírito Santo	120.656
Pernambuco	144.452
Alagoas	99.454
Rio Grande do Norte	69.076
Rio de Janeiro	44.515
Paraíba	37.665

Fonte: IBGE (2018).

O clima tropical e a fertilidade do solo da Região Nordeste favorecem o cultivo de coco, que é uma das fontes de renda da economia nordestina (FLORENCE, 2011).

Conforme dados do IBGE (2018) destacados na Tabela 9, o Brasil apresenta uma área plantada destinada ao cultivo de coco de 252 mil hectares e uma área colhida de aproximadamente 241 mil hectares em 2017. Sendo a região Nordeste a que mais contribuiu com a área plantada e colhida do país. Em 2017, o Brasil produziu aproximadamente 1,7 milhões de coco, que foram oriundos principalmente do Nordeste que chegou a produzir 1,3 milhões de frutos (Tabela 9).

**Tabela 9** - Área plantada, colhida e produção de coco das regiões do Brasil em 2017.

Regiões do Brasil	Área Plantada (ha)	Área Colhida (ha)	Produção (mil frutos)
Norte	26.588	23.192	217.499
Nordeste	206.896	200.480	1.334.338
Sudeste	16.857	15.973	219.978
Sul	230	230	2.300
Centro-Oeste	1.597	1.511	17.873
<b>Total - Brasil</b>	<b>252.168</b>	<b>241.386</b>	<b>1.791.988</b>

Fonte: IBGE (2018).

O Nordeste é o maior produtor de coco do Brasil, mas o rendimento em termos de produtividade é baixo se comparado a outras regiões do país, o que pode ser explicado pelo nível tecnológico utilizado e as variedades de coco usadas (MARTINS e JESUS JÚNIOR, 2014).

No Brasil, a fibra de coco é utilizada principalmente nos seguintes setores: paisagismos, jardinagem, moveleiro, calçadista, *design* de objetos para o lar, compósitos, combustíveis, papelaria, embalagens, fabricação de enzimas, construção civil, filtros industriais e geotêxteis (MARTINS *et al.*, 2013).

Para a aplicação do resíduo do coco na produção de combustível, a parte de interesse é o mesocarpo devido ao seu potencial substrato para a obtenção do bioetanol. O mesocarpo, também conhecido como fibras do coco, é pertencente à classe de materiais lignocelulósicos e constituído em média por 24,70% de celulose, polímero mais abundante na Terra, e 40,10% lignina, 12,26% de hemicelulose e 2,56% de cinzas, conforme os dados experimentais de Cabral (2015).

A composição dos materiais lignocelulósicos, como a fibra de coco e a palha da cana e entre outros é constituída de celulose, hemicelulose e lignina (SILVA NETO *et al.*, 2015).

Entre as técnicas instrumentais mais utilizadas na caracterização da morfologia dos materiais se destaca a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O MEV pode fornecer imagens tridimensionais das amostras dos materiais com grande profundidade de campo, ou seja, permite visualizar diversos relevos da superfície. Uma vantagem que se pode considerar nesta técnica é a facilidade de se preparar as amostras compostas por polímeros, neste caso a celulose. Na preparação dos materiais desta natureza é necessário apenas revestimentos condutivos ou utilização de baixa voltagem para aceleração do feixe (ARIETA, 2014).

O MEV tem por finalidade a caracterização das fibras antes e após o pré-tratamento químico, permitindo analisar as mudanças morfológicas e os impactos causados na estrutura da fibra pela reação das substâncias químicas no pré-tratamento (BRÍGIDA *et al.*, 2010).

A termogravimetria é muito bem empregada para a determinação das propriedades térmicas dos materiais, inclusive os de natureza polimérica, e tendo fundamento nos experimentos de pirólise. Dessa forma, possibilita analisar a

decomposição das substâncias observando a estabilidade térmica e temperatura de degradação. Além disso, a análise termogravimétrica permite verificar o volume de água absorvido, a temperatura em que se inicia a degradação térmica, a quantidade de massa perdida durante a degradação e o percentual de cinzas obtido no processo (CORRADINI *et al.*, 2009). Portanto, a termogravimetria pode ser usada para identificar as propriedades térmicas dos compostos lignocelulósicos, como a fibra de coco verde.

### 3.5.2 Beneficiamento da fibra de coco verde

O beneficiamento da fibra de coco é uma boa alternativa para dar destino ao resíduo das cascas de coco verde descartado no Brasil. O beneficiamento das cascas de coco verde pode transformar esse resíduo, por exemplo, em uma nova opção de renda para o produtor de água de coco (MARTINS *et al.*, 2013).

A qualidade da fibra do coco depende da variedade cultivada, do processo de extração, do grau de maturação do fruto e das condições climáticas do local onde se faz o cultivo. Esta qualidade é determinada principalmente pelas propriedades físicas como diâmetro, comprimento, elasticidade e rigidez. Segundo Silva (2014), existem três tipos de fibras: branca longa, marrom longa e marrom curta.

A casca do coco verde pode ser utilizada na fabricação de diversos produtos, insumos e energia possibilitando o desenvolvimento sustentável (MARTINS *et al.*, 2013). A utilização da fibra de coco verde pode ser uma das soluções para o problema de gestão dos resíduos *in natura* do coco, que estão sendo jogados nos lixões dos espaços urbanos.

Outra utilização do resíduo do coco seria seu aproveitamento em projetos de agricultura familiar, que possibilitam a inclusão social, geram trabalho e renda, principalmente nas cidades litorâneas (SILVA, 2014).

A utilização da casca do coco por meio de sua trituração para obtenção de fibra e pó é considerada uma forma para agregar valor à casca do coco, principalmente quando incorporado ao solo (SILVA, 2014).

O uso da casca de coco verde possibilita alguns benefícios, como por exemplo, na questão da sustentabilidade, reduzindo os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado deste resíduo nos ambientes urbanos e rurais.

Nesse contexto, tem se realizado pesquisas para obtenção do etanol do 2G através do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, que pode ser realizado por meio ácido ou enzimático.

Assim, a produção de etanol tem sido objeto de trabalhos científicos, que apresentaram os seguintes parâmetros no pré-tratamento da fibra do coco destacados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Estudos do pré-tratamento da casca do coco

Referência	Pré-Tratamento	Resultados
<b>Brígida <i>et al.</i> (2010)</b>	Utilizou 3 tipos: NaOCl, NaOCl/NaOH e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	O tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> foi o mais eficiente na remoção de ceras e ácidos graxos.
<b>Gonçalves <i>et al.</i> (2014)</b>	Peróxido de hidrogênio 7,35 % (v/v) a 25°C durante 1 hora sob agitação a 150 rpm. A correção do ph 11,5 (NaOH).	Conversão 76% de glicose para o SSF e 89% com SSSF.
<b>Sátiro <i>et al.</i> (2012)</b>	5g da fibra do coco verde em solução NaOH ou ácido 0,1M em refluxo por 30 minutos.	NaOH: Obtenção de precipitado negro, com aspecto de graxa. Ácido: Obtenção de solução alaranjada.
<b>Cabral (2015)</b>	Ácido e Base 0,5 e 10%.	Os melhores resultados obtidos foram em condições alcalinas utilizando hidróxido de sódio a 5% durante o intervalo de 40 minutos resultando em 44,71g/100g de açúcares em média.

Dos métodos observados na Tabela 10, Gonçalves *et al.* (2014) e Cabral (2015) apresentaram resultados relevantes utilizando no pré-tratamento o hidróxido de sódio, como reagente.

Em Brígida *et al.* (2010), o pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi mais eficiente na remoção dos resíduos ácidos e gordurosos. Os resultados da composição química revelaram que a utilização dos reagentes: NaOCl e NaOCl/NaOH causou uma redução da hemicelulose, que gerou uma maior exposição da celulose e uma redução da estabilidade térmica. No estudo realizado por Gonçalves *et al.* (2014), a utilização do SSSF permitiu obter maior concentração de etanol que no SSF.

Em Sátiro *et al.* (2012), o processo de deslignificação por hidrólise básica resultou em material oxidado, mas com a ação do reagente ácido foi promovido a solubilização parcial das fibras e totalmente do pó das cascas do coco.

No trabalho realizado por Cabral (2015), os resultados obtidos mais relevantes ocorreram na conversão enzimática de 87%, com rendimento global de 22,34 g/100g da fibra *in natura*, utilizando no processo fermentativo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* por 9 horas. Foi obtido concentração média de etanol de 5,90 g/L e 90,42% de rendimento fermentativo, a qual foi possível obter 39 litros de etanol para cada tonelada de casca de coco.

### **3.6 Perspectivas para a produção de etanol 2G**

Os resíduos agroindustriais têm potenciais aplicações tecnológicas pelas suas características como a composição e propriedades mecânicas. A casca de coco verde é material lignocelulósico podendo ser empregado no preparo de fertilizantes, materiais e compósitos na construção civil, na geração de energia térmica e na produção de biocombustível de 2ª geração.

Uma das características dos biocombustíveis e que torna sua produção interessante é sua origem renovável, que não ocorre com os combustíveis fósseis que ainda são as mais comuns fontes de energia. A utilização dos combustíveis renováveis contribui com a redução de gases relacionados ao efeito estufa, contribuindo com a sustentabilidade do planeta (CATOLICO *et al.*, 2015).

Em consequência das preocupações causadas pelo aumento do aquecimento global, os biocombustíveis vêm tendo sua importância cada vez mais elevada nos debates sobre as mudanças climáticas, e eles são vistos como uma importante saída na minimização do aquecimento (CHOFI e VALENÇA, 2009).

Neste contexto, Sátiro *et al.* (2012) avaliaram a potencialidade das fibras da casca de coco verde para a obtenção do etanol 2G. Após observar os estudos citados sobre etanol lignocelulósico, foi definido uma estratégia para o desenvolvimento deste trabalho. As fibras da casca do coco verde foram submetidas às seguintes etapas de tratamento: lavagem, trituração, hidrólise química e hidrólise enzimática. A hidrólise química foi efetuada em concentração moderada de ácido e um processo de aquecimento contínuo. Para realizar o pré-tratamento foi utilizado 5g da fibra do coco verde em solução NaOH ou ácido 0,1M em refluxo por 30

minutos. Com o uso da solução NaOH foi obtido um precipitado negro, com aspecto de graxa. Já no tratamento ácido foi obtida uma solução alaranjada.

Gonçalves *et al.* (2014) avaliaram diferentes estratégias de obtenção de etanol da casca de coco verde, dentre elas a Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) e a Sacarificação e Fermentação Semi-Simultâneas (SSSF). A casca de coco foi pré-tratada com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio. Os rendimentos chegaram a 76% de conversão de glicose em etanol com o SSF e a 89% com SSSF.

A fermentação das pentoses é um obstáculo a ser superado pelas pesquisas relacionadas ao etanol lignocelulósico visto que ainda não se tem uma levedura que seja capaz de converter hexoses e pentoses concomitantemente com alto rendimento em etanol. Outra limitação consiste no controle da etapa do pré-tratamento, visto que não há padronização deste processo (GONÇALVES *et al.*, 2014).

São consideradas pioneiras da produção de etanol 2G no mundo, a GranBio (instalada em 2014, localiza-se em São Miguel dos Campos, Alagoas, que produz etanol da palha da cana) e a Raízen (inaugurada em 2015, localizada em Piracicaba, São Paulo, uma filial conjunta da multinacional Shell e da brasileira Cosan, produz etanol 2G dos co-produtos da cana de açúcar: palha e bagaço) (NOVACANA, 2015). A GranBio (2017) foi um empreendimento ousado, porém teve suas atividades encerradas em 2017, ela chegou a produzir anualmente 82 milhões de etanol 2G. Com relação à Raízen, esta apresenta uma capacidade produtiva de 42 milhões de etanol de segunda geração por ano (CNPEM, 2016).

Albuquerque *et al.* (2016) realizaram uma pesquisa sobre a produção de etanol 2G através de um processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática a partir de resíduos agroindustriais, especificamente a casca de coco verde, um substrato lignocelulósico, rico em carboidratos. No processo de obtenção do etanol 2G são utilizadas enzimas celulasas 10 em alta pressão hidrostática e temperatura moderada para realizar a atividade celulósica, no processo de sacarificação. Os resultados mostraram que a pressão não foi suficiente para quebrar a estrutura lignocelulósica, mas o efeito sinérgico da pressão hidrostática, celulasas e temperatura aumenta a eficiência enzimática.

## 4. METODOLOGIA

O desenvolvimento do estudo do pré-tratamento alcalino e sacarificação enzimática da fibra do coco verde para produção do etanol 2G foi realizado seguindo as etapas destacadas na Figura 11. Cada etapa será descrita detalhadamente nos itens a seguir.

**Figura 11 – Fluxograma das etapas da pesquisa**



### 4.1 Beneficiamento da casca de coco verde

Foi obtido comercialmente na cidade de Salvador localizada na região Nordeste do Brasil, 10 amostras de coco verde (Figura 12a). Todos os resíduos da casca do coco verde foram removidos manualmente e com auxílio de um martelo, para obtenção das fibras do coco. As fibras da casca do coco verde removidas foram aquecidas em uma estufa de secagem à 60 °C durante um período de 24h. Após secagem, foi realizada a moagem da fibra utilizando um multiprocessador mecânico de marca Braun do Brasil, modelo MC-1, 60Hz. A fibra moída (Figura 12b) foi peneirada em peneira de polipropileno para selecionar partículas de tamanho uniforme. Posteriormente, foram armazenadas em um recipiente plástico à temperatura ambiente até submetê-las ao pré-tratamento (Figura 12c).

**Figura 12** – Preparo da amostra de fibra da casca de coco verde (a) amostra do coco verde; (b) fibra moída (c) armazenamento das fibras.



## 4.2 Pré-Tratamento e Sacarificação da fibra de coco

Para converter os materiais lignocelulósicos em etanol foi realizado o pré-tratamento com o objetivo de remover a hemicelulose e a lignina visando causar a exposição da celulose ao meio contendo as enzimas glucanases para liberação dos açúcares fermentescíveis.

## 4.3 Ensaio Preliminar

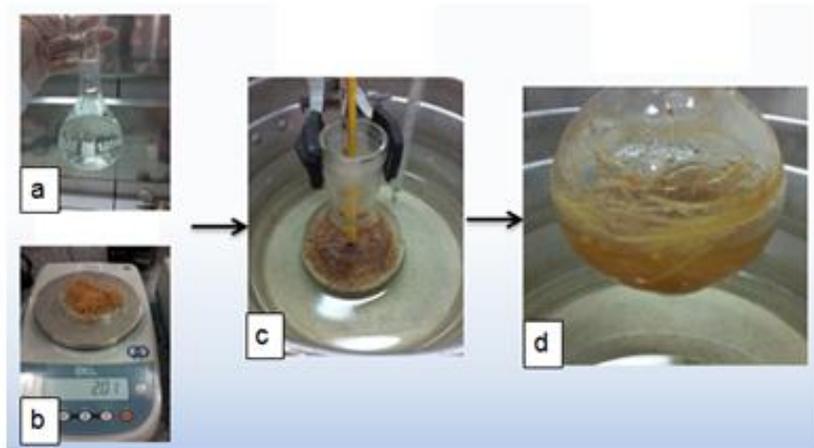
### 4.3.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento químico das fibras para deslignificação do material lignocelulósico da casca de coco foi realizado por hidrólise alcalina tendo como base o processo descrito por Brígida *et al.* (2010). Este processo de hidrólise química utilizou o agente químico peróxido de hidrogênio em pH 11,5 para promover a deslignificação da fibra.

O experimento foi realizado com 40 mL da solução de peróxido de hidrogênio para cada 2g da amostra de fibra beneficiada. A Figura 13 ilustra todos os passos do procedimento experimental adotado para a realização do processo de deslignificação da amostra de fibra de coco verde utilizando peróxido de hidrogênio.

O diferencial deste trabalho se baseia na aplicação das enzimas glucanases nos materiais lignocelulósicos pré-tratados com a técnica descrita por Brígida *et al.* (2010).

**Figura 13** - Procedimento experimental de deslignificação (a) agente químico; (b) fibra de coco; (c) início da hidrólise; (d) fim da hidrólise.



Após a reação de deslignificação, a amostra passou pelo processo de centrifugação para separação das fibras residuais da solução a serem submetidas às análises. O produto reacional foi centrifugado em centrífuga de bancada FANEM Excelsa II modelo 206BL, à 5000 rpm durante 5 min (Figura 14). A fibra residual foi separada do sobrenadante, lavada e seca em estufa.

**Figura 14** – Fibra após reação de hidrólise



#### 4.3.2 Sacarificação

Os ensaios enzimáticos foram conduzidos utilizando a enzima ROHALASE® SEP, doada pela AB ENZYMES, com as características descritas no Quadro 1.

**Quadro 1 - Dados técnicos da enzima ROHALASE®SEP.**

Descrição	Aplicação	Atividade Enzimática	Dose Recomendada
Mistura líquida de xylose e beta-glucanase fúngica para hidrólise de polissacarídeos não-amiláceos.	Degradação de fibras vegetais com alto conteúdo de xilanas e beta-glucanas (celulose) e outros polissacarídeos.	Min 225,000 BXU/g  Min 255,000 BU/g	Grãos: 50-100 g /farinha de trigo  Fabricação de cerveja e destilação: 25-100 g / tonelada de matéria-prima

Fonte: Folha de especificação AB ENZYMES.

A reação enzimática foi realizada utilizando uma solução tamponada de acetato de sódio Anidro 0,1 M. O tampão foi preparado com 25 mL de solução aquosa de ácido acético (1M) e 25 ml de solução aquosa de acetato de sódio. Foi adicionado em 1g de fibra pré-tratada (pH 5), 0,1mL da enzima Rohalase SEP, aquecidos à 80 °C durante uma hora e sob agitação para todos os experimentos do planejamento fatorial.

**Figura 15 - Fluxograma da sacarificação enzimática.**

Durante a sacarificação também foi observada a Curva da Cinética da reação enzima versus substrato para verificar a taxa de liberação de ART em função do tempo.

$$\text{Velocidade} = \frac{\text{ART (g)}}{t(\text{h})} \quad (\text{Eq. 2})$$

#### 4.4 Ensaios de avaliação dos parâmetros do pré-tratamento

Com o objetivo de obter o maior aproveitamento das hexoses, foi elaborado um planejamento experimental para avaliar o efeito de alguns parâmetros utilizados por Brígida *et al.* (2010) na etapa de pré-tratamento conforme apresentado na Tabela 11.

Foram definidas 3 variáveis como fatores para se avaliar e otimizar a etapa de pré-tratamento: (1) a concentração de peróxido de hidrogênio, (2) o tempo de contato da solução com a fibra e (3) a temperatura de reação. O planejamento fatorial  $2^3$  com triplicata do ponto central foi realizado utilizando as condições descritas na Tabela 11.

**Tabela 11** – Planejamento experimental do pré-tratamento da fibra de coco verde ( $2^3+3$ ).

Experimento	Concentração H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	8,1	3,0	90
2	8,1	3,0	70
3	8,1	2,0	90
4	8,1	2,0	70
5	2,7	3,0	90
6	2,7	3,0	70
7	2,7	2,0	90
8	2,7	2,0	70
9	5,4	2,5	80
10	5,4	2,5	80
11	5,4	2,5	80

Foram quantificadas como resposta para avaliação do efeito dos fatores a massa de fibra inicial ( $m_{\text{inicial}}$ ), fibra residual após tratamento ( $m_{\text{final}}$ ), a fibra

solubilizada no processo (FS) e a quantidade de açúcares redutores totais liberados na fase líquida (ART). Os principais açúcares que são liberados neste processo são: glicose, celobiose e xilose.

Para melhor avaliação da reposta, foi calculado o percentual da perda mássica de fibra no processo por meio da Equação 3 e calculada a quantidade de ART presente na fibra solubilizada por meio da Equação 4.

$$\text{Perda mássica \%} = \frac{(m_{\text{inicial}} - m_{\text{final}})}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{ARTFS} = \text{ART (g)} / \text{FS (g)} \quad (\text{Eq. 4})$$

#### 4.5 Ensaios de validação das condições de Pré-Tratamento

Foram realizados 3 ensaios para validar as condições estabelecidas como mais adequadas ao pré-tratamento. Cada um dos ensaios apresentou aspectos diferenciados para melhor compreensão do processo de extração da glicose das fibras.

##### 4.5.1 Ensaio 1

Este ensaio teve como objetivo validar as condições do pré-tratamento das fibras em uma escala maior.

##### 4.5.1.1 Pré-tratamento

Foram pesados em triplicata 6 g  $\pm$  0,1 g de fibra de coco triturada e peneirada, a fibra foi colocada em balões de fundo redondo de 250 mL, ao balão foi adicionado 120 mL de solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,5%. Os balões foram equipados com sistema de refluxo e mantidos sob agitação magnética por 2 h e 30 min a uma temperatura de 80  $\pm$  2 °C em banho térmico. Após etapa de reação, o conteúdo foi centrifugado e a fibra residual filtrada à vácuo em funil de Büchner e lavada uma vez com 100 mL de água

destilada. O filtrado passou por secagem à 60 °C em estufa de circulação de ar por 15 h.

#### **4.5.1.2 Sacarificação**

Em três balões de fundo redondo de 100 mL, equipados com sistema de fluxo, foram adicionados  $2 \pm 0,05$  g de fibra de coco pré-tratada seca, 200 µL de enzima (ROHALASE®SEP) e 40 mL de solução Tampão pH 5,0. O sistema foi mantido sob agitação de 2,5 rpm e temperatura de  $55 \pm 1$  °C por 4 h. Durante a reação foram coletadas amostras de 30 em 30 minutos e analisadas em espectrofotômetro conforme procedimento adotado para os padrões de glicose.

Ao final da etapa de reação, o conteúdo foi centrifugado e a fibra residual filtrada à vácuo em funil de Büchner e lavado uma vez com 100 mL de água destilada cada um. O filtrado foi secado à 60 °C em estufa de circulação de ar por 8h.

#### **4.5.2 Ensaio 2:**

Este ensaio teve como objetivo se obter massa suficiente para realização de análises de caracterização química bem como avaliar o efeito do aumento de escala do processo. As condições de pré-tratamento e hidrólise foram as mesmas do Ensaio 1.

##### **4.5.2.1 Pré – Tratamento**

Foi pesado 20,326g de fibra de coco triturada e peneirada, a fibra foi colocada em balões de fundo redondo de 1000 mL, ao balão foram adicionados 400 mL de solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,5%. O balão equipado com sistema de refluxo foi mantido sob agitação magnética por 2 h e 30 min a uma temperatura de  $80 \pm 2$  °C em banho térmico. Após etapa de reação o conteúdo foi centrifugado e a fibra residual filtrada à vácuo em funil de Büchner e lavado uma vez com 500 mL de água destilada. O filtrado foi secado à 60 °C em estufa de circulação de ar por 16 h. Foi obtida a massa seca de 17,153 g.

#### **4.5.2.2 Sacarificação**

Em um balão de fundo redondo de 500 mL, equipado com sistema de fluxo, foram adicionadas 9,142 g de fibra de coco pré-tratada e seca, (experimento 02), 914 µL de enzima (ROHALASE®SEP) e 183 mL de solução Tampão pH 5,0. O sistema foi mantido sob agitação de 2,5 rpm e temperatura de  $55 \pm 1$  °C por 4 h. Durante a reação foram coletadas amostras de 30 em 30 minutos e analisadas em espectrofotômetro conforme procedimento adotado para os padrões de glicose. Ao final da etapa de reação o conteúdo foi centrifugado e filtrado à vácuo em funil de Bunchner e lavado uma vez com 500 mL de água destilada. O filtrado foi secado à 60 °C em estufa de circulação de ar por 8 h. A massa seca obtida foi: 7,932 g.

#### **4.5.3 Ensaio 3**

O objetivo deste ensaio foi avaliar a cinética enzimática da sacarificação.

#### **4.5.4 Pré-tratamento**

Este ensaio foi realizado com a fibra pré-tratada da validação do planejamento experimental no Ensaio 1.

#### **4.5.5 Sacarificação nos Ensaios de Validação 1, 2 e 3**

Em três balões de fundo redondo de 100 mL equipado com sistema de fluxo foram adicionados  $2 \pm 0,05$  g de fibra de coco pré-tratada seca, 200 µL de enzima (ROHALASE®SEP) e 40 mL de solução Tampão pH 5,0. O sistema foi mantido sob agitação de 2,5 rpm e temperatura de  $55 \pm 1$  °C por 4 h. Durante a reação foram coletadas amostras de 30 em 30 minutos e analisadas em espectrofotômetro conforme procedimento adotado para os padrões de glicose. Ao final da etapa de reação o conteúdo foi centrifugado. O sobrenadante foi congelado para posterior análise e a fibra residual foi lavada uma vez com 500 mL de água destilada e filtrada à vácuo em funil de Büchner. O filtrado passou por secagem à 60 °C em estufa de circulação de ar por 8 h.

## 4.6 Métodos Analíticos

### 4.6.1 Caracterização morfológica das fibras do coco verde por MEV

O coco verde apresenta uma estrutura complexa que envolve materiais presentes naturalmente nos tecidos vegetais. Primeiramente foram analisadas as características superficiais das fibras de coco verde antes do pré-tratamento alcalino, utilizando um MEV, obtendo micrografias da superfície das fibras que revelam suas características morfológicas.

Foram analisadas as características superficiais das fibras de coco verde antes e após o processo do pré-tratamento alcalino (fibras sem passar pelo processo de peneiramento), utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), obtendo micrografias da superfície das fibras, revelando suas características estruturais na superfície das microfibras (Figura 16). As amostras de fibras utilizadas no ensaio sofreram tratamento de metalização com o ouro.

**Figura 16** - Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)



As amostras de fibra de casca de coco foram submetidas à análise no microscópio eletrônico (Zeiss Scope A1 com aplicação máxima de 1000 vezes, equipado com câmera Zeiss Axiocam ERc5s) antes e após a deslignificação para se obter uma visualização das alterações causadas pelo agente oxidante (peróxido de hidrogênio) na matriz lignocelulósica.

#### 4.6.2 Análise Térmica

As amostras também foram submetidas a uma análise térmica por termogravimetria (TG). Esta técnica consiste em avaliar o perfil de decomposição, ocasionado pelo aumento da temperatura. A técnica fornece informações relacionadas à perda de massas pelas reações de degradação. Cada polímero que compõe a estrutura da biomassa vegetal tem uma temperatura específica de degradação e esta é relacionada à sua estrutura molecular. O equipamento utilizado foi uma balança termogravimétrica modelo TGA-50, marca SHIMADZU. O aquecimento das amostras partiu da temperatura ambiente até 800 °C, sendo a razão de aquecimento de 10 °C/min (CORRADINI *et al.* 2009).

#### 4.6.3 Análise Química das fibras

Para a determinação dos principais constituintes da fibra da casca de coco verde (lignina, hemicelulose e celulose) foram utilizados os métodos de Van Soest (1965). Os ensaios realizados foram: FDN (Fibra Detergente Neutra); FDA (Fibra Detergente Ácida) e Lignina. Foram realizadas análises de fibras para determinação do teor de fibras totais, fibra detergente ácida e fibra neutra das amostras em analisador automático de fibras (ANKOM Technology), conforme metodologia de Van Soest & Wine (1967).

#### 4.6.4 Análise Química de Açúcares Redutores Totais (ART)

A glicose e o ART foram quantificados pelo método DNS. A preparação do reagente DNS foi realizada misturando-se inicialmente 4,976 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico com 200 mL de hidróxido de sódio (NaOH 1N) e 150 g de tartarato de sódio e potássio tetra hidratado. Em seguida, a mistura foi transferida para um Balão de 500 mL que foi avolumado com água destilada. A solução de hidróxido de sódio foi preparada dissolvendo-se 8 g de hidróxido de sódio anidro em água destilada com volume ajustado para 200 mL em um balão volumétrico. A solução final foi armazenada por até 30 dias em frasco âmbar até posterior uso.

Foram preparados 500 mL de solução estoque de glicose com concentração igual a 1,6 g/mL da seguinte forma: pesou-se em 0,806 g de Glicose anidra PA

(marca: Synth; pureza 99% lote 155355), adicionou-se 100 mL de água destilada, dissolveu-se completamente a glicose. Em seguida, a solução foi transferida para um balão de 500 mL, acrescentou-se mais água ao bécher para garantir que todo o reagente fosse transferido para o balão, então avolumou-se para 500 mL com água. Os outros pontos da curva foram preparados a partir de diluições da solução estoque 1,6 g/L em balões de 100 mL e avolumados com água destilada. Após preparar todos os padrões foi alíquotado 1 mL de cada ponto e adicionado em tubos de ensaio contendo 1 mL de DNS, os tubos foram tampados e colocados em banho Maria por 10 min, passados os dez minutos os tubos foram imersos em banho de gelo e foi carregado em cada tubo 10 mL de água destilada. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando espectrofotômetro (FEMTO; Mod. 80MB).

**Tabela 12** - Concentrações das soluções padrão diluídas de glicose a partir de uma solução de concentração 1g/L.

	Concentração (g/L)	Volumes coletados Da solução estoque
<b>glicose</b>	0,05	3,13 mL
	0,10	6,25 mL
	0,15	9,4 mL
	0,20	12,5 mL
	0,40	25 mL
	0,80	50 mL
	1,00	62,5 mL
	1,20	75 mL
	1,60	100 mL

Todas as amostras do meio aquoso reacional resultantes dos processos de delignificação e sacarificação das fibras tiveram os ARTs quantificados pelo método DNS e utilizando a curva de calibração similar a apresentada na Figura 19.

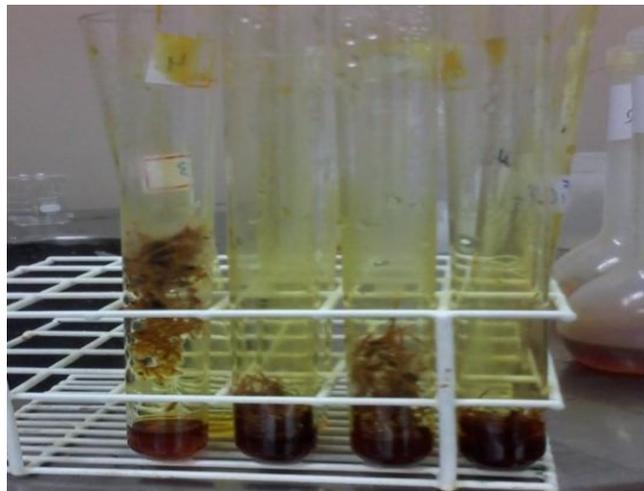
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Sacarificação

Após sacarificação a solução tornou-se uma mistura heterogênea de coloração âmbar, contendo uma fase líquida e outra fase sólida. Foi realizado o processo de separação da fibra residual da fase líquida por centrifugação. A Figura 18 apresenta a imagem do material após a realização da análise de açúcares redutores totais.

**Figura 18** - Fotografia do material após análise de açúcares redutores totais

ART

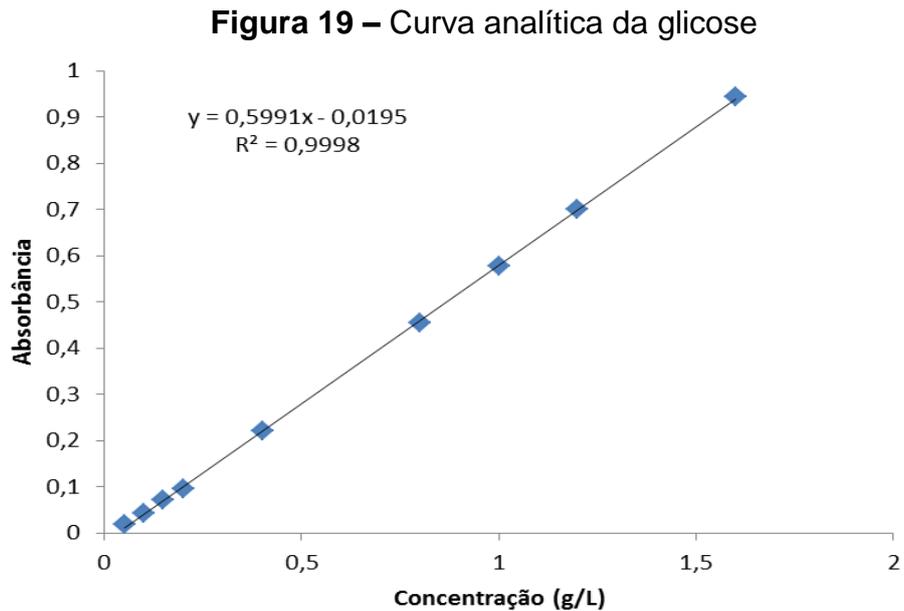


### 5.2 Determinação de Açúcares redutores totais (ART)

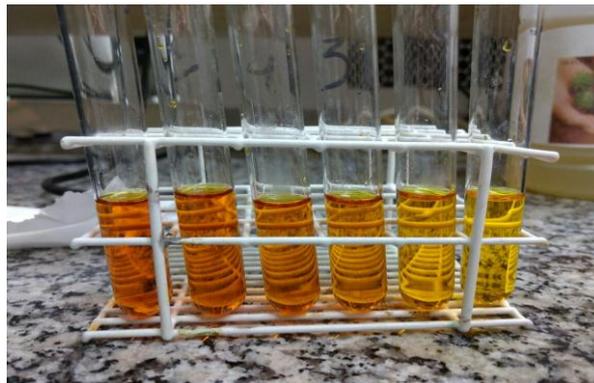
A quantificação dos ART foi realizada no meio reacional após tratamento químico (Pré-tratamento) e após tratamento enzimático (Sacarificação). No primeiro processo, a formação de ART não é desejada visto que evidencia degradação das fibras de celulose. Por outro lado, na sacarificação, a formação de ART evidencia a ação da enzima nas fibras de celulose liberando glicose e outros oligossacarídeos (celbiose).

Para a quantificação dos ART pelo método DNS, uma curva de calibração foi plotada de absorbância em função de concentrações conhecidas de glicose. A curva de calibração está apresentada na Figura 19 e a regressão linear resultou num

coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9998. Assim, os resultados obtidos na curva analítica demonstram que cerca de 99% da variação da absorbância é resultado da influência da concentração dos açúcares fermentescíveis demonstrando uma correlação da concentração versus absorbância .



**Figura 20 – Padrão de glicose após reação com DNS.**



Varição da coloração dos padrões de glicose observado na Figura 20 destaca a reatividade com o DNS e a correlação com as concentrações da glicose.

### 5.3 Microscopia

A Figura 21 apresenta uma fotografia da fibra antes (Figura 21a) e após tratamento químico (Figura 21b) em que se observa leve escurecimento da fibra residual após o contato com os reagentes. Estas fibras da casca de coco verde foram avaliadas antes e após pré-tratamento químico por meio de micrografias obtidas por meio de MEV.

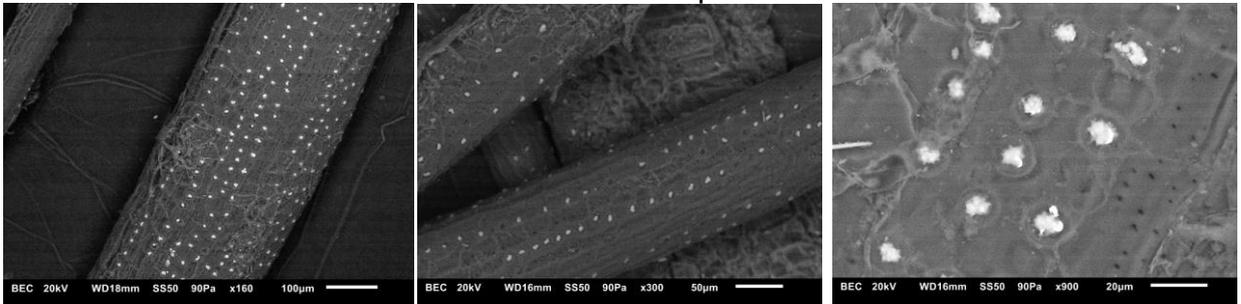
**Figura 21** – Aspectos visuais da fibra da casca de coco antes (a) e após o pré-tratamento (b) com  $H_2O_2$ .



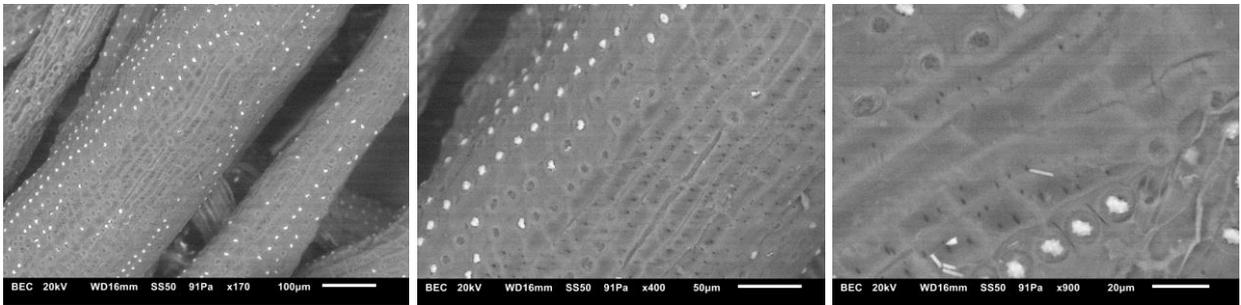
A Figura 22 apresenta algumas micrografias das fibras antes e após serem submetidas ao pré-tratamento e sacarificação cuja superfície pode ser caracterizada como rugosa, cuja diferença considerando o aspecto visual as amostras deve-se a ação do reagente químico.

**Figura 22** - Micrografias obtidas por MEV das amostras de fibra de coco verde

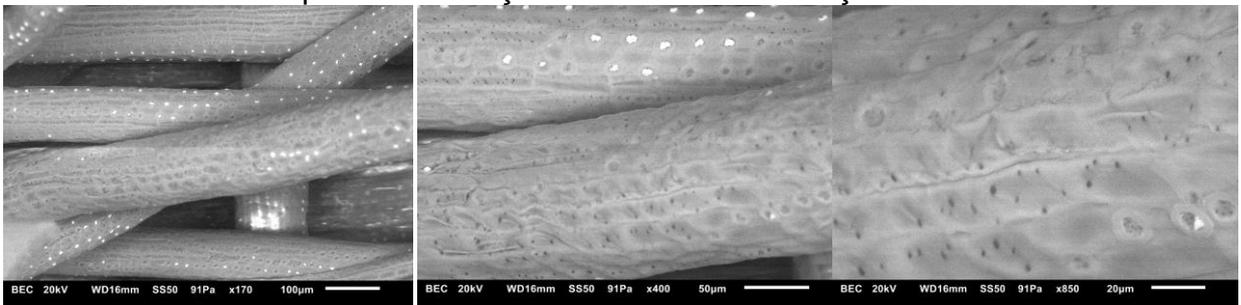
Antes do tratamento químico.



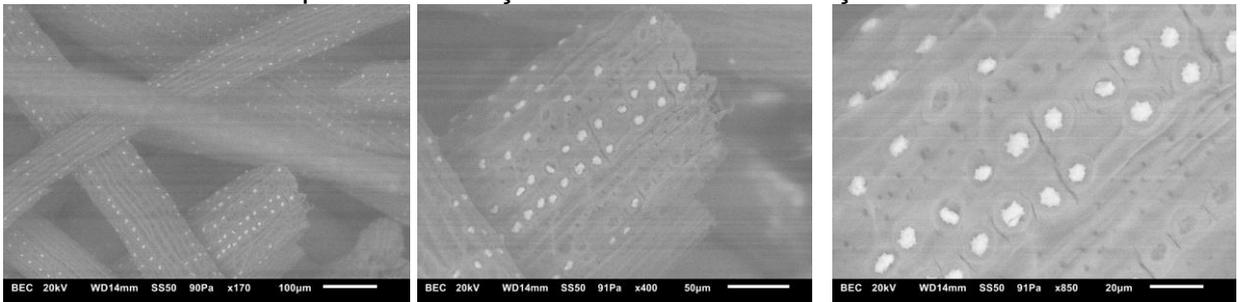
Pós-tratamento.



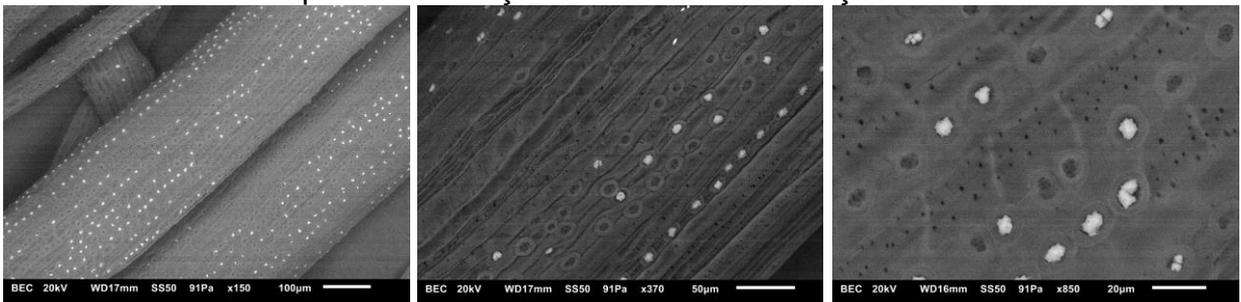
Após sacarificação do ensaio de validação 1



Após sacarificação do ensaio de validação 2



Após sacarificação do ensaio de validação 3



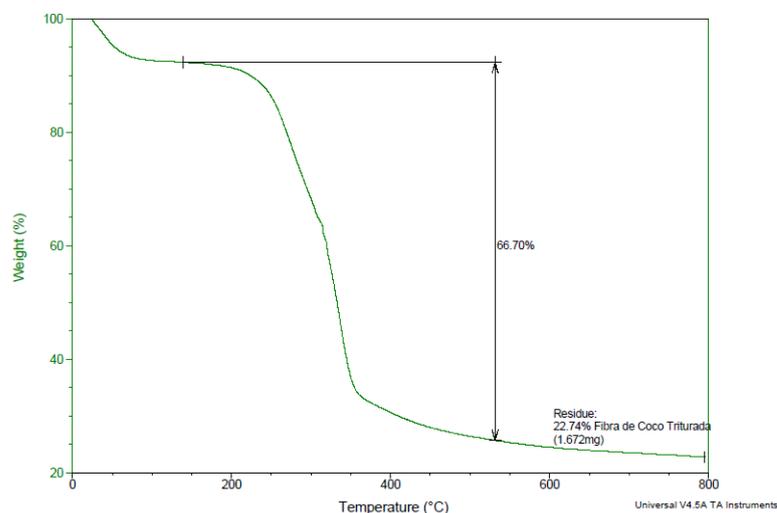
Após o processo do pré-tratamento químico, a fibra da casca do coco verde revelou uma superfície menos rugosa conforme micrografias apresentadas na Figura 22. Esta mudança, provocada pelo tratamento químico, pode ser atribuída à retirada das impurezas e sólidos solúveis, além da degradação da estrutura externa presente na superfície. Outra consequência causada pelo tratamento químico foi à abertura da fibra em algumas regiões permitindo assim o acesso à parte interna da mesma onde estão localizadas a celulose e a hemicelulose.

#### 5.4 Análise Termogravimétrica

Os efeitos do processo de hidrólise na fibra foram avaliados através da técnica de termogravimetria (Figuras 23 e 24). Foram obtidas curvas termogravimétricas da fibra de coco verde sem o tratamento (Figura 23) e após o tratamento de designificação química (Figura 24) com a utilização do peróxido de hidrogênio.

Na curva termogravimétrica da fibra antes do pré-tratamento (Figura 23), foi possível observar que no intervalo entre 25 °C a 90 °C ocorreu à primeira perda de massa relevante (7,5%), que é atribuída à vaporização da água naturalmente encontrada no coco verde, responsável pela sua umidade. Um segundo evento de perda de massa (66,70%) foi observado no intervalo de temperatura de 150 °C a 550 °C que pode ser atribuída à decomposição da hemicelulose e celulose.

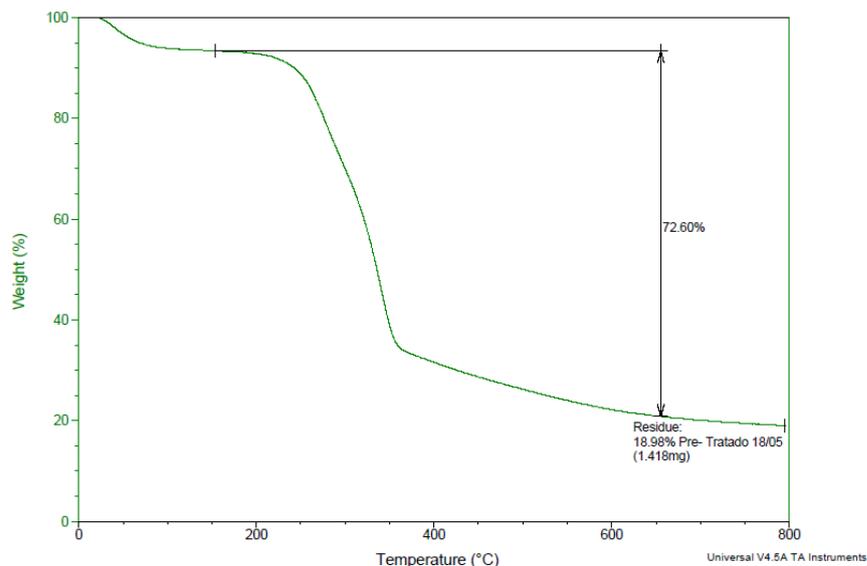
**Figura 23** – Curva termogravimétrica da fibra sem o pré-tratamento.



Após a temperatura de 550 °C, observa-se perda de massa gradual atribuída à decomposição da lignina restando as cinzas (22,74%) que corresponde a 1,672 mg de 7,3550 mg da massa inicial.

Na curva termogravimétrica da fibra após o pré-tratamento (Figura 24), verifica-se a perda de massa a partir de 40 °C até 152 °C devido à vaporização de compostos voláteis residuais do tratamento químico bem como da água. O evento seguinte de perda de massa iniciou-se em torno de 190 °C atribuída primeiramente à degradação da hemicelulose seguida da celulose até a temperatura de 350 °C.

**Figura 24** - Curva termogravimétrica para amostra de fibra de coco após o pré-tratamento alcalino.



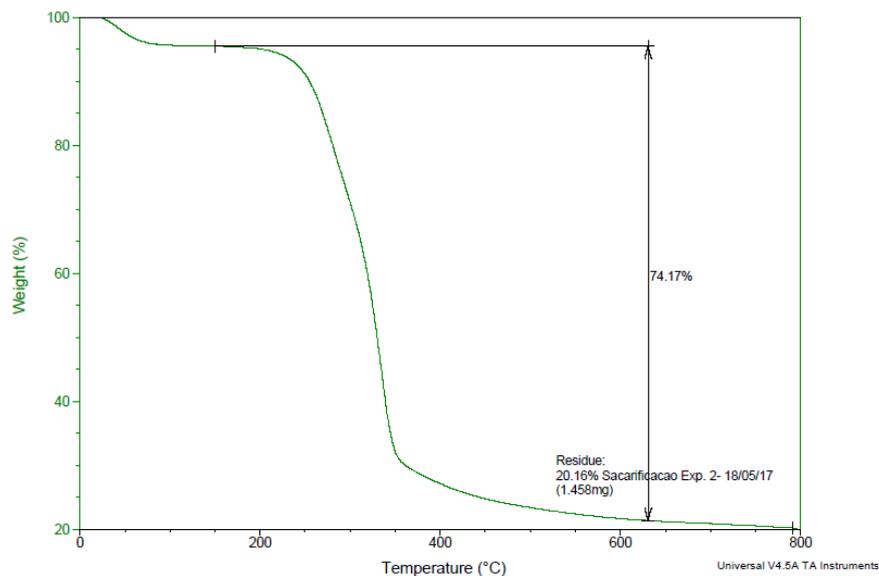
O próximo evento de perda de massa em temperatura acima de 400 °C é atribuída à degradação da lignina que finaliza em torno de 652 °C. No processo ocorreu uma perda de 72,60% da matéria orgânica numa faixa de temperatura de 152 °C à 652 °C que resultou em 18,98% de resíduo mineral.

A fibra que sofreu a sacarificação entre 1 à 2 horas, demonstrou em seu perfil termogravimétrico perda de 74,17%, que corresponde a decomposição da massa orgânica que se iniciou a 150 °C terminando a 600 °C, com cerca de 20,16% de resíduo mineral (Figura 25).

Considerando os perfis termogravimétricos foi observado que a decomposição do material orgânico ocorreu com menor variação de temperatura na fibra triturada. Já para as fibras pré-tratada e sacarificada, os resultados

demonstraram a diferença residual de 1,18% atribuída a maior temperatura da fibra sacarificada.

**Figura 25** - Curva termogravimétrica para amostra de fibra de coco após a sacarificação.



De acordo com Corradini *et al.* (2009), nas curvas de termogravimetria e da derivada de TG, a temperatura que a umidade é absorvida, que dado início a degradação térmica ocorre entre 25 °C à 120 °C e a perda de massa da relacionada a a geração das cinzas ocorre a 650 °C.

### 5.5 Determinação das condições ótimas de pré-tratamento

Os resultados obtidos nos ensaios do planejamento experimental para se determinar as condições ótimas do pré-tratamento da fibra de coco estão apresentados na Tabela 13.

De uma forma geral, os dados obtidos no ponto central tiveram uma boa repetitividade visto que foram obtidos baixos desvio padrão para as variáveis resposta (ART - Açúcares Redutores Totais; Fibra Residual - Fibra que permaneceu após a etapa do pré-tratamento; Fibra Solubilizada - Uma mistura de produto de degradação dos produtos da fibra; ARTFS - É a quantidade de açúcares redutores totais na fibra solubilizada; Perda Mássica - Perda de massa em g). De uma forma

geral, pôde ser observado que no processo de pré-tratamento, dentro do domínio experimental estudado, houve uma perda mássica significativa de 48 a 54% e deste percentual o ART apresenta-se em teor de 1 a 6,4%.

**Tabela 13** – Resultados do planejamento experimental da hidrólise da casca de coco verde.

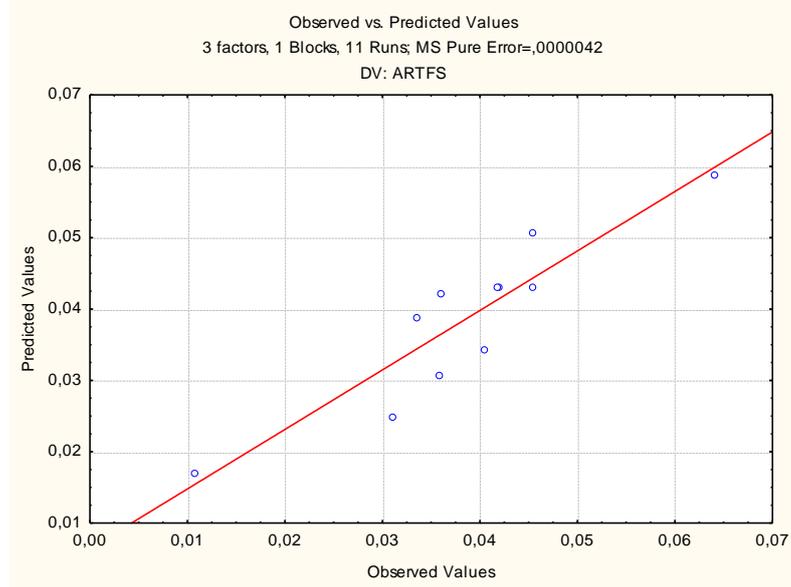
Ensaio	Fatores			Respostas				
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	ART (g)	Fibra Residual FR (g)	Fibra Solubiliza da FS (g)	ARTFS	Perda Mássica (%)
1	8,1	3,0	90	0,0114	0,9422	1,0578	0,01074	52,89%
2	8,1	3,0	70	0,0423	0,9545	1,0455	0,04049	52,28%
3	8,1	2,0	90	0,0346	1,0365	0,9635	0,03588	48,18%
4	8,1	2,0	70	0,0333	1,0081	0,9919	0,03355	49,60%
5	2,7	3,0	90	0,0302	1,0280	0,9720	0,03111	48,60%
6	2,7	3,0	70	0,0358	1,0064	0,9936	0,03602	49,68%
7	2,7	2,0	90	0,0445	1,0217	0,9783	0,04545	48,92%
8	2,7	2,0	70	0,0624	1,0243	0,9757	0,06399	48,79%
9	5,4	2,5	80	0,0479	0,9462	1,0538	0,04545	52,69%
10	5,4	2,5	80	0,0448	0,9304	1,0696	0,04193	53,48%
11	5,4	2,5	80	0,0451	0,9226	1,0774	0,04184	53,87%
Média no ponto central				0,0459	0,9331	1,0669	0,0431	0,5335
Desvio Padrão no ponto central				0,0017	0,0120	0,0120	0,0021	0,0060

O objetivo desta etapa do processo (pré-tratamento) é obter perda de massa moderada referente à deslignificação somada a uma mínima liberação de ART para o meio reacional, ou seja, mínima degradação das fibras de celulose. Para tanto foi criada uma variável combinada chamada ARTFS como sendo a razão da massa de ART liberada por massa de fibra solubilizada após o pré-tratamento. Entende-se como fibra solubilizada uma mistura dos produtos de degradação das fibras (lignina, hemicelulose e celulose) que são solúveis em água.

Os dados da Tabela 13 foram submetidos a uma análise estatística para adequação a um modelo quadrático para as duas respostas: ARTFS e %Perda Mássica.

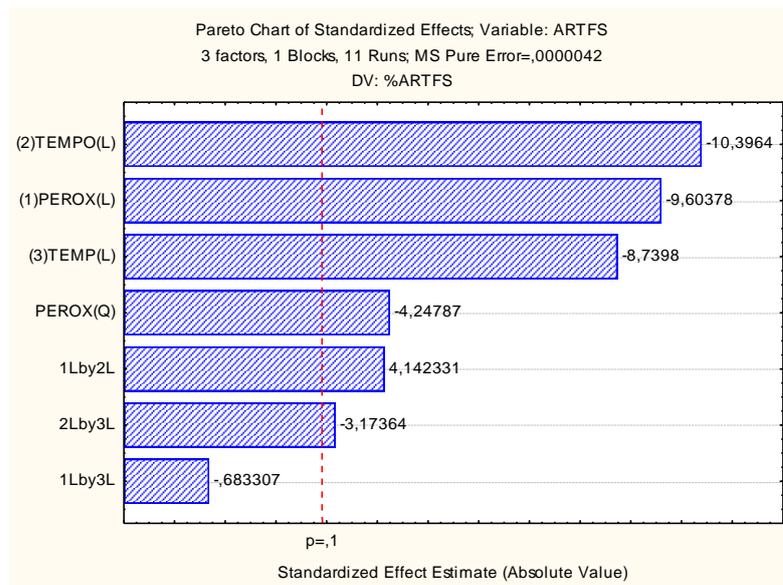
A Figura 26 apresenta os dados da resposta ARTFS observados versus predito pelo modelo gerado indicando que houve uma boa reprodutibilidade dos pontos experimentais ao modelo quadrático, pois os valores preditos em relação aos observados apresentam uma significativa correlação.

**Figura 26 –** Valores preditos versus observados do modelo quadrático para a resposta ARTFS



A Figura 27 apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores estudados na resposta ARTFS, para um nível de significância  $p=0,10$ .

**Figura 27 -** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o modelo da resposta ARTFS

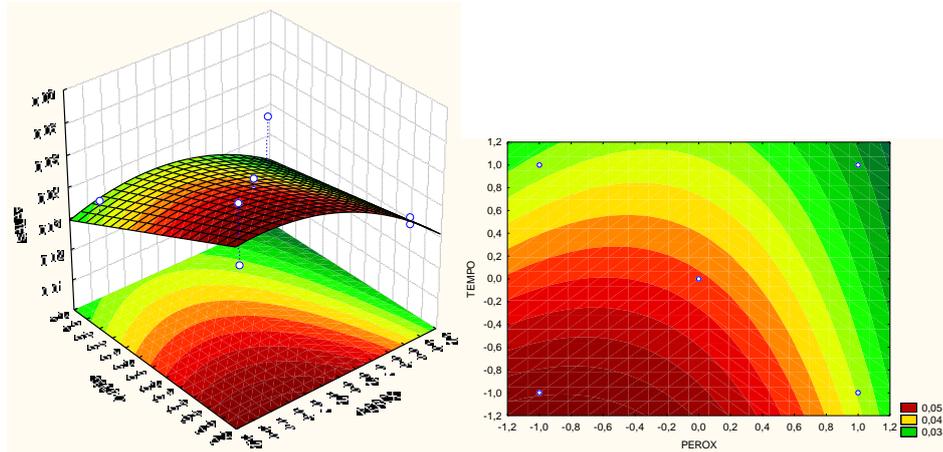


Verifica-se no gráfico de Pareto, Figura 27, que todas as variáveis estudadas apresentaram efeito negativo exceto o efeito combinado do tempo e da concentração de peróxido. Entre as variáveis estudadas, pode-se destacar que o “tempo de Reação” foi a variável mais relevante para o pré-tratamento, seguida pela “concentração de Peróxido de Hidrogênio” e por último a “temperatura”. A combinação das duas variáveis tempo e concentração de peróxido, e os efeitos quadráticos das variáveis tempo e temperatura não apresentaram correlações significativas. Justificando assim a escolha e importância das três variáveis estudadas. Deste modo, fez-se a regressão de um novo modelo desconsiderando os efeitos não significativos e foram construídas as superfícies de resposta para avaliação da resposta ARTFS.

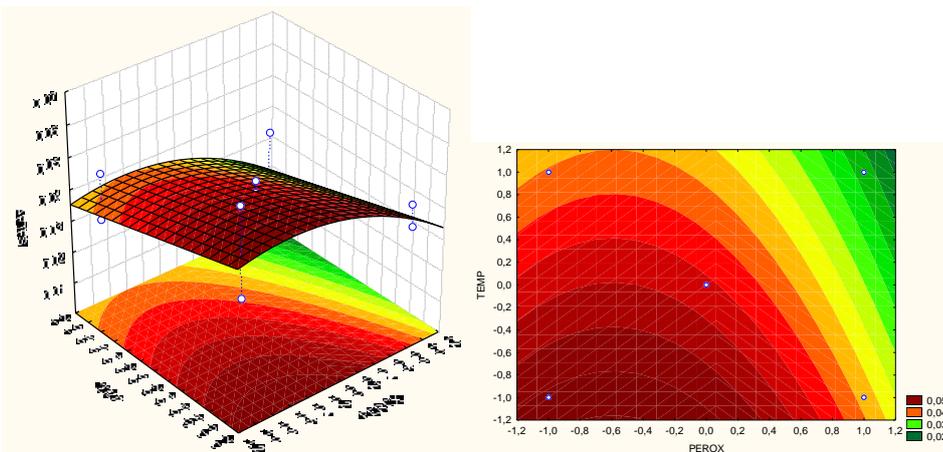
As superfícies de resposta para a variável ARTFS estão apresentadas na Figura 28 e puderam direcionar a tendência dos efeitos relacionados às variáveis estudadas.

Avaliando-se as superfícies de resposta e curvas de nível, é possível notar que a obtenção de valores moderados de ARTFS ocorre em condições de baixa concentração de peróxido de hidrogênio associada a maior tempo e temperatura ou em condições de alta concentração de peróxido de hidrogênio associada a menor tempo e temperatura. Assim, o estudo preliminar do efeito após a sacarificação pode ser considerado mais representativo, uma vez que foi possível avaliar a eficiência das condições de domínio estabelecidas.

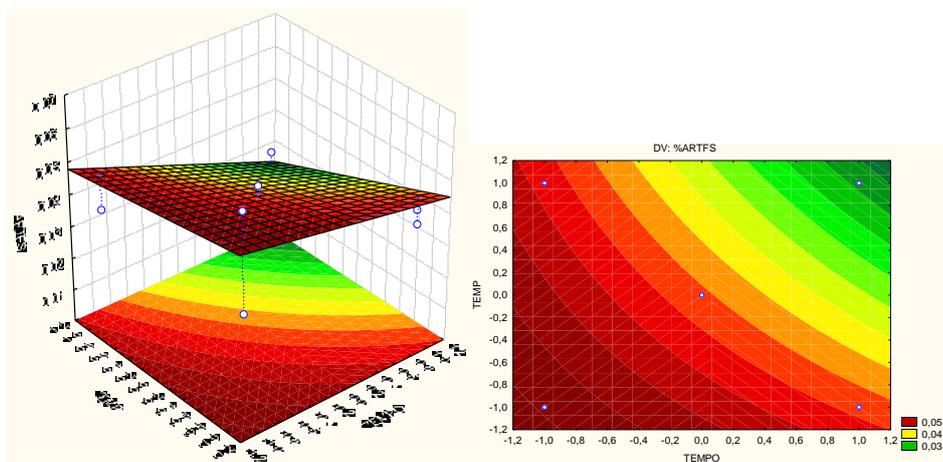
**Figura 28** – Superfície de Resposta do efeito das variáveis estudadas no pré-tratamento (a) tempo e concentração de  $H_2O_2$ ; (b) temperatura e concentração de  $H_2O_2$ ; e (c) temperatura e tempo.



(a)



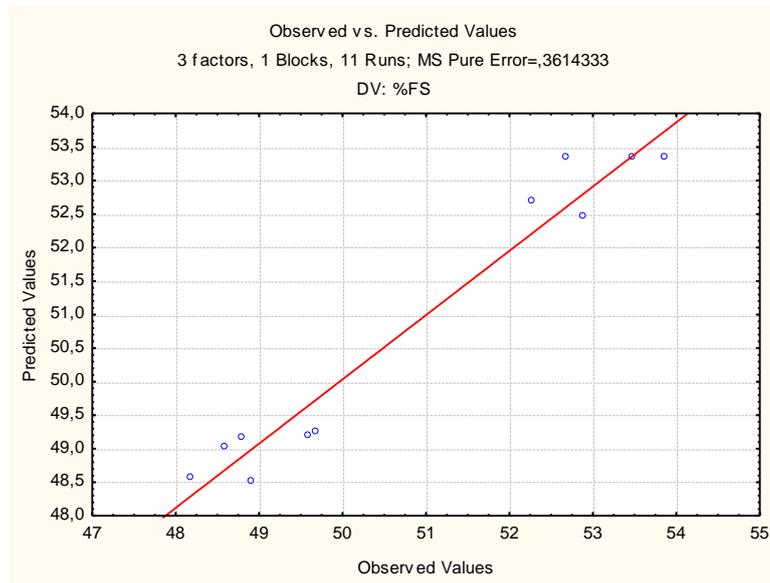
(b)



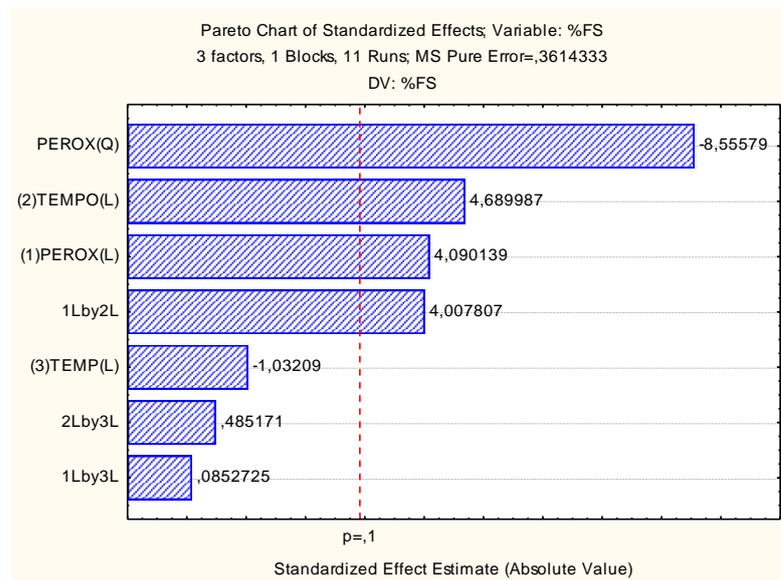
(c)

A Figura 29 apresenta os dados da resposta ARTFS observados versus predito pelo modelo gerado indicando que houve uma boa reprodutibilidade dos pontos experimentais ao modelo quadrático. A Figura 30 apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos dos fatores estudados na resposta % Perda Mássica, para um nível de significância  $p=0,10$ .

**Figura 29 – Valores preditos versus observados do modelo quadrático para a resposta %Perda Mássica**



**Figura 30 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o modelo da resposta %Perda Mássica**

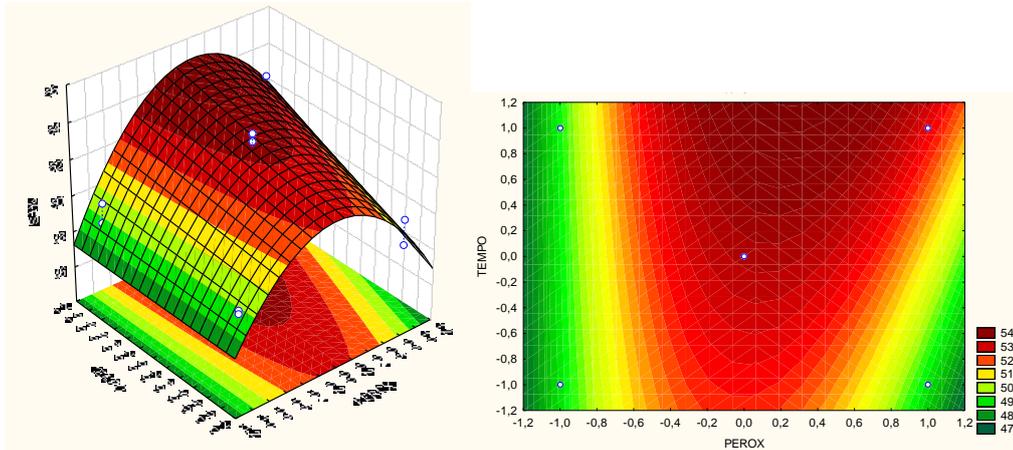


Verifica-se, na Figura 30, que todas as variáveis estudadas apresentaram efeito positivo exceto o efeito quadrático da concentração de peróxido e o efeito linear da temperatura. Entre as variáveis estudadas, pode-se destacar que a concentração de peróxido foi a variável mais relevante para o pré-tratamento, seguida pelo tempo de reação. O efeito linear da temperatura, a combinação da variável temperatura (3) com as outras duas, tempo (2) e concentração de peróxido (1) e os efeitos quadráticos das variáveis tempo e temperatura não apresentaram correlações significativas. Justificando assim a escolha e importância das três variáveis estudadas. Deste modo, fez-se a regressão de um novo modelo desconsiderando os efeitos não significativos e foram construídas as superfícies de resposta para avaliação da resposta %Perda Mássica.

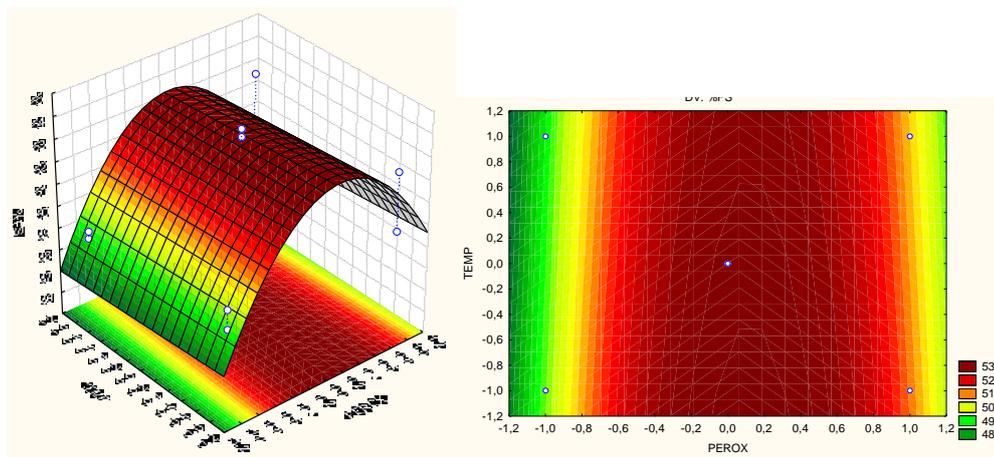
As superfícies de resposta e curvas de nível para a variável %Perda Mássica estão apresentadas na Figura 31 e puderam direcionar a tendência dos efeitos relacionados às variáveis estudadas.

Avaliando-se as superfícies de resposta e curvas de nível da Figura 31, é possível notar que a obtenção de altos valores de % Perda Mássica ocorre em condições de concentração moderada de peróxido de hidrogênio associada a maior tempo e temperatura. Nesta condição, por meio da análise da Figura 31, foi observado que existe maior formação de ART não desejada nesta etapa. A condição de concentração de peróxido de hidrogênio mais baixa associada a tempo e temperatura moderados apresenta-se como condição mais adequada para condução do pré-tratamento evitando-se a perda de ART e extraindo-se a lignina e hemicelulose. As condições ótimas de pré-tratamento estabelecidas pela análise das superfícies de resposta, portanto, são: tempo de 2,5h, temperatura de 80 °C e concentração de peróxido de hidrogênio de 3,5%.

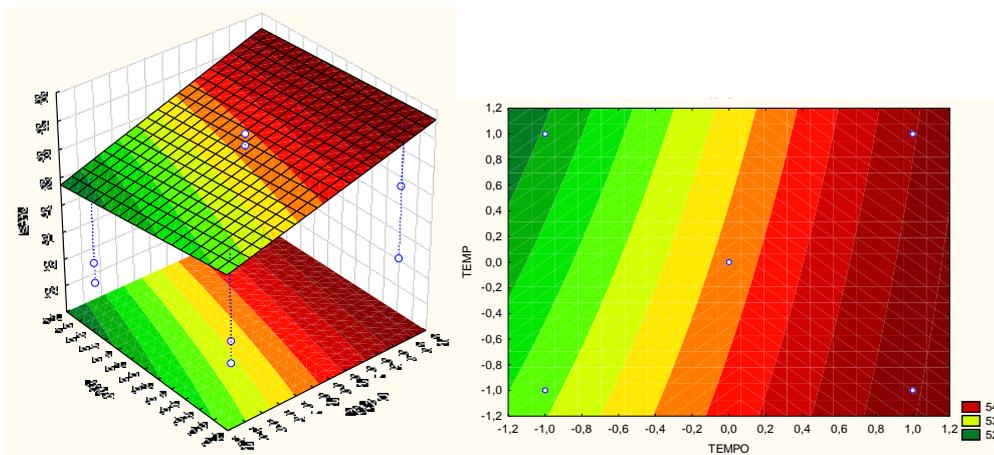
**Figura 31** – Superfície de Resposta do efeito das variáveis estudadas no pré-tratamento (a) tempo e concentração de  $H_2O_2$ ; (b) temperatura e concentração de  $H_2O_2$ ; e (c) temperatura e tempo.



(a)



(b)



(c)

## 5.6 Validação do Resultado do Planejamento Experimental

### 5.6.1 Ensaio de Validação 1

Os dados da Tabela 14 mostram que após o pré-tratamento a fibra do coco teve êxito na decomposição do material lignocelulósico com perda mássica de 75,7%.

**Tabela 14 – Dados obtidos no Pré-Tratamento**

IDENTIFICAÇÃO	ART (g/L)	ART (g)	Fibra Bruta (g)	Fibra Residual (g)	Fibra Solubilizada (g)	ARTFS	%Perda Mássica
Réplica 1	0,549	0,0659	6,002	4,544	1,458	4,5%	75,7%
Réplica 2	0,558	0,0669	6,013	4,584	1,429	4,7%	76,2%
Réplica 3	0,558	0,0669	6,009	4,522	1,487	4,5%	75,3%
<b>Média</b>	<b>0,555</b>	<b>0,067</b>	<b>6,008</b>	<b>4,550</b>	<b>1,458</b>	<b>4,6%</b>	<b>75,7%</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,0048</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0056</b>	<b>0,0314</b>	<b>0,0290</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0049</b>

Com relação ao processo de sacarificação, 4,1% do composto celulósico foram sacarificados, e foi responsável por 74% dos açúcares fermentescíveis, (Tabela 15). Assim, 26% correspondem ao percentual de açúcar não fermentável liberado pelas fibras de coco verde.

**Tabela 15 – Dados obtidos na Sacarificação**

IDENTIFICAÇÃO	Massa ART (g)	Fibra PTD (g)	Fibra Residual (g)	Fibra Sacarificada	% Fibra SAC	ART/SAC (g)
<b>Réplica 1 (4h)</b>	0,052801	2,01	1,89	0,11	5,6%	47%
<b>Réplica 2 (4h)</b>	0,058432	2,06	1,99	0,06	3,0%	94%
<b>Réplica 3 (4h)</b>	0,061303	2,05	1,98	0,08	3,7%	82%
<b>Média</b>				0,083	4,1%	74,2%
<b>Desvio Padrão</b>				0,0258	0,0133	0,2424

### 5.6.2 Ensaio de Validação 2

Os resultados referentes às alterações na massa das fibras do coco pré-tratada e sacarificada estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16** – Balanço de massa da fibra nas etapas de pré - tratamento e sacarificação

Etapa	Massa Fibra (g)	Massa Fibra Residual (g)	Fibra Consumida (g)	ART (g)	Fibra Consumida Não Fermentescível	Fibra Consumida Fermentável
<b>Pré-Tratamento</b>	20,362	17,153	3,209	0,316	90,1%	9,9%
<b>Sacarificação</b>	9,142	7,932	1,210	0,451	62,7%	37,3%

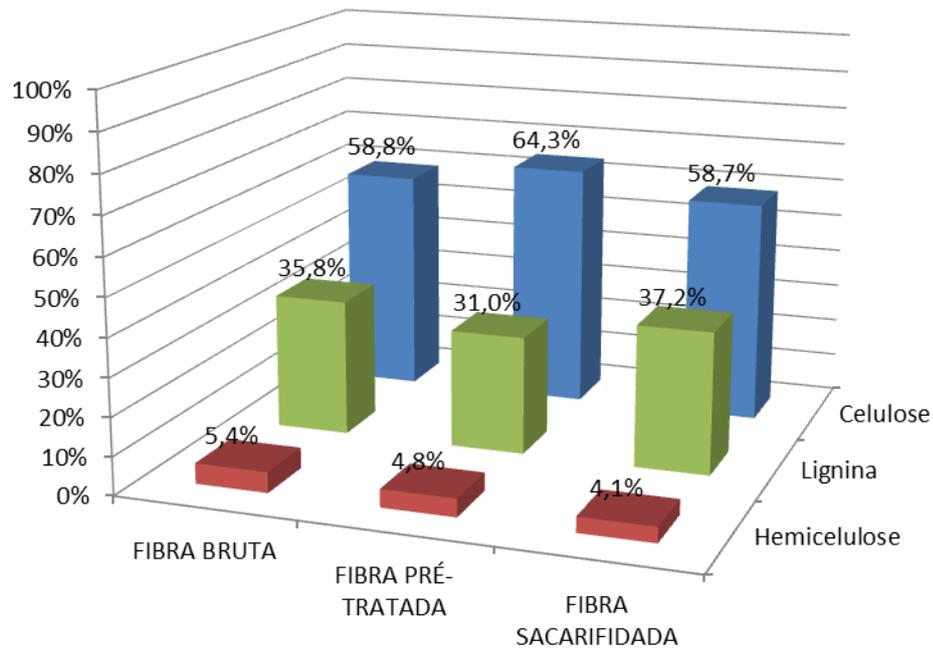
O pré-tratamento consumiu 15,8% da fibra. Deste percentual digerido, cerca de 90% foi de fibra não fermentescível e 10% de fibra fermentescível, o que significa que o pré-tratamento foi eficaz na remoção da lignina e outros compostos não fibrosos da casca do coco e não consumiu de modo significativo as fibras de celulose, mas sim as fibras de hemicelulose.

A sacarificação digeriu 13% da fibra pré - tratada e, deste percentual, 62,7% constitui-se de açúcares fermentescíveis. A ação da enzima ROHALASE SEP é composta de atividade de beta-glucanases e xilanases, de modo que a hemicelulose também sofreu hidrólise, sendo responsável pelo percentual de açúcar não redutor liberado pelas fibras.

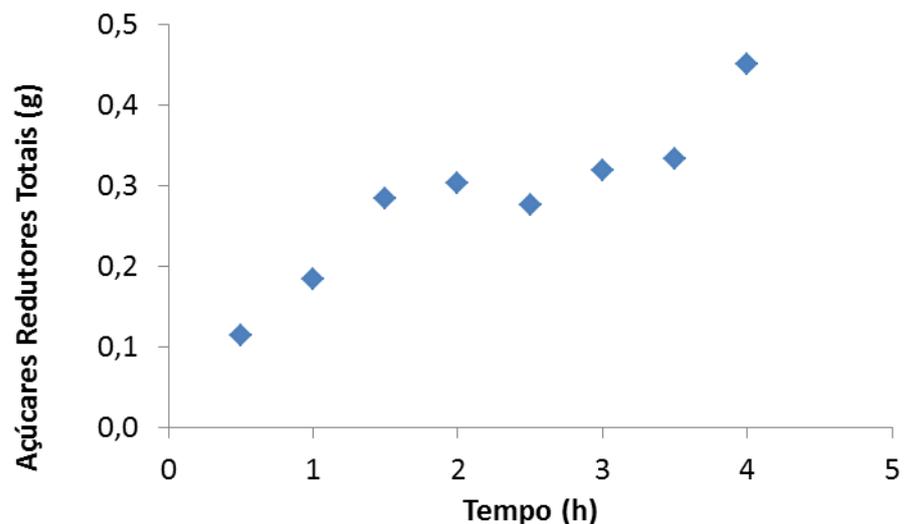
De maneira geral, verificou-se pouca perda de massa de fibras nas duas etapas, fato este atribuído ao tamanho da partícula da fibra.

A Figura 32 apresenta os dados da composição da fibra da casca de coco verde bruta, pré-tratada e sacarificada. Observa-se que na etapa de pré-tratamento houve aumento no percentual de celulose causada pelo consumo de lignina. Na etapa de sacarificação, por sua vez, o teor de celulose e hemicelulose reduziu, obviamente por causa da ação de beta-glucanases e xilanases no complexo enzimático ROHALASE®SEP.

**Figura 32** – Composição da fibra da casca de coco verde bruta, pré - tratada e sacarificada.



**Figura 33** – Cinética de sacarificação da casca de coco verde pré - tratada com ROHALASE SEP



Verificou-se uma velocidade de 0,19 g/h de liberação de açúcares redutores totais no início da sacarificação, até às 2 horas, e uma redução desta velocidade para a metade deste valor até o final da etapa. Este fato pode ser decorrente de ação de inibição pelo produto ou impedimento estérico das enzimas às moléculas de

celulose ainda em formato de microfibrilas, não disponibilizadas na etapa de pré-tratamento.

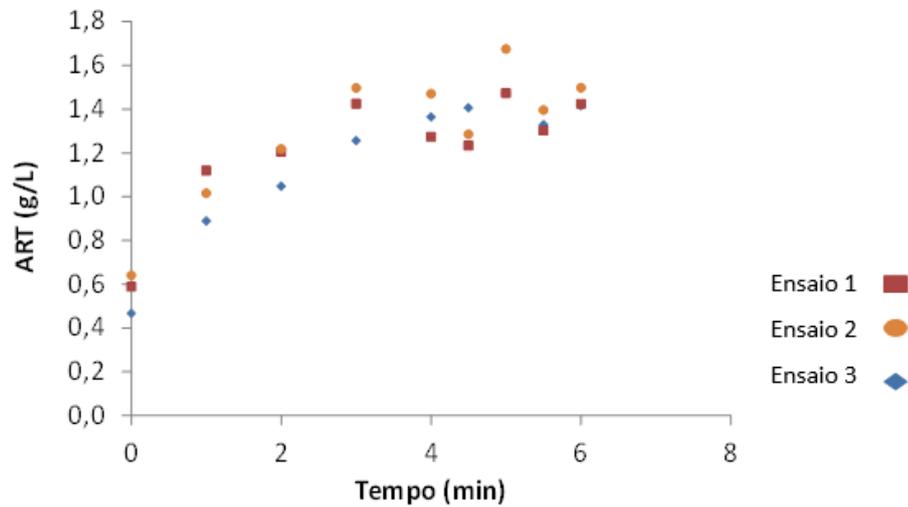
### 5.6.3 Ensaio de Validação 3

As fibras obtidas no pré-tratamento do ensaio de validação 1, foram submetidas a sacarificação enzimática em triplicata e alíquotas foram coletadas ao longo do processo para se obter uma curva da cinética da reação. A Tabela 17 apresenta os dados obtidos na sacarificação de 1,894 g de fibra pré-tratada no Ensaio de Validação 1 em que foram consumidos ou solubilizados 0,1120 g de fibra. O percentual de fibra não fermentescível foi calculado pela diferença (Fibra Consumida - ART Final) dividida pela Fibra Consumida e o percentual de fibra fermentescível foi calculado pela razão ART Final por Fibra consumida.

**Tabela 17** – Dados da sacarificação da fibra pré - tratada do Ensaio de Validação 1

Réplica	Massa ART Final (g)	Fibra Não Fermentescível	Fibra Fermentescível
1	0,0707	79%	21%
2	0,0712	74%	26%
3	0,0749	71%	29%
Média	0,0723	0,7478	0,2522
Desvio Padrão	0,0023	0,0400	0,0400

Verificou-se que os valores médios apresentaram baixo desvio padrão e que a ação da enzima ROHALASE®SEP realmente libera um percentual maior de outros açúcares não fermentescíveis. Este resultado indica que as condições do pré-tratamento aplicado não foram efetivas para permitir o acesso da enzima às fibras de celulose. Os dados cinéticos da ação da enzima reafirmam esta observação conforme é apresentado na Figura 34.

**Figura 34 – Cinética de sacarificação**

O perfil dos pontos experimentais da sacarificação ao longo do tempo indicou uma maior velocidade de reação (liberação de ART) nos primeiros 3 minutos. Após este tempo, houve uma grande dispersão nos valores sem que fosse observada tendência de aumento de ART. A redução da atividade enzimática indica exaustão do substrato (fibras de celulose no meio) muito mais que uma inibição por substrato uma vez que a perda de massa da fibra pré - tratada foi pequena.

## 6. CONCLUSÕES

As variáveis tempo, concentração de peróxido de hidrogênio e temperatura apresentaram significância com efeito negativo, demonstrando que quanto maior for os valores dessas variáveis, menor é o efeito na formação do ART e perda de massa. As condições ótimas foram com concentração de peróxido de hidrogênio com média de 5,4%, a um tempo reacional de 2,5 horas e temperatura média de 80°C.

O pré-tratamento e a sacarificação provocaram alterações significativas na estrutura da fibra do coco, sendo que a parte não fermentescível foi a que mais sofreu degradação. Os resultados demonstraram que a redução do tamanho de partícula das fibras é importante para obtenção de maior rendimento nas etapas de pré-tratamento e sacarificação.

Foi verificado através das imagens obtidas por MEV que o experimento referente à reação de hidrólise ocorrida na estrutura lignocelulósica da fibra de coco verde demonstrou êxito quanto ao processo de deslignificação da fibra. Este resultado foi atribuído à reação do agente alcalino.

## 7. DIVULGAÇÃO DA PESQUISA

Trabalhos apresentados em Congressos:

- 1) RAMALHO, J.J.A.; GUARIEIRO, L.L.N.; VIEIRA, E.D. **Perspectivas para produção de etanol de segunda geração utilizando da fibra de coco verde**. I Simpósio Internacional de Inovação e Tecnologia (SIINTEC), Salvador, 2015.
- 2) RAMALHO, J.J.A.; GUARIEIRO, L.L.N.; VIEIRA, E.D. **Análise do potencial de uso da fibra de coco verde (*Cocos nucifera*) para produção de etanol de segunda geração**. Workshop de Gestão, Tecnologia Industrial e Modelagem Computacional, Salvador, 2016.
- 3) RAMALHO, J.J.A.; ALVES, E.C.; MACHADO, B.A.S.; VIEIRA, E.D.; GUARIEIRO, L.L.N. **Estudo do pré-tratamento alcalino e sacarificação enzimática da fibra de coco para produção do etanol 2G**. III Simpósio Internacional de Inovação e Tecnologia (SIINTEC), Salvador, 2017.

## 8. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Com o desenvolvimento desta pesquisa pode-se sugerir como trabalhos futuros:

- 1) Cinética da fermentação etanólica de hidrólidos lignocelulósicos de tratamento enzimático.
- 2) Estimativa do custo de produção do etanol lignocelulósico de tratamento enzimático.
- 3) Estudo comparativo entre o tratamento ácido concentrado e enzimático para hidrólise de materiais lignocelulósicos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIETA, P.F. **Caracterização de Produtos Comerciais à Base de Amido de Milho**. Universidade Federal do Rio de Janeiro - Escola Politécnica, 2014. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10012443.pdf>>. Acesso em: 26 agosto 2016.

ALBUQUERQUE, E.D.; FERNANDES, A.A.R.; FERNANDES, P.M.B. **Processo de hidrólise enzimática sob alta pressão hidrostática a partir de resíduos agroindustriais**. INPI, 2016.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. **Processo de fermentação para produção de bioetanol**. INPI, 2009.

BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review**. Energy Conversion and Management, v.52, p. 858–875, 2011.

BARBOSA, R.R.N.; SILVA, A.A.; NEVES, M.G.; GALVÃO, A.R.A.; OLIVEIRA NETO, C.F. **Produção e sequestro de carbono na atmosfera**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.9, n.16, p. 1783, 2013.

BERTOIA, R.S.; ZARDINI, A.A.; KEUKEN, H.; ASTORGA, C. **Impact of ethanol containing gasoline blends on emissions from a flex-fuel vehicle tested over the Worldwide Harmonized Light duty Test Cycle (WLTC)**. Fuel, v.15, n. 143, p. 173-182, 2015.

BIAGGI, D.E.; PIACENTE, F.J.; SILVA, V.C. **Produção de etanol de segunda geração a partir da cana-de-açúcar: estudo de prospecção de patentes**. X Workshop de Pós-Graduação e Pesquisa do Centro Paula Souza. São Paulo, 2015.

BRASKEM. **A cana de Açúcar**, 2015. Disponível em: <<http://www.braskem.com.br/site.aspx/Cana-de-Acucar>>. Acesso em: 22 maio 2015.

BRASIL. **Ministério da Agricultura**, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 20 fevereiro 2017.

BRÍGIDA, A.I.S.; CALADO, V.M.A.; GONÇALVES, L.R.B.; COELHO, M.A.Z.; **Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber**. Carbohydrate Polymers, v.10, n.79, p. 832-838, 2010.

CABRAL, M. M. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; ABUD, A. K. S. **Estudo do pré-tratamento químico em fibra da casca de coco verde para a produção de etanol 2G**. XX COBEQ (Congresso Brasileiro de Engenharia Química), Florianópolis, v. 1, outubro de 2014.

CABRAL, M.M.S. **Aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol de segunda geração**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de

Alagoas – UFAL, Maceió - AL 2015. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1201/1/Aproveitamento%20da%20casca%20do%20coco%20verde%20para%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol%20de%20segunda%20gera%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em 17 novembro 2015.

CABRAL, M.M.S.; ABUD, A.K.S.; ROCHA, M.S.R.S.; ALMEIDA, R.M.R.G.; GOMES, M.A. **Composição da fibra da casca de coco verde *in natura* e após pré-tratamentos químicos.** ENGEVISTA, v.19, n.1, p. 99-108, 2017.

CARRIJO, O.A.; LIZ, R.S.; MAKISHIMA, N. **Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola.** Horticultura Brasileira, Brasília, v.20, n. 4, p. 533-535, 2002.

CATOLICO, A.C.; OLIVEIRA, R.; CRIVELARE, L.; OLIVEIRA, A. **Análise de sustentabilidade do etanol 2G e bioenergia da cana.** XI Fórum Ambiental na Alta Paulista, v. 11, n.9, p. 97-112, 2015.

CHOHFI, F. M.; VALENÇA, G. P. **Novos produtos e energia a partir de biomassa, uma matéria prima abundante e renovável para o Brasil.** Revista Agrogeoambiental, v. 1, n.1, p. 80-90, 2009.

CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. **Raízen avança no etanol de 2ª geração.** Estadão, 2016. Disponível em: < <http://cnpem.br/raizen-avanca-no-etanol-de-2a-geracao/>>. Acesso em 08 fevereiro 2017.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira (Safra 2015/16),** 2016. v. 2, n.3. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_02\\_23\\_17\\_34\\_53\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_02_23_17_34_53_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em 27 dezembro 2016.

CORRADINI, E.; ROSA, M.F.; MACEDO, B.P.; PALADIN, P.D.; MATTOSO, L.H.C. **Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 31, n. 3, p.837-846, 2009.

DÍAZ, M.A.; CARVALHO, V.C.H.A.; GOMES, M.S.P. **Análise do ciclo de vida e balanço energético do etanol de cana de açúcar brasileira.** VI Congresso Nacional de Engenharia Mecânica. Campina Grande, 2010.

DODO, C.M.; MAMPHWELI, S.; OKOH, O. **Bioethanol production from lignocellulosic sugarcane leaves and tops.** Journal of Energy in Southern África, v.18, n.3, 2017.

EMBRAPA. **Beneficiamento da casca de coco verde para a produção de fibra e pó,** 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e>

[servicos/-/produto-servico/33/beneficiamento-da-casca-de-coco-verde-para-a-producao-de-fibra-e-po](#). Acesso em 18 novembro 2016.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division**, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 18 março 2018.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **WOOD**: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter Gruyter, p.613, 1989.

FLORENCE, F. **Avanços e Novos Rumos da Agropecuária Baiana**. Revista Bahia Agrícola, v. 19, 2011.

Folha de especificação AB Enzymes an ABF Ingredients company. **ROHALASE® SEP Xylanase and beta-glucanase enzyme for grain processing, brewing & distilling**.

GARCIA, J.C.C.; SPERLING, E.V. **Emissão de gases de efeito estufa no ciclo de vida do etanol: estimativa nas fases de agricultura e industrialização em Minas Gerais**. Eng Sanit Ambiental, v.15 n.3, p. 217-222, 2010.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. **The Potential for first-generation ethanol production from sugarcane**. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 2010.

GONÇALVES, F.A.; RUIZ, H.A.; NOGUEIRA, C.C; SANTOS, E.S.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, G,R. **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.

GRANBIO. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br>>. Acesso em 08 fevereiro 2017.

GROSSI, E.C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. Universidade de Brasília, Brasília - Distrito Federal, 2015. Disponível em:<[http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/18579/3/2015\\_EltonCarlosGrossi.pdf](http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/18579/3/2015_EltonCarlosGrossi.pdf)>. Acesso em 01 novembro 2016.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. **Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering**. Biotechnology Advances, v. 30, p.1207–1218, 2012.

HAYES, D.J. **An examination of biorefining processes, catalysts and challenges**. Catalysis Today, 2009, v. 145, p. 138–151.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Rio de Janeiro, 2018.

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Intelectual. **Principais Titulares de Pedidos de Patente no Brasil, com prioridade brasileira.** Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, 2016.

JESSEN, H.J.; LUNDORFF, J.; LIAO, H. RAYMOND, A.N. **Compósitos e métodos para aumentar a produção de etanol da biomassa.** Thomson Innovation, 2014.

KARSTENS, T. **Método para produção do etanol por fermentação da biomassa lignocelulósica.** Thomson Innovation, 2014.

LIMA, A.M. **Estudos recentes e perspectivas da viabilidade técnico-econômica da produção de etanol lignocelulósico.** Circular Técnica 05, EMBRAPA, 2011.

LIRA, F.P. **Análise experimental do consumo de um veículo flex operando com diferentes misturas de gasolina/etanol em tráfego.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2015. Disponível em: [https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/20930/1/FabioPimentaDeLira\\_DISSERT.pdf](https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/20930/1/FabioPimentaDeLira_DISSERT.pdf). Acesso em 31 janeiro 2017.

MACÊDO, L.A. **Influência da composição da biomassa no rendimento em condensáveis no processo de torrefação.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2012. Disponível em: < [http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/13150/1/2012\\_LuceliaAlvesdeMacedo.pdf](http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/13150/1/2012_LuceliaAlvesdeMacedo.pdf)>. Acesso em 03 abril 2018.

MARTINS, C.R.; PEREIRA, P.A.P.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. **Ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre: a importância na química da atmosfera.** Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola, nº 5, 2003.

MARTINS, A.P.; WATANABE, T.; SILVA, P.L.R.; BORELLI, C.; MARCICANO, J.P.P.; SANCHES, R.A. **Aproveitamento de fibra de coco verde para aplicabilidade têxtil.** Revista de Design, Inovação e Gestão Estratégica- Redige, v.4, n. 2, p.1-15, 2013.

MARTINS, C.R.; JESUS JÚNIOR, L.A. **Produção e Comercialização de Coco no Brasil frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014.** EMBRAPA, 2014.

MARTINS, F.A.; MARTIM, T.; CORRÊA, A.M.; DE OLIVEIRA, F.F. **A Produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana de açúcar.** Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção, vol. 2, n. 3, 2014.

MAUGERI FILHO, F.; ATALA, D.I.P. **Processo fermentativo extrativo a vácuo para produção de etanol.** INPI, 2006.

MENON, V.; RAO, M. **Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept.** Progress in Energy and Combustion Science, v. 38, p. 522-550, 2012.

MORAES, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. **Análise da Madeira de Pinus Oocarpa Parte I – Estudo Dos Constituintes Macromoleculares e Extrativos Voláteis**. R. Árvore, Viçosa, v.29, n.3, p. 461-470, 2005.

NARENDRANATH, N.V. **Sistema de tratamento da biomassa para facilitar a produção de etanol**. Thomson Innovation, 2015.

NARENDRANATH, N.V.; CARLSON, D.C. **Sistema para fermentação da biomassa para produção de etanol**. Thomson Innovation, 2015.

NOLASCO, JUNIOR; AZZONI, S.F.; ROSSELL, C.E.V. **Processo e equipamento para conversão simultânea de biomassa utilizando reatores UHTST** n. Pat. BR 13 2013 017839-9 E2. INPI, 2013.

NovaCana, 2015. **Etanol 2.0: Biocombustível revolucionário que é a aposta do Brasil**. Disponível em <<https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/etanol-2-0-biocombustivel-revolucionario-aposta-brasil-071215/>>. Acesso em 09 novembro 2016.

OMETTO, A.R. **Avaliação do ciclo de vida do álcool etílico hidratado combustível pelos métodos EDIP, exergia e emergia**. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos, São Carlos - SP, 2005. Disponível em: [file:///C:/Users/claud/Downloads/2005D\\_OmettoAldoRoberto.pdf](file:///C:/Users/claud/Downloads/2005D_OmettoAldoRoberto.pdf). Acesso em 19 janeiro 2017.

PAZ, E.C.S.; PEDROZA, M.M.; OLIVEIRA, L.R.A.; PAZ, R.R.S. **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.

PITARELO, A.P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Paraná, 2013. Disponível em: <http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/32102/R%20-%20T%20-%20ANA%20PAULA%20PITARELO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 19 maio 2017.

RAÍZEN. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/>>. Acesso em 07 março 2018.

RETSINA, T.; PYLKKANEN, V.; RUTHERFORD, S.R. **Conversão hidrotérmica e mecânica da biomassa lignocelulósica em etanol e outros produtos da fermentação**. Thomson Innovation, 2016.

RFA - Renewable Fuels Association (Associação de Combustíveis Renováveis). **World Fuel Ethanol Production**, 2018. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. Acesso em 18 março 2018.

ROSA, S.E.S.; GARCIA, J.L.F. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades**. Revista do BNDES, v.32, p. 117-156, 2009.

ROSA, M.F.; SOUZA FILHO, M.S.M.; FIGUEIREDO, M.C.B.; MORAIS, J.P.S.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.S. **Valorização dos Resíduos da Agroindústria. II SIGERA** (II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais). Foz do Iguaçu, vol. 1, 2011.

ROSSETTO, R. **Planejamento da colheita**. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica, 2016. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_97\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_97_22122006154841.html). Acesso em 30 dezembro 2016.

SALLA, D.A.; CABELLO, C. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana de açúcar e milho**. Revista Energia na Agricultura, v. 25, n.2, p. 32-53, 2010.

SANTOS, Danielle da Silveira dos. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**, Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

SANT'ANNA, L.M.M.; PEREIRA JÚNIOR, N.; BITANCUR, G.J.V.; BEVILAQUA, J.V.; GOMES, A.C.; MENEZES, E.P. **Processo de produção de etanol a partir do hidrolisado da fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar em reator do tipo prensa**. INPI, 2007.

SANT'ANNA, L.M.M.; PEREIRA JÚNIOR, N.; GOMES, A.C.; VÁSQUEZ, M.P. **Processo para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos por via enzimática**. INPI, 2008.

SANTOS, M.S.R. **Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Alagoas-UFAL, Maceió-AL, 2014. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1204/1/Estudo%20de%20pr%C3%A9%20tratamentos%20de%20palha%20e%20sabugo%20de%20milho%20visando%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol%202G.pdf>. Acesso em 19 maio 2017.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H; COLODETTE, J.L; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. **Potencial da Palha de Cana de Açúcar para Produção de Etanol**. Química Nova, v.35, n.5, p.1004-1010, 2012.

SÁTIRO, J. R.; BARROS, P.H.S.; BRANDÃO, M.C.R; FIGUEIROA, J.A. **Estudo do potencial da casca do coco verde para obtenção de etanol lignocelulósico**. VII CONNEPI (Congresso Norte Nordeste em Pesquisa e Inovação), Palmas - TO, 2012.

SILVA, A.C. **Reaproveitamento da casca de coco verde**. Revista Monografias Ambientais - REMOA, v.13, n.5, p. 4077 – 4086, 2014.

SILVA, S.S. **Avaliação do Ciclo de Vida do Etanol Combustível: Uma Análise Econômica, Social e Ambiental**. Dissertação em Economia Regional. Universidade Estadual de Londrina, Paraná - Londrina, 2012.

SILVA NETO; J.M.; ANTUNES JÚNIOR, A.U.; LIMA, F.S; DOS ANJOS, D.A. **Potencial de Fibras Lignocelulósicas para a Produção de Etanol de Segunda Geração**. 5º Encontro Regional de Química & 4º Encontro Nacional de Química, Blucher Chemistry Proceedings, vol. 3, nº1, 2015.

SILVEIRA, M. S. **Aproveitamento das cascas de coco verde para produção de briquete em Salvador - BA**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008. Disponível em: <[http://www.teclim.ufba.br/site/material\\_online/dissertacoes/dis\\_monica\\_silveira.pdf](http://www.teclim.ufba.br/site/material_online/dissertacoes/dis_monica_silveira.pdf)>. Acesso em 01 junho 2015.

Thomson Innovation, 2018. Disponível em: <[www.thomsoninnovation.com](http://www.thomsoninnovation.com)>. Acesso em 20 março 2018.

UDOP - União dos Produtores de Bioenergia. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=busca#>>. Acesso em 23 janeiro 2017.

UNICA. **Aprovação de maior mistura de etanol na gasolina nos EUA não significa aumento nas exportações brasileiras**, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/20255763920338419546/aprovacao-de-maior-mistura-de-etanol-na-gasolina-nos-eua-nao-significa-aumento-nas-exportacoes-brasileiras/>>. Acesso em 31 janeiro 2017.

UNICA. **Nova tecnologia pode ampliar perspectivas para etanol hidratado brasileiro na Europa**, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/1863142892034578544/nova-tecnologia-pode-ampliar-perspectivas-para-etanol-hidratado-brasileiro-na-europa/>. Acesso em: 31 janeiro 2017.

UNICA - União da Indústria de Cana de Açúcar. **Setor Sucroenergético**, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em 28 dezembro 2016.

UNICA - União da Indústria de Cana de Açúcar. **UNICADATA**, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 18 março 2018.

VAN SOEST, P. J. **Symposium on factors influencing the voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility**. Journal of Animal Science, v. 24, p. 834, 1965.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. **Use of detergents in analysis of fibrous feeds. In: Determination of plant cell wall constituents.** J Assoc Off Anal Chem. 1967; 50: 50. Available: [http://catalogo.latu.org.uy/doc\\_num.php?explnum\\_id=1418](http://catalogo.latu.org.uy/doc_num.php?explnum_id=1418)

VOHRA, M.; MANWAR, J.; MANMODE R.; PADGILWAR, S.; PATIL, S. **Bioethanol production: Feedstock and current technologies.** Journal of Environmental Chemical Engineering, v.2, p. 573–584, 2014.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/4071/3594.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 22 agosto 2015.