



RENORBIO

Programa de pós-graduação em Biotecnologia

Avaliação do potencial da fibra e casca de coco
maduro, casca de coco verde e cacto pré-tratados
visando à produção de etanol

Fabiano Avelino Gonçalves

Natal – RN

2014

Fabiano Avelino Gonçalves

Avaliação do potencial da fibra e casca de coco
maduro, casca de coco verde e cacto pré-tratados
visando à produção de etanol

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gorete Ribeiro de Macedo

Orientador no exterior: Prof. PhD. José António Couto Teixeira

Tese submetida ao programa de pós-graduação em Biotecnologia, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia na área de concentração em Biotecnologia Industrial.

Natal – RN

2014

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Gonçalves, Fabiano Avelino.

Avaliação do potencial da fibra e casca de coco maduro, casca de
coco verde e cacto pré-tratados visando à produção de etanol / Fabiano
Avelino Gonçalves. – Natal, RN, 2014.

245 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Gorete Ribeiro Macedo.

Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Couto Teixeira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

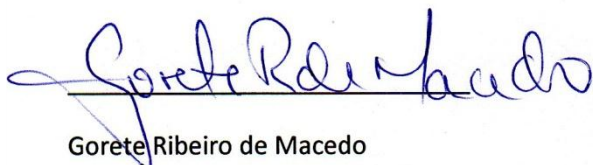
1. Etanol. – Tese. 2. Bioetanol. - Tese. 3. Coco. – Tese. I. Macedo,
Gorete Ribeiro. II. Teixeira, José Antonio Couto. III. Universidade
Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 661.722

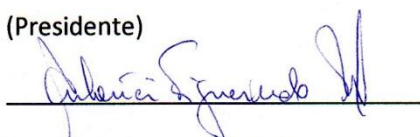
Tese de doutorado de Fabiano Avelino Gonçalves

“Avaliação do potencial da fibra e casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto pré-tratados visando à produção de etanol”.



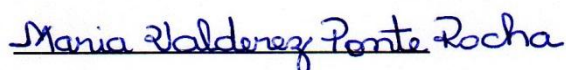
Gorete Ribeiro de Macedo

(Presidente)



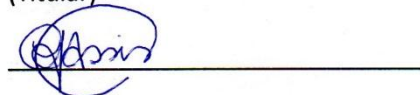
Ana Lúcia Figueiredo Porto

(Titular)



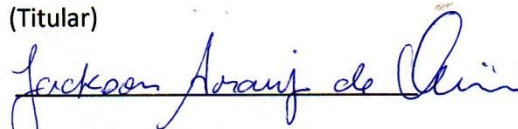
Maria Valderez Ponte Rocha

(Titular)




Cristiane Fernandes de Assis

(Titular)



Jackson Araújo de Oliveira

(Titular)



José Antonio Teixeira

(Titular)

RESUMO

O presente trabalho investigou o potencial de diferentes materiais lignocelulósicos residuais gerados em regiões rurais e urbanas (fibra de coco maduro, casca de coco verde e casca de coco maduro), além de vegetal cultivado em ambientes inóspitos (cacto) visando à produção de etanol, sendo todos, materiais abundantes na região Nordeste do Brasil. Esses materiais foram submetidos aos pré-tratamentos com peróxido hidrogênio alcalino seguido por hidróxido de sódio (PHA-PHS), autohidrólise (PA), hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS) e *organosolv* usando etanol alcalino (POEA). Os materiais pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática e as estratégias de fermentação e sacarificação simultânea (SSF) e fermentação e sacarificação semi-simultânea (SSSF), utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Zymomonas mobilis*. Avaliou-se também, a presença de compostos inibitórios (hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e a água marinha no meio de cultivo. Os materiais pré-tratados por PHA-PHS resultaram na deslignificação dos materiais em uma faixa entre 54,0 e 71,0%, contendo entre 51,80 e 54,91% de celulose, entre 17,65 e 28,36% de hemicelulose, entre 7,99 e 10,12% de lignina. As hidrólises enzimáticas proporcionaram conversões dos materiais em glicose entre 68,0 e 76,0%. Os rendimentos em etanol utilizando SSF e SSSF para a fibra de coco maduro pré-tratada variaram entre 0,40 e 0,43 g/g, 0,43 e 0,45 g/g, respectivamente. Os materiais pré-tratados por PA apresentaram rendimentos de sólidos entre 42,92 e 92,74%, contendo entre 30,65 e 51,61% de celulose e entre 21,34 a 41,28% de lignina. As hidrólises enzimáticas resultaram nas conversões dos materiais em glicose entre 84,10 e 92,52%. Os rendimentos em etanol utilizando casca de coco verde pré-tratada e as estratégias SSF e SSSF foram entre 0,43 e 0,45 g/g. A fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS apresentou rendimentos de sólidos entre 21,64 e 60,52%, com aumento de celulose entre 28,40 e 131,20%, redução de hemicelulose entre 43,22 e 69,04%, redução de lignina entre 8,27 e 89,13%. A hidrólise enzimática resultou em conversão do material em glicose de 90,72%. Os rendimentos em etanol utilizando SSF e SSSF foram 0,43 e 0,46 g/g, respectivamente. Os materiais pré-tratados por POEA apresentaram reduções de sólido entre 10,75 e 43,18%, aumento de celulose em até 121,67%, redução de hemicelulose em até 77,09% e redução de lignina em até 78,22%. As hidrólises enzimáticas resultaram nas conversões dos materiais em glicose entre 77,54 e 84,27%. Os rendimentos em etanol utilizando cacto pré-tratado e as estratégias SSF e SSSF foram entre 0,41 e 0,44 g/g, 0,43 e 0,46 g/g, respectivamente. As fermentações alcoólicas realizadas em biorreator resultaram em rendimentos e produção de etanol entre 0,42 e 0,46 g/g, 7,62 e 12,42 g/L, respectivamente. Os compostos inibitórios apresentaram efeitos sinérgicos negativos nas fermentações realizadas por *P. stipitis*, *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*. O ácido fórmico e o ácido acético apresentaram efeitos mais significativos entre os compostos inibitórios, seguido pelo hidroximetilfurfural, furfural e ácido levulínico. As fermentações realizadas em meio de cultivo diluído com água marinha apresentaram resultados promissores, especialmente quando se utilizou *S. cerevisiae* (0,50 g/g) e *Z. mobilis* (0,49 g/g). Os diversos resultados obtidos no presente trabalho indicam que, os materiais lignocelulósicos, pré-tratamentos, estratégias fermentativas e micro-organismos estudados merecem atenção por parecerem promissores e passíveis de serem utilizados no contexto de biorrefinaria visando à produção de etanol.

Palavras-chave: bioetanol, coco, cacto, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação, biorrefinaria, compostos inibitórios, água marinha

ABSTRACT

The present work investigated the potential of different residual lignocellulosic materials generated in rural and urban areas (coconut fibre mature, green coconut shell and mature coconut shell), and vegetable cultivated in inhospitable environments (cactus) aimed at the production of ethanol, being all materials abundant in the Northeast region of Brazil. These materials were submitted to pretreatments with alkaline hydrogen peroxide followed by sodium hydroxide (AHP-SHP), autohydrolysis (AP), hydrothermal catalyzed with sodium hydroxide (HCSHP) and alkali ethanol organosolv (AEOP). These materials pretreated were submitted to enzymatic hydrolysis and strategies of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and saccharification and fermentation semi-simultaneous (SSSF) by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis*. It was also evaluated the presence of inhibitory compounds (hydroxymethylfurfural, furfural, acetic acid, formic acid and levulinic acid) and seawater during the fermentative process. Materials pretreated with AHP-SHP have resulted in delignification of the materials in a range between 54 and 71%, containing between 51.80 and 54.91% of cellulose, between 17.65 and 28.36% of hemicellulose, between 7.99 and 10.12% of lignin. Enzymatic hydrolysis resulted in the conversions in glucose between 68 and 76%. Conversion yields in ethanol using SSF and SSSF for coconut fibre mature pretreated ranged from 0.40 and 0.43 g/g, 0.43 and 0.45 g/g, respectively. Materials pretreated by AP showed yields of solids between 42.92 and 92.74%, containing between 30.65 and 51.61% of cellulose, 21.34 and 41.28% of lignin. Enzymatic hydrolysis resulted in glucose conversions between 84.10 and 92.52%. Proceeds from conversion into ethanol using green coconut shell pretreated, in strategy SSF and SSSF, were between 0.43 and 0.45 g/g. Coconut fibre mature pretreated by HCSHP presented solids yields between 21.64 and 60.52%, with increased in cellulose between 28.40 and 131.20%, reduction of hemicellulose between 43.22 and 69.04% and reduction in lignin between 8.27 and 89.13%. Enzymatic hydrolysis resulted in the conversion in glucose of 90.72%. Ethanol yields using the SSF and SSSF were 0.43 and 0.46 g/g, respectively. Materials pretreated by AEOP showed solid reductions between 10.75 and 43.18%, cellulose increase up to 121.67%, hemicellulose reduction up to 77.09% and lignin reduced up to 78.22%. Enzymatic hydrolysis resulted in the conversion of glucose between 77.54 and 84.27%. Yields conversion into ethanol using the SSF and SSSF with cactus pretreated ranged from 0.41 and 0.44 g/g, 0.43 and 0.46 g/g, respectively. Fermentations carried out in bioreactors resulted in yields and ethanol production form 0.42 and 0.46 g/g and 7.62 and 12.42 g/L, respectively. The inhibitory compounds showed negative synergistic effects in fermentations performed by *P. stipitis*, *Z. mobilis* and *S. cerevisiae*. Formic acid and acetic acid showed most significant effects among the inhibitory compounds, followed by hydroxymethylfurfural, furfural and levulinic acid. Fermentations carried out in culture medium diluted with seawater showed promising results, especially for *S. cerevisiae* (0.50 g/g) and *Z. mobilis* (0.49 g/g). The different results obtained in this study indicate that lignocellulosic materials, pretreatments, fermentative processes strategies and the microorganisms studied deserve attention because they are promising and capable of being used in the context of biorefinery, aiming the ethanol production.

Keywords: bioethanol, coconut, cactus, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, biorefinery, inhibitory compounds, seawater

*A Deus, aos meus pais, irmãos,
amigos e professores...
companheiros de todas as horas...*

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais um ciclo acadêmico, movido por inúmeros problemas e surgimento de algumas soluções decorrente dessa trajetória, venho expressar o meu profundo agradecimento às pessoas que contribuíram para o êxito neste trabalho.

Inicialmente, agradeço a Prof.^a Dr.^a Gorete Ribeiro de Macedo e ao Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos pela orientação na tese, permitindo a excelência acadêmica e prestígio ao trabalho.

Ao Prof. PhD. José Teixeira, Prof. PhD. Antônio Vicente, Prof. PhD. Héctor Ruiz e Dr.^a Aloia Romani, agradeço pelo apoio durante o período de estágio de doutoramento no exterior.

Ao Me. Francisco C. de Sousa Júnior, Farmacêutico Bioquímico do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, agradeço pela assistência e suporte.

Aos professores e alunos integrantes do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Gorete Ribeiro de Macedo.

Aos professores e alunos integrantes do Laboratório de Instalações Piloto e do Laboratório de Fermentações da Universidade do Minho, coordenados pelos Prof. PhD. Antônio Vicente e Prof. PhD. José Teixeira, respectivamente.

A Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Lescano de Almeida da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul por me orientar durante a graduação, aos Prof.^a Dr.^a Eliana Janet Sanjinez-Argandoña e Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca da Universidade Federal da Grande Dourados por me orientarem durante o mestrado, agradeço a partir da premissa do aprendizado contínuo e permanente.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos, colegas de curso e a todos os demais professores que comigo partilharam do seu saber.

A todos, o meu profundo agradecimento.

*“Cada sonho que você deixa para trás é um
pedaço do seu futuro que deixa de existir”*

(Steve Jobs)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. <i>Etanol celulósico</i>	3
2.1.1. <i>Situação contemporânea das usinas sucroenergéticas brasileiras para a produção de etanol celulósico</i>	4
2.1.2. <i>Microdestilaria</i>	9
2.1.2.1. <i>Implantação de microdestilaria</i>	9
2.1.2.2. <i>Implantação de microdestilaria no contexto de biorrefinaria</i>	13
2.1.3. <i>Produção de coprodutos e subprodutos no processo produtivo do etanol celulósico</i>	15
2.1.4. <i>Enzimas</i>	20
2.2. <i>Materiais lignocelulósicos</i>	22
2.2.1. <i>Biomassa fotossintética terrestre</i>	23
2.2.2. <i>Bagaço de coco</i>	26
2.2.3. <i>Cacto</i>	28
2.3. <i>Pré-tratamento</i>	28
2.3.1. <i>A importância do pré-tratamento</i>	28
2.3.2. <i>Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de sódio</i> ..	30
2.3.3. <i>Pré-tratamento por autohidrólise</i>	31
2.3.4. <i>Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio</i>	32
2.3.5. <i>Pré-tratamento por organosolv</i>	33
2.4. <i>Hidrólise enzimática</i>	35
2.5. <i>Processo fermentativo</i>	35
2.5.1. <i>Micro-organismos</i>	35
2.5.2. <i>Estratégias fermentativas</i>	36
2.6. <i>Compostos inibitórios</i>	37
2.6.1. <i>Compostos inibitórios oriundos dos materiais lignocelulósicos</i>	37
2.6.2. <i>Uso de água marinha em processo de produção de etanol</i>	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. <i>Matéria-prima</i>	43
3.2. <i>Processo de pré-tratamento</i>	43
3.2.1. <i>Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) e pré-tratamento com hidróxido de sódio (PHS)</i>	43

3.2.2. Pré-tratamento por autohidrólise (PA).....	44
3.2.3. Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS) .	46
3.2.4. Pré-tratamento por organosolv usando etanol alcalino (POEA)	48
3.3. Caracterização dos materiais lignocelulósicos <i>in natura</i> e pré-tratados.....	50
3.3.1. Composição química dos materiais lignocelulósicos <i>in natura</i> e pré-tratados	50
3.3.2. Determinação de cinzas e umidade	50
3.3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	50
3.3.4. Análise de difração de raios-X e cristalinidade.....	51
3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
3.4. Caracterização dos licores.....	52
3.4.1. Caracterização dos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA.....	52
3.4.2. Caracterização dos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA	53
3.4.3. Compostos fenólicos totais presentes nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA.....	53
3.4.4. Precipitação ácida da lignina insolúvel presente nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA.....	54
3.4.4.1. Caracterização da lignina presente no licor dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA.....	54
3.4.4.1.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)..	54
3.4.4.1.2. Análise termogravimétrica (TGA) da lignina.....	55
3.5. Enzimas.....	55
3.5.1. Celulases	55
3.5.2. β -glicosidase.....	56
3.5.3. Xilanase.....	56
3.6. Hidrólise enzimática	56
3.7. Processo fermentativo	57
3.7.1. Micro-organismos	57
3.7.2. Preparo do inóculo	57
3.7.3. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)	58
3.7.4. Sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF).....	59
3.7.5. Sacarificação e fermentação semi-simultânea em biorreator	59
3.7.6. Fermentação alcoólica na presença dos compostos inibitórios.....	60
3.7.7. Fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água marinha	61

3.7.8. Determinação da concentração celular microbiana	62
3.7.9. Rendimento em etanol.....	62
3.8. Análise das amostras em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	63
3.9. Determinação de parâmetros cinéticos para fermentações na presença de compostos inibitórios	64
3.10. Análises estatísticas.....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Composição da matéria-prima.....	66
4.2. Materiais lignocelulósicos pré-tratados com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) e hidróxido de sódio (PHS) visando à produção de etanol.....	67
4.2.1. Caracterização dos materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados.....	67
4.2.1.1. Composição dos materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados.....	67
4.2.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	71
4.2.1.3. Análise de difração de raios-X e índice de cristalinidade	73
4.2.1.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	75
4.2.2. Hidrólise enzimática	79
4.3. Materiais lignocelulósicos pré-tratados por autohidrólise (PA) visando à produção de etanol	81
4.3.1. Caracterização dos materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados.....	81
4.3.1.1. Composição dos materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados.....	81
4.3.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	84
4.3.1.3. Análise da difração de raios-X e índice cristalinidade.....	85
4.3.2. Planejamento experimental e análise estatística	86
4.3.3. Caracterização dos licores.....	90
4.3.3.1. Composição dos licores resultantes dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA.....	90
4.3.4. Hidrólise enzimática	94
4.4. Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS) sobre a fibra de coco maduro visando à produção de etanol.....	97
4.4.1. Caracterização da fibra de coco maduro in natura e pré-tratada	97
4.4.1.1. Composição da fibra de coco maduro in natura e pré-tratada.....	97
4.4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	99
4.4.1.3. Análise da difração de raios-X e índice cristalinidade.....	100
4.4.2. Planejamento experimental e análise estatística	101
4.4.3. Caracterização do licor.....	105

4.4.3.1. Composição dos licores resultantes da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.....	105
4.4.3.2. Compostos fenólicos totais presente nos licores da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.....	106
4.4.3.3. Precipitação ácida da lignina insolúvel presente nos licores da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.....	107
4.4.3.4. Caracterização da lignina presente no licor da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.....	108
4.4.3.4.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	108
4.4.3.4.2. Análise termogravimétrica (TGA) da lignina.....	110
4.4.4. Hidrólise enzimática.....	111
4.5. Materiais lignocelulósicos pré-tratados por organosolv usando etanol alcalino (POEA) visando à produção de etanol.....	113
4.5.1. Caracterização dos materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados.....	113
4.5.1.1. Composição dos materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados.....	113
4.5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	117
4.5.1.3. Análise da difração de raios-X e índice cristalinidade.....	119
4.5.2. Planejamento experimental e análise estatística.....	121
4.5.3. Caracterização do licor.....	127
4.5.3.1. Composição dos licores resultantes dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA.....	127
4.5.3.2. Compostos fenólicos totais presentes nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA.....	129
4.5.3.3. Precipitação ácida da lignina insolúvel presente nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA.....	130
4.5.3.4. Caracterização da lignina presente no licor dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA.....	131
4.5.3.4.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	131
4.5.3.4.2. Análise termogravimétrica (TGA) da lignina.....	133
4.5.4. Hidrólise enzimática.....	134
4.6. Produção de etanol usando materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHA-PHS, PA, PHCHS e POEA.....	137
4.6.1. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS.....	137
4.6.2. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando a casca de coco verde pré-tratada por PA.....	141

4.6.3. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.....	144
4.6.4. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando cacto pré-tratado por POEA.....	147
4.7. Produção de etanol em biorreator usando a SSSF.....	154
4.8. Fermentação alcoólica na presença de compostos inibitórios.....	158
4.8.1. Fermentação alcoólica na presença de furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico.....	158
4.8.2. Fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água marinha.....	166
5. CONCLUSÃO.....	171
REFERÊNCIAS.....	172
ANEXOS.....	208
Divulgações científicas.....	208
Apresentação em eventos.....	208
Artigos.....	209
Apêndice.....	211

Lista de figura

Figura 2.1. Produção por tipo de biocombustíveis

Figura 2.2. Potencial de mercado da bioeletricidade à rede elétrica - Brasil (2010-2021)

Figura 2.3. Estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal

Figura 2.4. Composição e degradação do material lignocelulósico

Figura 2.5. Composição e degradação do material lignocelulósico

Figura 3.1. Materiais lignocelulósicos: (A) Cacto; (B) Casca de coco verde; (C) Fibra de coco maduro; (D) Casca de coco maduro

Figura 3.2. Sistema de reator em batelada

Figura 3.3. Frasco Erlenmeyer adaptado para fermentação de etanol celulósico

Figura 3.4. Diagrama do biorreator usado em SSSF: (1) motor; (2) coletor de amostra; (3) entrada de gás; (4) medidor de pH; (5) termômetro; (6) condensador; (7) tampa; (8) parede do tanque; (9) revestimento do banho-maria; (10) saída da água do revestimento do banho-maria; (11) eixo de transmissão; (12) impelidor do tipo turbina de lâminas planas; (13) entrada de água no banho-maria

Figura 4.1. Composições químicas e rendimentos dos materiais lignocelulósicos *in natura*, pré-tratados por PHA e PHA-PHS

Figura 4.2. MEV dos materiais lignocelulósicos: (1A) Fibra de coco maduro *in natura*; (1B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA; (1C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (2A) Casca de coco verde *in natura*; (2B) Casca de coco verde pré-tratada por PHA; (2C) Casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA; (3C) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por PHA; (4C) Cacto pré-tratado por PHA-PHS

Figura 4.3. Difração de raios-X dos materiais lignocelulósicos: (1A) Fibra de coco maduro *in natura*; (1B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA; (1C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (2A) Casca de coco verde *in natura*; (2B) Casca de coco verde pré-tratada por PHA; (2C) Casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA; (3C) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por PHA; (4C) Cacto pré-tratado por PHA-PHS

Figura 4.4. FTIR dos materiais lignocelulósicos: (1A) Fibra de coco maduro *in natura*; (1B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA; (1C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (2A) Casca de coco verde *in natura*; (2B) Casca de coco verde pré-tratada por PHA; (2C) Casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA; (3C) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por PHA; (4C) Cacto pré-tratado por PHA-PHS

Figura 4.5. Conversão em glicose dos materiais pré-tratados por PHA-PHS. Os materiais pré-tratados estão representados pelo ícone preto e os materiais *in natura* estão representados pelo ícone branco

Figura 4.6. Taxa inicial de hidrólise dos materiais pré-tratados por PHA-PHS

Figura 4.7. MEV da casca de coco verde. (A) Casca de coco verde *in natura*; (B) Casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min)

Figura 4.8. Difração de raios-X da casca de coco verde *in natura* e pré-tratada por PA (200 °C e 50 min)

Figura 4.9. Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados de temperatura e tempo dos materiais pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.10. Gráficos de superfície de resposta e contorno dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA relacionado à variação de celulose (%) em função da temperatura e tempo. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.11. Gráficos de valores previstos *versus* valores observados de celulose (%) oriundos dos materiais pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.12. Conversão em glicose dos materiais pré-tratados por PA (200 °C e 50 min). Os materiais pré-tratados estão representados pelo ícone preto e os materiais *in natura* estão representados pelo ícone branco

Figura 4.13. Taxa inicial de hidrólise dos materiais pré-tratados por PA (200 °C e 50 min)

Figura 4.14. MEV da fibra de coco maduro. (A) Fibra de coco maduro *in natura*; (B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Figura 4.15. Difração de raios-X da fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Figura 4.16. Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados de temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio sobre a fibra de coco maduro pré-tratado por PHCHS

Figura 4.17. Gráficos de superfície de resposta e contorno da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS. (A) Variação de celulose em função da temperatura e concentração de hidróxido de sódio; (B) Variação de celulose em função do tempo e concentração de hidróxido de sódio; (C) Variação de celulose em função do tempo e temperatura

Figura 4.18. Gráfico de valores previstos *versus* valores observados de celulose (%) oriunda da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

Figura 4.19. FTIR da lignina padrão e da lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Figura 4.20. TGA da lignina padrão e da lignina recuperada do licor da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Figura 4.21. Conversão em glicose da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min). O material pré-tratado está representado pelo ícone preto e o material *in natura* está representado pelo ícone branco

Figura 4.22. Taxa inicial de hidrólise da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Figura 4.23. MEV dos materiais lignocelulósicos. (1A) Casca de coco verde *in natura*; (1B) Casca de coco verde pré-tratada por POEA; (2A) Fibra de coco maduro *in natura*; (2B) Fibra de coco maduro pré-tratada por POEA; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por POEA; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por POEA

Figura 4.24. Difração de raios-X dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.25. Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados de temperatura, concentração de etanol e tempo sobre os materiais pré-tratados por POEA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.26. Gráficos de superfície de resposta e contorno dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA relacionados às variações de designificações dos materiais em função da temperatura e tempo. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.27. Gráficos de valores previstos *versus* valores observados dos materiais pré-tratados por POEA em relação à designificação (%). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Figura 4.28. FTIR da lignina padrão e das ligninas recuperadas dos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Figura 4.29. TGA da lignina padrão e das ligninas recuperadas nos licores oriundos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Figura 4.30. Conversão em glicose dos materiais pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h). Os materiais pré-tratados estão representados pelo ícone preto e os materiais *in natura* estão representados pelo ícone branco

Figura 4.31. Taxa inicial de hidrólise dos materiais pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Figura 4.32. Fermentação em SSF e SSSF usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS. (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Figura 4.33. Fermentação em SSF e SSSF usando a casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min). (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Figura 4.34. Fermentação em SSF e SSSF utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min). (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Figura 4.35. Fermentação em SSF e SSSF utilizando o cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h). (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Figura 4.36. Fermentação em biorreator usando a estratégia SSSF e *S. cerevisiae*. (A) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (B) Casca de coco verde pré-tratada por PA; (C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS; (D) Cacto pré-tratado por POEA

Figura 4.37. Perfil cinético da fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água doce ou água marinha. (A) *Z. mobilis*; (B) *S. cerevisiae*; (C) *P. stipitis*. O meio de cultivo diluído com água doce (ícone preto) e meio de cultivo diluído com água marinha (ícone branco)

Lista de tabela

Tabela 2.1. Características dos cenários avaliados

Tabela 2.2. Micro-organismos produtores de CMCase, xilanase e β -glicosidase

Tabela 2.3. Safra brasileira em 2011

Tabela 2.4. Produção de etanol celulósico a partir de diferentes materiais lignocelulósicos, pré-tratamentos, micro-organismos e bioprocessos

Tabela 3.1. Condições operacionais do pré-tratamento PA

Tabela 3.2. Fator de severidade do pré-tratamento PA

Tabela 3.3. Condições operacionais do pré-tratamento PHCHS

Tabela 3.4. Condições operacionais do pré-tratamento POEA

Tabela 3.5. Planejamento experimental dos meios de cultivos contendo compostos inibitórios

Tabela 4.1. Composições químicas dos materiais lignocelulósicos *in natura*

Tabela 4.2. Índice de cristalinidade do cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro *in natura*, pré-tratados por PHA e PHA-PHS

Tabela 4.3. Índice de cristalinidade do cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro *in natura*, pré-tratados por PHA e PHA-PHS

Tabela 4.4. Composições e rendimentos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.5. ANOVA dos materiais pré-tratados por PA baseado no teor de celulose em função da temperatura (X_1) e tempo (X_2). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.6. Composições dos licores obtidos dos materiais pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.7. Composições e rendimentos da fase sólida da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

Tabela 4.8. ANOVA da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS baseado no teor de celulose em função da temperatura (X_1), tempo (X_2) e concentração de hidróxido de sódio (X_3)

Tabela 4.9. Composição do licor, lignina recuperada e compostos fenólicos oriundos da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

Tabela 4.10. Composições e rendimentos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.11. Índice de cristalinidade da fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto *in natura* e pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Tabela 4.12. ANOVA do processo de deslignificação dos materiais em função da temperatura (X_1), concentração de etanol (X_2) e tempo (X_3). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.13. Composição do licor, lignina recuperada e compostos fenólicos oriundos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.14. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS

Tabela 4.15. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF usando a casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min)

Tabela 4.16. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Tabela 4.17. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF usando o cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Tabela 4.18. Parâmetros cinéticos da fermentação em biorreator usando a estratégia SSSF, *S. cerevisiae* e materiais pré-tratados

Tabela 4.19. Fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* na presença de compostos inibitórios no meio de cultivo

Tabela 4.20. Análise estatística da fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* na presença de compostos inibitórios no meio de cultivo

Tabela 4.21. Parâmetros cinéticos das fermentações alcoólicas de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em meio de cultivo diluído com água doce ou água marinha

Tabela 4.22. Análise estatística da fermentação alcoólica de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em meio de cultivo diluído com água doce ou água marinha

Lista de abreviatura

AcO: grupo acetil ligados aos oligossacarídeos

ANOVA: análise de variância

ArO: arabinooligossacarídeos

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

df: grau de liberdade

dt: tempo de pré-tratamento

FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

GO: glicooligossacarídeos

h: hora

HMF: hidroximetilfurfural

I_{002} : intensidade máxima

I_{am} : intensidade de difração amorfa

IC: índice de cristalinidade

LML: % de lignina contida no material *in natura*;

LMLP: % de lignina no material pré-tratado;

LOI: índice de ordem lateral

MC: meio de cultivo

MEV: microscopia eletrônica de varredura

min: minuto

MLI: % de material insolubilizado;

MLS: % de material solubilizado;

NREL: Laboratório Nacional de Energia Renovável

PA: pré-tratamento por autohidrólise

PCA: ágar para contagem em placa

PDA: ágar batata dextrose

PHA: pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

PHA-PHS: pré-tratamento com peróxido hidrogênio alcalino seguido por hidróxido de sódio

PHCHS: pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio

PHS: pré-tratamento com hidróxido de sódio

POEA: pré-tratamento por *organosolv* utilizando etanol alcalino

R_0 : fator de severidade

SSF: fermentação e sacarificação simultânea

SSSF: fermentação e sacarificação semi-simultânea

T: temperatura

t: tempo

TAPPI: Associação Técnica da Indústria de Papel e Celulose

TCl: índice de cristalinidade total

X_1, X_2, X_3 : valores das variáveis independentes

XO: xilooligossacarídeos

Y_i : função resposta

β_0 : coeficiente relativo a intercepção do plano com o eixo de resposta

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$: coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$: coeficiente das variáveis quadráticas

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$: coeficiente de interação entre as variáveis independentes

1. INTRODUÇÃO

Em busca de mitigar a mudança climática, o alto preço do petróleo e derivados, aliados a necessidade emergente em obter energia limpa, barata e renovável, na composição de uma matriz energética sustentável, surge como uma das alternativas a produção de biocombustíveis, especialmente o etanol. No entanto, o etanol produzido a partir de amido de milho, sacarose da cana-de-açúcar e da beterraba podem no futuro estar em um ambiente de competição entre o uso desses materiais para a produção de bioenergia ou alimentação (Gonçalves *et al.*, 2011), além de terem limitações socioeconômicas e ambientais para a sua expansão produtiva (Gonçalves *et al.*, 2011). Assim, uma alternativa promissora para aumentar a oferta de etanol consiste no uso de materiais lignocelulósicos como substrato, sendo esses inicialmente convertidos em açúcares fermentescíveis pelo processo de pré-tratamento e hidrólise, com subsequente fermentação. No entanto, as tentativas de produzir etanol dos materiais lignocelulósicos são antigas e teve origem na Alemanha e Rússia, há mais de 80 anos atrás, e foram intensificadas após a Segunda Guerra Mundial, a partir da sacarificação por hidrólise ácida (Bastos, 2007). Porém, ainda é limitada a produção de etanol celulósico em escala comercial, produzido de forma consolidada, eficiente e socioambiental amigável, devido principalmente aos obstáculos existentes durante as fases de pré-tratamento e hidrólise enzimática, além da falta de aproveitamento integral da matéria-prima. Por outro lado, faz-se necessária a seleção de matérias-primas que possam ser utilizadas como substrato, de acordo com a região.

O Brasil possui expressiva produção de cana-de-açúcar utilizada para a produção de etanol e que geram resíduos como a palha e o bagaço. No entanto, na atual conjuntura do modelo brasileiro de produção de etanol e açúcar, esses resíduos são destinados à produção de calor e energia elétrica (Sousa e Macedo, 2010; Hofsetz e Silva, 2012). Sendo assim, o destino desses resíduos são incertos para a produção de etanol celulósico. Como uma alternativa para minimizar essa possível ausência dos

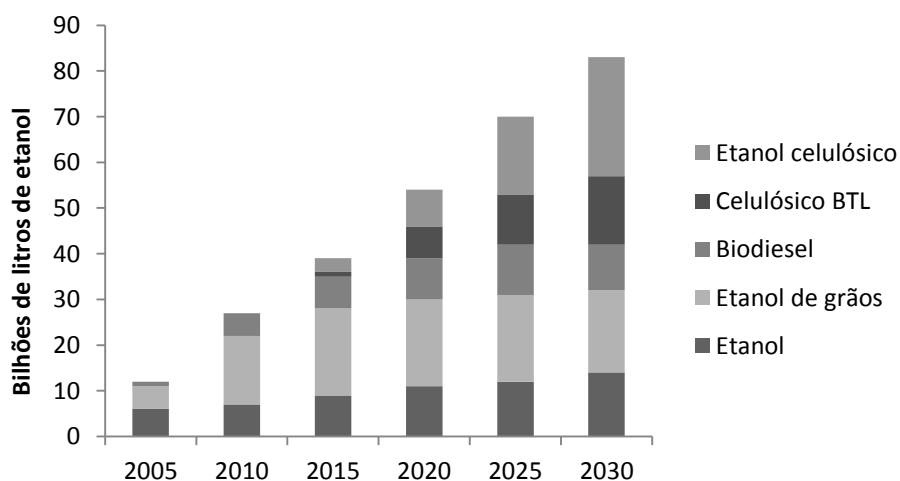
resíduos da cana-de-açúcar, faz-se necessária uma avaliação de matérias-primas alternativas. Neste contexto, no presente trabalho estudou-se os resíduos agroindustriais (fibra de coco maduro, casca de coco verde e casca de coco maduro), resíduo urbano (casca de coco verde) e vegetal cultivado em ambientes inóspitos (cacto). Esses materiais são abundantes no Brasil, principalmente na Região Nordeste (FAO, 2012; IBGE, 2012).

Este trabalho visa avaliar o potencial da fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto como substrato para produção de etanol. Além da caracterização físico-química dos materiais *in natura* e pré-tratados, estudar os processos de pré-tratamentos com peróxido hidrogênio alcalino seguido por hidróxido de sódio (PHA-PHS), autohidrólise (PA), hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS) e *organosolv* usando etanol alcalino (POEA) nos materiais, analisar os licores resultantes das etapas de pré-tratamentos PA, PHCHS e POEA, caracterizar a lignina dos licores oriundos dos pré-tratamentos PHCHS e POEA, e analisar as hidrólises enzimáticas promovidas pelas enzimas comerciais Cellic (Ctec 2 e Htec 2) da Novozymes sobre os materiais pré-tratados. Adicionalmente, buscou-se avaliar as estratégias fermentativas SSF e SSSF usando os micro-organismos *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *P. stipitis* e os materiais pré-tratados, e a fermentação da *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *P. stipitis* em meio de cultivo com a presença simultânea dos compostos inibitórios (hidroximetilfurfural, furfural, ácido acético, ácido levulínico e ácido fórmico, em diferentes concentrações), bem como a fermentação da *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *P. stipitis* em meio de cultivo diluído com água marinha.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Etanol celulósico

A política energética global gera modificações ambientais, sociais e econômicas na sociedade contemporânea. Além de provocarem nas últimas décadas, profundas mudanças no ambiente marinho, influenciado principalmente pelas ações antrópicas, oriundo da emissão de dióxido de carbono contido nos combustíveis fósseis, promovendo assim, acidificação da água e prejudicando a biodiversidade existente (Hönisch *et al.*, 2012). Uma alternativa de mitigar essa pressão exercida pelos combustíveis fósseis e seus derivados consiste no uso de biocombustíveis (Figura 2.1). Portanto, uma opção consiste na produção de etanol celulósico, que permitirá elevada abrangência geográfica, aumento significativo na oferta de energia limpa, aproveitamento dos resíduos agroindustriais e urbanos de origem vegetal, sem a necessidade de expansão no uso de terras agricultáveis (Gonçalves *et al.*, 2011). Todavia, a produção de etanol celulósico possui algumas dificuldades nas etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.



Fonte: Sastri e Lee (2008).

Figura 2.1. Produção por tipo de biocombustíveis

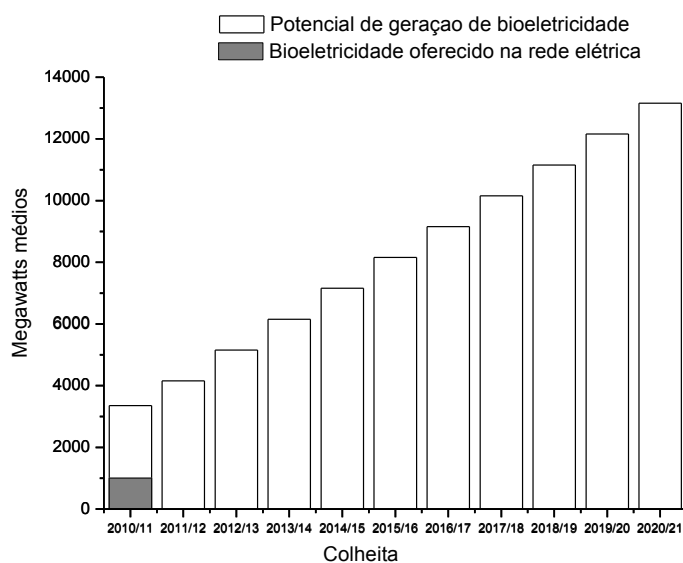
2.1.1. Situação contemporânea das usinas sucroenergéticas brasileiras para a produção de etanol celulósico

As usinas sucroenergéticas brasileiras possuíam foco apenas na produção de etanol e açúcar, porém, recentemente a atenção voltou-se também para a produção de bioeletricidade, alcoolquímica e comercialização de créditos de carbono (Sousa e Macedo, 2010; Cavalett *et al.*, 2012; Dantas *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2013). Dessa forma, possibilitou o aumento na oferta de produtos gerados pelas usinas sucroenergéticas (Dias *et al.*, 2011; Cavalett *et al.*, 2012). Além disso, destaca-se globalmente o interesse na produção de etanol celulósico como alternativa à produção de etanol produzido a base de fonte alimentícia (Sivakumar *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2011; Agostinho e Ortega, 2012; Gonçalves *et al.*, 2013a; Koizumi, 2013). No Brasil, a produção de etanol celulósico está sendo projetada, inicialmente, a partir de resíduos da cana-de-açúcar (Pandey *et al.*, 2000; Ferreira-Leitão *et al.*, 2010; Socol *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2013), estimando-se que a primeira usina brasileira desse tipo estará em operação em 2014 (Novozymes, 2012).

O aproveitamento do potencial energético brasileiro referente à palha e bagaço de cana-de-açúcar a curto e médio prazo está direcionado para produção de energia elétrica (Pessoa *et al.*, 2005; Goldemberg *et al.*, 2008; Sousa e Macedo, 2010; Dias *et al.*, 2011; Gnansounou e Dauriat, 2010; Arruda, 2011; Hofsetz e Silva, 2012; Dantas *et al.*, 2013), que é considerado economicamente viável no Brasil (Cardona *et al.*, 2010; Dantas *et al.*, 2013), o que se configura um concorrente em potencial na destinação da palha e bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol, principalmente se forem adotadas políticas específicas, como os leilões de energia relacionados à geração de bioeletricidade. Segundo Dias *et al.* (2011), Castro *et al.* (2009) e Menon e Rao (2012), o etanol celulósico pode competir com a produção de bioeletricidade, mas inicialmente necessita da utilização integral dos resíduos da cana-de-açúcar, menor custo das enzimas envolvidas no processo e a produção em escala industrial. Entretanto, apesar

das expectativas, uma grande incerteza permanece sobre o desempenho da produção de etanol celulósico em escala industrial (Menon e Rao, 2012) e a implantação dessas usinas em escala industrial é prejudicada pela ausência de financiamento público-privado, derivado da crise econômica mundial (Frankel, 2012; Gross, 2012). Todavia, essa rota biotecnológica ainda precisa demonstrar solidez, eficiência e competitividade.

Em 2010, o Brasil possuía 432 usinas sucroenergéticas em atividade, dessas, 129 exportavam energia para a rede elétrica, somando 1002 megawatts (Sousa e Macedo, 2010; Bioeletricidade, 2013). Em 2012, foram 348 usinas sucroenergéticas exportadoras de energia para a rede elétrica (UNICA, 2012). Nessa tendência, verifica-se a utilização da palha e do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de eletricidade (Hofsetz e Silva, 2012). Segundo Sousa e Macedo (2010), a bioeletricidade apresenta um potencial de suprir cerca de 20,0% de toda a demanda de eletricidade brasileira até o final dessa década (Sousa e Macedo, 2010). Estimando-se que a produção e distribuição de bioeletricidade na rede elétrica brasileira, até 2021, podem ser comparadas a três usinas hidroelétricas da grandeza da Usina Belo Monte (Figura 2.2) (Bioeletricidade, 2013).



Fonte: Bioeletricidade (2013).

Figura 2.2. Potencial de mercado da bioeletricidade à rede elétrica - Brasil (2010-2021)

Nesse contexto, a produção brasileira de etanol a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar poderá ser penalizada também pelas estruturas adaptativas das usinas sucroenergéticas na utilização desses resíduos na produção de eletricidade, pois a lei ambiental brasileira possui algumas restrições sobre as instalações de novas usinas sucroenergéticas. Por exemplo, o Estado de Mato Grosso do Sul limita a instalação de nova usina sucroenergética à distância radial mínima de 25 km entre as usinas e limita, em 20 km, a distância mínima entre o perímetro urbano e a usina. Isso significa que em poucos anos teremos ocupadas à maioria das áreas permissíveis para implantação dessas usinas sucroenergéticas, e na atual conjuntura, destinando-se os resíduos da cana-de-açúcar para a produção de eletricidade. Essa destinação dos resíduos da cana-de-açúcar para a produção de eletricidade no Brasil foi motivado também pela demora na implantação das usinas produtoras de etanol a partir desses materiais lignocelulósicos, além do aumento nos incentivos público-privado para a produção de bioeletricidade (Hofsetz e Silva, 2012), reduzindo assim a oferta de resíduos da cana-de-açúcar para produção de etanol. Esses eventos são favorecidos também pelos recentes “apagões energéticos” e pelos baixos níveis hidrológicos dos reservatórios das usinas hidrelétricas brasileiras.

Segundo Dias *et al.* (2012a) e Pellegrini e Oliveira Junior (2011), as usinas sucroenergéticas precisam analisar a necessidade de instalarem caldeiras de baixa pressão e utilizarem internamente a energia gerada, ou de acordo com o mercado, realizarem investimentos em caldeiras de alta pressão, as quais permitem exportar com eficiência a energia excedente para a rede elétrica. Nesse sentido, no Brasil as usinas estão gradativamente substituindo as caldeiras de baixa pressão por caldeiras de alta pressão e as novas usinas já possuem caldeiras de alta pressão, focando o interesse dessas usinas em exportar o excedente da energia produzida para a rede elétrica (Pellegrini e Oliveira Junior, 2011; Hofsetz e Silva, 2012; Dias *et al.*, 2013).

A bioeletricidade vinculada à produção de etanol e açúcar possui condições excepcionais para representar papel estratégico na expansão do sistema elétrico

nacional, sendo uma importante fonte energética para complementar a oferta de energia gerada pela hidroeletricidade, além de proporcionar baixo custo de produção, transmissão e distribuição (energia elétrica gerada próximo aos centros consumidores), benefícios ambientais (fonte de energia renovável e redução das emissões dos gases de efeito estufa) e socioeconômicos (geração de empregos, garantia do suprimento de energia, reduções das perdas de transmissão elétrica e descentralização da oferta de energia elétrica). Esses fatores fortalecem a competitividade da economia nacional (Sousa e Macedo, 2010), além disso, a bioeletricidade permite a geração de energia durante os meses com menores níveis pluviométricos (Sousa e Macedo, 2010; Hofsetz e Silva, 2012), possibilitando a redução do custo de produção do açúcar, etanol e etanol celulósico, quando a geração de bioeletricidade está presente no processo produtivo (Pellegrini e Oliveira Junior, 2011; Starfelt *et al.*, 2012), proporcionando ainda, valores fixos e contratos financeiros superiores há 15 anos (Hofsetz e Silva, 2012). Esses motivos incentivam a escolha das políticas público-privadas favoráveis à geração de bioeletricidade como possível solução energética, além de proporcionar confiabilidade ao mercado energético e ser ofertada em um país em plena expansão socioeconômico, com necessidade crescente da disponibilidade de energia elétrica.

De acordo com Dias *et al.* (2011), os resultados obtidos por simulação demonstraram a possibilidade de melhorar a taxa interna de retorno das destilarias autônomas convencionais quando utiliza integralmente a cana-de-açúcar e o excedente de energia elétrica repassada à rede. Os dados obtidos por Dias *et al.* (2011) evidenciaram os melhores resultados nos cenários onde a produção de eletricidade é maximizada, enquanto, que para o etanol celulósico as melhores taxas internas de retorno foram obtidas a partir do uso integral da cana-de-açúcar e eficiente hidrólise enzimática.

Segundo Dias *et al.* (2012b), a simulação avaliativa de alguns cenários produtivos, que considera diferentes níveis de integração entre as usinas de produção

de etanol e etanol celulósico a partir da cana-de-açúcar apresenta diferenças significativas (Tabela 2.1). A produção integrada de etanol e etanol celulósico com a atual tecnologia de hidrólise enzimática (cenário 2) possui o maior investimento entre os cenários estudados apresenta taxa interna de retorno maior apenas que a usina de geração autônoma de etanol celulósico (cenário 5) e os maiores custos de produção. A utilização das tecnologias avançadas de hidrólise enzimática no processo integrado melhora a produção de etanol (cenários 3 e 4), mas apenas quando se realiza a fermentação das pentoses (cenário 4), sendo a taxa de retorno maior que da usina autônoma de etanol (cenário 1). A usina autônoma de etanol celulósico (cenário 5) tem a menor taxa interna de retorno, devido ao grande investimento inicial, similar ao cenário 1a, além da baixa produção de etanol. Se o solvente utilizado na deslignificação alcalina for recuperado, essa configuração proporciona os melhores indicadores ambientais (Dias *et al.*, 2012b). Todos esses cenários testados possuem exportação do excedente de energia na forma de bioeletricidade a rede elétrica.

Tabela 2.1. Características dos cenários avaliados

Parâmetro	Cenário					
	1	1a	2	3	4	5
Produção de etanol	x	x	x	x	x	
Produção de etanol celulósico			x	x	x	x
Venda de eletricidade excedente	x	x	x	x	x	x
Venda de excedente de bagaço		x				
Tecnologia atual para o etanol celulósico			x			
Tecnologia em 2015 para o etanol celulósico				x	x	x
Biodigestão das pentoses			x	x		
Fermentação das pentoses					x	x

Fonte: Dias *et al.* (2012b).

Esses fatos corroboram para escassez na oferta de palha e bagaço de cana-de-açúcar como os principais materiais lignocelulósicos para produção de etanol no Brasil. Diante disso, a produção de etanol celulósico brasileiro deverá ser realizada não apenas a partir do uso da palha e bagaço de cana-de-açúcar, mas sim, a partir de

várias fontes de biomassas vegetais. Além de ser produzido não apenas por usinas de grande escala, mas também por usinas de média e pequena escala, como as microdestilarias. Nesse sentido, este trabalho evidencia as dificuldades encontradas no Brasil para a produção de etanol a partir da palha e bagaço da cana-de-açúcar em escala industrial e demonstra alguns materiais lignocelulósicos com elevado potencial como matéria-prima para produções de enzimas, etanol celulósico, coprodutos e subprodutos, no contexto de biorrefinaria. Além da possibilidade de produção de etanol celulósico em microdestilaria, pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos, estratégias fermentativas, efeitos da presença de compostos inibitórios durante a fermentação alcoólica e o uso da água marinha em bioprocessos.

2.1.2. Microdestilaria

2.1.2.1. Implantação de microdestilaria

O Brasil consiste no maior exportador e segundo maior produtor mundial de etanol (Du e Carriquiry, 2013), mas apresenta escassez interna de etanol, principalmente na época de entressafra da colheita de cana-de-açúcar, a qual proporciona a redução na quantidade de etanol presente na gasolina e aumenta a dificuldade em adquirir o etanol hidratado, e esses entraves geram aumento no valor do etanol. Em um país exportador de etanol, esses fatores proporcionam descrédito do mercado. Dessa forma, a fim de evitar tais fatos, surge como alternativa, a possibilidade da produção de etanol celulósico em microdestilarias, com a implantação desse empreendimento em grandes latifúndios individuais, cooperativas agroindústrias, urbanas e da agricultura familiar.

A produção de etanol em microdestilaria, por meio de estrutura simples e acessível permite a produção diária de até 5000 litros de etanol e a instalação de microdestilaria não necessita de grande área homogênea para seu funcionamento, permitindo assim, a sua instalação em diversos locais e utilização de inúmeras

matérias-primas, além de permitir a produção em locais de difíceis acessos e a possibilidade de consumo local (Sachs, 1988; Agostinho e Ortega, 2012; Daianova *et al.*, 2012). Esses fatores referentes ao tamanho da instalação, localização da matéria-prima, infraestrutura para produção e distribuição do produto são fatores inter-relacionados e interdependentes que geram impactos substanciais sobre o custo de produção do etanol celulósico (Sanders *et al.*, 2007; Kocoloski *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2012; Daianova *et al.*, 2012; Machado e Atsumi, 2012; Starfelt *et al.*, 2012). Dessa forma, a instalação em local que minimize os custos de transporte das matérias-primas e do produto representa economia de 15,0 a 25,0% do custo total de produção do etanol celulósico (Kocoloski *et al.*, 2011).

A produção de etanol em microdestilaria possibilita ainda o aumento considerável do índice de desenvolvimento humano, a partir da melhoria na qualidade de vida na zona rural (Sachs, 1988). Com geração de renda (desestimula o êxodo rural) e ausência dos problemas sociais relacionados à produção em larga escala de etanol (Agostinho e Ortega, 2012). Possibilita aumento da quantidade de alimentos produzidos através do uso dos subprodutos da microdestilaria (Ortega *et al.*, 2008), sendo um sistema integrado de produção de alimentos, energia e serviços ambientais como alternativa promissora para propriedades rurais, principalmente se o objetivo for relacionado ao desempenho energético-ambiental, comparado à produção de etanol em larga escala (Agostinho e Ortega, 2012). Esse conceito produtivo se fortalece quando compara, além das questões energéticas, os parâmetros socioambientais (Agostinho e Ortega, 2012) e a potencialidade de neutralizar o carbono gerado (Hill *et al.*, 2009). Permitindo assim, a produção de vários coprodutos e subprodutos no contexto de biorrefinaria (Agostinho e Ortega, 2012) e ausência da disputa com a produção de alimentos (Ghatak, 2011).

O etanol produzido no Brasil precisa obrigatoriamente da certificação pela Agência Nacional de Petróleo (ANP), normalmente o transporte desse produto percorrerá centenas de quilômetros até a ANP e posteriormente até ao centro

consumidor, encarecendo o produto, devido aos acúmulos de encargos tributários e custo de transporte. Uma alternativa consiste na possibilidade de certificar o processo industrial de produção do etanol celulósico na microdestilaria, dessa forma, se autoriza o produto para comercialização local, sem a necessidade de certificar o produto. Destacando-se que a proximidade entre o centro produtor e o consumidor de etanol celulósico deverá ser incentivada por proporcionar a redução no valor do produto (Kocoloski *et al.*, 2011).

De acordo com Pereira e Ortega (2010), a produção de etanol realizada em grande escala apresenta renovabilidade de apenas 30,0%, além de apresentar preocupantes impactos ambientais e elevados consumo de recursos naturais. O estudo realizado por Cavalett *et al.* (2010) corroboram com os resultados obtidos por Pereira e Ortega (2010), o qual apresenta renovabilidade de 64,0% na produção de etanol em microdestilaria e a torna mais sustentável do que a produção de etanol em grande escala (renovabilidade 23,0%). Segundo Ortega *et al.* (2006), por meio da análise sistêmica, torna-se possível analisar que a economia de escala desaparece, ao mesmo tempo em que o sistema agrícola ecológico integrado presente em microdestilaria pode apresentar ótimo desempenho econômico e socioambiental. Além de que, o processamento em microdestilaria poderá ser vantajoso em relação à produção em grande escala (Daianova *et al.*, 2012; Menon e Rao, 2012). A produção de etanol em larga escala reduzirá as terras aráveis para o cultivo de alimento (Pereira e Ortega, 2010; Agostinho e Ortega, 2012; Xing *et al.*, 2012), o que resulta, portanto em necessidade de abordagem cautelosa para a produção em grande escala (Ghatak, 2011). Além disso, a demanda de uso da biomassa para a produção de bioenergia poderá potencializar a pressão sobre os sistemas produtivos geradores de impactos negativos à biodiversidade (Fletcher *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2011), à expansão de monoculturas e aplicações de produtos químicos (Fletcher *et al.*, 2011). Além da biodiversidade, os principais impactos negativos da produção de biocombustíveis em

grande escala são as ameaças às florestas, aumento nos preços dos alimentos e a competição por recursos hídricos (Koh e Ghazoul, 2008).

Experiências bem sucedidas na produção de etanol em microdestilaria brasileira a partir de sacarose da cana-de-açúcar são apresentadas por Moreno e Ortiz (2007), como as cooperativas agroindustriais COOPERCANA, CRERAL e COOPERBIO. A COOPERCANA produz cerca de 2,0% do combustível consumido no Rio Grande do Sul e cerca de 2.500 hectares de cultivo de cana-de-açúcar espalhados por mais de 300 propriedades distribuídas nos municípios de Porto Xavier, Roque Gonzáles e Lucena Porto, com produção de 9 milhões de litros de etanol por ano (Moreno e Ortiz, 2007). A COOPERBIO dispõe de uma rede de 64 municípios no Rio Grande do Sul e desenvolve um programa para a produção de alimentos e biocombustíveis baseados em princípios agroecológicos, direcionados a pequenos agricultores familiares, com a capacidade produtiva diária de 600 litros de etanol (Bergquist *et al.*, 2012).

Em termos comparativos aos países Nórdicos, que também estão em busca de atender a demanda por etanol, a Suécia aposta na produção regional de etanol celulósico em microdestilaria (Daianova *et al.*, 2012). Por exemplo, a biorrefinaria Borregaard (Sarpsborg, Noruega) se constitui em uma das mais avançadas biorrefinarias em operação, com experiência de mais de 40 anos de atuação e atualmente produzindo a partir de material lignocelulósico, tais como: bioenergia, lignossulfonatos, oxilignina sulfonatos, vanilina, celobiose octaacetato, celulose microfibrilar, celulose, etanol e proteína (Rødsrud *et al.*, 2012). Kadam *et al.* (2008) relatam uma biorrefinaria, com capacidade de converter a palha de milho em etanol, celulose solúvel e lignina para a produção de resina. Uma biorrefinaria baseada em caule de sorgo doce produziu após 54 h, cerca de 140,0 g/L de etanol, com rendimento de etanol de 0,49 g/g (Yu *et al.*, 2012) e o bagaço de sorgo doce pré-tratado com ácido acético hidrolisou 85,0% das hemiceluloses, usando esse hidrolisado como matéria-prima (55 g/L açúcares), produzindo 19,21 g/L de solvente total (9,34 g de butanol, 2,5 g de etanol e 7,36 g acetona) por *Clostridium*

acetobutylicum e o bagaço residual do pré-tratamento extrusado com poli (ácido láctico) para produção de bioplásticos (Yu *et al.*, 2012). De acordo com Mao *et al.* (2010) e Fornell *et al.* (2012), existe viabilidade técnica e econômica na produção de etanol a partir de *kraft mill*. Esse processo produtivo também é atrativo para microdestilaria (Mao *et al.*2010).

A partir dos incentivos público-privados é possível imaginar a implantação de milhares de microdestilarias em território brasileiro, proporcionando assim, um salto na oferta energética a partir de resíduos, além de incorporar ganhos sociais, ambientais e econômicos à população. Ressalta-se que a partir do desenvolvimento desse modelo, o Brasil poderá contribuir para o desenvolvimento de outros países. Por exemplo, o continente africano apresenta características similares ao Brasil e a produção de bioenergia poderá permitir a possibilidade de aumentar a segurança alimentar (aumento na produção de alimento), investimento em tecnologia e infraestrutura, recuperação de áreas agricultáveis e formação de recursos humanos (Lynd e Woods, 2011), configurando-se uma região com elevada capacidade produtiva ainda não explorada energeticamente.

2.1.2.2. *Implantação de microdestilaria no contexto de biorrefinaria*

A possibilidade de implantar milhares de microdestilarias para a produção de etanol celulósico baseado no contexto de biorrefinaria proporcionará um salto biotecnológico ao Brasil. O termo biorrefinaria foi estabelecido pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) em 1990 (Fernando *et al.*, 2006) e segundo o NREL (2012), biorrefinaria consiste em uma instalação industrial que integra os processos de conversão e equipamentos para a produção de combustíveis, energia e outros produtos químicos a partir da biomassa. Definições similares para conceituar biorrefinaria foram mencionadas por Chum e Overend (2001), Fernando *et al.* (2006), Sanders *et al.* (2007), Luo *et al.* (2010), Ghatak (2011) e Liu *et al.* (2012).

Os três principais modelos de biorrefinaria consistem: na biorrefinaria baseada em matéria-prima lignocelulósica (LCF), na “*whole-crop biorefinery*” e na biorrefinaria verde (Kamm e Kamm, 2004; Uihlein e Schebek, 2009). Segundo Uihlein e Schebek (2009), a biorrefinaria LCF é considerada a mais promissora. Recentemente, surgiu o modelo de biorrefinaria baseada na biomassa aquática fotossintética (Naik *et al.*, 2010), além do modelo de biorrefinaria associada aos resíduos sólidos urbanos de origem vegetal. As biorrefinarias são classificadas em três fases, sendo a biorrefinaria de fase 1, limitada no uso de uma matéria-prima para produção de único produto. A biorrefinaria de fase 2, utiliza uma matéria-prima e a converte em vários produtos. A biorrefinaria de fase 3, a mais avançada, a qual visa o emprego de vários processos de conversão na produção de múltiplos produtos a partir de várias matérias-primas (Srirangan *et al.*, 2012).

As biorrefinarias podem realizar atividades interligadas que permitam a criação de redes industriais, as quais geralmente proporcionam benefícios sociais, ambientais e econômicos (Realff e Abbas, 2003; Ghatak, 2011), por combinarem as tecnologias necessárias para o processamento das matérias-primas biológicas, dos produtos intermediários e finais (Kamm e Kamm, 2004), realizados por processos termoquímicos, químicos, bioquímicos, físicos ou combinação desses processos (Ghatak, 2011; Srirangan *et al.*, 2012), formando assim, uma simbiose industrial (Realff e Abbas, 2003).

Além disso, as biorrefinarias utilizam os recursos de forma mais sustentável, sem produzir resíduos e outros poluentes ambientais (Luo *et al.*, 2010; Munasinghe e Khanal, 2010). Sendo de extrema importância sobre a visão da economia sustentável baseada em recursos biológicos (Uihlein e Schebek, 2009; Liu *et al.*, 2012; Menon e Rao, 2012), permitindo o crescimento econômico sustentável a partir de recursos seguros para a produção industrial (Kamm e Kamm, 2004; Uihlein e Schebek, 2009; Naik *et al.*, 2010). De acordo com Rødsrud *et al.* (2012), a operação de biorrefinaria baseada em materiais lignocelulósicos consiste em um desafio, tanto no ponto de vista

de processamento, quanto de mercado. Destacando-se que a industrialização verde não consegue ser sempre limpa e sustentável (Ghatak, 2011).

Nesse contexto, a biorrefinaria pode melhorar a sua sustentabilidade por meio da diversificação dos produtos a partir da biomassa. Sendo a diversidade das matérias-primas e das tecnologias de processamento precursores das várias combinações industriais, de modo a atender às diferentes necessidades, localização geográfica, economia de escala e prioridades nacionais (Naik *et al.*, 2010, Ghatak, 2011; Menon e Rao, 2012). Assim, um conjunto de tecnologias específicas deverá ser desenvolvido, a fim de converter cada fração de maneira mais eficiente e a geração de produtos de maior valor agregado (Sanders *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010; Menon e Rao, 2012). Da mesma forma, a produção de múltiplos produtos em um determinado local, mas em diferentes épocas pode permitir o funcionamento contínuo da biorrefinaria (Yu *et al.*, 2012).

2.1.3. Produção de coprodutos e subprodutos no processo produtivo do etanol celulósico

As perspectivas são otimistas para a produção de etanol celulósico e seus derivados na Europa (Gnansounou, 2010), Malásia (Tye *et al.*, 2011), Coréia (Lee *et al.*, 2011a), China (Fang *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2012), Índia (Parikh, 2012; Sukumaran *et al.*, 2009), Turquia (Bayrakci e Koçar, 2012), Canadá (Li *et al.*, 2012a), Gana (Afrane, 2012), Sérvia (Mojovic *et al.*, 2012), Austrália (Puri *et al.*, 2012), Colômbia (Quintero *et al.*, 2013) e no Brasil (Soccol *et al.*, 2010).

Alguns materiais lignocelulósicos possibilitam extração da proteína antes da etapa de pré-tratamento, essa proteína poderá ser utilizada no enriquecimento proteico dos alimentos industriais e formulações de compostos nitrogenados (Dale *et al.*, 2009; Chiesa e Gnansounou, 2011; Kamma *et al.*, 2011).

Baseado na produção de etanol celulósico, a degradação de materiais lignocelulósicos promovida pelo pré-tratamento e hidrólise química ou enzimática

poderão resultar na liberação de monômeros de açúcares, derivados furânicos, ácidos fracos, compostos fenólicos, lignina e outros (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010; Ghatak, 2011; Wetterlund *et al.*, 2012), gerando ainda, subprodutos oriundos do processo industrial como o dióxido de carbono, vinhaça e material lignocelulósico residual, que possibilitam a produção de gás de síntese ou biogás, eletricidade e calor (Ghatak, 2011; Wetterlund *et al.*, 2012).

Nas usinas convencionais de produção de etanol a lignina é considerada um resíduo de baixo valor agregado, sendo geralmente queimada para fornecer energia e calor (Fang *et al.*, 2009). Porém, no conceito de biorrefinaria essa lignina deverá ser integrada de forma eficiente ao processo produtivo (Chakar e Ragauskas, 2004). De acordo com Ghatak (2011), o uso da lignina na forma não energética poderá melhorar significativamente a sustentabilidade econômica e ambiental das biorrefinarias. Nesse cenário, a lignina pode ser convertida em gás de síntese (Fang *et al.*, 2009; Öhrman *et al.*, 2013), ou degradada em frações menores para a produção de espuma de poliuretano, resinas fenólicas e epóxi, como fonte de fenol e de etileno (Gonçalves e Benar, 2001; Lora e Glasser, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Tejado *et al.*, 2007), adsorventes e precursores de carbono (Lora e Glasser, 2002; Kadla *et al.*, 2002), formulações de polímeros (Bittencourt *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006) e matéria-prima para inúmeras substâncias aromáticas de baixa massa molecular (Villar *et al.*, 2001; Lora e Glasser, 2002). Além da possibilidade de produzir aditivo para biocombustíveis renováveis a partir do processo de ozonólise da lignina (Chuck *et al.*, 2013).

As degradações da celulose e hemicelulose durante o pré-tratamento poderão gerar compostos passíveis de promoverem efeitos inibitórios durante as etapas de hidrólise enzimática e fermentação, como os derivados furânicos, o hidroximetilfurfural (HMF), produto da desidratação da hexose e o furfural, produto da desidratação da pentose. A degradação do HMF libera o ácido levulínico e ácido fórmico. O ácido fórmico também pode ser liberado pela degradação do furfural. A hidrólise de grupos

acetil ligados aos açúcares gera o ácido acético. Os compostos fenólicos e aldeídos são formados pela degradação da lignina e carboidratos. O ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico são os ácidos fracos mais comuns nos hidrolisados lignocelulósicos (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida *et al.*, 2007). Esses compostos possuem possibilidade de aproveitamento, por exemplo, o furfural pode ser hidrolisado em ácido maléico ou formar resina com adição de ureia ou fenol (Mckillip *et al.*, 1989), o HMF clivado em ácido fórmico e ácido levulínico, esse último podendo ser utilizado como matéria-prima para a produção de poliésteres (Schuchardt *et al.*, 2001), o ácido acético como reagente químico ou sobre a forma de vinagre, além de fornecer material de partida para a síntese de vários polímeros tais como acetato de vinila e anidrido acético, os quais são produzidas tradicionalmente a partir de matérias-primas à base de petróleo (Yoneda *et al.*, 2001; Khanal, 2008).

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos aumentará a oferta de etanol e possibilitará a geração de muitos coprodutos, tais como, vapor de etanol na produção de hidrogênio para a obtenção de células de combustível (Benito *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2007), produção de etileno, etilenoglicol, acetaldeído, acetato, acetato de etila, glicóis, acrilatos, cloreto de etila, butano, propileno e butadieno (Schuchardt *et al.*, 2001) e a produção de etano resultante da desidratação de etanol, precursor de vasta gama de produtos como polietileno, polipropileno e cloreto de polivinila (PVC). No Brasil, a produção desses coprodutos a partir de etanol está em expansão devido ao país produzir cada vez mais etanol (BNDES, 2008). Além do uso de etanol em substituição ao metanol durante a produção de biodiesel (García *et al.*, 2009), bem como a conversão de etanol em etileno para a produção de bioplásticos, cenários que contribuem para o aumento na demanda por etanol. Ressalta-se que o etanol utilizado durante a etapa de transesterificação do biodiesel poderá ser repostado pelo aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos resultantes da extração de óleo da própria produção de biodiesel e direcionado à produção de etanol celulósico (Visser *et al.*, 2011), valendo registrar que, atualmente, 80,0% do biodiesel produzido no Brasil

utiliza soja como matéria-prima (ANP, 2013). Segundo Visser *et al.* (2011), a reposição do etanol varia de acordo com o material lignocelulósico utilizado, no caso da semente de algodão, 470,0% da demanda de etanol utilizado durante a etapa de transesterificação da produção de biodiesel poderá ser fornecida a partir da produção de etanol do resíduo da semente de algodão.

O aproveitamento da biomassa microbiana produzida durante a fermentação alcoólica pode ser fonte de proteína (*single cell protein*) e incorporada à alimentação (Cysewski e Wilke, 1976; Ugalde e Castrillo, 2005; Zheng *et al.*, 2005). A biomassa microbiana ainda contém ácidos nucleicos, carboidratos, compostos da parede celular, lipídios, minerais e vitaminas (Ugalde e Castrillo, 2005).

Durante o processo industrial existe geração de resíduos líquidos com elevada carga orgânica e inorgânica, por exemplo, a vinhaça, a qual possui alta eficiência como fertilizante. Segundo Silva *et al.* (2011), Bekatorou *et al.* (2006) e Selim *et al.* (1991) é também potencialmente viável a utilização da vinhaça na produção de proteína unicelular por *S. cerevisiae*, proporcionando um efluente menos tóxico (Bekatorou *et al.*, 2006). Além disso, inúmeros resíduos orgânicos poderão ser empregados na produção de proteína microbiana, por exemplo, o meio de cultivo contendo mamão (Ojokoh e Uzeh, 2005) e o meio de cultivo contendo casca de soja (Mielenz *et al.*, 2009) possibilitaram aumento na concentração de proteína em *S. cerevisiae* em 20,0 e 25,0%, respectivamente. Dessa forma, fortalece a ideia de utilizar inúmeras matérias-primas para produção de proteína microbiana (*single cell protein*) em microdestilaria.

A etapa de fermentação produz um fluxo de CO₂ de alta pureza (Koornneef *et al.*, 2012) e o CO₂ armazenado, proveniente da fermentação não necessita de tratamento posterior (Visser *et al.*, 2011). Os custos de instalação, operação e manutenção para captura e armazenamento de CO₂ a partir da etapa fermentativa são geralmente baixos (Visser *et al.*, 2011). Esse CO₂ gerado durante a produção de etanol pode ser utilizado na produção de biomassa microbiana (Fang *et al.*, 2009; Silva

et al., 2010) e de gás de síntese, possibilitando aumento da oferta, juntamente com a gaseificação do material lignocelulósico residual do processo fermentativo, essa última rica em CO e H₂, que pode ser usado na síntese de qualquer hidrocarboneto (Ghatak, 2011). Essa posterior captura e armazenamento de carbono de material lignocelulósico residual do processo fermentativo, possibilita a redução real da concentração global de CO₂ na atmosfera (Koornneef *et al.*, 2012), somada à captura de carbono das emissões de fontes pontuais, como uma das várias estratégias necessárias para mitigar os gases de efeito estufa na atmosfera (Olajire, 2010). Torna-se possível também a utilização deste CO₂ não gaseificado, gerado no processo fermentativo para a produção de microalgas, as quais ajudam na ciclagem do CO₂ e permite a utilização dessa biomassa, principalmente na forma de lipídeos para produção de biodiesel e o uso da biomassa microbiana residual na produção de etanol celulósico, acetona e butanol (Ellis *et al.*, 2012).

Quanto ao gás de síntese, sua fermentação oferece um caminho para a síntese sustentável de combustíveis e produtos químicos com muitas vantagens sobre a conversão de gás de síntese catalítica gerando etanol, hidrogênio, butanol, ácido acético, ácido butílico, butanol, metano, biopolímeros e proteína unicelular (Datar *et al.*, 2004; Posten e Schaub, 2009; Munasinghe e Khanal, 2010; Mohammadi *et al.*, 2011; Wilkins e Atiyeh, 2011). Essa fermentação do gás de síntese apresenta elevada eficiência na conversão biocatalítica em vários compostos bioquímicos e biocombustíveis (Choi *et al.*, 2010; Mohammadi *et al.*, 2011). Por exemplo, o butanol é utilizado como matéria-prima para a produção de acetato de butila e acrilato de butila, que podem ser utilizados como aditivos de combustível para melhorar o índice de octanagem da gasolina (Grethlein e Jain, 1992).

Segundo Mohammadi *et al.* (2011) e Munasinghe e Khanal (2010), inúmeros micro-organismos são capazes de fermentar o gás de síntese em biocombustíveis, como a *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanosarcina barkeri*, *Clostridium thermoaceticum*,

Rhodopseudomonas gelatinosa, *Bacillus simithii* ERIH2, *Rhodopseudomonas palustris* P4 e *Acetobacterium kivui*. Experimentos realizados por Mohammadi *et al.* (2012), visando a produção de bioprodutos a partir do gás de síntese, contendo: 55,0% de CO, 20,0% de H₂, 10,0% de CO₂ e 15,0% de Ar por *Clostridium ljungdahlii* em biorreator agitado de fluxo contínuo a 37 °C e agitação de 500 rpm, resultaram em 2,34 g/L de massa seca, conversão de 96,0% de CO, concentrações de 6,50 g/L de etanol e 5,43 g/L de acetato. A modificação microbiana, em busca do uso dos gases de efeito estufa, principalmente CO₂, como substrato na produção de biocombustível se torna realidade (Sheehan, 2009). Lu *et al.* (2012) modificaram *Ralstonia eutropha* para o uso de CO₂ na produção de isobutanol e 3-metil-1-butanol resultando em 140 mg/L de alcoóis de cadeia ramificada.

O material lignocelulósico residual do processo produtivo do etanol celulósico possibilita também a produção de biogás, produzido através da digestão desse material orgânico (Mohseni *et al.*, 2012).

2.1.4. Enzimas

As etapas de produção de enzima e de hidrólise enzimática precisam de atenção quando se pretende a produção de etanol celulósico em microdestilaria, pois essas etapas poderão inviabilizar economicamente a produção de etanol, em especial nessa escala. Dessa forma, há opção de uso das enzimas comerciais ou produzidas localmente com substrato regional. A possibilidade de produção local (*in situ*) das enzimas a partir dos resíduos e subprodutos agroindustriais se torna uma alternativa promissora (Castro e Castro, 2012), principalmente para a produção de enzimas em bioprocessos semissólidos (Tabela 2.2). A produção dessas enzimas a partir de resíduos agroindustriais e urbanos possibilita sustentabilidade e rentabilidade à cadeia produtiva, além de reduzir a emissão de carbono na atmosfera e a possibilidade do uso de materiais lignocelulósicos de baixo custo (Castro e Castro, 2012). A produção de

enzima *in situ* possibilita o uso do extrato enzimático bruto, sem a necessidade de concentrá-lo e purificá-lo. Cita-se como exemplo, a produção de β -glicosidase por *Lichthememia ramosa* em farelo de trigo, com produção de 15,0 U/mL de β -glicosidase (Gonçalves *et al.*, 2013b) e a possibilidade de produção *in situ* e aplicação de forma não concentrada realizada por Gonçalves *et al.* (2012), a partir da mistura sinérgica das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Lichtheimia ramosa* na hidrólise da casca de coco maduro pré-tratada por peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio, resultando em conversões da casca de coco maduro pré-tratada em açúcares redutores e glicose de 82,3 e 83,9%, respectivamente, em 96 h de hidrólise.

Tabela 2.2. Micro-organismos produtores de CMCCase, xilanase e β -glicosidase

Enzima	Micro-organismo	Substrato	Produção U/mL	Referência
CMCase	<i>Trichoderma harzianum</i>	Farelo de trigo	1,64	Ruegger eTauf-Tornisielo, 2004
	<i>Chaetomium erraticum</i>	Farelo de trigo	0,04	Soni e Soni, 2010
	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Caule de mostarda e palha	2,95	Pal <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lysinibacillus sp.</i>	Farelo de trigo	0,43	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
	<i>Neosartorya spinosa</i>	Farelo de trigo	0,11	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
Xilanase	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Farelo de trigo	1,59	Johnson <i>et al.</i> , 1988
	<i>Streptomyces sp. C-248</i>	Farelo de trigo	4,48	Johnson <i>et al.</i> , 1988
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de milho	130,00	Oliveira <i>et al.</i> , 2010
	<i>Streptomyces sp. C-254</i>	Farelo de trigo	6,44	Johnson <i>et al.</i> , 1988
	<i>Aspergillus sydowii</i>	Farelo de trigo	1,10	Ghosh <i>et al.</i> , 1993
	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Caule de mostarda e palha	14,12	Pal <i>et al.</i> , 2013
	<i>Lysinibacillus sp.</i>	Farelo de trigo	5,40	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
	<i>Neosartorya spinosa</i>	Farelo de trigo	2,10	Alves-Prado <i>et al.</i> , 2009
β -glicosidase	<i>Chaetomium globosum</i>	Fibras de palmeira deslignificada	9,80	Umikalsan <i>et al.</i> , 1997
	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Caule de mostarda e palha	2,30	Pal <i>et al.</i> , 2013
	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	2,84	Sukumaran <i>et al.</i> , 2009
	<i>Trichoderma reesei</i>	Farelo de trigo	0,22	Sukumaran <i>et al.</i> , 2009
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo	7,00	Leite <i>et al.</i> , 2008

De acordo com Castro e Castro (2012), o Brasil é um dos maiores produtores de biocombustíveis do mundo, tendo na sua biodiversidade e nas características ambientais a possibilidade de torná-lo um grande gerador de produtos biotecnológicos, tais como as enzimas para a indústria de bioenergia. Os resultados obtidos por Castro e Castro (2012) indicam a possibilidade de produção brasileira de concentrados enzimáticos a partir de resíduos agroindustriais baseados em amilases, celulasas,

lipases e xilanases estimados em $3,1 \times 10^7$, $3,2 \times 10^7$, $3,1 \times 10^8$ e $2,9 \times 10^9$ t, respectivamente.

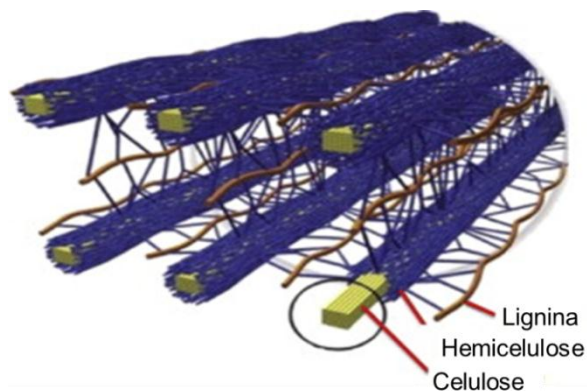
Além da busca por eficiências nas etapas de produção de enzimas e hidrólise enzimática, torna-se importante também realizar a recuperação das enzimas após o processo fermentativo (Hayes, 2013). Eckard *et al.* (2013) realizaram a reciclagem enzimática da sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e da hidrólise e fermentação separada (SHF) da palha de milho com o uso de estabilizadores de enzimas: caseína, PEG-Tween 20, Tween 20 e micelas poliméricas de polietileno glicol PEG-caseína. Com a adição desses compostos foram obtidas significativas recuperações e permanências das atividades enzimáticas. Segundo Rodrigues *et al.* (2012), a recuperação das celulases pode ser realizada com a lavagem alcalina da lignina e celulose residual. A partir dessa simples lavagem alcalina foram recuperadas as enzimas, apresentando mais de 60,0% de atividade enzimática em substrato sintético (4-metilumbeliferil- β -D-celobiose), portanto, consiste em uma estratégia promissora para reciclagem enzimática, sendo de simples implantação em escala industrial, além de ser eficaz e econômica (Rodrigues *et al.*, 2012), proporcionando a redução de custos de produção do etanol celulósico (Zhang *et al.*, 2011).

2.2. Materiais lignocelulósicos

Material lignocelulósico consiste em um termo genérico para descrever os principais constituintes dos vegetais, sendo celulose, hemicelulose e lignina (Klass, 1998), e estão apresentados na Figura 2.3. A celulose é a principal constituinte dos vegetais (Della, 2005) e considerada a matéria orgânica mais abundante. A celulose consiste em um homopolissacarídeo linear com 8.000-12.000 unidades de glicose unidas entre si por ligações 1,4- β -glicosídicas, que resultam na redução de uma molécula de água (Fengel e Wegener, 1989). A hemicelulose consiste em um heteropolissacarídeo complexo, composto por glicose, galactose, manose, xilose, arabinose, ácidos urônicos e grupos acetila, de cadeia ramificada e apresenta grau de

polimerização inferior a 200 unidades (Fengel e Wegener, 1989). A lignina consiste em um polímero fenólico que contribui para a rigidez estrutural dos tecidos vegetais (Buckeridge *et al.*, 2008), formada por macromolécula sintetizada por via radicalar a partir de três álcoois *p*-hidróxi-cinâmílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Fengel e Wegener, 1989).

As moléculas de glicose une-se através de ligações glicosídicas formando cadeias lineares (celulose) que interagem umas com as outras através das ligações de hidrogênio, formando-se a estrutura denominada fibrila elementar, insolúvel em água e com alto grau de cristalinidade. Quatro fibrilas elementares são agrupadas por uma monocamada de hemicelulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz de hemicelulose e lignina, essa íntima associação consiste na microfibrila celulósica (Fengel e Wegener, 1989; Matulova *et al.*, 2005; Wyman *et al.*, 2005). Formando uma estrutura de difícil separação (Figura 2.3).



Fonte: modificado de Ghaffar e Fan (2014).

Figura 2.3. Estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal

2.2.1. Biomassa fotossintética terrestre

A produção de biomassa terrestre consiste em aproximadamente 100 bilhões de toneladas de matéria orgânica seca (Carlsson *et al.*, 2007; Naik *et al.*, 2010). Parte dessa biomassa é utilizada (1,25%), o restante é reciclado pelo sistema biótico. Diante disso, parte dessa biomassa poderá ser usada como matéria-prima para obtenção de inúmeros produtos (Naik *et al.*, 2010).

A produção de biocombustíveis utiliza geralmente substratos oriundos de culturas alimentares, o que tem proporcionado polêmica entre a destinação dessa biomassa vegetal para a alimentação ou para a produção de biocombustível (Harun *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011; John *et al.*, 2011; Ghatak, 2011; Pittman *et al.*, 2011; Koizumi, 2013). Dessa forma, destaca-se a busca por fontes sustentáveis de biomassa para produção de biocombustíveis, principalmente etanol. Em virtude do risco de insegurança alimentar, essa questão deve ser cuidadosamente observada, por exemplo, o governo chinês possui leis que desestimulam utilização de matéria-prima alimentícia para produção de etanol (Qiu *et al.*, 2012). Como alternativa às fontes alimentícias surge o uso dos resíduos agroindustriais e urbanos (Champagne e Li, 2009; Shi *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011; Hussin *et al.*, 2013) e vegetais cultivados em áreas inóspitas (Parida e Das, 2005; Gheewala *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011; Xian-Zhao *et al.*, 2012). Esse cenário permite agregar valor a essas biomassas, possibilitando aumento na produção de combustível sem a necessidade de expansão no uso de terras agricultáveis, fornecendo ainda, subsídios para o cumprimento de metas estabelecidas nos acordos diplomáticos como o Protocolo de Montreal (1987), Kyoto (1997) e Copenhagen (2009).

Contudo, o avanço no uso dos materiais lignocelulósicos aumenta a preocupação em preservar as florestas naturais, principalmente em países tropicais (Popp *et al.*, 2012). Sendo a conservação das florestas uma pré-condição para a produção sustentável de etanol celulósico (Popp *et al.*, 2012). E tudo reforça a importância de utilizar resíduos agroindustriais e urbanos, além de vegetais cultivados para a produção de etanol e enzimas (conforme Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4). Além disso, a safra brasileira de 2011, mostrada na Tabela 2.3, evidencia o potencial de material lignocelulósico deixado no campo. Alguns desses materiais lignocelulósicos apresentam poucas informações na literatura, por exemplo, os resíduos de coco e o cacto, citados abaixo.

Tabela 2.3. Safra brasileira em 2011

Vegetal	Produção (t)	Estimativa de biomassa vegetal deixada no campo (t)*
Feijão (em grão)	3550107	1171535
Algodão herbáceo (em caroço)	5059618	1669674
Amendoim (em casca)	275460	90902
Arroz (em casca)	13456369	4440602
Aveia (em grão)	340995	112528
Batata	3943146	1301238
Cebola	1402758	462910
Milho (em grão)	56099662	18512888
Soja (em grão)	74829383	24693696
Sorgo (em grão)	1941267	640618
Trigo (em grão)	5646166	1863235
Triticale (em grão)	147078	48536
Alho	8962	2957
Cacto	60000	-
Girassol (em grão)	78690	25968
Fruto	Produção (t)	Estimativa de bagaço (t)**
Coco	1899355	949678
Castanha de caju	229319	114660
Cacau	248165	124083

*33 % do vegetal

**50 % do fruto

Fonte: modificado de IBGE (2012).

Tabela 2.4. Produção de etanol celulósico a partir de diferentes materiais lignocelulósicos, pré-tratamentos, micro-organismos e bioprocessos

Biomassa	Pré-tratamento	Micro-organismo	Bioprocesso	Etanol (g/g)	Referência
Bagaço de caju	Digestão ácida	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SHF	0,27	Rocha et al., 2011
Caule de algodão	Ausente	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHF	0,03	Shi et al., 2009
Cana gigante	Digestão ácida	<i>Pichia stipitis</i>	SHF	0,33	Scordia et al., 2012
Palha de canola	Digestão ácida, hidrotérmico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHF	0,21	Lu et al., 2009
Resíduos têxteis à base de algodão	Digestão alcalina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SSSF	0,48	Jeihanipour e Taherzadeh, 2009
Palha de trigo	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SSF	0,32	Ballesteros et al., 2004
Palha de canola	Digestão alcalina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Pichia stipitis</i>	SVSCF	0,14	Karagöz et al., 2012
Bagaço de sorgo doce	Digestão alcalina	<i>Mucor hiemalis</i>	SHF	0,48	Goshadrou et al., 2011
Folha de cana	Digestão ácida, deslignificação	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batch	0,48	Jutakanoke et al., 2012
Casca de arroz	Digestão alcalina	<i>Escherichia coli</i>	SHF	0,21	Saha e Cotta, 2007
Palha de arroz	Digestão ácida, vapor	<i>Mucor indicus</i>	SHF	0,43	Abedinifar et al., 2009
Palha de arroz	Digestão ácida, vapor	<i>Rhizopus oryzae</i>	SHF	0,41	Abedinifar et al., 2009
Floculos de celulose	Digestão ácida	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SSF	0,34	Kadár et al., 2004
Bagaço de sorgo doce	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SSF	0,31	Ballesteros et al., 2004
Resíduo de mostarda	Explosão a vapor	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SSF	0,35	Ballesteros et al., 2004
Espiga de milho	Digestão ácida, supercalagem	<i>Zymomonas mobilis</i>	Batch	0,42	Mohaghegi et al., 2004
Haste de sorgo doce	Digestão ácida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Batch	0,49	Yu et al., 2012
Casca de tangerina	Hidrotérmico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHEF	0,46	Choi et al., 2013
Resíduo celulósico de banana	Digestão alcalina	<i>Clostridium thermocellum</i> e <i>C. thermosaccharolyticum</i>	Batch	0,42	Reddy et al., 2010
Notas de dinheiro	Digestão ácida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHF	22,01*	Sheikh et al., 2013
Resíduos de horticultra	Digestão alcalina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHF	0,43	Geng et al., 2012
Borras de café	Digestão ácida	<i>Pichia stipitis</i>	Batch	0,26	Mussatto et al., 2012
Resíduos de papel	Digestão ácida	<i>Pichia stipitis</i>	SHF	0,34	Dubey et al., 2012
Resíduos de madeira de demolição	Digestão ácida	<i>Pichia stipitis</i>	SHF	0,42	Cho et al., 2011
Papel velho	Digestão ácida	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	SSF	0,31	Kadár et al., 2004
Papel fino	Digestão ácida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SSF	0,33	Kadár et al., 2004
Eucalipto	Micro-ondas assistida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHF	0,47	McIntosh et al., 2012
Algarroba	Digestão ácida, vapor, deslignificação	<i>Pichia stipitis</i>	SHF	0,39	Gupta et al., 2009
Cana gigante	Explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHF	0,27	Ask et al., 2012
Cana gigante	Explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SSF	0,24	Ask et al., 2012
Pinheiro	Digestão ácida, explosão a vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SSF	0,44	Bertilsson et al., 2009

SHF: Hidrólise e fermentação separado; SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas; SSSF: Sacarificação e fermentação semi-simultâneas; SHEF: Hidrólise e fermentação separado e evaporação;

SVSCF: Sacarificação e co-fermentação; *Etanol (mg/mL)

2.2.2. Bagaço de coco

Os coqueiros são ideais para o cultivo em clima tropical úmido, eles prosperam em solos pobres, arenosos e toleram curto período exposto à água salina (Etherington, 2005), encontram-se distribuídos em mais de 200 países (FAO, 2012). Segundo a FAO (2012), a produção mundial de coco em 2009 foi de cerca de 55 milhões de toneladas, com destaque produtivo da Filipinas (36,0%), Indonésia (28,0%) e Índia (20,0%). O Brasil é o quarto maior produtor mundial de coco, com produção aproximada de 3 milhões de toneladas (5,0%) (IBGE, 2012). Na América do Sul, o Brasil é responsável por mais de 80,0% da produção, sendo a Região Nordeste responsável por 82,28% do total da área plantada e 69,25% do valor total do coco produzido em 2009 (IBGE, 2012).

A busca pela alimentação adequada como alternativa para melhorar a saúde gera inúmeros produtos alimentícios produzidos a base de coco, tais como a água de coco *in natura* e em pó, leite de coco, coco ralado e óleo de coco. Em função desse avanço, a cadeia produtiva do coco não possui a destinação correta dos seus resíduos agroindustriais e urbanos. Em cidades litorâneas, principalmente as áreas com vocação turística, as cascas de coco verde chegam a representar até 80,0% do volume total dos resíduos sólidos recolhidos na orla marítima e devido a sua alta concentração de lignina, hemicelulose e celulose apresenta lenta decomposição, sendo 85,0% do peso do fruto constituído de material lignocelulósico (Ferreira-Leitão *et al.*, 2010). Além do descarte da casca de coco verde em lixões, aterros sanitários, pátios das indústrias de processamento e áreas comuns de utilização pública geram gastos e agrava a poluição ambiental (Aragão, 2002).

O bagaço de coco maduro quando processado, possibilita a obtenção de fibra longa, empregadas geralmente na indústria automobilística (Leão *et al.*, 1998), mas gera material residual. Estima-se que para cada quilograma de fibra produzida sejam gerados aproximadamente 2 kg de pó e fibras curtas (APCC, 1996).

A composição do pó da fibra de coco possui lignina (42,10%), celulose (32,69%) e hemicelulose (22,56%) (Muensri *et al.*, 2011). A fibra de coco verde tem lignina (43,14%) e celulose (45,93%) (Brígida *et al.*, 2010). E a casca de coco tem lignina (29,79%), celulose (39,31%) e hemicelulose (16,15%) (Vaithanomsat *et al.*, 2011). Esses materiais possuem condições de serem empregados como substratos para a produção de bioprodutos, por exemplo, na produção de etanol. A casca de coco pré-tratada por hidróxido de sódio foi utilizado em processo de sacarificação e fermentação simultânea usando *S. cerevisiae*, resultando em rendimento de etanol de 0,4 g/g (Vaithanomsat *et al.*, 2011).

Alguns países da Ásia e Oceania utilizam óleo de coco como biocombustível em motores diesel (Cloin, 2005; Etherington, 2005; SOPAC, 2007), normalmente misturado a querosene e ao diesel, porém, em certas condições substitui integralmente o diesel (Cloin, 2005; Etherington, 2005), usado no setor de transporte (Cloin, 2005; Cloin, 2007; SOPAC, 2007) e geração de energia elétrica (Cloin, 2005; Etherington, 2005). Com destaque no setor de transporte, principalmente na Tailândia e Filipinas (SOPAC, 2007). Alguns países das Ilhas do Pacífico tais como as Ilhas Fiji, Kiribati, Ilhas Marshall, Papua Nova Guiné, Samoa, Ilhas Salomão, Tuvalu e Vanuatu também utilizam óleo de coco como estratégia energética para diminuir a importações de combustíveis, além de aproveitar a abundância de coco na região (Etherington, 2005; SOPAC, 2007). Esse aumento no uso de biocombustíveis em países insulares do Pacífico contribui também para a redução de gases do efeito estufa, criação de empregos e fortalecimento da economia (Cloin, 2007). Segundo Tan *et al.* (2004), a utilização de óleo de coco reduz entre 80,8% a 109,3% as emissões de CO₂, em comparação ao diesel. A produção de óleo de coco é realizada em pequena escala industrial, situadas nas propriedades rurais (Cloin, 2005; Cloin, 2007; SOPAC, 2007), sendo assim, a integração do sistema produtivo de óleo de coco acoplado a microdestilaria de produção de etanol celulósico, com aproveitamento dos resíduos agroindustriais da extração do óleo do coco, torna-se uma alternativa promissora.

2.2.3. Cacto

O cacto consiste em um vegetal adequado para produção de bioenergia e comumente cultivado em ambientes áridos (Yan *et al.*, 2011). Essas características permitem o cultivo em áreas com baixa pluviometria, localizadas principalmente no continente africano e países como o México, Chile, Brasil, Austrália, China, Índia e Estados Unidos. Sendo assim, cultivado em áreas impróprias para o cultivo de vegetais destinados a alimentação convencional (Gheewala *et al.*, 2011). No Brasil, a produção de cacto foi 60 mil toneladas em 2009, concentrada na Região Nordeste e destinada integralmente à ração animal (IBGE, 2012).

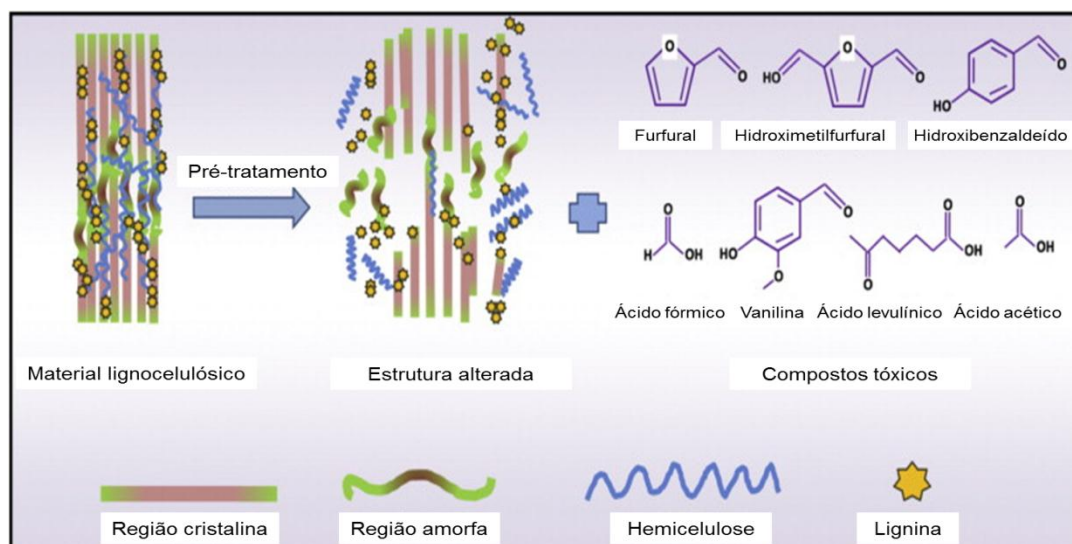
O aproveitamento do fruto de cacto (cladódios) foi realizado por Retamal *et al.* (1987) para a produção de etanol, utilizando cladódios pré-tratado com ácido clórico e fermentado por *S. cerevisiae*, resultando em 9,0 L de etanol a partir de 100,0 kg de cladódios.

2.3. Pré-tratamento

2.3.1. A importância do pré-tratamento

O material lignocelulósico é composto principalmente por três biopolímeros: celulose, hemicelulose e lignina, contendo entre 75,0 e 80,0% de polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e entre 20,0 e 25,0% de lignina, por isso, não podem ser facilmente convertidos em açúcares monoméricos, devido à natureza recalcitrante desses biopolímeros (conforme Figura 2.3). Para tornar a celulose e a hemicelulose disponível ao ataque das celulases e hemicelulases, o pré-tratamento é geralmente utilizado (Adsul *et al.*, 2005; Bon *et al.*, 2008; Hendriks e Zeeman, 2009), com a finalidade de alterar ou remover a hemicelulose e lignina, aumentar área superficial, diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, aumentar a digestibilidade enzimática do material e posterior aumento dos açúcares fermentescíveis (Sun e Cheng, 2002; Mosier *et al.*, 2005). O fracionamento do material lignocelulósico promovido pelo pré-tratamento torna-se importante e desperta

interesse pela aplicabilidade no contexto de biorrefinaria (Garrote *et al.*, 1999a; Pan *et al.*, 2005), como apresentado na Figura 2.4.



Fonte: modificado de Zeng *et al.* (2014).

Figura 2.4. Composição e degradação do material lignocelulósico

O pré-tratamento do material lignocelulósico consiste em um fator chave para a produção de etanol celulósico (Sun e Cheng, 2002; Yang e Wyman, 2008; Galbe e Zacchi, 2012), sendo os rendimentos em açúcares fermentescíveis e a quantidade de enzimas necessárias para a hidrólise dependentes do pré-tratamento e das características do material utilizado (Hideno *et al.*, 2013). Alguns pré-tratamentos são baseados em propriedades físicas, químicas, biológicas, físico-químicas ou a combinação dessas propriedades (Gonçalves *et al.*, 2013a), como exemplo, os pré-tratamentos: ácido (Zhao *et al.*, 2007); biológico (Kurakake *et al.*, 2007); alcalino (Barcelos *et al.*, 2013); dióxido de carbono (Kim e Hong, 2001); explosão a vapor catalisado (Alizadeh *et al.*, 2005); dióxido de cloro, nitrogênio e ácido sulfúrico (Fan *et al.*, 1982); irradiação (Kumakura *et al.*, 1982); moagem (Mais *et al.*, 2002); *organosolv* (Zhao *et al.*, 2009) e explosão a vapor (Ballesteros *et al.*, 2006).

Entretanto, o pré-tratamento utilizado deve cumprir o maior número possível das seguintes condições: baixo impacto ambiental; estrutura simples e econômica;

dimensionável para o tamanho industrial; perdas reduzidas de polissacarídeos; geração mínima de resíduos durante o processo; produção máxima de produtos derivados da hemicelulose e baixa geração de compostos indesejados da degradação; produção máxima de coprodutos a partir da lignina; requisitos mínimos de água e processos químicos; menor teor de lignina na fase sólida; baixo consumo de energia; capacidade de romper a estrutura lignocelulósica das matérias-primas; elevada concentração de celulose na fase sólida e a alta susceptibilidade à hidrólise enzimática (Sun e Cheng, 2002; Mosier *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2006; Brosse *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

2.3.2. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de sódio

O peróxido de hidrogênio e o hidróxido de sódio em contato com o material lignocelulósico reagem com a lignina sobre certas condições, sendo largamente usado como alvejante em polpas de madeira utilizadas na produção de papel (Gould, 1985; Kang *et al.*, 2011).

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) é baseado no pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos utilizando peróxido de hidrogênio em condições alcalinas com pH 11,5 (Gould e Freer, 1984). Esse processo é operado a baixa temperatura e pressão, o peróxido decompõe-se em oxigênio e água, podendo assim, ser considerado como processo com baixo impacto ambiental (Rabelo *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2011). Sendo uma vantagem, pois o consumo de água consiste em um fator crítico durante a produção de etanol, além da ausência de tratamento dos resíduos e efluentes (Rabelo *et al.*, 2011). De acordo com Gould (1985), a utilização de peróxido de hidrogênio melhora a deslignificação subsequente do material lignocelulósico, pois o peróxido de hidrogênio em condições alcalinas promove a despolimerização oxidativa da lignina, devido à quebra das ligações carbono-carbono na estrutura da lignina (Gupta e Lee, 2009). E assim, poderá aumentar a digestibilidade do material durante a hidrólise enzimática (Kang *et al.*, 2011).

Xiang e Lee (2000) relataram dois fatores importantes para o processo de oxidação: o pH da reação e a decomposição do peróxido de hidrogênio. Segundo Gould (1985) e Sun *et al.* (2004), esses fatores ocorrem da geração em pH alcalino do ânion hidroperóxido (HOO^-). Porém, o peróxido de hidrogênio possui instabilidade em condições alcalinas, decompondo-se em radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil (OH), responsáveis pela oxidação da lignina a partir da degradação dos grupos hidrofílicos e promovendo a dissolução da hemicelulose e lignina. O pré-tratamento PHA foi utilizado, por exemplo, em bagaço de caju (Correia *et al.*, 2013), palha de milho (Selig *et al.*, 2009), palha de trigo (Gould *et al.*, 1984; Gould, 1985) e bagaço de cana-de-açúcar (Azzam, 1989; Rabelo *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).

O potencial de uso do pré-tratamento com hidróxido de sódio (PHS) foi examinado em diversos estudos, entre os quais a maioria dos casos demonstrou elevada eficácia do pré-tratamento. Diversos materiais lignocelulósicos foram pré-tratados com hidróxido de sódio, como exemplo, bagaço de cana-de-açúcar (Santos e Gouveia, 2009) e *Cynodon dactylon* (Wang *et al.*, 2010). O uso de hidróxido de sódio permite deslignificar os materiais lignocelulósicos, quebrando as ligações cruzadas de ésteres da lignina e xilana, aumentando a área superficial interna do material (Kang *et al.*, 2012).

2.3.3. Pré-tratamento por autohidrólise

Pré-tratamento por autohidrólise (PA) (também chamado de pré-tratamento por água quente ou hidrotérmico) foi inicialmente usado por Bobleter *et al.* (1976) para aumentar a susceptibilidade dos materiais lignocelulósicos na hidrólise enzimática. Em geral, as maiores vantagens desse processo consistem em: (1) o processo não requer adição e recuperação de produtos químicos diferentes de água; (2) utiliza equipamento limitado aos problemas de corrosão; (3) operação simples e econômica (Garrote *et al.*, 1999a; Cybulska *et al.*, 2010; Romaní *et al.*, 2010). Por esse motivo, o

pré-tratamento PA pode ser considerado um processo de fracionamento ambientalmente amigável (Garrote *et al.*, 2003).

Esse método é realizado por aquecimento da solução aquosa na presença do material lignocelulósico e resulta na hidrólise da hemicelulose na fase líquida (oligossacarídeos e monossacáridos) (Garrote *et al.*, 1999b; Romaní *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013), dos produtos da decomposição dos açúcares (furfural e HMF) e ácido acético (Ruiz *et al.*, 2013), aumento da área superficial e porosidade do material lignocelulósico (Liu e Wyman, 2005; Cybulska *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012) e relocação da lignina na superfície do material lignocelulósico (Kristensen *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2013), aumento adicional da quantidade de celulose e lignina na fase sólida e aumento da susceptibilidade do material pelas enzimas (Garrote *et al.*, 1999b; Ruiz *et al.*, 2013). Segundo Romaní *et al.* (2011), a solubilidade da hemicelulose pelo pré-tratamento PA consiste na etapa inicial do processo produtivo baseado no contexto de biorrefinaria. Além da possibilidade de recuperar a lignina na etapa de destilação do caldo fermentado, permitindo assim, realizar a separação seletiva dos principais componentes contidos no material (hemicelulose, celulose e lignina).

O pré-tratamento PA foi realizado em alguns materiais, por exemplo, na *Spartina pectinata* (Cybulska *et al.*, 2010), resíduos de poda de oliveira (Manzanares *et al.*, 2011), *Eucalyptus globulus* (Romaní *et al.*, 2010, 2012) e palha de trigo (Ruiz *et al.*, 2012).

2.3.4. Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio

O processo de pré-tratamento termoquímico é atualmente considerado como o mais eficaz, sendo principais ferramentas do pré-tratamento termoquímico o pH e a temperatura (Park *et al.*, 2012). O pré-tratamento alcalino é utilizado com intuito de eliminar a lignina, principalmente usando o hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e hidróxido de amônia, devido ao baixo custo, além de geralmente ser necessária menor carga enzimática para converter a celulose em glicose durante a hidrólise (Sendich *et*

al., 2008). O uso de hidróxido de sódio como catalisador foi realizada por Park *et al.* (2012) utilizando pré-tratamento por explosão a vapor, resultando na elevada deslignificação e alto rendimento de açúcares durante a hidrólise enzimática de *E. grandis*.

Embora, o material lignocelulósico pré-tratado por explosão a vapor possui redução mínima de lignina na fração sólida (Park *et al.*, 2012), fato similar ocorre com o material pré-tratado por autohidrólise (Garrote *et al.*, 2004). Nesse sentido, o uso de hidróxido de sódio no pré-tratamento hidrotérmico surge como uma alternativa para reduzir o teor de lignina no material e utilizado por Rawat *et al.* (2013) em álamo (*Populus deltoides*), Kim e Han (2012) em palha de arroz e Barcelos *et al.* (2013) em bagaço de cana-de-açúcar.

Durante esse pré-tratamento a hemicelulose é degradada em oligômeros de baixa massa molecular, monômeros e ácidos orgânicos, que formam um licor negro, a extração de hemicelulose consiste em uma alternativa atrativa para a produção de etanol (Egüés *et al.*, 2012; Huang e Ragauskas, 2013). No entanto, é essencial a aplicação de processos de purificação da hemicelulose contida no licor (Egüés *et al.*, 2012). Além disso, o licor negro possui elevada concentração de lignina (Egüés *et al.*, 2012) e compostos fenólicos (Ghatak, 2008). A recuperação da lignina presente no licor pode ser realizada pelo método de precipitação ácida (Ghatak, 2008) e convertida em gás de síntese (Fang *et al.*, 2009) ou matéria-prima para várias substâncias aromáticas baixa massa molecular (Villar *et al.*, 2001; Lora e Glasser, 2002). Os compostos fenólicos são fontes naturais de antioxidantes e podem ser aplicados como aditivos alimentares (Garrote *et al.*, 2004).

2.3.5. Pré-tratamento por organosolv

O pré-tratamento por *organosolv* consiste em um pré-tratamento promissor para a produção de etanol em escala industrial baseado no contexto de biorrefinaria

(Brosse *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Obama *et al.*, 2012; Hiden *et al.*, 2013). Esse pré-tratamento deslignifica o material lignocelulósico utilizando solvente orgânico (frequentemente etanol) e água, com fácil recuperação do solvente por destilação, sendo um processo químico amigável em comparação aos processos *Kraft* e de sulfito de sódio (Ziaie-Shirkolaei *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2011). O pré-tratamento por *organosolv* foi desenvolvido pela *General Electric Company* em 1970 para fazer biocombustível limpo para geradores de turbina e posteriormente desenvolveu-se o processo de polpação Alcell (Ruiz *et al.*, 2011). Depois, o processo *organosolv* foi desenvolvido como parte de uma tecnologia comercial de biorrefinaria lignocelulósica, conhecido de processo Lignol (Ruiz *et al.*, 2011).

O pré-tratamento por *organosolv* comumente utilizado sequencialmente ao pré-tratamento por autohidrólise, utilizando etanol como solvente orgânico e geralmente com adição ácida ou alcalina (Romaní *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2011; Obama *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2013). O pré-tratamento também é realizado em apenas uma etapa, usando etanol catalisado com ácido (Brosse *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2012; Hiden *et al.*, 2013).

Durante o pré-tratamento por *organosolv*, a estrutura da lignina é quebrada em fragmentos menores e forma um licor rico em compostos fenólicos como efluente do processo (Ziaie-Shirkolaei *et al.*, 2008). A lignina é o mais abundante polímero aromático heterogêneo presente no material lignocelulósico, formado por compostos fenólicos (álcoois precursores *trans-coniferyl*, *trans-sinapyl* e *transp-coumaryl*), a estrutura depende do método de extração e o material utilizado (Ruiz *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012). A lignina é amorfa, possui ligação cruzada e polímeros fenólicos dimensionais. A lignina de madeira macia consiste principalmente de unidade guaiacil, enquanto que a lignina de madeira dura consiste das unidades de guaiacil e siringil (Xiao *et al.*, 2013). O pré-tratamento por *organosolv* permite obter lignina sem enxofre (Ruiz *et al.*, 2011), elevado rendimento e alta pureza da lignina (Brosse *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2011). A lignina consiste em um material biodegradável e ambientalmente

amigável devido o seu potencial em substituir os produtos à base de derivados de fenol (Choi e Faix, 2011).

2.4. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática reproduz o processo existente na natureza, em que as longas cadeias de celulose e hemicelulose são quebradas em açúcares, a partir do uso das enzimas (celulases e hemicelulases, produzidas por fungos e bactérias) e a degradação da lignina pelas ligninases.

Existem inúmeras enzimas específicas que hidrolisam a celulose, como exemplo, avicelase, endoglucanase, carboximetilcelulase e celobiase, as enzimas que atuam sobre a hemicelulose, como as mananases, glicanases, xilanases e galactanases, e as enzimas oxidativas, como a manganês-peroxidase, lignina-peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas, que atuam sobre a lignina (Wood e Garcia-Campayo, 1990; Tuor *et al.*, 1995).

No complexo hemicelulolítico, destacam-se as β -1,4-endoxilanases, que despolimerizam a xilana pela hidrólise randômica do esqueleto principal e as β -xilosidasas, que quebram pequenos oligossacarídeos liberando a xilose. No complexo celulolítico destacam-se três enzimas: endoglicanases, que clivam randomicamente o polímero de celulose, alterando rapidamente o grau de polimerização da celulose, as celobiohidrolases, que hidrolisam o polímero nos terminais não redutores, liberando celobiose e as celobiasas (β -glicosidase) que são responsáveis por clivar a celobiose a glicose, permitindo o uso desse monossacarídeo nas vias metabólicas dos micro-organismos (Lee, 1997; Buckeridge, 2008).

2.5. Processo fermentativo

2.5.1. Micro-organismos

Após o pré-tratamento, muitos compostos inibidores poderão estar presentes no hidrolisado e nos materiais pré-tratados, isso dependerá do pré-tratamento e material

utilizado, podendo causar efeitos negativos sobre o desempenho fermentativo (Almeida *et al.*, 2007). Alguns estudos realizados demonstraram o importante papel de alguns micro-organismos na produção de etanol celulósico, coprodutos e subprodutos, por exemplo, a fermentação do hidrolisado contendo hexoses e pentoses pela *P. stipitis* (Parekh *et al.*, 1986; Delgenes *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2008; Rudolf *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; Bellido *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2011; Dubey *et al.*, 2012; Scordia *et al.*, 2012; Bellido *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014a; Singh *et al.*, 2014b) e a fermentação do hidrolisado contendo hexoses pela *S. cerevisiae* (Delgenes *et al.*, 1996; Rudolf *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Jutakanoke *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013c; Lu *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014a) e *Z. mobilis* (Delgenes *et al.*, 1996; Mohaghegi *et al.*, 2004; Ruanglek *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2009; Zhang e Feng, 2010; Wirawan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Singh e Bishnoi, 2013; Wang *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014b). Além disso, esses micro-organismos são importantes produtores de etanol em escala industrial. Portanto, esses micro-organismos foram selecionados e utilizados neste trabalho.

2.5.2. Estratégias fermentativas

Após a etapa de pré-tratamento, as etapas de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica podem ser realizadas em etapas separadas ou simultâneas. Na estratégia de hidrólise e fermentação separada (SHF), a hidrólise enzimática e a fermentação são executadas em etapas diferentes. Nesse processo, cada etapa pode ser realizada em condições ótimas de pH e temperatura. No entanto, a glicose e a celobiose poderiam se acumular durante a hidrólise e conseqüentemente, inibiriam a ação enzimática (Xiao *et al.*, 2004). Na estratégia de fermentação e sacarificação simultânea (SSF), a hidrólise enzimática e a fermentação seriam executadas na mesma etapa, assim, os açúcares fermentescíveis liberados pela ação enzimática são convertidos em etanol pelo micro-organismo e a assimilação contínua desses

açúcares fermentescíveis minimizam a inibição enzimática (de Souza *et al.*, 2012), dessa forma, possibilitam maiores conversões de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis.

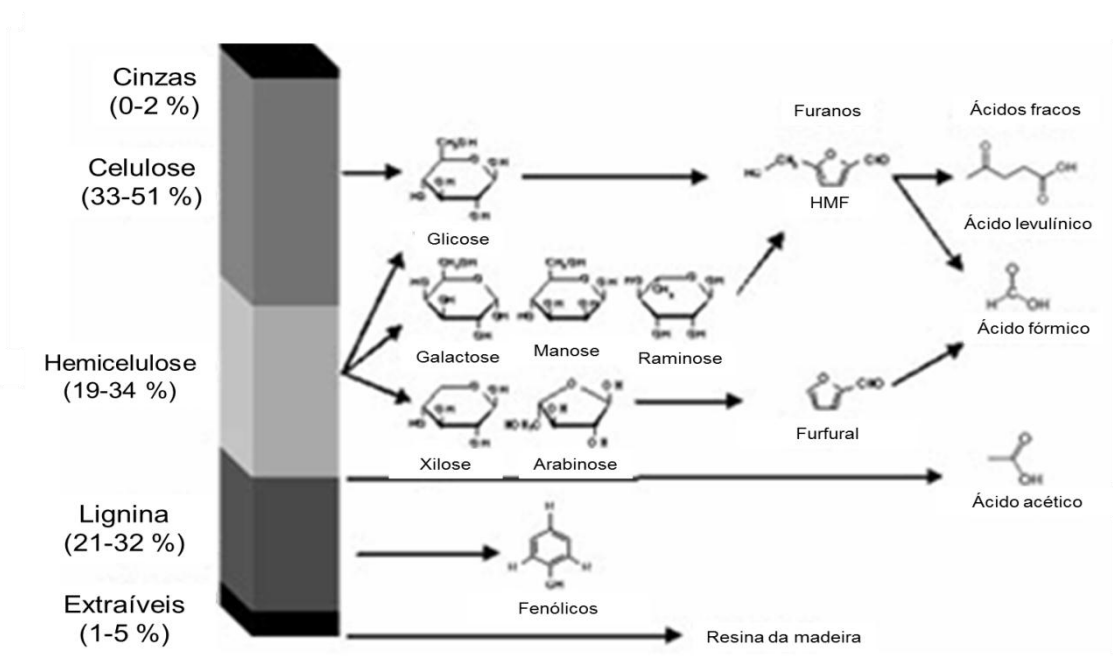
Por conseguinte, o processo SSF possibilita menor custo devido à redução da carga enzimática utilizada durante a hidrólise do material (Shen e Agblevor, 2010). A SSF geralmente possui maior produção e produtividade volumétrica de etanol, quando comparado a SHF (Shen e Agblevor, 2010). Além disso, na SSF, a presença de etanol no hidrolisado evita a contaminação microbiana. Embora, a SHF apresente maior velocidade de hidrólise (Shen e Agblevor, 2010; de Souza *et al.*, 2012). Sendo desvantagem da SSF o uso da temperatura e pH ótimos apenas para a fermentação (de Souza *et al.*, 2012). A estratégia de fermentação e sacarificação semi-simultânea (SSSF) permite amenizar esses inconvenientes (Mesa *et al.*, 2011), por mesclar as vantagens proporcionadas pela SSF e SHF, a qual inclui uma fase de pré-sacarificação e a etapa de SSF (Öhgren *et al.*, 2007; Shen e Agblevor, 2010). Dessa forma, espera-se que a SSSF tenha maior produção, produtividade e rendimento de etanol, quando comparado a SSF e SHF, se o tempo de pré-sacarificação for apropriado (Öhgren *et al.*, 2007; Shen e Agblevor, 2010), pois existe um tempo ideal para iniciar o processo fermentativo, considerando o ponto de equilíbrio entre os fatores inibitórios e as taxas de conversões dos açúcares fermentescíveis (Shen e Agblevor, 2010; Mesa *et al.*, 2011).

2.6. Compostos inibitórios

2.6.1. Compostos inibitórios oriundos dos materiais lignocelulósicos

A etapa de pré-tratamento gera e libera inúmeros compostos inibitórios para a etapa de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, os quais variam de acordo com o pré-tratamento e material utilizado (Figura 2.5). Segundo Luo *et al.* (2002), mais de 100 compostos foram detectados como potenciais inibidores presente nos hidrolisados lignocelulósicos. Alguns desses compostos inibitórios possuem efeitos sinérgicos

negativos (Almeida *et al.*, 2007). Sendo compostos inibitórios aos micro-organismos industriais (Palmqvist *et al.*, 1999; Taherzadeh *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004) e proporcionam impacto negativo no desempenho fermentativo (crescimento celular, formação de ATP, consumo de açúcares e produção de etanol) (Delgenes *et al.*, 1996; Taherzadeh *et al.*, 1999; Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Taherzadeh *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011b). Segundo Liu *et al.* (2004), os efeitos de diferentes inibidores variam amplamente entre os micro-organismos e normalmente, os ácidos orgânicos são mais tóxicos nas bactérias que em leveduras. Porém, os ácidos orgânicos apresentam acentuado efeito inibitório em levedura (Huang *et al.*, 2011). Essa sinergia negativa sugere que os compostos inibitórios podem agir por mecanismos diferentes ou como cada micro-organismo se adapta a presença do inibidor (Liu *et al.*, 2004).



Fonte: modificado de Almeida *et al.* (2007).
 Figura 2.5. Composição e degradação do material lignocelulósico

Durante a degradação do material lignocelulósico promovido pelo pré-tratamento, a lignina, celulose e hemicelulose poderão resultar na liberação de monômeros de açúcar, derivados furânicos, ácidos fracos e compostos fenólicos

(Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida *et al.*, 2007). Os derivados furânicos são o HMF, produto da desidratação da hexose e o furfural, produto da desidratação da pentose. A degradação do HMF libera o ácido levulínico e ácido fórmico. O ácido fórmico também pode ser liberado pela degradação do furfural (Figura 2.5). A hidrólise de grupos acetil ligados aos açúcares gera o ácido acético. Os compostos fenólicos e aldeídos são formados da degradação da lignina e carboidratos. O ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico são os ácidos fracos mais comuns nos hidrolisados lignocelulósicos (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida *et al.*, 2007). Diante disso, foi avaliado neste trabalho a presença simultânea de HMF, furfural, ácido acético, ácido levulínico e ácido fórmico nos meios de cultivos da *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *P. stipitis*.

2.6.2. *Uso de água marinha em processo de produção de etanol*

Além da necessidade de utilizar os resíduos orgânicos fotossintéticos, a oferta de água doce torna-se uma barreira ambiental ao aumento da produção de energia. Segundo o WWAP (2012), Otto *et al.* (2011) e Gheewala *et al.* (2011), a mudança climática e o aumento na demanda mundial por água doce propicia elevada pressão sobre a disponibilidade de água e promove aumento substancial do estresse hídrico. Atualmente, existe 1 bilhão de pessoas sem acesso à água potável, cerca de 120 milhões de pessoas no continente europeu, dessa forma, a sociedade se torna mais vulnerável a fome, sede, doenças e morte, crises econômicas e ecossistemas degradados (WWAP, 2012). Essa escassez de água associado à desertificação e degradação do solo intensifica a insegurança alimentar entre as comunidades afetadas (WWAP, 2012). A água subterrânea é crucial para a subsistência e a segurança alimentar de 1,2 a 1,5 bilhão de famílias rurais nas regiões mais pobres da África e Ásia (WWAP, 2012) e a falta de água potável gera crise de preocupação global, além de motivar conflitos de diferentes intensidades (Otto *et al.*, 2011; WWAP,

2012). A Região Árabe apresenta conflitos cíclicos relacionados à oferta de água, pois 66,0% da água de superfície se originam em países circunvizinhos, caracterizando assim, um dos motivos geradores dos conflitos com os países a montante, além dos possíveis conflitos internos por água entre os distritos administrativos, comunidades e tribos (WWAP, 2012).

Além disso, mais de 1 bilhão de pessoas não possui acesso à eletricidade ou a outra fonte limpa de energia, se medidas eficientes não forem tomadas, a situação global tende a agravar, pois a população urbana mundial chegará a 6,3 bilhões de pessoas em 2050 (WWAP, 2012), criando uma onda de consumo de energia, particularmente em países não-Europeu (WWAP, 2012).

As preocupações sobre a segurança alimentar, energética e mudanças climáticas estimulam a evolução da oferta de energia renovável. A energia a partir de biomassa lignocelulósica oferece fonte energética limpa, energia segura, redução da emissão de gases do efeito estufa e substituição da gasolina (Borrion *et al.*, 2012; Hussin *et al.*, 2013). Sendo a produção de etanol por fermentação de açúcares a principal tecnologia para a geração de combustíveis líquidos a partir dos recursos renováveis (Fierro, 2012). O etanol celulósico apresenta alguns aspectos positivos, como: econômico, energético, desempenho ambiental e oferta de energia limpa, mas pode aumentar os impactos negativos sobre o uso de água, aquecimento global, toxicidade e ecotoxicidade aquática (Liang *et al.*, 2013; Ramchandran *et al.*, 2013). Todavia, a produção de biomassas fotossintéticas utilizadas como matérias-primas para produção de biocombustíveis líquidos é vulnerável aos efeitos das mudanças climáticas, como a temperatura, precipitação e níveis de CO₂ (Schaeffer *et al.*, 2012).

A produção de biocombustíveis representa uma demanda adicional sobre os recursos hídricos e compete com a produção de alimentos por água e terra aráveis (Koh e Ghazoul, 2008; Dale, 2011; Schornagel *et al.*, 2012; WWAP, 2012; Xing *et al.*, 2012; Ramchandran *et al.*, 2013). Segundo Gerbens-Leenes *et al.* (2012), a estimativa de uso de água doce para a produção de biocombustíveis crescerá em 5,5% sobre a

disponibilidade de água até 2030, promovendo assim, uma pressão extra sobre esse recurso natural. E o consumo de água varia de acordo com o tipo de biomassa cultivada, da necessidade de irrigação e das práticas de irrigação regionais (Koh e Ghazoul, 2008; Borrion *et al.*, 2012), podendo variar até 60,0% entre as diferentes matérias-primas (Fingerman *et al.*, 2010). A produção de biocombustíveis pode afetar além da quantidade de água, a qualidade da água (Dale, 2011; Diaz-Chavez *et al.*, 2011), considerando-se a soma da água usada para o cultivo da matéria-prima e a água utilizada durante o processo produtivo (Dale, 2011). Entretanto, algumas localidades possuem limitação na oferta de água, sendo que o cultivo da biomassa energética para a produção de biocombustíveis exercerá maior pressão sobre a Bacia Hidrográfica e Aquífero (Dale, 2011).

De acordo com Babel *et al.* (2011), a produção de etanol proporciona impacto negativo sobre a qualidade da água da bacia Khlong Phlo Watershed na Tailândia. A água de Bacia do Rio Iowa também sofre impactos negativos sobre a sua quantidade e qualidade a partir da destinação para a produção de etanol da palha de milho e *Panicum virgatum*, sendo menor a interferência na quantidade e qualidade da água quando a palha de milho é utilizada, em comparação a *Panicum virgatum* (Wu e Liu, 2012). A produção de etanol de primeira geração necessita de maior quantidade de água, quando comparado à produção de etanol celulósico (Wu *et al.*, 2009; Schornagel *et al.*, 2012). Cerca de 70,0% do milho cultivado para a produção de etanol nos Estados Unidos consome entre 10 a 17 litros de água por litro de etanol produzido (Wu *et al.*, 2009) e a produção de etanol a partir de *Panicum virgatum* consome entre 1,9 a 9,8 litros de água por litro de etanol produzido (Wu *et al.*, 2009). Existe também a necessidade de verificar a qualidade da água residual oriunda dos pré-tratamentos realizados nos materiais lignocelulósicos (Galbe e Zacchi, 2012) e durante o processo produtivo (Qiu *et al.*, 2012; Ramchandran *et al.*, 2013).

Nesse contexto, surge como alternativa para minimizar o uso de água potável, a possibilidade de utilizar água marinha no processo produtivo de etanol, o que

amenizará o impacto do uso de água doce, permitindo acompanhar a demanda crescente de bioenergia e proporcionar oportunidade para uma gestão sustentável da água (Gheewala *et al.*, 2011), além da possibilidade de utilizar a emergente produção de biocombustíveis como modelo para manter a qualidade da água (Dale, 2011). Essa possibilidade viabilizará a produção de etanol em algumas regiões com baixa oferta de água doce e circundada por água marinha. No Brasil, a Região Nordeste se enquadra nessa situação e a possibilidade de uso da água marinha será de grande valia. Alguns estudos caminham nesse sentido, como o uso da água marinha durante o processo de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos (vom Stein *et al.*, 2010) e na etapa de hidrólise enzimática (Grande *et al.*, 2012). Utilização de leveduras marinhas (Senthilraja *et al.*, 2011) e *Kluyveromyces marxianus* em processos fermentativos em meio de cultivo com água marinha (Yuan *et al.*, 2008), seleção de leveduras marinhas com capacidade halogênica e fermentativa visando a utilização de biomassa fotossintética de origem marinha (Ueno *et al.*, 2001) e resíduos de algas (Ellis *et al.*, 2012), geralmente ricas em sais, na produção de etanol holocelulósico. Portanto, a fermentação em meio hipersalino reduzirá a necessidade de água doce durante a produção de etanol (Doan *et al.*, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

Os materiais lignocelulósicos utilizados foram a fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto (*Opuntia ficus-indica*) provenientes das agroindústrias e localidades urbanas da Região Nordeste do Brasil, apresentados na Figura 3.1. As matérias-primas foram lavadas cinco vezes com água destilada a 70 °C para a remoção de compostos residuais presentes nos materiais. Após esse procedimento, os materiais foram secos a 40 °C em estufa com circulação de ar durante 24 h, moídos e selecionados na granulometria de 48 mesh (menor ou igual a 0,3 mm).



Figura 3.1. Materiais lignocelulósicos: (A) Cacto; (B) Casca de coco verde; (C) Fibra de coco maduro; (D) Casca de coco maduro

Neste trabalho, todos os experimentos e análises das amostras foram realizados em duplicata. Além disso, as frações sólida e líquida (licor) resultantes da etapa de pré-tratamentos foram separadas por filtração a vácuo e caracterizadas.

3.2. Processo de pré-tratamento

3.2.1. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) e pré-tratamento com hidróxido de sódio (PHS)

O pré-tratamento PHA foi realizado em cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro. Foram misturados 4,0 g de material lignocelulósico (4,0% m/v de material) com 31,75 mL de peróxido de hidrogênio (concentração de

7,35% v/v de peróxido de hidrogênio) em um frasco a 25 °C e agitado a 150 rpm durante 1 h. A solução de peróxido de hidrogênio foi ajustada a pH 11,5, com adição de hidróxido de sódio (Rabelo *et al.*, 2011).

Os materiais pré-tratados por PHA foram submetidos ao pré-tratamento PHS, a partir da transferência do material para um frasco, com solução de 4,0% m/v de hidróxido de sódio. A mistura foi mantida a 100 °C sobre agitação de 100 rpm durante 1 h (Santos e Gouveia, 2009).

3.2.2. Pré-tratamento por autohidrólise (PA)

O pré-tratamento PA foi realizado nos materiais lignocelulósicos utilizando planejamento experimental, a partir da obtenção de uma suspensão contendo água e o material na proporção de 10:1 de líquido/sólido, de acordo com as condições operacionais do pré-tratamento e fatores de severidade apresentadas nas Tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente. Esses experimentos foram realizados em 50,0 mL de volume total, em reatores cilíndricos de aço inoxidável. O reator foi fechado e colocado verticalmente em um banho de óleo Julabo (Julabo, Alemanha), com controle de temperatura PID, apresentado na Figura 3.2, previamente aquecido à temperatura de reação desejada. No final do tempo de reação desejado, o reator foi removido do banho de óleo e arrefecido por imersão em banho de gelo durante 5 min.

O fator de severidade foi interpretado de acordo com Overend e Chornet (1987), que se baseia nos efeitos proporcionados pelo tempo e temperatura sobre o pré-tratamento, representado pela Equação 3.1.

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T - 100}{14.75}\right) dt \quad (\text{Equação 3.1})$$

Sendo: R_0 = fator de severidade;
 dt = tempo de pré-tratamento (min);
 T = temperatura de pré-tratamento (°C);

100 = temperatura de referência (°C);
 14,75 = parâmetro empírico relacionado à energia de ativação.

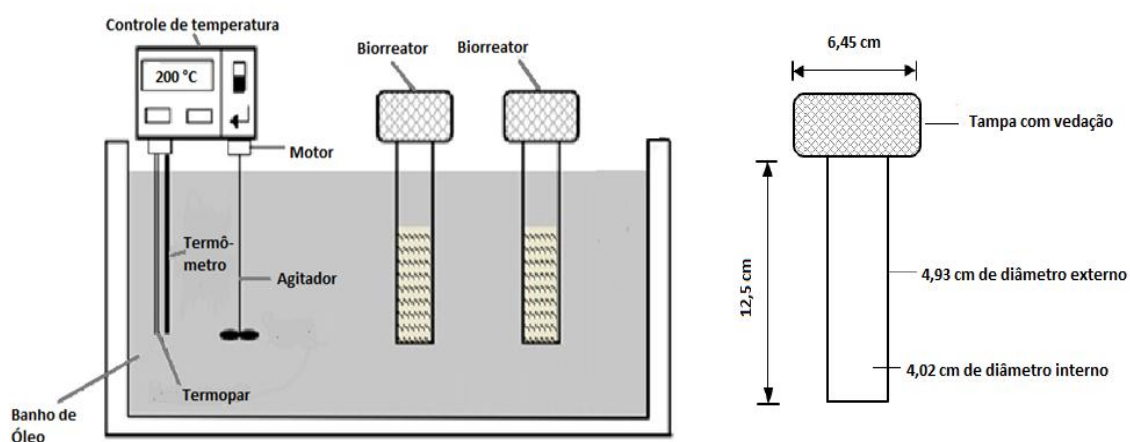
Tabela 3.1. Condições operacionais do pré-tratamento PA

Experimento	Condições operacionais			
	Valor real ^a		Variável codificada	
	T (°C)	t (min)	X ₁	X ₂
1	160	10	-1	-1
2	160	50	-1	1
3	160	30	-1	0
4	200	10	1	-1
5	200	50	1	1
6	200	30	1	0
7	180	10	0	-1
8	180	50	0	1
9	180	30	0	0
10	180	30	0	0

^a X₁: Temperatura, X₂: Tempo

Tabela 3.2. Fator de severidade do pré-tratamento PA

T °C/t min	Fator de severidade (R ₀)		
	10	30	50
160	2,76	3,24	3,46
180	3,35	3,83	4,05
200	3,94	4,42	4,64



Fonte: modificado de Ruiz *et al.* (2013).
 Figura 3.2. Sistema de reator em batelada

A fim de relacionar a variável dependente (celulose, %) e as variáveis independentes: temperatura (X_1 , °C) e tempo (X_2 , min) nos materiais pré-tratados por PA, de acordo com o número mínimo possível de experimentos, foi realizado o delineamento experimental composto central 2^2 (CCD) para 2 fatores que permitiram a obtenção de polinômios de segunda ordem nas variáveis independentes e a identificação de significância estatística nas variáveis.

O modelo matemático (Equação 3.2) correspondente ao planejamento experimental foi dado na forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (\text{Equação 3.2})$$

Sendo: Y_i = função resposta;

X_1, X_2 = valores das variáveis independentes;

β_0 = coeficiente relativo a intercepção do plano com o eixo de resposta;

β_1, β_2 = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

β_{11}, β_{22} = coeficiente das variáveis quadráticas;

β_{12} = coeficiente de interação entre as variáveis independentes.

A qualidade do ajuste da Equação polinomial foi avaliada pelo coeficiente de determinação R^2 e a significância estatística foi avaliada pelo teste F de Fisher para análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95,0%. O efeito de cada variável independente e também de seus efeitos de interação foram determinados. O programa *Statística 7.0* (Statsoft, EUA) foi usado para avaliar os resultados de ANOVA e dos gráficos de Pareto das interações e efeitos. Esses procedimentos também foram realizados nos planejamentos experimentais dos materiais pré-tratados por PHCHS e POEA.

3.2.3. Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS)

O pré-tratamento PHCHS foi realizado na fibra de coco maduro utilizando planejamento experimental, a partir da mistura da solução alcalina (1,0; 2,5 ou 4,0% m/v de hidróxido de sódio) e a fibra de coco maduro, em proporção de 10:1 de

líquido/sólido. A temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio utilizados no pré-tratamento PHCHS estão apresentados na Tabela 3.3. Esses experimentos foram realizados em 50,0 mL de volume total em reatores cilíndricos de aço inoxidável. O reator foi fechado e colocado verticalmente em um banho de óleo Julabo (Julabo, Alemanha), com controle de temperatura PID (conforme Figura 3.2), previamente aquecido à temperatura de reação desejada. No final do tempo de reação desejado, o reator foi removido do banho de óleo e arrefecido por imersão em banho de gelo durante 5 min.

Tabela 3.3. Condições operacionais do pré-tratamento PHCHS usando a fibra de coco maduro

Experimento	Condições operacionais					
	Valor real			Variável codificada		
	(°C)	(min)	(%)	T (°C)	t (min)	NaOH (%)
	Temperatura	Tempo	NaOH	X ₁	X ₂	X ₃
1	160	10	1,0	-1	-1	-1
2	160	10	4,0	-1	-1	1
3	160	50	4,0	-1	1	1
4	160	50	1,0	-1	1	-1
5	200	10	1,0	1	-1	-1
6	200	10	4,0	1	-1	1
7	200	50	4,0	1	1	1
8	200	50	1,0	1	1	-1
9	180	30	2,5	0	0	0
10	180	30	2,5	0	0	0
11	160	30	2,5	-1	0	0
12	200	30	2,5	1	0	0
13	180	10	2,5	0	-1	0
14	180	50	2,5	0	1	0
15	180	30	1,0	0	0	-1
16	180	30	4,0	0	0	1

A fim de relacionar a variável dependente (celulose, %) e as variáveis independentes: temperatura (X₁, °C), tempo (X₂, min) e concentração de hidróxido de sódio (X₃, %) sobre a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS, de acordo com o número mínimo possível de experimentos, foi realizado o delineamento experimental

composto central 2^3 (CCD) para 3 fatores que permitiram a obtenção de polinômios de segunda ordem nas variáveis independentes e a identificação de significância estatística nas variáveis.

O modelo matemático (Equação 3.3) correspondente ao planejamento experimental foi dado na forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (\text{Equação 3.3})$$

Sendo: Y_i = função resposta;

X_1, X_2, X_3 = valores das variáveis independentes;

β_0 = coeficiente relativo a intercepção do plano com o eixo de resposta;

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ = coeficiente das variáveis quadráticas;

$\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ = coeficiente de interação entre as variáveis independentes.

3.2.4. Pré-tratamento por organosolv usando etanol alcalino (POEA)

O pré-tratamento POEA foi realizado nos materiais lignocelulósicos utilizando planejamento experimental, a partir da mistura da solução alcalina (0,5% m/v de hidróxido de sódio) com concentração de etanol (40,0, 60,0 ou 80,0% v/v) e material, a fim de se obter uma proporção de 10:1 de líquido/sólido. A temperatura, tempo e concentração de etanol utilizados no pré-tratamento POEA estão apresentados na Tabela 3.4. Esses experimentos foram realizados em 50,0 mL de volume total, em reatores cilíndricos de aço inoxidável. O reator foi fechado e colocado verticalmente em um banho de óleo Julabo (Julabo, Alemanha), com controle de temperatura PID (conforme Figura 3.2), previamente aquecido à temperatura de reação desejada. No final do tempo de reação desejado, o reator foi removido do banho de óleo e arrefecido por imersão em banho de gelo durante 5 min.

Tabela 3.4. Condições operacionais do pré-tratamento POEA

Experimento	Condições operacionais					
	Valor real			Variável codificada		
	(°C)	(%)	(min)	T (°C)	Etanol (%)	t (min)
	Temperatura	Etanol	Tempo	X ₁	X ₂	X ₃
1	160	40,0	10	-1	-1	-1
2	160	40,0	60	-1	-1	1
3	160	80,0	60	-1	1	1
4	160	80,0	10	-1	1	-1
5	200	40,0	10	1	-1	-1
6	200	40,0	60	1	-1	1
7	200	80,0	60	1	1	1
8	200	80,0	10	1	1	-1
9	180	60,0	35	0	0	0
10	180	60,0	35	0	0	0
11	160	60,0	35	-1	0	0
12	200	60,0	35	1	0	0
13	180	40,0	35	0	-1	0
14	180	80,0	35	0	1	0
15	180	60,0	10	0	0	-1
16	180	60,0	60	0	0	1

A fim de relacionar a variável dependente (deslignificação, %) e as variáveis independentes: temperatura (X₁, °C), concentração de etanol (X₂, %) e tempo (X₃, min) em materiais pré-tratados por POEA, de acordo com o número mínimo possível de experimentos, foi realizado o delineamento experimental composto central 2³ (CCD) para 3 fatores que permitiram a obtenção de polinômios de segunda ordem nas variáveis independentes e a identificação da significância estatística nas variáveis.

O modelo matemático (Equação 3.4) correspondente ao planejamento experimental foi dado na forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (\text{Equação 3.4})$$

Sendo: Y_i = função resposta;

X₁, X₂, X₃ = valores das variáveis independentes;

β₀ = coeficiente relativo a intercepção do plano com o eixo de resposta;

β₁, β₂, β₃ = coeficientes lineares estimados pelo método dos mínimos quadrados;

β₁₁, β₂₂, β₃₃ = coeficiente das variáveis quadráticas;

β₁₂, β₁₃, β₂₃ = coeficiente de interação entre as variáveis independentes.

3.3. Caracterização dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

3.3.1. Composição química dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

As composições dos materiais foram realizadas de acordo com Gouveia *et al.* (2009), complementada pelos protocolos do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL, Estados Unidos) (Sluiter *et al.*, 2008) e métodos padrões da Associação Técnica da Indústria de Papel e Celulose (TAPPI). Os materiais tiveram a composição química realizado da seguinte maneira: o material (0,5 g) foi submetido a hidrólise ácida com 5,0 mL de ácido sulfúrico a 72,0% m/m a 30 °C durante 1 h. Em seguida, esse hidrolisado foi ajustado a concentração de ácido sulfúrico de 4,0% m/m (adição de água de até 148,67 g) a 121 °C durante 1 h. Antes da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o resíduo sólido do processo de pós-hidrólise foi recuperado por filtração e considerado como lignina Klason (Browning, 1967). Os monossacarídeos, ácido acético, HMF e furfural contidos no hidrolisado foram determinados por CLAE (conforme seção 3.8) para estimar o conteúdo das amostras de celulose, xilana, arabinano e grupos acetil.

3.3.2. Determinação de cinzas e umidade

O teor de cinza residual foi estimado a partir de 2,0 g de amostra mantida a 550 °C durante 5 h e pesado para aferir o teor de cinza residual (Sluiter *et al.*, 2005). A umidade foi estimada a partir de 2,0 g da amostra mantida a 105 °C durante 24 h e aferida para calcular o teor residual (Sluiter *et al.*, 2008).

3.3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos materiais *in natura* e pré-tratados foram medidos em um espectrômetro FTIR (Spectrun 65 FTIR, Perkin Elmer, EUA). As condições de análise foram em resolução de 4 cm⁻¹ e na região de 400-4000 cm⁻¹.

Os dados obtidos na análise de FTIR foram utilizados para avaliar a estrutura dos materiais *in natura* e pré-tratados, a partir de duas equações relacionadas à estrutura celulósica. A Equação 3.5 consiste na razão entre as áreas dos picos 1426 e 896 cm^{-1} , referindo-se ao índice de cristalinidade (O'Connor *et al.*, 1958) ou índice de ordem lateral (LOI) (Hurtubise e Krassig, 1960). A Equação 3.6 consiste na razão entre as áreas dos picos 1373 e 2917 cm^{-1} , referindo-se ao índice de cristalinidade total (TCI) (Nelson e O'Connor, 1964a).

$$\text{LOI} = \frac{\text{área do comprimento de onda de } 1426 \text{ cm}^{-1}}{\text{área do comprimento de onda de } 896 \text{ cm}^{-1}} \quad (\text{Equação 3.5})$$

$$\text{TCI} = \frac{\text{área do comprimento de onda de } 1373 \text{ cm}^{-1}}{\text{área do comprimento de onda de } 2917 \text{ cm}^{-1}} \quad (\text{Equação 3.6})$$

3.3.4. Análise de difração de raios-X e cristalinidade

Análise de difração de raios-X foi realizada nos materiais *in natura* e pré-tratados utilizando difratômetro de raios-X (Bruker D8 Discover, EUA), com radiação $K\alpha$ de cobre, voltagem de 40 kV, corrente elétrica de 40 mA e velocidade de 2,0 graus por minuto utilizando varredura contínua de ângulo 2θ de 4,0 a 70,0.

O índice de cristalinidade (IC) foi determinado de acordo com a Equação 3.7 (Segal *et al.*, 1959).

$$\text{IC} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3.7})$$

Sendo: I_{002} = intensidade máxima (2θ , 22,6°), correspondendo ao ângulo de maior cristalinidade da celulose;
 I_{am} = intensidade de difração amorfa (2θ , 18,7°), correspondendo ao ângulo de menor cristalinidade da celulose.

3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A superfície dos materiais *in natura* e pré-tratados foram visualizadas usando MEV (Nova NanoSEM 200, Holanda). As amostras foram inicialmente revestidas por

uma camada de ouro pelo processo de pulverização catódica na voltagem de 15 kV e posteriormente visualizada por MEV.

3.4. Caracterização dos licores

3.4.1. Caracterização dos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA

Os licores foram analisados utilizando CLAE (conforme seção 3.8). Além disso, os licores foram submetidos à etapa de pós-hidrólise (4,0% v/v de ácido sulfúrico a 121 °C durante 1 h) e analisados por CLAE (Garrote *et al.*, 2002).

As Equações 3.8 a 3.17 foram usadas para calcular: (a) porcentagem de xilana convertida em xilooligossacarídeos (XOS_c), xilose (Xil_c) e furfural (F_c); (b) porcentagem de arabinano convertido em arabinooligossacarídeos (AOS_c) e arabinose (Ara_c); (c) porcentagem de grupos acetil convertido em grupos acetil ligados aos oligossacarídeos (AcO_c) e ácido acético (AcL_c); (d) porcentagem de celulose convertida em glicooligossacarídeos (GO_c), glicose (Gli_c) e HMF (HMF_c).

$$XOS_c = \frac{132}{150} \cdot \frac{XOS}{Xil_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.8})$$

$$Xil_c = \frac{132}{150} \cdot \frac{Xil}{Xil_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.9})$$

$$AOS_c = \frac{132}{150} \cdot \frac{AOS}{Ara_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.10})$$

$$Ara_c = \frac{132}{150} \cdot \frac{Ara}{Ara_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.11})$$

$$F_c = \frac{132}{96} \cdot \frac{F}{Xil_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.12})$$

$$AcO_c = \frac{43}{60} \cdot \frac{AcOS}{AcI_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.13})$$

$$AcL_c = \frac{43}{60} \cdot \frac{AcI}{AcI_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.14})$$

$$GO_c = \frac{162}{180} \cdot \frac{GO}{Gli_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.15})$$

$$Gli_c = \frac{162}{180} \cdot \frac{Gli}{Gli_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.16})$$

$$HMF_c = \frac{162}{126} \cdot \frac{HMF}{Gli_{FS}} \cdot \frac{W_L}{W_{FS}} \cdot 10 \quad (\text{Equação 3.17})$$

Sendo: XOS_c = xilooligossacarídeos;

Xil_c = xilose;

F_c = furfural;

AOS_c = arabinooligossacarídeos;

Ara_c = arabinose;

AcO_c = grupos acetil ligados aos oligossacarídeos;

A_cL_c = ácido acético;

GO_c = glicooligossacarídeos;

Gli_c = glicose;

HMF_c = hidroximetilfurfural;

W_L = peso inicial do licor;

W_{FS} = peso final do licor submetido à etapa de pós-hidrólise;

c = convertido;

L = inicial;

FS = final.

Os termos seguintes correspondem ao fator estequiométrico para a conversão de xilana em xilose ou arabinano em arabinose (132/150), xilose em furfural (132/96), os grupos acetil em ácido acético (43/60), celulose em glicose (162/180) e celulose em HMF (162/126) (Garrote *et al.*, 2001; Garrote *et al.*, 2002; Carvalheiro *et al.*, 2005).

3.4.2. Caracterização dos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA

As concentrações de açúcares monoméricos, HMF, furfural e ácido acético presentes nos licores dos materiais pré-tratados por PHCHS e POEA foram analisados utilizando CLAE (conforme seção 3.8).

3.4.3. Compostos fenólicos totais presentes nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA

Os compostos fenólicos totais presentes nos licores foram determinados pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Foram adicionados 100,0 μ L de licor, 2,0 mL de solução de carbonato de sódio,

500,0 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. Os tubos foram colocados em um banho com água a 50 °C durante 5 min. Após o arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente, foram agitados em vórtex e efetuaram-se as leituras da absorbância das amostras em comprimento de onda de 700 nm. O ácido gálico foi usado como padrão, construindo-se uma curva com sete pontos (0 a 2000 mg/L). As concentrações de compostos fenólicos totais foram determinadas em triplicata.

3.4.4. *Precipitação ácida da lignina insolúvel presente nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA*

A precipitação ácida foi utilizada para recuperar a lignina insolúvel presente nos licores. Para esse efeito, os licores foram acidificados até pH 2,0, com ácido sulfúrico a 72,0% m/m e armazenados durante 48 h para decantar. Posteriormente foi realizada a lavagem com água da fração precipitada, seguida da secagem em estufa a vácuo a 50 °C até peso constante (modificado de Egüés *et al.*, 2012).

A lignina teórica solubilizada (LTS) foi calculada pela Equação 3.18:

$$LTS = ((MLS \times 0,1) \times (LML \times 0,1)) + (((MLI \times 0,1) \times ((LML - LMLP) \times 0,1)) \quad (\text{Equação 3.18})$$

Sendo: MLS = % de material solubilizado;
LML = % de lignina contida no material *in natura*;
MLI = % de material insolubilizado;
LMLP = % de lignina no material pré-tratado;
0,1 = fator de conversão de % para g.

3.4.4.1. *Caracterização da lignina presente no licor dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHCHS e POEA*

3.4.4.1.1. *Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros de FTIR da lignina presente nos licores dos materiais pré-tratados foram medidos em espectrômetro FTIR (Spectrun 65 FTIR, Perkin Elmer, EUA). As

condições de análise foram realizadas em resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$, na região de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Foi utilizada como padrão a lignina comercial (Sigma).

3.4.4.1.2. *Análise termogravimétrica (TGA) da lignina*

A estabilidade térmica das amostras foi analisada por TGA utilizando o equipamento Shimadzu TGA-50 (Shimadzu Corporation, Japão), com o *software TASYs thermal*. As amostras foram pesadas (entre $10,0$ a $15,0\text{ mg}$) em recipientes de alumínio. Os experimentos foram realizados sobre a atmosfera de N_2 , com taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}$ por minuto, ao longo de intervalo de temperatura entre 20 a $600\text{ }^\circ\text{C}$. Foi utilizada como padrão a lignina comercial (Sigma).

3.5. *Enzimas*

As soluções de enzimas, celulasas e β -glicosidase (Cellic CTec 2), e endoxilanase (Cellic HTec 2) foram gentilmente fornecidas pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

3.5.1. *Celulasas*

A atividade total de celulase da Cellic CTec 2 foi analisada em conformidade com a metodologia padrão estabelecida por Mandels *et al.* (1976). Em um tubo de ensaio foi adicionados $0,3\text{ mL}$ de enzima comercial diluída, $1,2\text{ mL}$ de tampão citrato de sódio $0,5\text{ mM}$ a $\text{pH } 4,8$ e $50,0\text{ mg}$ de papel de filtro Whatman N° 1 como substrato. O meio foi incubado em um banho de água a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h e a quantidade de glicose liberada foi medida utilizando o método de DNS descrito por Ghose (1987). Uma unidade de atividade enzimática (FPU) foi definida como sendo a quantidade necessária de enzima capaz de liberar $1,0\text{ }\mu\text{mol}$ do respectivo produto por minuto de reação.

3.5.2. β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase da Cellic CTec 2 foi medida através da incubação de 0,1 mL de enzima com 15,0 mM de celobiose em tampão citrato de sódio 50,0 mM (pH 4,8) a 50 °C durante 30 min. A reação foi interrompida pela imersão dos tubos de ensaios em água fervente durante 5 min. Em seguida, a concentração de glicose foi determinada utilizando o método GOD-POD a 25 °C durante 10 min e a quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotômetro a 500 nm (Ghose, 1987). Uma unidade de atividade enzimática (CBU) foi definida como sendo a quantidade necessária de enzima capaz de liberar 1,0 μ mol do respectivo produto por minuto de reação.

3.5.3. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada no complexo Cellic HTec 2. A mistura de reação tiveram 0,1 mL de enzima e 0,5% m/v da solução de xilana de *oat spelts* em tampão acetato com pH 5,0. A mistura foi incubada a 50 °C durante 10 min. Após o período determinado, os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método de DNS, medido por espectrofotômetro a 540 nm (Ghose, 1987). Uma unidade de atividade enzimática (UI/mL) foi definida como sendo a quantidade necessária de enzima capaz de liberar 1,0 μ mol do respectivo produto por minuto de reação.

3.6. Hidrólise enzimática

Os materiais foram utilizados como substrato nas hidrólises enzimáticas. As hidrólises enzimáticas foram realizadas com 4,0% m/v de materiais usando *kit* enzimático Cellic CTec 2 e HTec 2, com carga enzimática de 30,0 FPU, 75,0 CBU e 130,0 UI de xilanase por grama de sólido, em frasco Erlenmeyer com 48,0 mL de tampão citrato de sódio a 50,0 mM e 0,02% m/v de azida de sódio para prevenir o crescimento microbiano, a 50 °C e agitado a 150 rpm durante 96 h. As amostras foram

coletadas em intervalos de 6 h para as primeiras 12 h e nos intervalos de 12 h, durante 96 h (Dowe e Mcmillan, 2001; Santos *et al.*, 2010). As concentrações de açúcares foram determinadas por CLAE (conforme seção 3.8).

A digestibilidade do material foi calculada usando a Equação 3.19 (Dowe e McMillan, 2001).

$$\text{Digestibilidade (\%)} = \frac{[\text{glicose}] + 1,053 [\text{celobiose}]}{1,111f \cdot [\text{biomassa}]} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3.19})$$

Sendo: glicose = concentração de glicose (g/L);
celobiose = concentração de celobiose (g/L);
biomassa = concentração do material seco inicial na hidrólise enzimática (g/L);
f = consiste na fração de celulose da biomassa seca (g/g);
1,111 = consiste no fator de conversão de celulose em glicose equivalente;
1,053 = consiste no fator de conversão de celobiose em glicose equivalente.

3.7. Processo fermentativo

3.7.1. Micro-organismos

Os micro-organismos *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *P. stipitis* foram usados no presente trabalho. As linhagens *P. stipitis* Y7124 e *Z. mobilis* B14023 foram adquiridas do banco de linhagens *Northern Regional Research Laboratory* e a *S. cerevisiae* PE2 foi adquirida da empresa Fermentec Ltda (Piracicaba, Brasil). Os micro-organismos foram mantidos em glicerol -80 °C, posteriormente, liofilizados para uso como estoque.

3.7.2. Preparo do inóculo

A *S. cerevisiae* e *P. stipitis* foram mantidas em placas de Petri com meio de cultivo contendo ágar batata dextrose (PDA) e a *Z. mobilis* foi mantida em placas de Petri com meio de cultivo contendo ágar para contagem em placa (PCA) a 30 °C durante 24 h, ambos em pH 6,0. As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 100,0 mL de meio de cultivo (MC) estéril contendo: 50,0 g/L de glicose; 1,0 g/L de sulfato de amônia; 0,5 g/L de fosfato de potássio; 0,25 g/L de sulfato de magnésio; 10,0 g/L extrato de levedura; 10,0 g/L de peptona e incubado a

30 °C em agitador orbital durante 12 h (Santos *et al.*, 2010), com agitação de 200, 250 e 150 rpm para a *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*, respectivamente.

3.7.3. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)

As SSF foram realizadas utilizando materiais pré-tratados, de acordo com o procedimento padrão NREL (Dowe e Mcmillan, 2001), em frascos Erlenmeyer (Figura 3.3). A SSF foram realizadas com 4,0% m/v de sólidos pré-tratados e 48,0 mL de tampão citrato de sódio 50,0 mM (pH 5,0), carga enzimática de 30,0 FPU, 75,0 CBU e 130,0 UI xilanases (*kit* enzimático Cellic CTec 2 e HTec 2) por grama de material pré-tratado, suplementado com: 1,0 g/L de sulfato de amônia; 0,5 g/L de fosfato de potássio; 0,25 g/L de sulfato de magnésio; 2,0 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de peptona (Santos *et al.*, 2010). A SSF foi iniciada pela adição das enzimas e o micro-organismo, incubados a 30 °C em agitador orbital a 200, 250 e 150 rpm para a *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*, respectivamente. As amostras foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 h, após cada retirada de amostra foi inserido nitrogênio gasoso no meio de cultivo. Etanol e açúcares foram determinados por CLAE (conforme seção 3.8). A concentração celular inoculada foi equivalente a densidade óptica de 2,0 em comprimento de onda de 600 nm medido por espectrofotômetro de UV-VIS (de Souza *et al.*, 2012).



Fonte: Ruiz (2011).

Figura 3.3. Frasco Erlenmeyer adaptado para fermentação de etanol celulósico

3.7.4. Sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF)

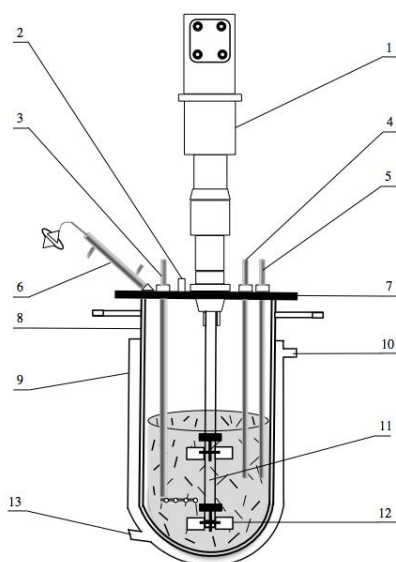
A SSSF foi realizada durante 12 h de pré-sacarificação e mais 36 h de processo SSF utilizando os materiais pré-tratados, em frascos Erlenmeyer (conforme Figura 3.3). As SSSF foram realizadas com 4,0% m/v de sólidos pré-tratados e 48,0 mL de tampão citrato de sódio 50,0 mM (pH 5,0), carga enzimática de 30,0 FPU, 75,0 CBU e 130,0 UI xilanases (*kit* enzimático Cellic CTec 2 e HTec 2) por grama de material pré-tratado, no período de pré-sacarificação, a temperatura do meio foi mantido a 50 °C e agitação de 150 rpm. Após 12 h de pré-sacarificação, a temperatura do meio foi ajustado para 30 °C e suplementado com uma solução contendo: 1,0 g/L de sulfato de amônia; 0,5 g/L de fosfato de potássio; 0,25 g/L de sulfato de magnésio; 2,0 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de peptona. Em seguida, o processo fermentativo foi iniciado com a adição do micro-organismo, em um agitador orbital a 200, 250 e 150 rpm para a *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*, respectivamente. As amostras foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 h, após cada retirada de amostra foi inserido nitrogênio gasoso no meio de cultivo. Etanol e açúcares foram determinados por CLAE (conforme seção 3.8). A concentração celular inoculada foi equivalente a densidade óptica de 2,0 em comprimento de onda de 600 nm medido por espectrofotômetro de UV-VIS (de Souza *et al.*, 2012).

3.7.5. Sacarificação e fermentação semi-simultânea em biorreator

Os experimentos foram realizados em um biorreator de tanque agitado de 2,0 L (Bioengineering AG, Suíça), com volume de trabalho de 1,0 L (Figura 3.4). Foram utilizados materiais pré-tratados, *S. cerevisiae* e a estratégia fermentativa de SSSF, selecionados de acordo com os resultados obtidos nos experimentos realizados em frascos Erlenmeyer (conforme seções 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3 e 4.6.4).

Os procedimentos realizados foram similares aos descritos anteriormente para a SSSF em frascos Erlenmeyer (conforme seção 3.7.4) e contendo 960,0 mL de tampão

citrato de sódio 50,0 mM (pH 5,0), realizados em condições estéreis e contendo antiespumante (antiespumante 204, Sigma). Os experimentos foram realizados na presença de nitrogênio gasoso, exceto durante os 30 minutos iniciais do processo fermentativo. As amostras foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 h. Etanol e açúcares foram determinados por CLAE (conforme seção 3.8).



Fonte: Ruiz (2011).

Figura 3.4. Diagrama do biorreator usado em SSSF: (1) motor; (2) coletor de amostra; (3) entrada de gás; (4) medidor de pH; (5) termômetro; (6) condensador; (7) tampa; (8) parede do tanque; (9) revestimento do banho-maria; (10) saída da água do revestimento do banho-maria; (11) eixo de transmissão; (12) impelidor do tipo turbina de lâminas planas; (13) entrada de água no banho-maria

3.7.6. Fermentação alcoólica na presença dos compostos inibitórios

As fermentações alcoólicas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100,0 mL de meio de cultivo MC (conforme seção 3.7.2.) e a presença de diferentes concentrações de compostos inibitórios: furfural (1,0; 2,0; 3,0 g/L), HMF (1,0; 2,0; 3,0 g/L), ácido acético (2,5; 5,0; 7,5 g/L), ácido levulínico (0,3; 0,6; 0,9 g/L) e ácido fórmico (0,5; 0,8; 1,1 g/L), realizado a partir de um planejamento experimental, de acordo com a Tabela 3.5. O cultivo da *S. cerevisiae* foi realizado em meio de cultivo com pH 5,0 e acondicionado a 200 rpm, 30 °C durante 48 h. O cultivo da *P. stipitis* foi realizado em meio de cultivo com pH 5,5 e acondicionado a 250 rpm, 30 °C durante 48

h. O cultivo da *Z. mobilis* foi realizado em meio de cultivo com pH 5,5 e acondicionado a 150 rpm, 30 °C durante 48 h (modificado de Wikandari *et al.*, 2010). As amostras foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 36 e 48 h. Etanol, compostos inibitórios e açúcares foram determinados por CLAE (conforme seção 3.8).

Tabela 3.5. Planejamento experimental dos meios de cultivos contendo compostos inibitórios

Experimento	Compostos inibitórios (g/L)				
	Furfural	HMF	Ácido acético	Ácido fórmico	Ácido levulínico
1	1,0	1,0	2,5	0,5	0,9
2	3,0	1,0	2,5	0,5	0,3
3	1,0	3,0	2,5	0,5	0,3
4	3,0	3,0	2,5	0,5	0,9
5	1,0	1,0	7,5	0,5	0,3
6	3,0	1,0	7,5	0,5	0,9
7	1,0	3,0	7,5	0,5	0,9
8	3,0	3,0	7,5	0,5	0,3
9	1,0	1,0	2,5	1,1	0,3
10	3,0	1,0	2,5	1,1	0,9
11	1,0	3,0	2,5	1,1	0,9
12	3,0	3,0	2,5	1,1	0,3
13	1,0	1,0	7,5	1,1	0,9
14	3,0	1,0	7,5	1,1	0,3
15	1,0	3,0	7,5	1,1	0,3
16	3,0	3,0	7,5	1,1	0,9
17 (C)	2,0	2,0	5,0	0,8	0,6
18 (C)	2,0	2,0	5,0	0,8	0,6
19 (C)	2,0	2,0	5,0	0,8	0,6

A concentração celular inoculada foi equivalente a densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 600 nm medido por espectrofotômetro de UV-VIS. Subsequentemente, as células foram inoculadas em 100,0 mL de meio de cultivo para o início da fermentação alcoólica na presença dos compostos inibitórios.

3.7.7. Fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água marinha

As fermentações alcoólicas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100,0 mL do meio de cultivo MC (conforme seção 3.7.2.), com modificação na concentração de glicose (pureza analítica) de 50,0 g/L para 20,0 g/L, diluído com

água marinha, segundo Lin *et al.* (2011), a água possui a seguinte composição: 0,09 g/L de NaBr; 0,74 g/L de KCl; 1,67 g/L de CaCl₂; 3,38 g/L de Na₂SO₄; 2,50 g/L de MgCl₂; 27,13 g/L de NaCl e 0,21 g/L de NaHCO₃. O cultivo da *Z. mobilis* foi realizado em meio de cultivo com pH 5,5 e acondicionado a 150 rpm, 30 °C durante 11 h. O cultivo da *P. stipitis* foi realizado em meio de cultivo com pH 5,5 e acondicionado a 250 rpm, 30 °C durante 11 h. O cultivo da *S. cerevisiae* foi realizado em meio de cultivo com pH 5,0 e acondicionado a 200 rpm, 30 °C durante 11 h (modificado de Wikandari *et al.*, 2010). As amostras foram retiradas em intervalos de 1 h, até 11 h de fermentação. Etanol e açúcares foram determinados por CLAE (conforme seção 3.8).

A concentração celular inoculada foi equivalente a densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 600 nm medido por espectrofotômetro de UV-VIS. Subsequentemente, as células foram inoculadas em 100,0 mL de meio de cultivo para início da fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água marinha.

3.7.8. Determinação da concentração celular microbiana

A concentração celular foi obtida a partir da correlação entre o valor da leitura da amostra em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm e o valor dessa amostra submetida ao processo de secagem (massa seca).

3.7.9. Rendimento em etanol

O rendimento em etanol (Equação 3.20) foi calculado assumindo que toda a glicose presente nos materiais pré-tratados estará disponível para a fermentação e que 1,0 g de glicose resultará em 0,51 g de etanol, e que 1 g de celulose resultará em 0,9 g de glicose (Dowe e McMillan, 2001). Além disso, o rendimento em etanol a partir da xilose foi calculado de acordo com Dowe e McMillan (2001), porém com a inserção da xilose ao invés da glicose (Equação 3.21). E considerando que 1,0 g de xilose

resultará em 0,51 g de etanol (Parekh *et al.*, 1986; Singh e Bishnoi, 2012; Singh *et al.*, 2014a; Singh *et al.*, 2014b).

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{[\text{etanol}]}{[\text{glicose inicial}] \cdot 0,511} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3.20})$$

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{[\text{etanol}]}{[\text{xilose inicial} - \text{xilose final}] \cdot 0,511} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3.21})$$

Sendo: etanol = concentração final de etanol (g/L);
glicose inicial = concentração inicial de glicose (g/L);
xilose inicial = concentração inicial de xilose (g/L);
xilose final = concentração final de xilose (g/L);
0,511 = consiste no fator de conversão de glicose ou xilose para etanol.

3.8. Análise das amostras em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras analisadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal, Brasil) foram centrifugadas e filtradas para quantificar os açúcares, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido acético, furfural, HMF e etanol. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna Shim-Pack SCR-101H (300 x 7,8 milímetros, Shimadzu, Japão), com as seguintes condições: fase móvel de 0,005 mol/L de ácido sulfúrico, fluxo 0,6 mL/min e temperatura da coluna de 65 °C, utilizando cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão), equipado com detector de índice de refração (Shimadzu, Japão). O volume injetado foi 20,0 µL.

As amostras analisadas no Laboratório de Análise I da Universidade do Minho (Braga, Portugal) foram centrifugadas e filtradas para quantificar os açúcares, ácidos orgânicos, glicerol, xilitol, HMF, furfural e etanol. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna Metacarb 87H (300 x 7,8 milímetros, Varian, EUA), com as seguintes condições: fase móvel de 0,005 mol/L de ácido sulfúrico, fluxo 0,7 mL/min e temperatura da coluna de 60 °C, utilizando cromatógrafo Jasco 880-PU (Jasco, Japão)

equipado com Jasco 830-IR detector de índice de refração (Jasco, Japão) e amostrador automático Jasco AS-2057 (Jasco, Japão). O volume injetado foi 20,0 uL.

3.9. Determinação de parâmetros cinéticos para fermentações na presença de compostos inibitórios

A determinação da velocidade específica de crescimento (μ_x), velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) e velocidade específica de formação de produto (μ_p) foram realizadas conforme o método geométrico proposto por Le Duy e Zajic (1973), com as Equações desse método implementadas em planilha de cálculo do programa *Microsoft Office Excel* (Schmidell *et al.*, 2001) e estão representadas pelas Equações 3.22, 3.23 e 3.24.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{(Equação 3.22)}$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad \text{(Equação 3.23)}$$

$$\mu_s = - \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad \text{(Equação 3.24)}$$

Sendo: μ_x = velocidade específica de crescimento (h^{-1});
 μ_s = velocidade específica de consumo de substrato ($g/(L.h)$);
 μ_p = velocidade específica de formação de produto ($g/(L.h)$);
 X = massa celular (g/L);
 t = tempo (h);
 S = massa de substrato (g/L);
 P = massa de produto (g/L).

O rendimento de etanol baseado no consumo de glicose ($Y_{P/S}$) e a produção de biomassa baseado no consumo de glicose ($Y_{X/S}$) foram estimados de acordo com as Equações 3.25 e 3.26. E as produtividades de etanol (P^E) e biomassa (P^X) foram determinadas pelas Equações 3.27 e 3.28.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{(Equação 3.25)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (\text{Equação 3.26})$$

$$P^E = \frac{P}{t} \quad (\text{Equação 3.27})$$

$$P^X = \frac{X - X_0}{t} \quad (\text{Equação 3.28})$$

Sendo: $Y_{X/S}$ = rendimento do crescimento celular baseado no consumo de substrato (g células/g substrato);

$Y_{P/S}$ = rendimento de produto (etanol) baseado no consumo de substrato (g etanol/g substrato);

X = concentração celular final (g/L);

X_0 = concentração celular inicial (g/L);

P = concentração final de etanol (g/L);

P_0 = concentração inicial de etanol (g/L);

S = concentração final de substrato (g/L);

S_0 = concentração inicial de substrato (g/L);

P^E = produtividade de etanol (g/(L.h));

P^X = produtividade celular (g/(L.h));

t = tempo (h).

3.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas *Microsoft*

Office Excel e Statistica 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição da matéria-prima

A composição química do cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro está apresentada na Tabela 4.1. As umidades de cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro foram 12,60%, 8,99%, 6,14% e 5,52%, respectivamente. O maior componente presente nos materiais foi à celulose, sendo 38,12%, 33,23%, 32,12% e 29,58% para o cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro, respectivamente, seguido pela hemicelulose e lignina, exceto para a casca de coco maduro, que apresenta porcentagem de lignina mais elevada que a hemicelulose. Existem poucos relatos sobre a composição de cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro na literatura. Além disso, a composição de celulose, hemicelulose e lignina, por exemplo, do cacto, pode variar dependendo do tempo de cultivo, tempo de colheita e solo (Oliveira *et al.*, 2010), embora se observe que, o cacto apresenta composição similar a outros materiais lignocelulósicos (García-Aparício *et al.*, 2011). Com relação a casca de coco *in natura*, Vaithanomsat *et al.* (2011) relataram a composição química da casca de coco como sendo 39,31% de celulose, 16,15% de hemicelulose e 29,79% de lignina. Ding *et al.* (2012) relataram a composição química da casca de coco *in natura* contendo 21,26% de celulose, 17,33% de hemicelulose e 46,36% de lignina. Desse modo, esses materiais podem ser considerados promissores para a produção de etanol, devido às características apresentadas nas composições químicas.

Tabela 4.1. Composições químicas dos materiais lignocelulósicos *in natura*

Material lignocelulósico	Fase sólida (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
Fibra de coco maduro	32,18 ± 0,12	27,81 ± 0,74	25,02 ± 0,01	3,31 ± 0,02
Casca de coco verde	33,23 ± 0,24	29,14 ± 0,22	25,44 ± 0,12	2,34 ± 0,11
Casca de coco maduro	29,58 ± 0,50	27,77 ± 0,79	31,04 ± 0,10	3,84 ± 0,08
Cacto	38,12 ± 0,75	23,50 ± 0,42	19,51 ± 0,13	5,64 ± 0,21

4.2. Materiais lignocelulósicos pré-tratados com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA) e hidróxido de sódio (PHS) visando à produção de etanol

4.2.1. Caracterização dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

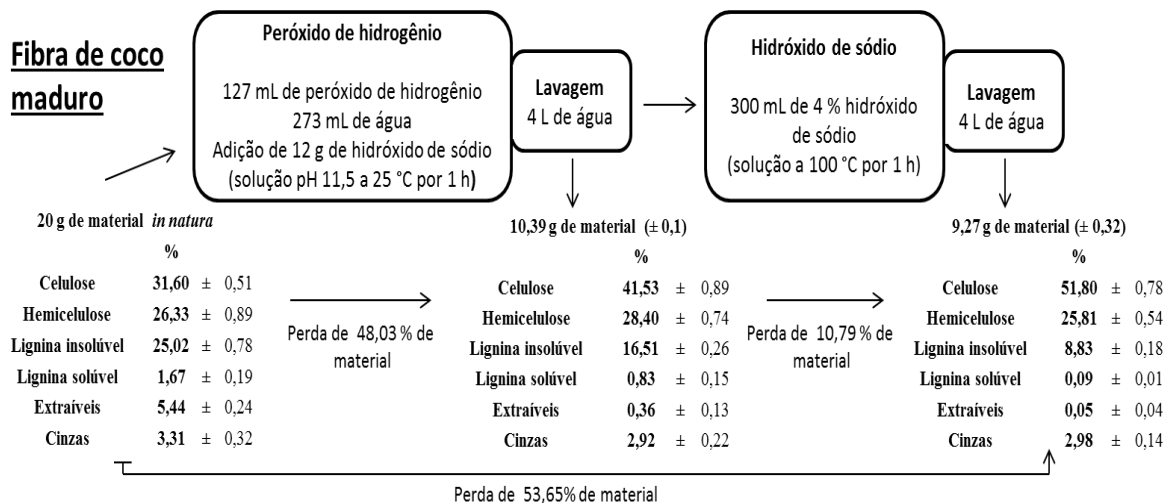
4.2.1.1. Composição dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

A finalidade de uso do peróxido de hidrogênio alcalino consiste em melhorar o processo de deslignificação do material (Gould e Freer, 1984; Gould, 1985; Rabelo *et al.*, 2008; Selig *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2011; Correia *et al.*, 2013) juntamente com o uso do hidróxido de sódio (Santos e Gouveia, 2009; Wang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012).

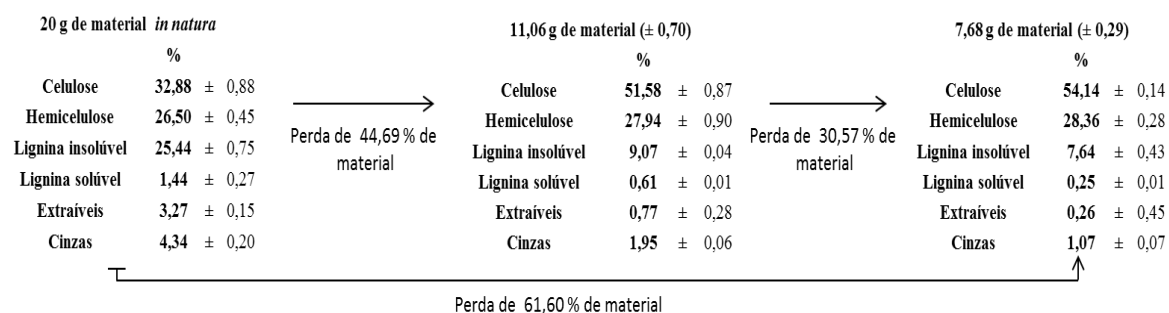
Os materiais pré-tratados por PHA apresentaram redução de sólido, sendo para o cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro de 35,89%, 44,69%, 48,03% e 40,30%, respectivamente. O pré-tratamento sequencial PHS nos materiais possibilitou a redução de sólido entre 10,0 e 30,0%. A realização sequencial dos pré-tratamentos PHA-PHS possibilitaram a redução de sólido em cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro em 49,10%, 61,60%, 53,65% e 50,24%, respectivamente (Figura 4.1). Esses dados indicam as solubilizações dos materiais submetidos aos pré-tratamentos PHA e PHA-PHS, sendo importante a seletividade desses pré-tratamentos, proporcionando assim, a redução da lignina e mantendo a celulose no material. Portanto, os pré-tratamentos promovem a redução de sólido, sem reduzir o teor de celulose do material.

O pré-tratamento PHA realizado nos materiais possibilitou a redução da lignina contida no cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro

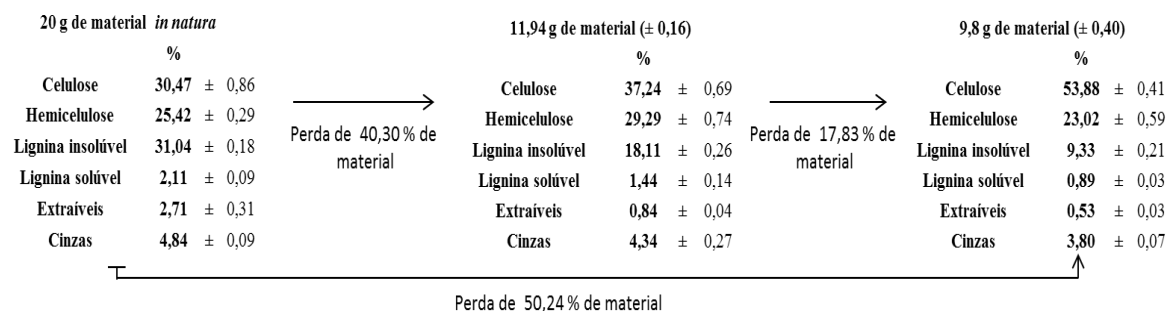
em 28,56%, 63,99%, 35,03% e 41,02%, respectivamente. Em recente trabalho, Correia *et al.* (2013) relataram a redução de 43,76% de lignina em bagaço de caju pré-tratado por PHA (4,3% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 35 °C por 24 h). Selig *et al.* (2009) relataram a redução de 19,6% de lignina em palha de milho pré-tratada com PHA. Gould *et al.* (1984) realizaram o pré-tratamento PHA em palha de trigo (1,0% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 25 °C por 24 h), resultando em redução de 50,0% da lignina contida na palha de trigo. Ayeni *et al.* (2013) realizaram pré-tratamento PHA em *Vitellaria paradoxa sawdust* (1,0% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 150 °C por 45 min), resultando no aumento de 60,0% de celulose, reduções de 80,0% de hemicelulose e 17,0% de lignina. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, evidenciando à redução da lignina no sólido após o pré-tratamento PHA. No entanto, Brígida *et al.* (2010) realizaram o pré-tratamento PHA sobre a fibra de coco verde (5,4% v/v de peróxido de hidrogênio a 85 °C por 2 h), resultando na redução de 4,31% de celulose e aumento de 3,31% de lignina.



Casca de coco verde



Casca de coco maduro



Cacto

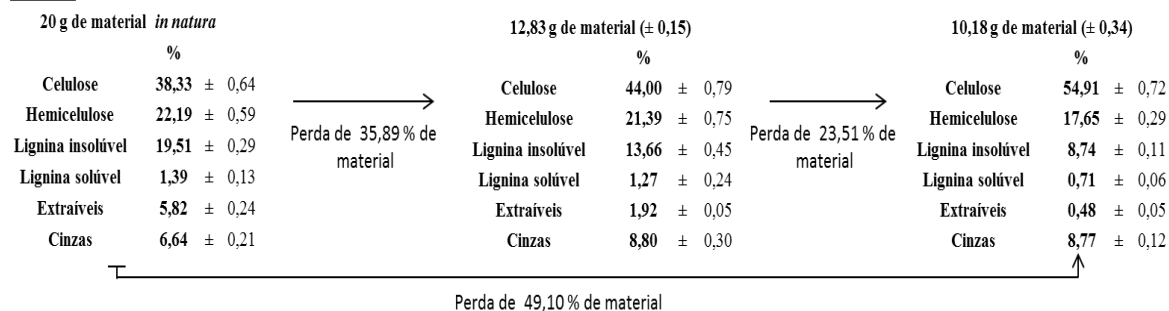


Figura 4.1. Composições químicas e rendimentos dos materiais lignocelulósicos *in natura*, pré-tratados por PHA e PHA-PHS

O pré-tratamento sequencial PHA-PHS apresentou redução de lignina em cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro de 36,70%, 18,49%, 48,56% e 47,72% em relação aos materiais pré-tratados por PHA, respectivamente. Após a realização dos pré-tratamentos PHA-PHS houve a redução da lignina em cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro de 54,31%, 70,65%, 66,58% e 69,17% em relação aos materiais *in natura*, respectivamente. Wang *et al* (2010) realizaram o pré-tratamento PHS sobre a *Cynodon dactylon* (3,0% v/v de hidróxido de sódio a 121 °C por 1 h), obtendo remoção de 86,0% da lignina contida no material. De acordo com Siqueira *et al.* (2013), a remoção da lignina facilita a hidrólise enzimática do material, porém não há necessidade da remoção completa da lignina no material para hidrolisar mais de 80,0% de celulose. Dessa forma, os materiais pré-tratados por PHA e PHA-PHS apresentaram reduções de lignina (conforme Figura 4.1), porém ainda contém lignina. Portanto, esses materiais poderão apresentar eficientes digestibilidades ao serem submetidos à ação enzimática.

Os materiais submetidos ao pré-tratamento PHA-PHS apresentaram aumento acima de 50,0% de celulose e baixa redução de hemicelulose (Figura 4.1). Esse fato é característico dos pré-tratamentos alcalinos, por exemplo, o PHA e PHA-PHS, que visam à remoção da lignina e a permanência da celulose nos materiais. Porém, a redução da hemicelulose nos materiais pré-tratados depende da severidade dos pré-tratamentos alcalinos e das características físico-químicas dos materiais utilizados. Azzam (1989) e Rabelo *et al.* (2011) realizaram pré-tratamento PHA sobre o bagaço de cana-de-açúcar, resultando no aumento de celulose, redução significativa de lignina e hemicelulose. Entretanto, o presente trabalho também apresenta aumento da celulose e redução significativa da lignina nos materiais pré-tratados, mas diverge sobre a redução da hemicelulose, a qual se mantém elevada após os pré-tratamentos (PHA e PHA-PHS). Resultados similares foram apresentados por Correia *et al.* (2013) e Selig *et al.* (2009) em bagaço de caju e palha de milho pré-tratados por PHA,

respectivamente. Dessa forma, esses dados indicam que os pré-tratamentos apresentam ação seletiva sobre a lignina dos materiais utilizados neste trabalho.

4.2.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV apresentadas na Figura 4.2 permitem visualizar os efeitos promovidos pelos pré-tratamentos sobre os materiais lignocelulósicos. As amostras *in natura* apresentaram fibras rígidas, superfícies intactas e altamente ordenadas (Figura 4.2: 1A, 2A, 3A e 4A). Entretanto, os materiais pré-tratados por PHA (Figura 4.2: 1B, 2B, 3B e 4B) e os materiais pré-tratados por PHA-PHS (Figura 4.2: 1C, 2C, 3C e 4C) apresentaram estruturas modificadas, fibras desordenadas e separadas.

As influências dos pré-tratamentos PHA e PHA-PHS sobre as estruturas dos materiais são visíveis na Figura 4.2 e essas características estruturais poderão proporcionar maior suscetibilidade dos materiais pré-tratados à ação enzimática, a partir da redução da lignina e maior exposição dos açúcares na superfície do material.

Além disso, a casca de coco verde (Figura 4.2: 2B) e a casca de coco maduro (Figura 4.2: 3B), ambas pré-tratadas por PHA apresentaram estruturas mais fragmentadas e descontínuas em comparação aos demais materiais pré-tratados por PHA, evidenciando os maiores teores de deslignificação obtida nesses materiais (conforme Figura 4.1).

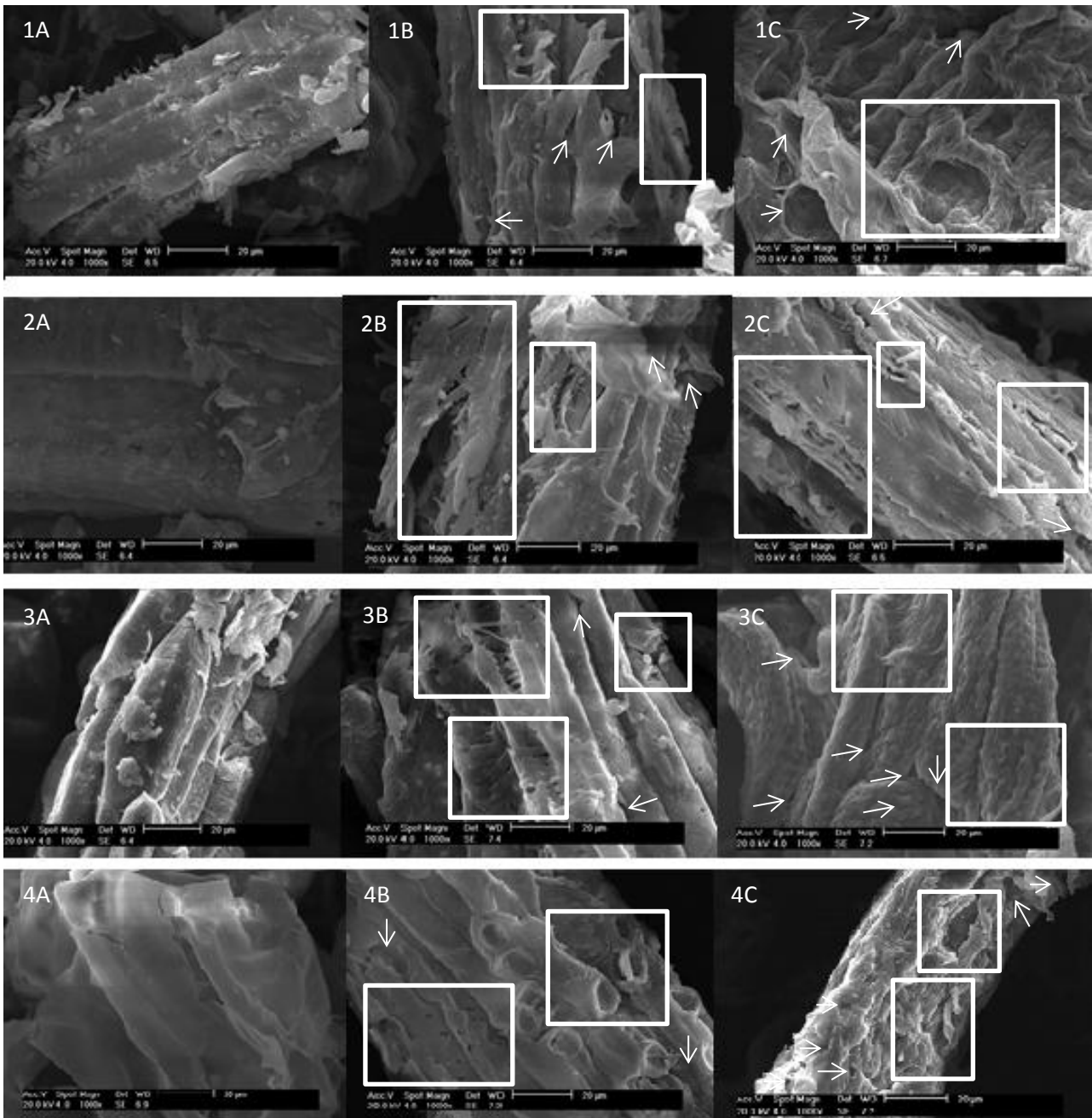


Figura 4.2. MEV dos materiais lignocelulósicos: (1A) Fibra de coco maduro *in natura*; (1B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA; (1C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (2A) Casca de coco verde *in natura*; (2B) Casca de coco verde pré-tratada por PHA; (2C) Casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA; (3C) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por PHA; (4C) Cacto pré-tratado por PHA-PHS

4.2.1.3. Análise de difração de raios-X e índice de cristalinidade

A análise de difração de raios-X e a determinação do índice de cristalinidade (IC) foram realizadas nos materiais *in natura* e pré-tratados (PHA e PHA-PHS) visando analisar a estrutura cristalina.

Os índices de cristalinidade dos materiais estudados foram entre 23,20% e 55,98% (Figura 4.3 e Tabela 4.2). Os índices de cristalinidade dos materiais *in natura* apresentaram aumento após serem submetidos ao pré-tratamento PHA. Os índices de cristalinidade na casca de coco verde pré-tratada por PHA e a pré-tratada por PHA-PHS foram similares, já o cacto e a fibra de coco maduro apresentaram aumento nos índices de cristalinidade ao serem submetidos aos dois pré-tratamentos e a casca de coco maduro apresentou redução no índice de cristalinidade ao ser submetido aos dois pré-tratamentos (Tabela 4.2). De acordo com Wei e Cheng (1985), a remoção da lignina amorfa e da hemicelulose leva ao aumento da cristalinidade, embora o inchaço da celulose submetida em solução de peróxido de hidrogênio proporciona amolecimento da estrutura lignocelulósica, portanto, reduzindo a recalcitrância do material e possibilitando melhor digestibilidade desse material a ação enzimática.

Tabela 4.2. Índice de cristalinidade do cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro *in natura*, pré-tratados por PHA e PHA-PHS

Material lignocelulósico	IC (%)		
	<i>In natura</i>	PHA	PHA-PHS
Cacto	23,20	46,09	48,43
Casca de coco verde	29,31	49,18	49,89
Fibra de coco maduro	34,34	50,79	55,73
Casca de coco maduro	28,03	55,98	53,77

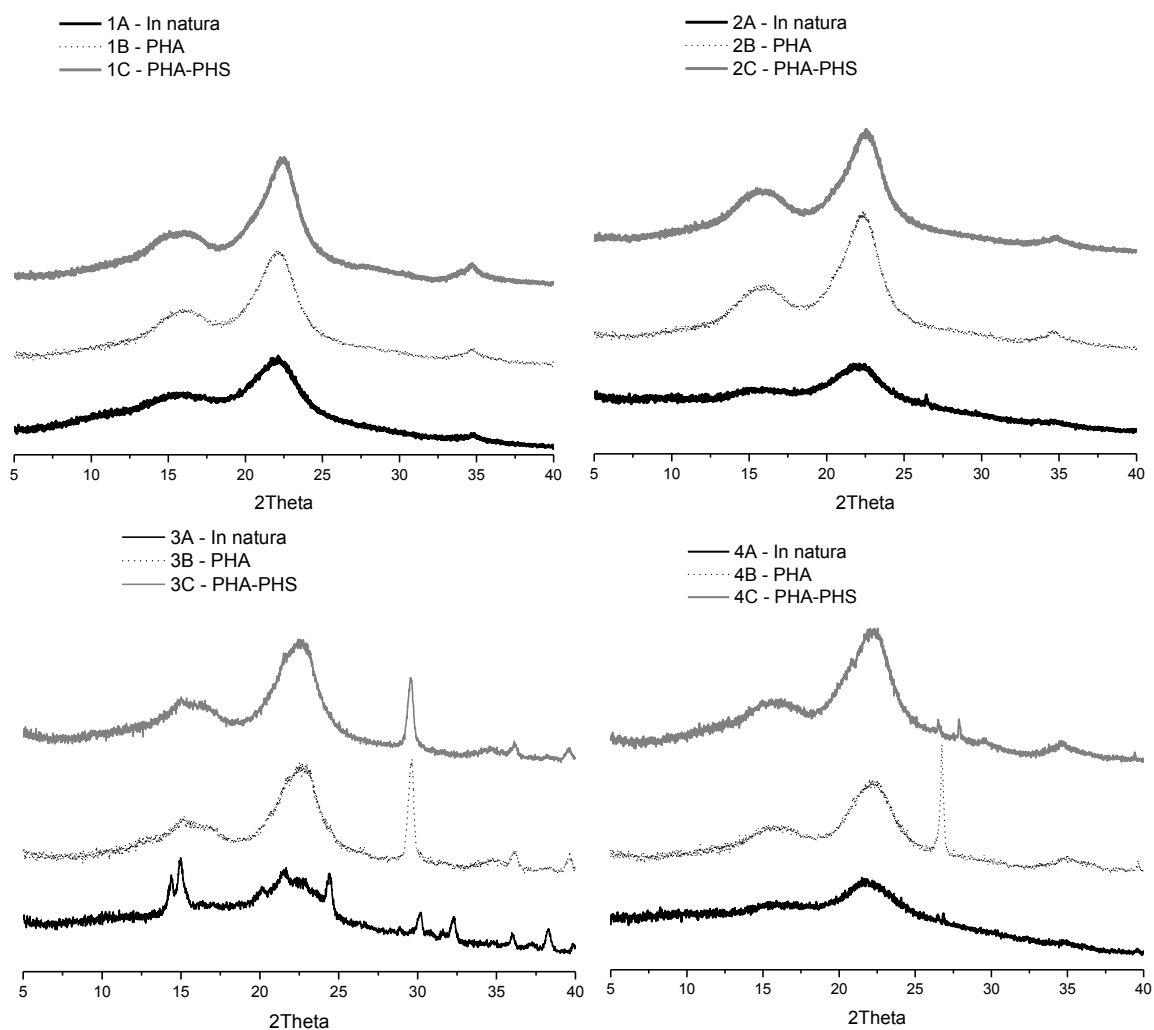


Figura 4.3. Difração de raios-X dos materiais lignocelulósicos: (1A) Fibra de coco maduro *in natura*; (1B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA; (1C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (2A) Casca de coco verde *in natura*; (2B) Casca de coco verde pré-tratada por PHA; (2C) Casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA; (3C) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por PHA; (4C) Cacto pré-tratado por PHA-PHS

Em trabalho realizado por Wei e Cheng (1985) utilizando a palha de arroz pré-tratada por PHA (4,0% v/v de peróxido de hidrogênio e 1,0% v/v de hidróxido de sódio a 32 °C em pH 10,7 por 5 h), resultou na redução do índice de cristalinidade de 83,8% (material *in natura*) para 81,6%. Thompson e Chen (1992) realizaram pré-tratamento PHA em madeira nativa mista (2,5% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 25 °C), resultando em índice de cristalinidade de 68,4%, 69,0% e 77,2% em material pré-

tratado por 0,5 h, 5 h e 19 h, respectivamente. A madeira nativa mista *in natura* possui índice de cristalinidade de 71,6%. Esses trabalhos realizados por Wei e Cheng (1985) e Thompson e Chen (1992) apresentaram proximidade nos índices de cristalinidade entre os seus materiais *in natura* e os materiais pré-tratados por PHA, além de elevados valores nos índices de cristalinidade dos materiais *in natura*. Embora, diferem dos resultados obtidos neste trabalho, pois os materiais *in natura* apresentaram índices de cristalinidade entre 23,20% e 34,34%, e os materiais *in natura* apresentaram aumento significativo nos índices de cristalinidade após serem submetidos ao pré-tratamento PHA (entre 46,09% e 55,98%) (Tabela 4.2).

O pré-tratamento PHS visa manter a celulose e reduzir a lignina nos materiais pré-tratados por PHA. Neste sentido, a fibra de coco maduro, cacto e casca de coco maduro alcançaram os resultados almejados (conforme Figura 4.1). Entretanto, a casca de coco verde submetida ao pré-tratamento PHA-PHS resultou na redução de sólido de 30,57%, com aumento de 2,56 pontos percentuais de celulose e redução 1,79 pontos percentuais de lignina, apresentando elevada redução de sólido, baixo aumento de celulose e baixa redução de lignina. Esses dados corroboram com os índices de cristalinidade da casca de coco verde pré-tratada por PHA de 49,18% e PHA-PHS de 49,89%, indicando baixa modificação na estrutura da casca de coco verde pré-tratada por PHA e a casca de coco verde submetida ao pré-tratamento PHA-PHS. As imagens de MEV (conforme Figuras 4.2B-C) apresentaram similaridades entre a casca de coco verde pré-tratada por PHA e a casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS. Diante disso, esses dados evidenciam a baixa influência do pré-tratamento PHA-PHS sobre a casca de coco verde pré-tratada por PHA.

4.2.1.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises por infravermelho foram realizadas com a finalidade de obter informações dos grupamentos químicos presentes nos materiais e a detecção das formações de radicais livres em cadeias poliméricas, indicando as possíveis ligações

covalentes rompidas, método comumente utilizado pela simplicidade e eficiência nas análises biológicas (Sun *et al.*, 2004). Os espectros de FTIR na região entre 400 a 4000 cm^{-1} dos materiais estão apresentados na Figura 4.4.

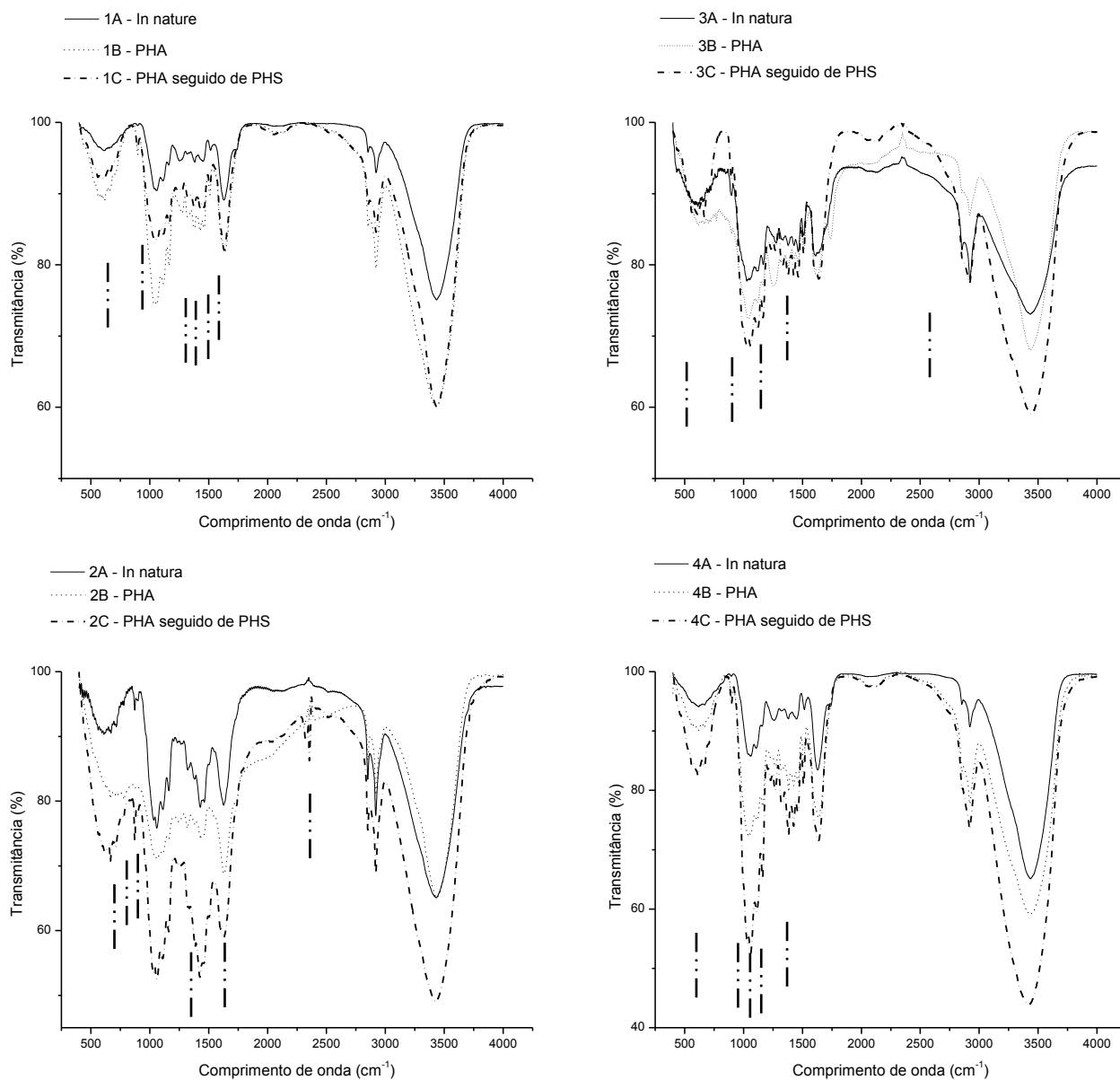


Figura 4.4. FTIR dos materiais lignocelulósicos: (1A) Fibra de coco maduro *in natura*; (1B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA; (1C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (2A) Casca de coco verde *in natura*; (2B) Casca de coco verde pré-tratada por PHA; (2C) Casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA; (3C) Casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por PHA; (4C) Cacto pré-tratado por PHA-PHS

Algumas modificações foram observadas nos materiais pré-tratados, em relação aos materiais *in natura*. A presença no material *in natura* do pico no comprimento de onda de 1238 cm^{-1} está relacionada com ésteres, éteres e grupos fenóis, sendo atribuído principalmente à presença de ceras no tecido epidérmico. Esse pico é ausente nos materiais pré-tratados, o que pode indicar a remoção da cera nos materiais pré-tratados. Resultados similares foram descritos por Brígida *et al.* (2010) usando fibra de coco verde pré-tratada por PHA. Além disso, a banda carboxilo (1636 cm^{-1}) nos espectros das amostras *in natura* está relacionada aos grupos carboxilo da pectina associada com as fibras de celulose (Calado *et al.*, 2000).

No comprimento de onda de 1254 cm^{-1} percebe-se ausência de pico referente à dupla ligação de carbono e oxigênio da lignina nos materiais pré-tratados, sendo indício da redução ou ausência da lignina nos materiais. Além disso, a redução da intensidade do pico no comprimento de onda de 1329 cm^{-1} (siringil e guaiacil) nos materiais pré-tratados, indica redução da lignina (Zhu *et al.*, 2012). Segundo Gupta e Lee (2010), os comprimentos de onda de 1030, 1241, 1360, 1405, 1430 e 1500 cm^{-1} são referentes à lignina e os materiais pré-tratados apresentaram reduções na intensidade ou ausências desses picos, sinalizando às rupturas das ligações químicas com a lignina. Esses dados corroboram com a redução da lignina contida nas composições químicas dos materiais pré-tratados por PHA e PHA-PHS (conforme Figura 4.1) e as fragmentações apresentadas nas imagens de MEV dos materiais pré-tratados por PHA e PHA-PHS (conforme Figura 4.2).

De acordo com Chen *et al.* (2012), a hemicelulose apresenta picos característicos nos comprimentos de onda de 897, 1043, 1164, 1248 e 1728 cm^{-1} . Esses picos referentes à hemicelulose foram observados nos materiais *in natura* e pré-tratados, sinalizando a permanência da hemicelulose nos materiais. Tais resultados são corroborados com as composições químicas dos materiais, conforme Figura 4.1.

A ausência de pico entre o comprimento de onda de 1370 e 1390 cm^{-1} refere-se à estrutura simétrica e deformação assimétrica da celulose e hemicelulose, podendo

indicar maior exposição da celulose e hemicelulose na superfície dos materiais pré-tratados (Brígida *et al.*, 2010). Essa informação corrobora com os resultados obtidos pelos índices de cristalinidade dos materiais pré-tratados (conforme Tabela 4.2).

Os espectros revelam pico no comprimento de onda de 3340 cm^{-1} relacionado à ligação de hidrogênio, indicando a vibração de alongamento da estrutura de celulose e lignina contida no material (Brígida *et al.*, 2010). A banda em comprimento de onda de 3400 cm^{-1} representa o alongamento da hidroxila e fenol no material. Indicando que o processo de pré-tratamento proporciona aumento do pico, conseqüentemente menor presença de hidroxila e fenol. Possivelmente relacionado à redução do grau de ligação do hidrogênio, resultando na redução da polaridade superficial do material (Calado *et al.*, 2000).

Diante disso, os resultados apresentados pelas análises de FTIR (Figura 4.4) corroboram com as composições químicas dos materiais pré-tratados (conforme Figura 4.1), os quais apresentam redução da lignina e permanência da hemicelulose e celulose.

A partir das análises de FTIR foram determinados o índice de cristalinidade (IOL), obtido pelos valores contidos nos comprimentos de ondas de 1426 e 896, e o índice de cristalinidade total (ICT), obtidos pelos valores contidos nos comprimentos de ondas de 1373 e 2917 dos materiais *in natura* e pré-tratados. A banda em comprimento de onda de 1426 cm^{-1} representa a clivagem de CH_2 (Nelson e O'Connor, 1964b). A banda em comprimento de onda de 896 cm^{-1} indica a vibração envolvendo carbono e os quatro átomos ligados, característico de β -anômeros ou β -ligado aos polímeros de glicose (Nelson e O'Connor, 1964b). Os resultados obtidos por IOL (FTIR) e ICT (FTIR) estão apresentados na Tabela 4.3 e evidenciam aumento nos índices de cristalinidade dos materiais pré-tratados em comparação aos materiais *in natura*. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pelos índices de cristalinidade oriundos das análises de difração de raios-X (conforme Figura 4.3 e Tabela 4.2).

Tabela 4.3. Índice de cristalinidade do cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro *in natura*, pré-tratados por PHA e PHA-PHS

Material lignocelulósico	IOL (FTIR)			ICT (FTIR)			IC (difração de raios-X)		
	<i>In natura</i>	PHA	PHA-PHS	<i>In natura</i>	PHA	PHA-PHS	<i>In natura</i>	PHA	PHA-PHS
Cacto	0,6786	0,9079	0,9235	0,8157	0,9439	1,0140	0,2320	0,4609	0,4843
Casca de coco verde	0,8517	0,9103	0,9133	0,8607	1,0393	1,0562	0,2931	0,4918	0,4989
Fibra de coco maduro	0,8877	0,9338	0,9575	0,9192	1,0145	1,0729	0,3434	0,5079	0,5573
Casca de coco maduro	0,7827	0,9423	0,9370	0,8311	1,0675	1,0466	0,2803	0,5598	0,5377

IOL: índice de cristalinidade baseado em FTIR (1426/896 cm⁻¹)

ICT: índice de cristalinidade total baseado em FTIR (1373/2917 cm⁻¹)

IC: índice de cristalinidade baseado em difração de raios-X

4.2.2. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada para avaliar a digestibilidade dos materiais pré-tratados por PHA-PHS submetidos ao ataque enzimático.

As atividades iniciais das enzimas comerciais foram 126,0 FPU/mL de celulase, 269,0 CBU/mL de β-glicosidase para Cellic CTec 2 e 1654,0 UI/mL de endoxilanase para HTec 2.

As conversões de cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro em glicose foram 68,44% (0,50 g glicose/g material), 70,20% (0,56 g glicose/g material), 76,21% (0,59 g glicose/g material) e 74,50% (0,57 g glicose/g material), em 96 h de hidrólise enzimática, respectivamente (Figura 4.5). Esses resultados demonstram a acessibilidade dos materiais pré-tratados ao ataque enzimático. Rabelo *et al.* (2011) realizaram a hidrólise enzimática sobre o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por PHA (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 25 °C por 1 h), obtiveram conversão e digestibilidade em açúcares redutores de 84,07% e 0,49 g/g, em 48 h de hidrólise enzimática, respectivamente. A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por PHA usando celulase de *Trichoderma viride* (45 °C por 24 h), apresentou conversão em glicose de 95,0% (Azzam, 1989).

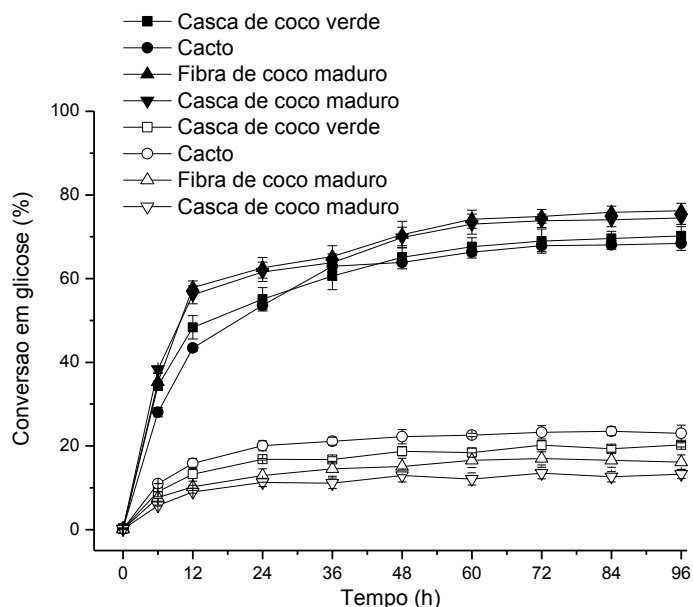


Figura 4.5. Conversão em glicose dos materiais pré-tratados por PHA-PHS. Os materiais pré-tratados estão representados pelo ícone preto e os materiais *in natura* estão representados pelo ícone branco

As conversões em glicose dos materiais pré-tratados por PHA-PHS durante a hidrólise enzimática foram avaliados pela ANOVA e apresentaram diferença significativa no nível de confiança de 95,0%.

Em relação a taxa inicial de hidrólise máxima (dG/dt), que ocorre nas primeiras 12 h (concentração de glicose *versus* tempo), mostrada na Figura 4.6, para a fibra de coco maduro e casca de coco maduro foram 1,49 g/(L.h) e 1,43 g/(L.h), respectivamente. A casca de coco verde e cacto tiveram a taxa inicial de hidrólise de 1,28 g/(L.h) e 1,04 g/(L.h), respectivamente. Ruiz *et al.* (2012) relataram a taxa inicial de hidrólise da palha de trigo pré-tratada por autohidrólise de 0,47 g/(L.h), utilizando 30 FPU/g de celulose. Esses resultados demonstram a susceptibilidade dos materiais pré-tratados por PHA-PHS ao ataque enzimático.

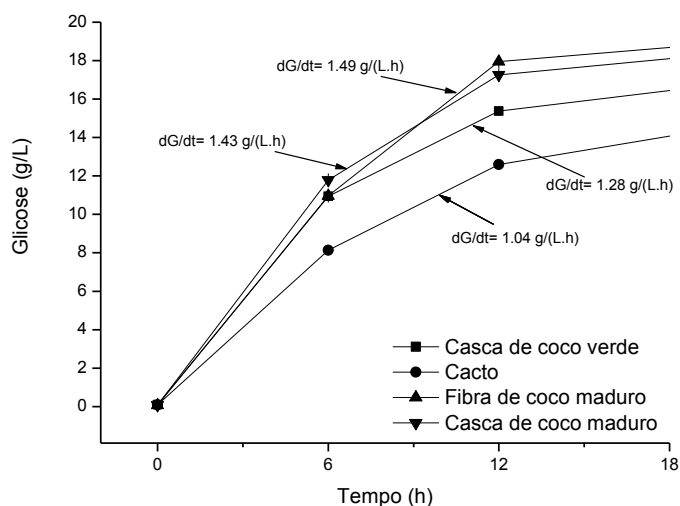


Figura 4.6. Taxa inicial de hidrólise dos materiais pré-tratados por PHA-PHS

Os resultados obtidos durante as hidrólises enzimáticas (Figura 4.5) enfatizam que as maiores conversões dos materiais pré-tratados em glicose ocorreram com os materiais que apresentaram maiores índices de cristalinidade (conforme Tabelas 4.2 e 4.3). De acordo com Kim *et al.* (2012), o aumento na cristalinidade do material pode proporcionar maior digestibilidade, devido a maior exposição da parte cristalina na superfície do material.

4.3. Materiais lignocelulósicos pré-tratados por autohidrólise (PA) visando à produção de etanol

4.3.1. Caracterização dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

4.3.1.1. Composição dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

Os materiais pré-tratados por PA apresentaram modificações significativas nas composições químicas após serem submetidos ao pré-tratamento (Tabela 4.4), com destaque para os materiais submetidos ao fator de severidade de 4,64 (200 °C e 50 min), os quais apresentaram maiores modificações nas composições químicas, em comparação aos materiais *in natura*. A fibra de coco maduro apresentou aumento de celulose de 40,55%, redução de hemicelulose de 50,16% e aumento de lignina de 19,10%. A casca de coco maduro apresentou aumento de celulose de 48,55%,

redução de hemicelulose de 74,71% e aumento de lignina de 16,43%. A casca de coco verde apresentou aumento de celulose de 23,38%, redução de hemicelulose de 72,27% e aumento de lignina de 62,26%. O cacto apresentou aumento de celulose de 35,39%, redução de hemicelulose de 76,77% e aumento de lignina de 37,72%. Além disso, os materiais submetidos ao pré-tratamento PA utilizando o maior fator de severidade (4,64) obteve-se composição de celulose em cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro de 51,61%, 41,96%, 45,23% e 43,94% (Tabela 4.4), respectivamente. Os materiais pré-tratados apresentaram redução de hemicelulose, aumento de celulose e lignina. Segundo Ruiz *et al.* (2013), esses aspectos são estratégicos para o fracionamento do material, pois permitem solubilizar a hemicelulose e enriquece o material de celulose e lignina.

Tabela 4.4. Composições e rendimentos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

A

Ro	Experimento	Fase sólida (%)				
		Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
0,00	<i>In natura</i>	100,00 ± 0,00	32,18 ± 0,12	27,81 ± 0,74	25,02 ± 0,01	3,31 ± 0,02
2,76	1	92,74 ± 0,50	32,54 ± 0,51	29,15 ± 0,46	29,29 ± 0,15	1,59 ± 0,07
3,24	2	82,70 ± 0,74	33,86 ± 0,37	19,48 ± 0,05	28,20 ± 0,25	1,60 ± 0,16
3,46	3	83,90 ± 1,28	34,59 ± 0,21	19,46 ± 0,21	26,66 ± 0,41	2,60 ± 0,16
3,94	4	90,80 ± 0,42	36,35 ± 0,12	17,41 ± 0,03	28,12 ± 0,16	1,98 ± 0,04
4,42	5	75,41 ± 0,33	42,55 ± 0,04	16,67 ± 0,12	28,68 ± 0,32	1,67 ± 0,19
4,64	6	76,89 ± 0,87	45,23 ± 0,23	13,86 ± 0,06	29,80 ± 0,25	1,35 ± 0,02
3,35	7	81,70 ± 1,81	34,52 ± 0,56	17,80 ± 0,14	27,01 ± 0,20	1,18 ± 0,03
4,05	8	87,38 ± 1,12	39,98 ± 0,24	18,73 ± 0,15	28,37 ± 0,40	2,53 ± 0,07
3,83	9	85,82 ± 0,40	39,53 ± 0,15	19,46 ± 0,01	27,44 ± 0,08	2,02 ± 0,02
3,83	10	87,72 ± 0,33	39,85 ± 0,15	19,82 ± 0,01	27,48 ± 0,08	2,46 ± 0,03

R₀: fator de severidade

B

Ro	Experimento	Fase sólida (%)				
		Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
0,00	<i>In natura</i>	100,00 ± 0,00	29,58 ± 0,50	27,77 ± 0,79	31,04 ± 0,10	3,84 ± 0,08
2,76	1	90,85 ± 0,09	30,35 ± 0,17	22,59 ± 0,02	29,13 ± 0,47	1,55 ± 0,11
3,24	2	88,51 ± 0,19	32,50 ± 0,52	31,64 ± 1,26	27,53 ± 0,49	0,82 ± 0,20
3,46	3	86,38 ± 0,44	32,53 ± 0,27	31,97 ± 0,24	29,23 ± 0,40	0,89 ± 0,05
3,94	4	87,63 ± 0,59	32,70 ± 0,59	26,49 ± 0,49	31,48 ± 0,22	0,68 ± 0,06
4,42	5	65,82 ± 0,20	41,21 ± 0,11	12,47 ± 0,15	34,39 ± 0,09	0,73 ± 0,03
4,64	6	60,03 ± 0,02	43,94 ± 0,53	7,01 ± 0,05	36,14 ± 0,05	0,71 ± 0,07
3,35	7	89,56 ± 0,31	32,19 ± 0,52	30,29 ± 0,17	24,70 ± 0,20	0,90 ± 0,10
4,05	8	73,92 ± 0,47	32,26 ± 0,41	21,66 ± 0,53	31,28 ± 0,03	0,69 ± 0,10
3,83	9	83,06 ± 0,15	36,52 ± 0,18	32,49 ± 0,13	28,93 ± 0,13	0,68 ± 0,11
3,83	10	83,56 ± 0,84	34,74 ± 0,12	30,04 ± 0,09	28,64 ± 0,41	0,63 ± 0,13

R₀: fator de severidade**C**

Ro	Experimento	Fase sólida (%)				
		Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
0,00	<i>In natura</i>	100,00 ± 0,00	33,23 ± 0,24	29,14 ± 0,22	25,44 ± 0,12	2,34 ± 0,11
2,76	1	89,43 ± 1,40	30,65 ± 0,03	21,40 ± 0,04	32,15 ± 0,47	1,71 ± 0,05
3,24	2	86,83 ± 0,53	32,07 ± 0,08	21,10 ± 0,07	30,93 ± 0,38	1,52 ± 0,29
3,46	3	84,44 ± 0,36	33,11 ± 0,12	19,87 ± 0,04	34,00 ± 0,43	1,73 ± 0,02
3,94	4	86,46 ± 0,72	32,14 ± 0,17	21,11 ± 0,01	31,05 ± 0,32	0,70 ± 0,42
4,42	5	75,03 ± 0,20	38,57 ± 0,10	14,55 ± 0,06	37,58 ± 0,10	1,06 ± 0,23
4,64	6	67,36 ± 0,44	41,96 ± 0,10	8,08 ± 0,10	41,28 ± 0,87	1,22 ± 0,04
3,35	7	89,77 ± 1,60	30,64 ± 0,09	21,07 ± 0,04	30,36 ± 0,40	1,88 ± 0,31
4,05	8	76,45 ± 1,13	35,92 ± 0,07	16,83 ± 0,11	33,92 ± 0,03	0,77 ± 0,01
3,83	9	82,56 ± 0,54	33,52 ± 0,21	19,30 ± 0,12	34,80 ± 0,26	1,41 ± 0,05
3,83	10	82,38 ± 1,60	34,01 ± 0,14	19,22 ± 0,22	34,22 ± 0,31	1,52 ± 0,30

R₀: fator de severidade**D**

Ro	Experimento	Fase sólida (%)				
		Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
0,00	<i>In natura</i>	100,00 ± 0,00	38,12 ± 0,75	23,50 ± 0,42	19,51 ± 0,13	5,64 ± 0,21
2,76	1	62,29 ± 0,87	39,59 ± 0,17	13,22 ± 0,05	26,73 ± 0,23	9,37 ± 0,22
3,24	2	53,15 ± 0,14	40,43 ± 0,18	11,01 ± 0,31	23,87 ± 0,31	10,62 ± 0,26
3,46	3	52,71 ± 0,78	39,95 ± 0,50	11,74 ± 0,05	26,90 ± 0,31	11,47 ± 0,41
3,94	4	56,14 ± 0,85	38,94 ± 0,25	11,87 ± 0,11	22,12 ± 0,21	10,45 ± 0,34
4,42	5	42,92 ± 1,28	48,82 ± 0,15	9,88 ± 0,33	27,11 ± 0,08	11,37 ± 0,31
4,64	6	42,33 ± 0,47	51,61 ± 0,04	5,46 ± 0,17	26,87 ± 0,06	12,25 ± 0,72
3,35	7	56,65 ± 0,09	36,67 ± 1,96	12,89 ± 0,03	21,34 ± 0,26	11,30 ± 0,29
4,05	8	44,71 ± 0,54	43,65 ± 0,52	10,92 ± 0,10	21,85 ± 0,11	10,34 ± 0,16
3,83	9	47,11 ± 0,73	42,65 ± 1,05	12,00 ± 0,08	21,89 ± 0,35	11,56 ± 0,38
3,83	10	46,81 ± 0,65	41,83 ± 0,04	11,45 ± 0,13	22,22 ± 0,24	10,89 ± 0,76

R₀: fator de severidade

Segundo Ballesteros *et al.* (2002) o aumento na degradação da hemicelulose de resíduo agrícola acontece em altas temperaturas e elevados tempos de residência, portanto, os maiores fatores de severidades no pré-tratamento proporcionaram

maiores reduções de hemicelulose. Resultados similares foram obtidos neste trabalho. Além disso, Kristensen *et al.* (2008) e Ruiz *et al.* (2013) relatam a realocização da lignina na superfície do material lignocelulósico promovido pelo pré-tratamento PA. Assim, a acessibilidade das enzimas ao material pré-tratado é favorecido, aumentando a hidrólise da celulose (Ruiz *et al.*, 2013). Além das mudanças físicas que melhoram a hidrólise enzimática, como o aumento da porosidade e da área superficial (Liu e Wyman, 2005; Cybulska *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012).

4.3.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV estão apresentadas na Figura 4.7, as quais permitem verificar os efeitos causados pelo pré-tratamento PA (200 °C e 50 min) sobre a casca de coco verde (material selecionado para a produção de etanol). A amostra de casca de coco verde *in natura* apresentou superfície rígida, fibras intactas e altamente ordenadas (Figura 4.7A). No entanto, a casca de coco verde pré-tratada por PA mostra estrutura modificada, fibras separadas e desordenadas (Figura 4.7B). Aparências similares foram obtidas pela casca de coco verde pré-tratadas por PHA e PHA-PHS (conforme Figura 4.2: 2B e 2C). Essas características estruturais podem proporcionar maior susceptibilidade da casca de coco verde pré-tratada a hidrólise enzimática.

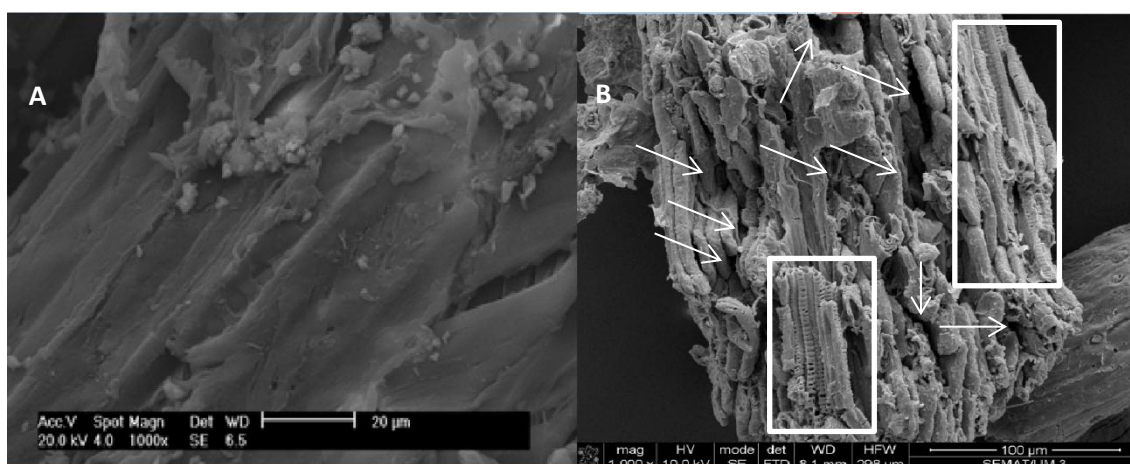


Figura 4.7. MEV da casca de coco verde. (A) Casca de coco verde *in natura*; (B) Casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min)

4.3.1.3. Análise da difração de raios-X e índice de cristalinidade

A análise de difração de raios-X e a determinação do índice de cristalinidade foram realizadas na casca de coco verde *in natura* e pré-tratada visando analisar a estrutura cristalina.

A casca de coco verde apresentou índice de cristalinidade no material *in natura* e pré-tratada por PA (200 °C e 50 min) de 29,31% e 43,47%, respectivamente (Figura 4.8), mostrando aumento no índice de cristalinidade da casca de coco verde pré-tratada por PA em relação ao material *in natura*. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pela casca de coco verde pré-tratadas por PHA (49,18%) e PHA-PHS (49,89%), os quais apresentaram aumento nos índices de cristalinidade dos materiais pré-tratados em relação ao material *in natura* (29,31%). Além dos resultados obtidos por Thompson e Chen (1992) sobre a madeira mista nativa pré-tratada por PA, que resultou em índice de cristalinidade de 78,1%, 85,2% e 85,8%, nos materiais pré-tratados a 240, 260 e 280 °C, respectivamente. A madeira mista nativa *in natura* possui índice de cristalinidade de 71,6%. Recentemente, Xu *et al.* (2013) relataram que o pré-tratamento do material por PA proporciona redução de sólido, remoção da parte amorfa, aumento da cristalinidade e área superficial.

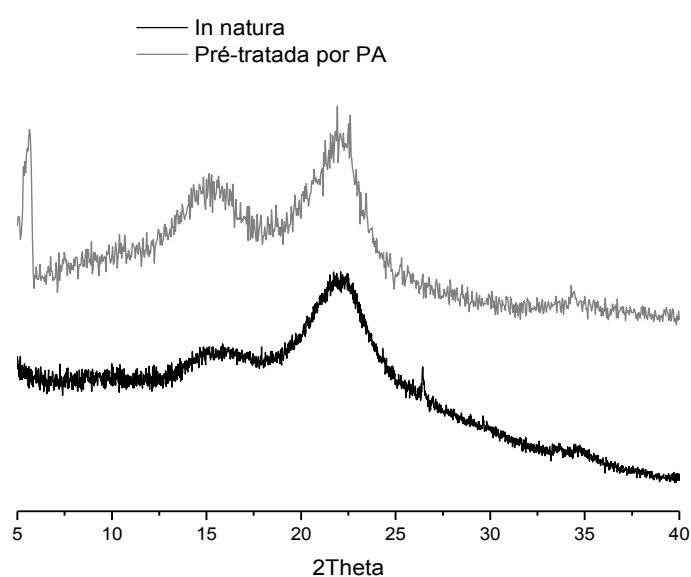


Figura 4.8. Difração de raios-X da casca de coco verde *in natura* e pré-tratada por PA (200 °C e 50 min)

4.3.2. Planejamento experimental e análise estatística

O planejamento experimental foi realizado com intuito de verificar as variáveis que interferem no pré-tratamento dos materiais e influenciam no teor de celulose contida nos materiais pré-tratados por PA. As condições utilizadas no planejamento experimental foram temperatura (160, 180 e 200 °C) e tempo (10, 30 e 50 min).

Os efeitos proporcionados pelo pré-tratamento PA são visualizados nos gráficos de Pareto (Figura 4.9A-D), onde se notam as influências das variáveis temperatura e tempo sobre os materiais pré-tratados.

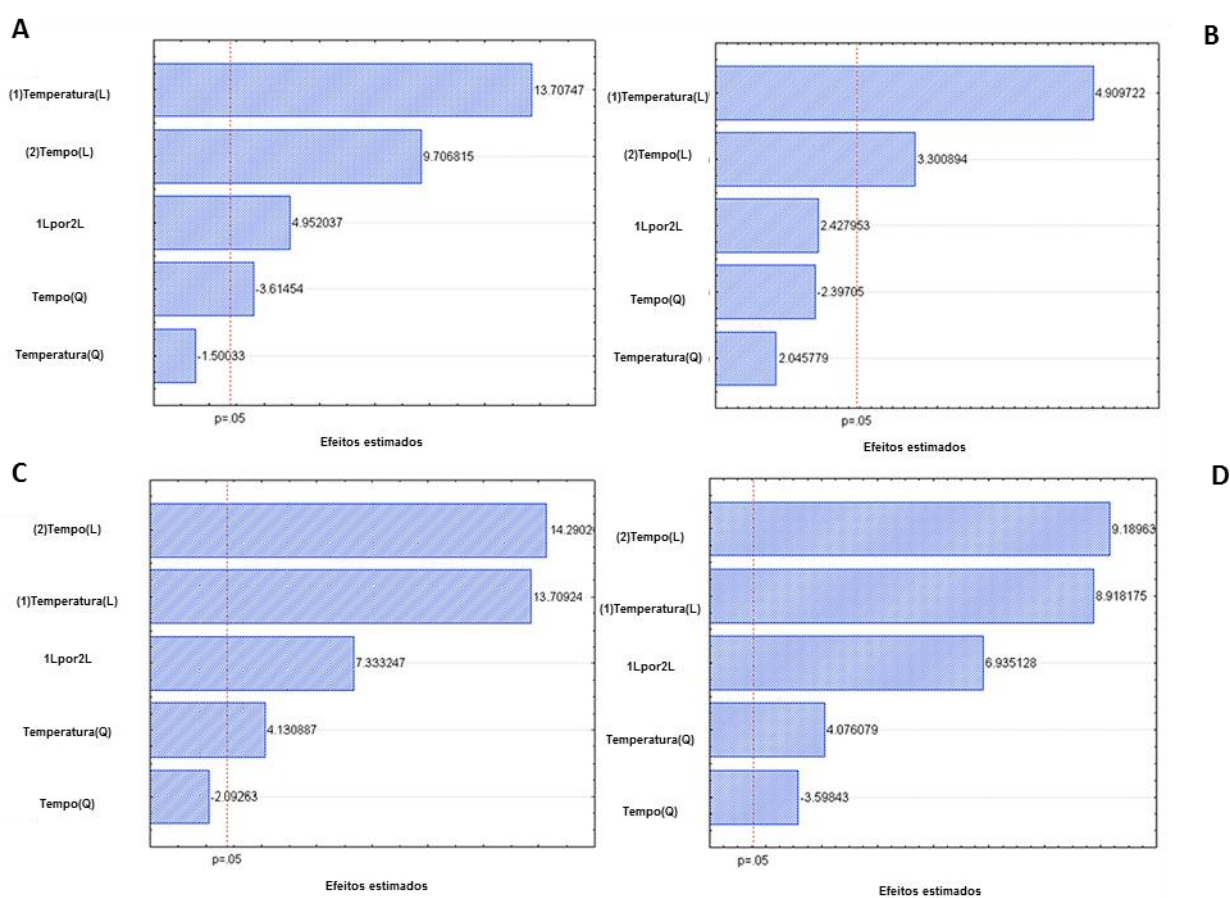


Figura 4.9. Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados de temperatura e tempo dos materiais pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

De acordo com os resultados de ANOVA para o rendimento de celulose nos materiais pré-tratados por PA (Tabela 4.4A-D), as variáveis lineares X_1 e X_2 são termos que possuem efeito significativo sobre as respostas de celulose em nível de

confiança de 95,0%. Tendo-se que os efeitos da temperatura e tempo são positivos (Figura 4.10A-D). Os termos quadráticos X_2^2 e a interação X_1X_2 são importantes para o rendimento da celulose na fibra de coco maduro, e a quadrática X_1^2 e a interação X_1X_2 para a casca de coco verde, e as quadráticas X_1^2 , X_2^2 e a interação X_1X_2 para o cacto (Tabela 4.5A-D).

Tabela 4.5. ANOVA dos materiais pré-tratados por PA baseado no teor de celulose em função da temperatura (X_1) e tempo (X_2). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

A

Fonte	Soma quadrática	d.f.	Média quadrática	Valor F	Valor p
X_1	89,17	1	89,17	187,89	0,00016 *
X_1^2	44,71	1	1,06	2,25	0,20791
X_2	11,63	1	44,71	94,22	0,00063 *
X_2^2	1,06	1	6,20	13,06	0,02246 *
X_1X_2	6,02	1	11,63	24,52	0,00775 *
Erro puro	1,89	4	0,47		
Total	155,78	9			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 65,49.

Ftabelado: 6,26.

B

Fonte	Soma quadrática	d.f.	Média quadrática	Valor F	Valor p
X_1	84,17	1	84,17	24,10	0,00798 *
X_1^2	14,61	1	14,61	4,18	0,11021
X_2	38,04	1	38,04	10,89	0,02990 *
X_2^2	20,06	1	20,06	5,74	0,07459
X_1X_2	20,58	1	20,58	5,89	0,07214
Erro puro	13,96	4	3,49		
Total	186,56	9			

d.f.: grau de liberdade

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 9,89.

Ftabelado: 6,26.

C

Fonte	Soma quadrática	d.f.	Média quadrática	Valor F	Valor p
X_1	47,30	1	47,30	187,94	0,00016 *
X_1^2	4,29	1	4,29	17,06	0,01448 *
X_2	51,39	1	51,39	204,21	0,00013 *
X_2^2	1,10	1	1,10	4,37	0,10452
X_1X_2	13,53	1	13,53	53,77	0,00184 *
Erro puro	1,00	4	0,25		
Total	118,04	9			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 93,63.

Ftabelado: 6,26.

D

Fonte	Soma quadrática	d.f.	Média quadrática	Valor F	Valor p
X_1	62,8302	1	62,8301	79,5338	0,00087 *
X_1^2	13,1251	1	13,1250	16,6144	0,01514 *
X_2	66,7133	1	66,7133	84,4493	0,00077 *
X_2^2	10,2291	1	10,2291	12,9486	0,02279 *
X_1X_2	37,9949	1	37,9949	48,0960	0,00227 *
Erro puro	3,1599	4	0,7899		
Total	190,7472	9			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 47,50.

Ftabelado: 6,26.

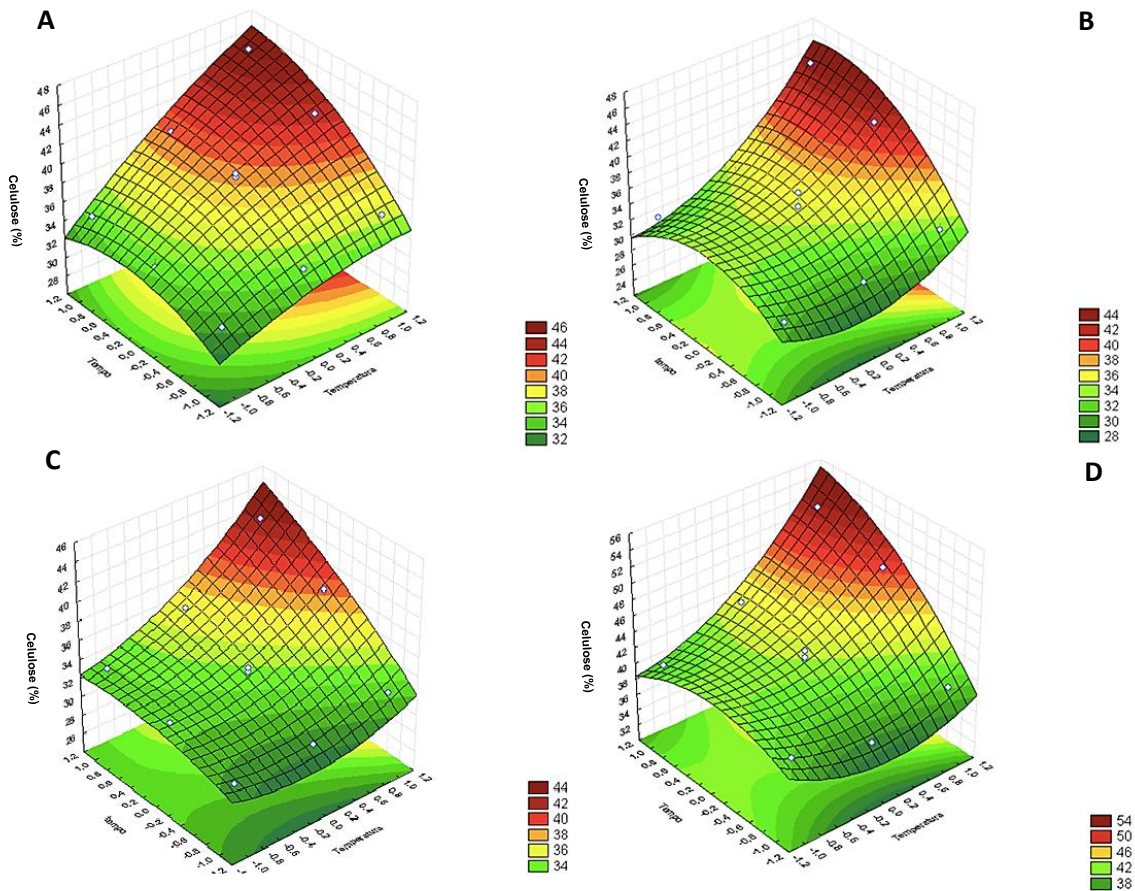


Figura 4.10. Gráficos de superfície de resposta e contorno dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA relacionado à variação de celulose (%) em função da temperatura e tempo. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; D) Cacto

O rendimento de celulose foi representado graficamente em função da temperatura e tempo (Figura 4.10) e apresentam aumento no rendimento de celulose correlacionado aos aumentos de temperatura e tempo durante o pré-tratamento PA

sobre os materiais. Nesse caso, observa-se maior porcentagem de celulose quando se utiliza o cacto, os demais resíduos apresentam resultados próximos entre si. Portanto, as variáveis de temperatura e tempo influenciam no teor de celulose contida nos materiais pré-tratados (conforme Figuras 4.9 e 4.10) e esses dados corroboram com as composições químicas dos materiais (conforme Tabela 4.4), observando-se que o aumento na temperatura e tempo do pré-tratamento proporciona aumento no teor de celulose no material, além de também promover redução da hemicelulose.

A análise de regressão múltipla e ANOVA dos dados experimentais foram realizadas para o ajuste do modelo matemático. Os modelos em termos de valores codificados (Tabela 3.1), expressos nas Equações 4.1 a 4.4 para a fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto, respectivamente, pré-tratados por PA, em função da temperatura (X_1) e tempo (X_2).

$$\begin{aligned} \text{Fibra de coco maduro} = \% \text{ Celulose} &= 39,28 + 3,85*X_1 - 0,67*X_1^2 \\ &+ 2,73*X_2 - 1,63*X_2^2 + 1,70*X_1*X_2 \quad (R^2 = 0,9878; R^2_{adj} = 0,9725) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.1)}$$

$$\begin{aligned} \text{Casca de coco maduro} = \% \text{ Celulose} &= 34,99 + 3,74*X_1 + 2,5*X_1^2 \\ &+ 2,51*X_2 - 2,93*X_2^2 + 2,26*X_1*X_2 \quad (R^2 = 0,9251; R^2_{adj} = 0,9115) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.2)}$$

$$\begin{aligned} \text{Casca de coco verde} = \% \text{ Celulose} &= 33,85 + 2,80*X_1 + 1,35*X_1^2 \\ &+ 2,92*X_2 - 0,68*X_2^2 + 1,83*X_1*X_2 \quad (R^2 = 0,9914; R^2_{adj} = 0,9808) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.3)}$$

$$\begin{aligned} \text{Cacto} = \% \text{ Celulose} &= 42,24 + 3,23*X_1 + 2,37*X_1^2 + 3,33*X_2 - 2,09*X_2^2 \\ &+ 3,08*X_1*X_2 \quad (R^2 = 0,9834; R^2_{adj} = 0,9627) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.4)}$$

As Equações 4.1 a 4.4 revelaram que os modelos polinomiais de segunda ordem representam adequadamente as respostas de rendimento de celulose com coeficientes de determinação R^2 , o que indica que 98,8%, 92,5%, 99,4% e 98,3% da

variabilidade de respostas poderiam ser explicadas pelos modelos. Esses valores estão de acordo com o coeficiente de determinação ajustado $R^2_{adj} = 0,973, 0,912, 0,980$ e $0,963$.

A Figura 4.11 mostra os valores previstos *versus* valores observados pelo modelo de aplicação por regressão múltipla e observa-se a boa qualidade do ajuste.

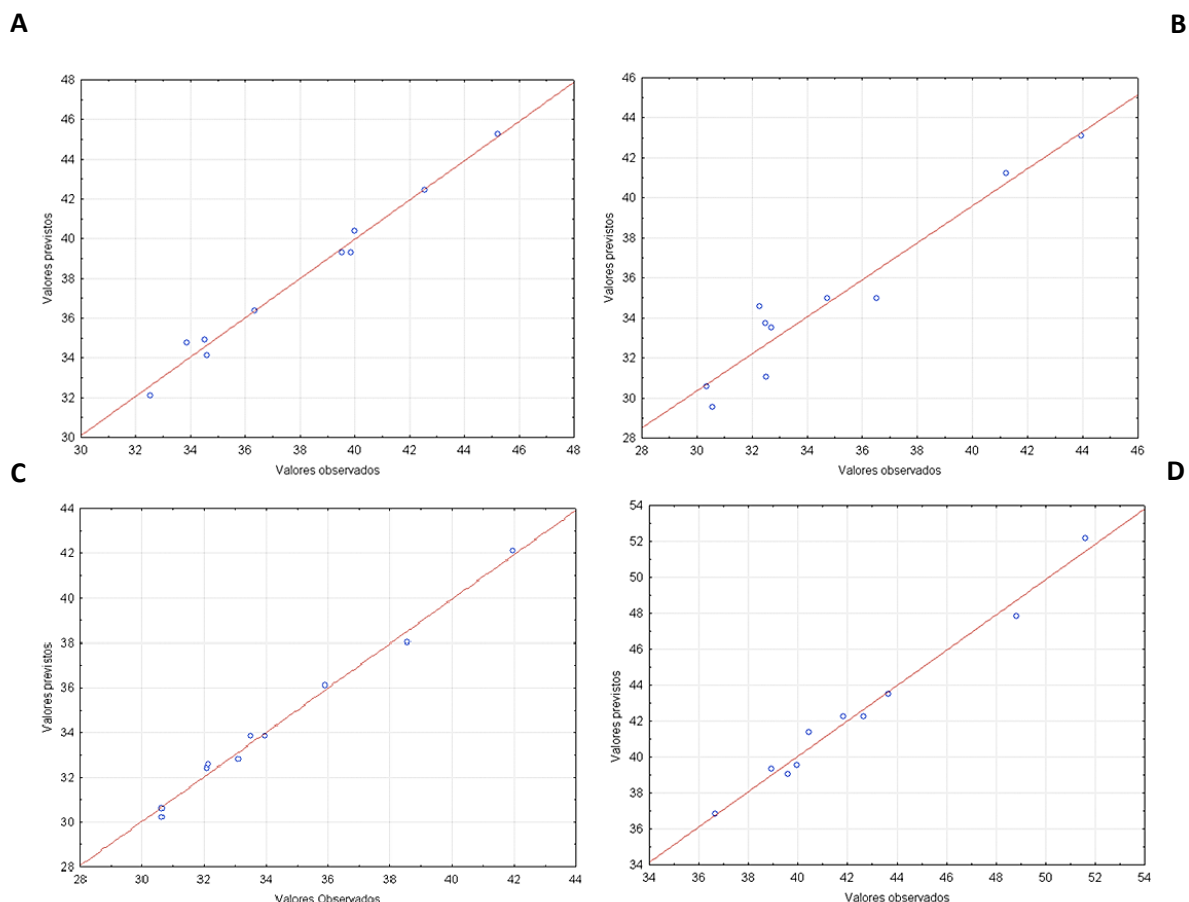


Figura 4.11. Gráficos de valores previstos *versus* valores observados de celulose (%) oriundos dos materiais pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

4.3.3. Caracterização dos licores

4.3.3.1. Composição dos licores resultantes dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por PA

Os materiais submetidos ao pré-tratamento geraram uma suspensão aquosa e a filtração dessa suspensão foi separada nas fases sólida e líquida (licor). Os licores

resultantes da fibra de coco maduro, casca de coco maduro e casca de coco verde pré-tratadas por PA apresentaram variações de pH de 32,48%, 37,62% e 30,77%, respectivamente. Essas variações de pH no licor são oriundas do aumento da severidade do pré-tratamento, gerando maior quantidade de ácido acético. Os licores do cacto pré-tratado por PA apresentaram baixa variações de pH (7,32%), entretanto, os valores de pH dos licores do cacto foram próximos dos valores mínimos de pH encontrados nos demais materiais pré-tratados (Tabela 4.6), esse fato, indica a alta sensibilidade do cacto aos fatores de severidade utilizados no pré-tratamento.

A fibra de coco maduro pré-tratada por PA apresentou as maiores concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural nos licores de 0,13, 1,77, 1,09, 0,86, 0,09 e 0,76 g/L, respectivamente. Para a casca de coco maduro pré-tratada por PA, obteve-se as maiores concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural de 0,16, 1,90, 0,47, 1,29, 0,11 e 0,83 g/L, respectivamente. Com relação à casca de coco verde pré-tratada por PA, obteve-se as maiores concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural de 0,17, 3,03, 0,94, 1,18, 0,08 e 0,86 g/L, respectivamente. O cacto pré-tratado por PA, forneceu as maiores concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, HMF e furfural de 2,87, 3,75, 1,29, 1,06, 0,54 e 0,94 g/L, respectivamente (Tabela 4.6). As maiores concentrações foram obtidas nos licores de cacto, indicando-se a maior sensibilidade do cacto ao pré-tratamento PA.

Tabela 4.6. Composições dos licores obtidos dos materiais pré-tratados por PA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

A

Ro	Experimento	pH	Fase líquida (g/L)									
			Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	HMF	Furfural	[GO]	[XO]	[ArO]	[AcO]
2,76	1	5,85	0,13	1,16	0,11	0,25	0,00	0,10	0,39	1,80	1,22	2,79
3,24	2	5,00	0,12	1,17	0,30	0,12	0,02	0,16	0,44	2,44	1,51	3,47
3,46	3	4,70	0,13	1,22	0,67	0,37	0,04	0,18	0,43	2,68	1,99	2,84
3,94	4	4,80	0,12	1,20	0,39	0,32	0,03	0,18	0,45	2,59	1,42	2,84
4,42	5	4,30	0,13	1,46	1,09	0,60	0,09	0,32	0,58	4,89	1,53	3,00
4,64	6	3,95	0,12	1,77	0,46	0,86	0,06	0,76	0,56	4,99	1,21	3,10
3,35	7	5,30	0,13	1,17	0,16	0,27	0,01	0,18	0,43	2,10	1,31	2,78
4,05	8	4,40	0,13	1,35	0,11	0,50	0,07	0,24	0,55	4,26	1,85	2,98
3,83	9	4,55	0,12	1,25	0,69	0,37	0,04	0,18	0,49	2,65	1,85	2,86
3,83	10	4,55	0,13	1,28	0,97	0,43	0,06	0,20	0,51	3,18	2,17	2,94

R₀: fator de severidade; HMF: hidroximetilfurfural; GO: glicooligossacarídeos; XO: xilooligossacarídeos; ArO: arabinooligossacarídeos; AcO: grupo acetyl ligados aos oligossacarídeos.

B

Ro	Experimento	pH	Fase líquida (g/L)									
			Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	HMF	Furfural	[GO]	[XO]	[ArO]	[AcO]
2,76	1	5,45	0,13	1,17	0,11	0,27	0,02	0,18	0,42	2,04	1,18	2,79
3,24	2	4,65	0,13	1,18	0,18	0,30	0,02	0,18	0,43	2,53	1,21	2,75
3,46	3	4,40	0,14	1,20	0,26	0,33	0,02	0,18	0,49	3,37	1,28	2,93
3,94	4	4,70	0,14	1,21	0,19	0,30	0,03	0,18	0,40	2,63	1,18	2,78
4,42	5	3,70	0,15	1,90	0,41	0,69	0,05	0,52	0,54	16,52	1,20	4,39
4,64	6	3,40	0,16	1,41	0,36	1,29	0,11	0,83	0,61	13,55	1,01	4,31
3,35	7	5,10	0,13	1,16	0,13	0,27	0,02	0,16	0,39	2,07	1,16	2,72
4,05	8	3,80	0,16	1,47	0,47	0,53	0,03	0,30	0,48	11,35	1,15	3,83
3,83	9	4,20	0,14	1,23	0,32	0,37	0,02	0,19	0,45	6,85	1,24	3,08
3,83	10	4,15	0,14	1,24	0,34	0,37	0,02	0,21	0,50	5,52	1,27	3,12

R₀: fator de severidade; HMF: hidroximetilfurfural; GO: glicooligossacarídeos; XO: xilooligossacarídeos; ArO: arabinooligossacarídeos; AcO: grupo acetyl ligados aos oligossacarídeos.

C

Ro	Experimento	pH	Fase líquida (g/L)									
			Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	HMF	Furfural	[GO]	[XO]	[ArO]	[AcO]
2,76	1	5,20	0,13	1,15	0,16	0,33	0,01	0,16	0,38	1,85	1,24	2,78
3,24	2	4,45	0,13	1,18	0,40	0,29	0,02	0,16	0,46	2,92	1,64	2,88
3,46	3	4,15	0,13	1,21	0,56	0,32	0,02	0,18	0,51	4,15	2,23	3,05
3,94	4	4,25	0,13	1,20	0,39	0,30	0,02	0,18	0,49	3,27	1,60	2,89
4,42	5	3,80	0,14	1,79	0,93	0,62	0,05	0,38	0,61	11,56	1,20	3,93
4,64	6	3,60	0,17	3,03	0,53	1,18	0,08	0,86	0,65	11,03	1,12	3,76
3,35	7	4,65	0,14	1,16	0,18	0,26	0,04	0,18	0,42	3,10	1,33	2,82
4,05	8	3,90	0,13	1,50	0,94	0,48	0,03	0,32	0,61	9,27	1,59	3,64
3,83	9	4,10	0,13	1,26	0,66	0,36	0,04	0,18	0,51	5,39	1,54	3,09
3,83	10	4,00	0,13	1,28	0,70	0,38	0,04	0,20	0,55	5,68	1,67	3,15

R₀: fator de severidade; HMF: hidroximetilfurfural; GO: glicooligossacarídeos; XO: xilooligossacarídeos; ArO: arabinooligossacarídeos; AcO: grupo acetyl ligados aos oligossacarídeos.

D

Ro	Experimento	pH	Fase líquida (g/L)									
			Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	HMF	Furfural	[GO]	[XO]	[ArO]	[AcO]
2,76	1	4,10	1,73	1,72	0,16	0,27	0,06	0,22	0,22	3,67	1,96	0,28
3,24	2	4,00	2,67	2,84	0,53	0,35	0,08	0,24	2,49	7,56	5,12	0,94
3,46	3	3,90	2,52	2,77	0,87	0,58	0,23	0,22	3,30	6,89	4,51	0,90
3,94	4	4,10	1,74	3,01	0,45	0,34	0,21	0,20	3,52	5,14	3,33	0,62
4,42	5	4,00	2,43	3,75	1,09	0,78	0,44	0,70	5,46	5,06	0,73	1,30
4,64	6	3,80	2,72	3,71	1,29	1,06	0,54	0,94	5,96	5,47	0,23	1,20
3,35	7	4,10	2,79	2,83	1,10	0,31	0,21	0,38	5,07	6,20	3,62	0,50
4,05	8	3,90	2,87	2,87	1,05	0,67	0,41	0,38	6,34	7,15	2,82	1,53
3,83	9	4,00	2,36	2,78	1,07	0,51	0,24	0,24	5,84	7,26	4,01	0,96
3,83	10	3,90	2,16	3,05	1,11	0,52	0,27	0,26	5,92	7,75	3,60	0,87

R₀: fator de severidade; HMF: hidroximetilfurfural; GO: glicooligossacarídeos; XO: xilooligossacarídeos; ArO: arabinooligossacarídeos; AcO: grupo acetil ligados aos oligossacarídeos.

Os materiais pré-tratados por PA apresentaram correlações entre as reduções de pH dos licores e o aumento nas concentrações de xilose, arabinose, ácido acético, HMF, furfural, GO (glicooligossacarídeos), XO (xilooligossacarídeos), ArO (arabinooligossacarídeos) e AcO (grupo acetil ligados aos oligossacarídeos) nos licores. Cybulska *et al.* (2010) relatam a importância de se monitorar e controlar o pH para maximizar a solubilização da fração hemicelulósica do material. Cara *et al.* (2007) relataram a redução de pH dos licores oriundos de materiais pré-tratados por PA, correlacionado ao aumento na concentração de produto da degradação da hemicelulose (furfural). Esses resultados foram similares aos resultados obtidos neste trabalho (Tabela 4.6).

Os licores da casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro apresentaram aumento nas concentrações de xilose, arabinose, ácido acético, HMF, furfural, XO e AcO, conseqüentemente, maiores concentrações de açúcares totais quando submetidos aos maiores fatores de severidades. Além disso, apresentaram maiores concentrações de oligossacarídeos em comparação aos monossacarídeos a partir do aumento do fator de severidade. Esses resultados também são correlacionados à redução de pH do licor. Reduzida quantidade de celulose ou hemicelulose foi degradada em GO oriundo da casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro. Resultados similares foram obtidos em palha de centeio pré-tratada por PA (Gullón *et al.*, 2010). Os licores de cacto

apresentaram maiores concentrações de açúcares monoméricos, ácido acético, HMF, furfural, GO e ArO relacionados ao aumento do fator de severidade. Esses resultados também foram correlacionados a redução de pH.

Os oligossacarídeos e monossacarídeos presentes nos licores podem ser utilizados em processos biotecnológicos e tecnológicos, porém, possivelmente será necessário concentrá-los. Moure *et al.* (2006) relatam a possibilidade de uso desses açúcares nas indústrias farmacêuticas e alimentares. Além da possibilidade de uso desses açúcares nas produções de etanol e xilitol, porém, possivelmente será necessária a etapa de hidrólise enzimática sobre os oligômeros. Há também a possibilidade de aproveitar o ácido acético presente no licor.

4.3.4. Hidrólise enzimática

Os materiais utilizados no processo de hidrólise enzimática foram selecionados de acordo com o teor de celulose presente na fase sólida após o pré-tratamento PA (Tabela 4.4 e Figura 4.10). Dessa forma, foram selecionados os materiais submetidos ao fator de severidade de $R_0 = 4,64$ (200 °C e 50 min), os quais resultaram na composição de celulose em cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro de 51,61%, 41,96%, 45,23% e 43,94%, respectivamente (conforme Tabela 4.4).

As conversões de cacto, casca de coco verde, fibra de coco maduro e casca de coco maduro em glicose foram 90,91% (0,43 g glicose/g material), 92,52% (0,43 g glicose/g material), 84,10% (0,42 g glicose/g material) e 89,20% (0,43 g glicose/g material), em 96 h de hidrólise enzimática, respectivamente (Figura 4.12). Os resultados obtidos nas hidrólises enzimáticas dos materiais pré-tratados por PA foram avaliados pela ANOVA e apresentaram diferença significativa no nível de confiança de 95,0%.

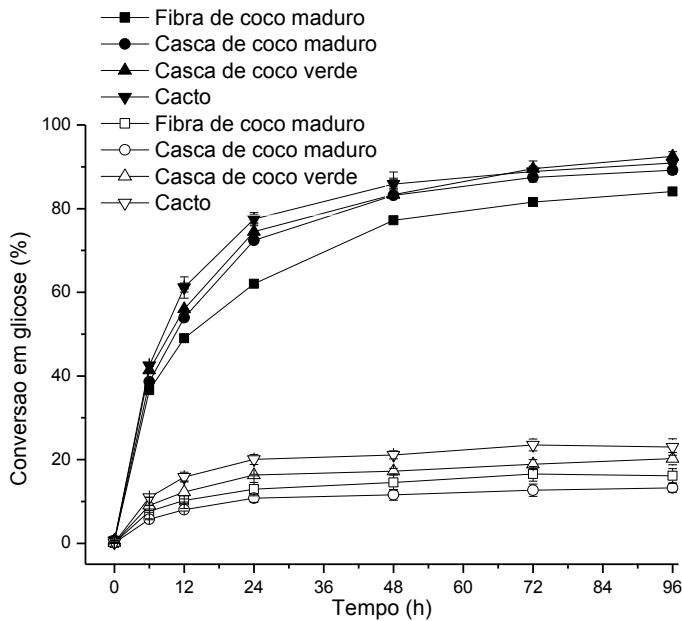


Figura 4.12. Conversão em glicose dos materiais pré-tratados por PA (200 °C e 50 min). Os materiais pré-tratados estão representados pelo ícone preto e os materiais *in natura* estão representados pelo ícone branco

Os resultados apresentados na Figura 4.12 evidenciam acessibilidades dos materiais pré-tratados por PA ao ataque enzimático. E os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os resultados relatados por alguns autores, como Cybulska *et al.* (2010) usando *S. pectinata* pré-tratada por PA (210 °C por 10 min), obtendo conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 97,96%, em 72 h. Romaní *et al.* (2010) usando *E. globulus* pré-tratado por PA (200 °C), obtendo conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 65,0%, em 96 h. Ruiz *et al.* (2012) usando palha de trigo pré-tratada por PA (180 °C por 30 min), obtendo conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 90,88%, em 96 h. Manzanares *et al.* (2011) usando resíduos de poda de oliveira pré-tratada por PA (210 °C por 10 min), obtendo conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 65,0%, em 72 h. Ding *et al.* (2012) usando a casca de coco submetida ao pré-tratamento térmico (autoclave a 121 °C durante 15 min), obtendo conversão em açúcares redutores durante a hidrólise enzimática de 0,12 g/g, em 48 h.

A casca de coco verde pré-tratada por PA apresentou maior conversão em glicose durante a hidrólise enzimática (92,52%), embora possua maior quantidade de

lignina entre os materiais utilizados (41,28%) (conforme Tabela 4.4), indicando a baixa influência dessa lignina contida no material pré-tratado por PA. Fato esse, influenciado pela realocação da lignina na superfície do material ocasionado pelo pré-tratamento PA (Kristensen *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2013).

Além disso, a fibra de coco maduro pré-tratada por PA apresentou a menor conversão em glicose durante a hidrólise enzimática em comparação aos demais materiais utilizados (84,10%), porém a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 por 1 h) apresentou a maior conversão em glicose na hidrólise enzimática em comparação aos demais materiais utilizados (76,21%). Esse fato evidencia a necessidade de avaliar o material lignocelulósico em mais de um pré-tratamento.

Em relação a taxa inicial de hidrólise (dG/dt), que ocorre nas primeiras 12 h (concentração de glicose *versus* tempo), mostrada na Figura 4.13, para a fibra de coco maduro e casca de coco maduro foram 0,82 g/(L.h) e 0,91 g/(L.h), respectivamente. A casca de coco verde e cacto tiveram a taxa inicial de hidrólise de 0,95 g/(L.h) e 1,03 g/(L.h), respectivamente. Esses materiais, quando pré-tratados por PHA-PHS (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 por 1 h) apresentaram maiores valores da taxa inicial de hidrólise máxima (conforme Figura 4.6), sendo para a fibra de coco maduro e casca de coco maduro de 1,49 g/(L.h) e 1,43 g/(L.h), respectivamente. Já a casca de coco verde e o cacto tiveram a taxa inicial de hidrólise de 1,28 g/(L.h) e 1,04 g/(L.h), respectivamente. Em comparação, Ruiz *et al.* (2012) relataram a taxa inicial de hidrólise da palha de trigo pré-tratada por PA de 0,47 g/(L.h), utilizando 30 FPU/g de celulose. Portanto, esses resultados demonstram a susceptibilidade dos materiais pré-tratados por PA ao ataque enzimático. Além disso, o cacto pré-tratado por PA apresentou a maior taxa inicial de hidrólise, quando comparado aos demais materiais pré-tratados por PA, porém consiste também no material com maior teor de celulose (51,61%) e menor teor de lignina (26,87%), possibilitando assim, a maior concentração de glicose inicial.

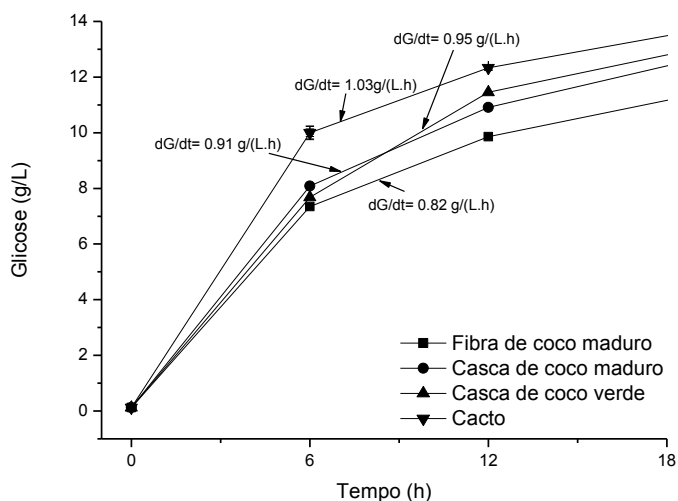


Figura 4.13. Taxa inicial de hidrólise dos materiais pré-tratados por PA (200 °C e 50 min)

4.4. Pré-tratamento hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio (PHCHS) sobre a fibra de coco maduro visando à produção de etanol

4.4.1. Caracterização da fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada

4.4.1.1. Composição da fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada

As composições químicas da fibra de coco maduro submetidas ao pré-tratamento de PHCHS estão apresentadas na Tabela 4.7, baseadas nas condições operacionais contidas na Tabela 3.3. A fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS apresentou modificação na composição química, em comparação a fibra de coco maduro *in natura*, observando-se aumento de celulose entre 28,40% e 131,20%, redução de hemicelulose entre 43,22% e 69,04% e redução de lignina entre 8,27% e 89,13%. Portanto, a fibra de coco maduro pré-tratada apresentou aumento de celulose, redução de hemicelulose e lignina na fase sólida, esses aspectos são estratégicos para o fracionamento da fibra de coco maduro pré-tratada e posterior aplicação no contexto de biorrefinaria. O pré-tratamento da fibra de coco maduro proporcionou redução na quantidade de sólido entre 39,48% e 78,36%, correlacionado ao aumento das condições operacionais. Em comparação, os experimentos realizados com o pré-tratamento PA (200 °C por 50 min) sobre a fibra de coco maduro, obteve

rendimento de sólido de 76,89%, aumento de celulose de 40,55%, redução de hemicelulose de 50,16% e aumento de lignina de 19,10% (conforme Tabela 4.4). Esses resultados apresentam diferenças no rendimento de sólido e composição química (celulose, hemicelulose e lignina) quando comparado aos resultados obtidos pela fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (conforme Tabela 4.7). Sendo assim, o pré-tratamento PA foi efetivo na redução da fração hemicelulósica do material e o pré-tratamento PHCHS foi efetivo nas reduções de hemicelulose e lignina, e dependendo das condições operacionais, podendo também reduzir a fração celulósica do material.

Tabela 4.7. Composições e rendimentos da fase sólida da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

Experimento	Condições			Fase sólida (%)				
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	NaOH (%)	Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
<i>In natura</i>				100,00 ± 0,00	32,18 ± 0,12	27,81 ± 0,74	25,02 ± 0,21	3,31 ± 0,32
1	160	10	1,0	60,52 ± 1,86	46,25 ± 0,15	15,79 ± 0,22	22,95 ± 0,10	4,36 ± 0,12
2	160	10	4,0	54,53 ± 0,53	41,32 ± 0,81	12,49 ± 0,85	22,20 ± 0,23	7,38 ± 0,82
3	160	50	4,0	48,36 ± 1,88	49,31 ± 1,11	12,88 ± 0,17	10,36 ± 0,21	7,90 ± 0,21
4	160	50	1,0	48,93 ± 0,42	51,61 ± 0,15	14,72 ± 0,43	9,14 ± 0,19	7,10 ± 0,39
5	200	10	1,0	54,36 ± 0,77	48,78 ± 0,36	14,79 ± 1,01	15,56 ± 0,13	6,96 ± 0,17
6	200	10	4,0	43,14 ± 0,92	58,72 ± 1,05	13,71 ± 0,43	12,76 ± 0,33	7,60 ± 0,31
7	200	50	4,0	21,64 ± 0,39	74,40 ± 1,21	8,61 ± 0,36	2,72 ± 0,35	9,20 ± 0,21
8	200	50	1,0	43,09 ± 1,06	58,71 ± 0,27	11,23 ± 0,43	5,06 ± 0,84	8,50 ± 0,16
9	180	30	2,5	43,14 ± 0,39	56,39 ± 0,02	12,26 ± 0,21	12,00 ± 0,11	8,30 ± 0,11
10	180	30	2,5	42,09 ± 0,28	56,44 ± 0,30	12,59 ± 0,88	11,72 ± 0,10	8,29 ± 0,37
11	160	30	2,5	48,67 ± 0,13	54,31 ± 0,31	12,85 ± 0,18	12,62 ± 0,11	8,88 ± 0,12
12	200	30	2,5	41,53 ± 0,60	58,76 ± 0,31	12,69 ± 0,16	11,34 ± 0,33	8,11 ± 0,04
13	180	10	2,5	45,58 ± 1,36	48,19 ± 1,17	13,02 ± 0,67	12,75 ± 0,21	7,35 ± 0,11
14	180	50	2,5	32,11 ± 0,15	55,70 ± 0,54	10,03 ± 0,23	7,84 ± 0,14	8,53 ± 0,17
15	180	30	1,0	45,87 ± 0,13	53,85 ± 0,58	12,30 ± 0,14	12,60 ± 0,28	7,07 ± 0,19
16	180	30	4,0	41,89 ± 0,63	57,02 ± 0,33	10,10 ± 0,32	11,44 ± 0,11	8,15 ± 0,26

Em trabalho recente, Kim e Han (2012) realizaram PHCHS sobre a palha de arroz (5,0% m/m de hidróxido de sódio a 80 °C por 1 h), obtendo uma composição da fase sólida de 50,6% de celulose, 21,7% de hemicelulose e 9,5% de lignina, com redução de 46,9% de lignina na palha de arroz pré-tratada. Rawat *et al.* (2013) realizaram PHCHS (2,8% m/m de hidróxido de sódio a 94 °C por 1 h) em algodão americano (*Populus deltoide*), obtendo redução de 12,7% de lignina, aumento de 26,15% de celulose e 14,2% de hemicelulose. Ding *et al.* (2012), realizaram o pré-

tratamento alcalino em casca de coco (5,0% m/v de hidróxido de sódio a 40 °C por 24 h), resultando na composição química de 36,87% de celulose, 22,63% de hemicelulose e 36,76% de lignina. Esses resultados foram similares aos obtidos neste trabalho. Além disso, de acordo com Ballesteros *et al.* (2002), as condições operacionais mais elevadas de temperaturas e tempos proporcionarão maior redução de hemicelulose. E a redução da lignina presente no sólido aumenta linearmente com o aumento das condições operacionais do pré-tratamento (concentração alcalina, temperatura e tempo de reação) (Kim e Han, 2012).

4.4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A utilização de MEV permitiu boa visualização das alterações morfológicas e estruturais promovidas na fibra de coco maduro quando submetida ao pré-tratamento PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min). As micrografias da fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada por PHCHS estão apresentadas na Figura 4.14A-B.

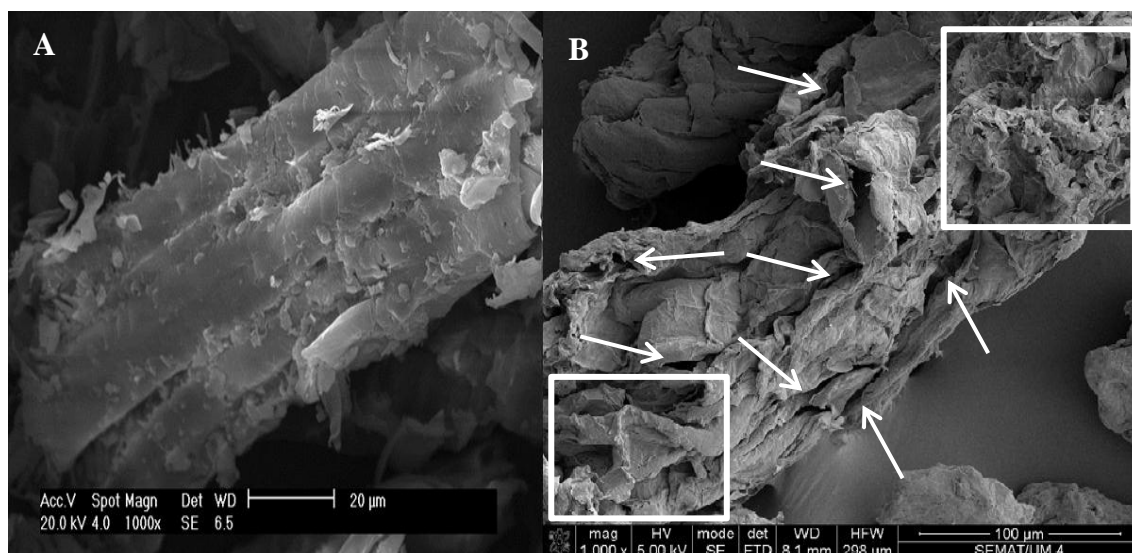


Figura 4.14. MEV da fibra de coco maduro. (A) Fibra de coco maduro *in natura*; (B) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

A imagem de MEV indica que a fibra de coco maduro *in natura* mostra a epiderme, lúmen e feixes vasculares intactos (Figura 4.14A). E o pré-tratamento PHCHS proporcionou fissuras heterogêneas e dispersas em toda a fibra de coco maduro (Figura 4.14B). O desenvolvimento dessas fissuras pode aumentar a área superficial e facilitar a ruptura do material, sendo pré-requisito importante para hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose (Kim e Han, 2012). Resultado similar foi obtido pela fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS (conforme Figura 4.2: 1C), e também relatados por Kim e Han (2012) e Rawat *et al.* (2013) usando palha de arroz e madeira de álamo pré-tratadas por PHCHS, respectivamente.

4.4.1.3. Análise da difração de raios-X e índice cristalinidade

A análise da difração de raios-X e a determinação do índice de cristalinidade foram realizadas na fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada visando analisar a estrutura cristalina.

A fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min) possuem índice de cristalinidade de 34,34% e 56,38%, respectivamente. Os resultados apresentaram aumento no índice de cristalinidade da fibra de coco maduro pré-tratada em relação a fibra de coco maduro *in natura*. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pela fibra de coco maduro pré-tratados por PHA (50,79%) e PHA-PHS (55,73%), que também apresentaram resultados maiores nos índices de cristalinidade dos materiais pré-tratados em relação à fibra de coco maduro *in natura* (34,34%). A Figura 4.15 apresenta a difração de raios-X da fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada por PHCHS.

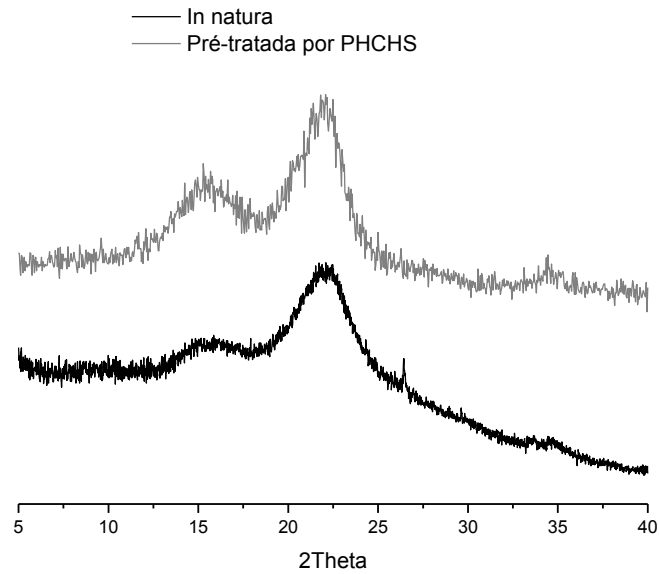


Figura 4.15. Difração de raios-X da fibra de coco maduro *in natura* e pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

4.4.2. Planejamento experimental e análise estatística

O planejamento experimental foi realizado com intuito de verificar as variáveis que interferem no pré-tratamento da fibra de coco maduro e influenciam no teor de celulose contida no material pré-tratado. As condições utilizadas no planejamento experimental foram temperatura (160, 180 e 200 °C), tempo (10, 30 e 50 min) e concentração de hidróxido de sódio (1,0, 2,5 e 4,0%). Os efeitos proporcionados pelo pré-tratamento PHCHS são visualizados no gráfico de Pareto (Figura 4.16) e notam-se as influências das variáveis de temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio sobre a fibra de coco maduro.

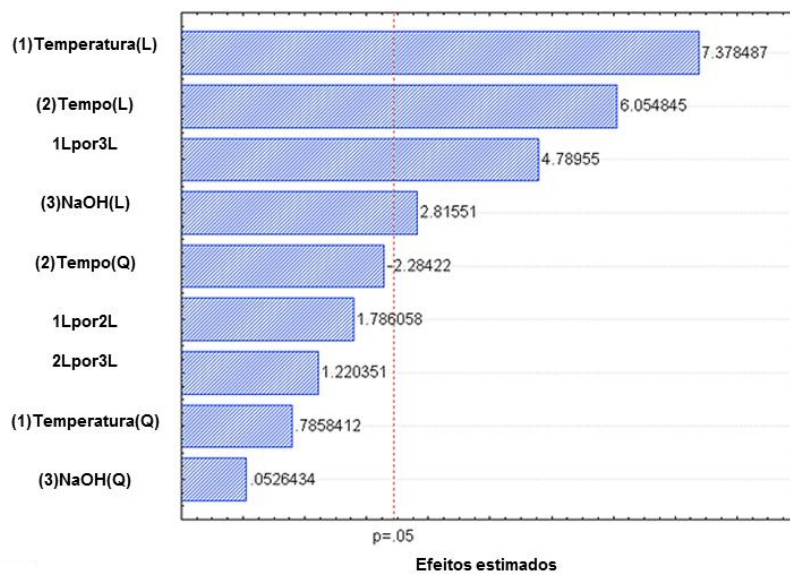


Figura 4.16. Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados de temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio sobre a fibra de coco maduro pré-tratado por PHCHS

O resultado da ANOVA para o rendimento de celulose contida na fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS indicam que os termos lineares X_1 , X_2 , X_3 e a interação X_1X_3 têm efeito significativo sobre o rendimento da celulose em nível de confiança de 95,0% (Tabela 4.8). Esses efeitos podem ser visualizados nos gráficos de Pareto (Figura 4.16). Observa-se que as variáveis de temperatura, tempo, concentração de hidróxido de sódio e a interação temperatura-concentração de hidróxido de sódio são importantes no nível de confiança de 95,0% sobre o rendimento da celulose. Os efeitos da temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio são positivos, conforme pode ser visto na Figura 4.17.

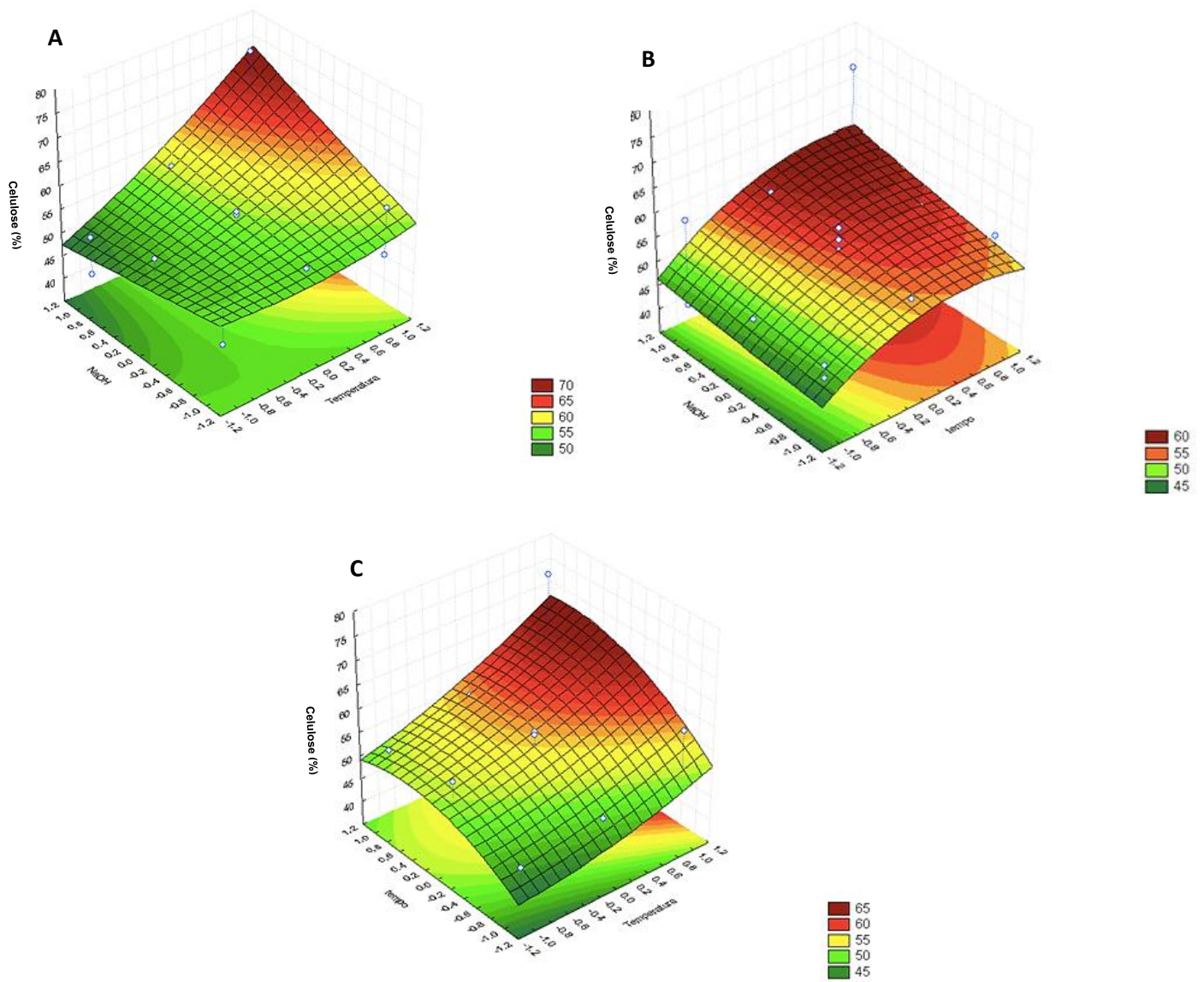


Figura 4.17. Gráficos de superfície de resposta e contorno da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS. (A) Variação de celulose em função da temperatura e concentração de hidróxido de sódio; (B) Variação de celulose em função do tempo e concentração de hidróxido de sódio; (C) Variação de celulose em função do tempo e temperatura

Tabela 4.8. ANOVA da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS baseado no teor de celulose em função da temperatura (X_1), tempo (X_2) e concentração de hidróxido de sódio (X_3)

<i>Fonte</i>	<i>Soma quadrática</i>	<i>d.f.</i>	<i>Média quadrática</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
X_1	320,12	1	320,12	54,4420	0,00031 *
X_1^2	3,63	1	3,63	0,61757	0,46185
X_2	215,57	1	215,57	36,6611	0,00092 *
X_2^2	30,680	1	30,687	5,2187	0,06243
X_3	46,61	1	46,61	7,9270	0,03053 *
X_3^2	0,0163	1	0,0163	0,0027	0,95972
X_1X_2	18,7578	1	18,7578	3,1900	0,12433
X_1X_3	134,890	1	134,8903	22,9397	0,00303 *
X_2X_3	8,7571	1	8,7571	1,4892	0,26811
Erro puro	35,2811	6	5,8801		
Total	814,2037	15			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 14,72.

Ftabelado: 4,10.

As superfícies de resposta foram expressas como gráficos tridimensionais de modelos polinomiais de segunda ordem, como uma função de duas variáveis que influenciam fortemente. O rendimento de celulose foi representado graficamente em função da temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio (Figura 4.17) e mostraram que o aumento no rendimento de celulose está correlacionado aos aumentos da temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio no pré-tratamento PHCHS sobre a fibra de coco maduro. E esses dados corroboram com as composições químicas da fibra de coco maduro pré-tratada (conforme Tabela 4.7), observando-se que o aumento da temperatura, concentração de hidróxido de sódio e tempo no pré-tratamento proporciona aumento da celulose no material, além de promover as reduções de hemicelulose e lignina (conforme Tabela 4.7).

A análise de regressão múltipla e ANOVA dos dados experimentais foram realizadas para o ajuste do modelo matemático. O modelo em termos de valores codificados (Tabela 3.3), expressos na Equação 4.5 representa a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS, em função da temperatura (X_1), tempo (X_2) e concentração de hidróxido de sódio (X_3).

$$\begin{aligned} \% \text{ Celulose} = & 55,70 + 5,65 * X_1 + 1,17 * X_1^2 + 4,64 * X_2 - 3,41 * X_2^2 \\ & + 2,15 * X_3 + 0,078 * X_3^2 + 1,53 X_1 * X_2 + 4,10 X_1 * X_3 + 1,04 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (\text{Equação 4.5})$$

$(R^2 = 0,9566; R_{adj} = 0,8916)$

O resultado da ANOVA apresentado na Equação 4.5 revela que o modelo polinomial de segunda ordem representa adequadamente as respostas de rendimento de celulose com coeficientes de determinação R^2 , o que indica que 95,66% da variabilidade de respostas poderiam ser explicadas pelo modelo. Esse valor está de acordo com o coeficiente de determinação ajustado $R^2_{adj} = 0,892$. Além disso, os valores previstos *versus* valores observados pelo modelo de aplicação por regressão múltipla estão apresentados na Figura 4.18 e evidência a boa qualidade do ajuste.

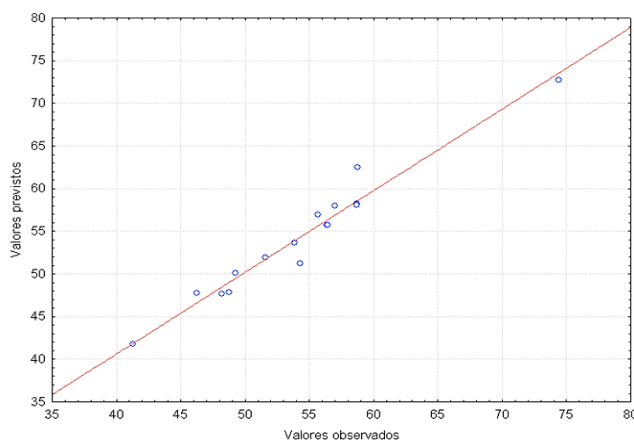


Figura 4.18. Gráfico de valores previstos *versus* valores observados de celulose (%) oriunda da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

4.4.3. Caracterização do licor

4.4.3.1. Composição dos licores resultantes da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

O licor foi separado por filtração da fase sólida contida na suspensão de fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS, nas condições operacionais indicadas na Tabela 3.3 e apresentaram variações de pH entre 9,3 e 13,6 (Tabela 4.9). Esse aumento no valor de pH está correlacionado as elevações das condições operacionais do pré-tratamento (temperatura, tempo e concentração de hidróxido de sódio). O pré-

tratamento da fibra de coco maduro apresentou correlação entre o aumento de pH e o aumento da concentração de glicose, hemicelulose, HMF, furfural e compostos fenólicos totais presente nos licores. Além disso, as maiores concentrações de glicose, hemicelulose, HMF e furfural nos licores da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS foram 4,09, 18,87, 0,21 e 0,47 g/L, respectivamente (Tabela 4.9). Esses açúcares, compostos fenólicos totais e a lignina contidos nos licores podem ser utilizados em processos biotecnológicos e tecnológicos.

Tabela 4.9. Composição do licor, lignina recuperada e compostos fenólicos oriundos da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

Experimento	pH	Material solubilizado (%)	Lignina recuperada (%)	Fase líquida (g/L)									
				Lignina recuperada		Compostos fenólicos		Glicose	Hemicelulose	HMF	Furfural		
1	11,6	39,48	85,27 ± 0,44	8,54	± 0,09	7,49	± 0,21	1,36	11,81	0,14	0,30		
2	13,2	45,47	84,64 ± 0,50	9,84	± 0,04	9,02	± 0,07	0,89	15,06	0,17	0,38		
3	13,3	51,64	88,35 ± 0,26	15,91	± 0,13	11,18	± 0,03	1,66	14,68	0,17	0,37		
4	9,3	51,07	86,57 ± 0,81	16,01	± 0,11	12,52	± 0,01	1,88	12,87	0,15	0,32		
5	9,9	45,65	88,92 ± 1,28	13,26	± 0,01	11,86	± 0,18	1,61	12,80	0,15	0,32		
6	12,9	56,86	89,31 ± 0,16	15,69	± 0,04	12,42	± 0,45	2,57	13,86	0,16	0,35		
7	13,1	78,37	87,88 ± 0,68	19,32	± 0,14	17,52	± 0,07	4,09	18,87	0,21	0,47		
8	13,0	56,91	88,10 ± 0,14	18,11	± 0,08	17,09	± 0,20	2,57	16,30	0,18	0,41		
9	13,0	56,86	88,79 ± 0,49	15,86	± 0,13	14,63	± 0,02	2,35	15,28	0,17	0,38		
10	13,0	57,92	88,66 ± 0,41	16,03	± 0,04	14,31	± 0,02	2,35	14,96	0,17	0,37		
11	13,0	51,34	88,14 ± 1,00	14,98	± 0,13	12,17	± 0,10	2,14	14,71	0,17	0,37		
12	12,7	58,47	89,90 ± 0,50	16,43	± 0,10	14,50	± 0,27	2,57	14,86	0,17	0,37		
13	13,3	54,42	88,40 ± 0,71	15,28	± 0,13	14,39	± 0,02	1,55	14,55	0,16	0,36		
14	12,9	67,89	91,10 ± 1,45	18,45	± 0,13	16,07	± 0,03	2,28	17,48	0,19	0,44		
15	9,6	54,13	85,81 ± 0,83	14,86	± 0,11	11,55	± 0,05	2,10	15,25	0,17	0,38		
16	13,6	58,11	85,12 ± 0,51	15,50	± 0,13	11,49	± 0,06	2,41	17,41	0,19	0,44		

4.4.3.2. Compostos fenólicos totais presente nos licores da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

O pré-tratamento PHCHS promove a deslignificação do material, tornando-se importante determinar os compostos fenólicos totais presente no licor e avaliar a possibilidade de recuperá-los e empregá-los em processos tecnológicos, por exemplo, como antioxidantes em aditivos alimentares (Garrote *et al.*, 2004) ou utilizá-los em bioprocessos, desde que seja analisado o potencial inibitório dos compostos fenólicos presente no licor.

Neste sentido, os licores derivados do pré-tratamento PHCHS da fibra de coco maduro resultaram entre 7,49 e 17,52 g/L de compostos fenólicos totais (compostos fenólicos totais entre 74,9 e 175,2 mg/g de material seco) (conforme Tabela 4.9). Em trabalho realizado por Faustino *et al.* (2010), analisando licor negro de *E. globulus* submetido ao pré-tratamento *kraft*, obteve-se compostos fenólicos totais entre 91,6 e 293,5 mg/g de material seco, ou seja, os resultados obtidos no presente trabalho estão na mesma faixa dos resultados apresentados por Faustino *et al.* (2010).

4.4.3.3. Precipitação ácida da lignina insolúvel presente nos licores da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

A etapa de pré-tratamento realizado nos materiais lignocelulósicos poderá resultar na liberação da lignina (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2010; Ghatak, 2011; Wetterlund *et al.*, 2012) e a recuperação dessa lignina contida no licor permitirá empregá-la em processos tecnológicos, por exemplo, na produção de resina (Kadam *et al.*, 2008), espuma de poliuretano, resinas fenólicas e epóxi, como fonte de fenol e de etileno (Gonçalves e Benar, 2001; Lora e Glasser, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Tejado *et al.*, 2007), formulações de polímeros (Bittencourt *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006), convertida em gás de síntese (Fang *et al.*, 2009; Öhrman *et al.*, 2013) e na produção de aditivo para biocombustíveis renováveis a partir do processo de ozonólise da lignina (Chuck *et al.*, 2013). Além disso, a lignina poderá ser queimada para fornecer calor e energia (Fang *et al.*, 2009). Sendo assim, a precipitação ácida consiste no método mais comum para recuperar a lignina presente no licor (Ghatak, 2008).

Nesse contexto, os licores derivados do pré-tratamento PHCHS sobre a fibra de coco maduro tiveram adição ácida e a recuperação dos compostos precipitados, resultando em 8,54 a 19,32 g/L de lignina, com rendimento de lignina recuperada em até 91,1% (conforme Tabela 4.9). Em comparação, Egüés *et al.* (2012) realizaram a recuperação de lignina em licor de resíduo de milho (material contendo 17,18% de

lignina Klason) pré-tratado por PHCHS (160 °C e 75 min, na relação de sólido/líquido de 1:20 e solubilização de 39,75% do resíduo de milho), o que resultou na recuperação de 2,5 g/L de lignina. Schorr *et al.* (2014) realizaram a recuperação de lignina dos licores fornecidos pelas indústrias de papel e celulose, Kruger Wayagamack e Domtar Windsor, resultando em rendimento de lignina recuperada de 65,0% e 68,0%, respectivamente. Esses resultados relatados por Egüés *et al.* (2012) e Schorr *et al.* (2014) apresentaram valores inferiores aos resultados obtidos neste trabalho, indicando assim, o potencial de recuperação da lignina contida no licor da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.

4.4.3.4. Caracterização da lignina presente no licor da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

4.4.3.4.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram realizadas por espectroscopia de infravermelho, com a finalidade de obter informação dos grupos químicos presentes na lignina (Sun *et al.*, 2013). Os espectros de FTIR da lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada e da lignina padrão estão apresentadas na Figura 4.19. Os espectros de FTIR foram realizados na região entre 500 e 4000 cm^{-1} .

Os espectros apresentam uma banda larga em comprimento de onda de 3396 a 3381 cm^{-1} devido aos grupos alifáticos e fenólicos, seguido por bandas de alongamento de CH em grupos metil e metileno (entre o comprimento de onda de 2962 e 2874 cm^{-1}), as bandas em comprimento de onda de 1604, 1516 e 1495 cm^{-1} são atribuídas às vibrações das estruturas aromáticas, e o pico no comprimento de onda de 1495 cm^{-1} foi mais acentuado na lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS. O comprimento de onda de 1454 cm^{-1} é atribuído às deformações de CH e as vibrações do anel aromático, o comprimento de onda de 1440 cm^{-1} é atribuído às vibrações das estruturas aromáticas, o comprimento de onda

de 1331 cm^{-1} é atribuído ao anel siringil com alongamento de CO, o comprimento de onda de 1284 cm^{-1} é atribuído ao anel guaiacil com alongamento de CO e o comprimento de onda de 1039 cm^{-1} é atribuído ao guaiacil aromático de CH e a deformação de CH do álcool primário, esses comprimentos de onda foram mais acentuados na lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS. E a ausência do pico em comprimento de onda de 1739 cm^{-1} é atribuída ao alongamento de CO que se estende da cetona não conjugada, carbonila e grupos éster, indicando a presença de hidroxicinamatos, tais como p-cumarato e p-ferulato (Sun *et al.*, 2000).

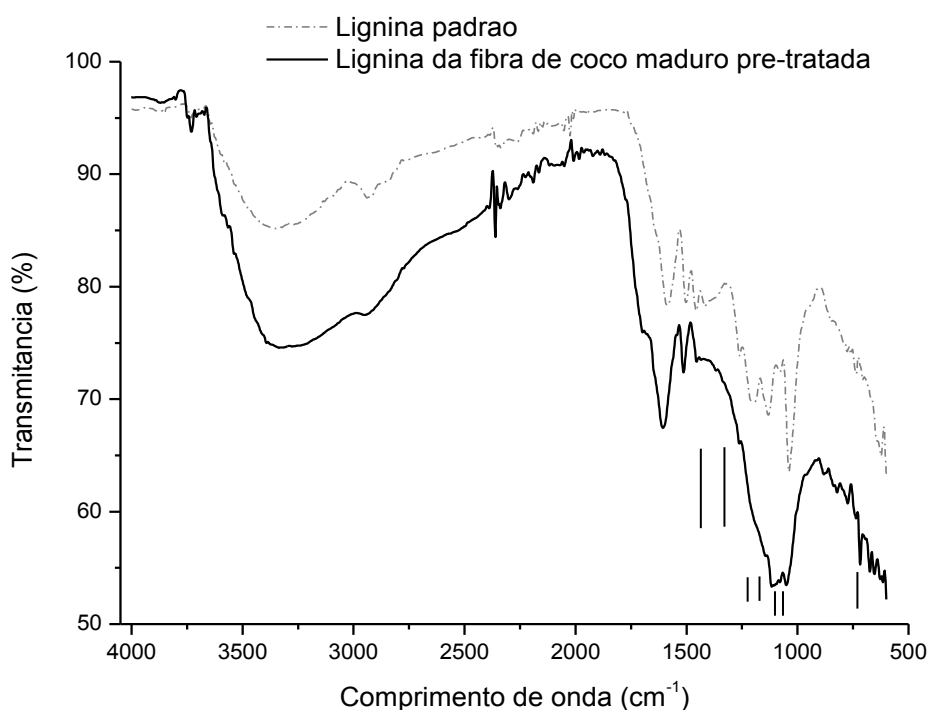


Figura 4.19. FTIR da lignina padrão e da lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min)

Os picos em comprimento de onda de 1170 e 1164 cm^{-1} não foram observados nos espectros das ligninas. Segundo Tan *et al.* (2009), essa ausência de picos indica ausência de enxofre na lignina e torna-se uma característica importante, pois a presença de enxofre na lignina consiste em um contaminante e interfere no seu aproveitamento.

4.4.3.4.2. Análise termogravimétrica (TGA) da lignina

A estabilidade térmica da lignina recuperada foi investigada pelo método TGA e está apresentada na Figura 4.20. Os perfis de degradação da lignina padrão e da lignina recuperada do licor da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS foram similares. Em geral, o comportamento da decomposição térmica das amostras de lignina pode ser dividido em três fases. A primeira fase (de 25 a 150 °C) envolve a desidratação da lignina, devido à absorção de água pela lignina. A amostra de lignina contém quantidade de água entre as ligações, cuja evaporação ocorre a temperaturas superiores a 100 °C, o que indica uma forte interação entre a molécula de água e os grupos hidroxilas presente nas amostras de lignina. A próxima etapa ocorre até 350 °C e envolve as fragmentações de ligações internas entre as unidades de lignina e os principais produtos dessa etapa são o coque, ácidos orgânicos e compostos fenólicos juntamente com produtos gasosos (Rencoret *et al.*, 2009). Na última etapa (mais de 350 °C), ocorre a degradação pirolítica da lignina, decomposição e condensação dos anéis aromáticos (Yang *et al.*, 2007). Os pesos residuais a 600 °C da lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS e a lignina padrão foram 55,68% e 56,71%, respectivamente. Em recente trabalho, Schorr *et al.* (2014) realizaram TGA em ligninas oriundas de licores fornecidos pelas indústrias de papel e celulose, Kruger Wayagamack e Domtar Windsor, obtendo pesos residuais da lignina a 600 °C de 50,0% e 48,0%, respectivamente, ou seja, o resultado obtido no presente trabalho está próximo dos resultados apresentados por Schorr *et al.* (2014).

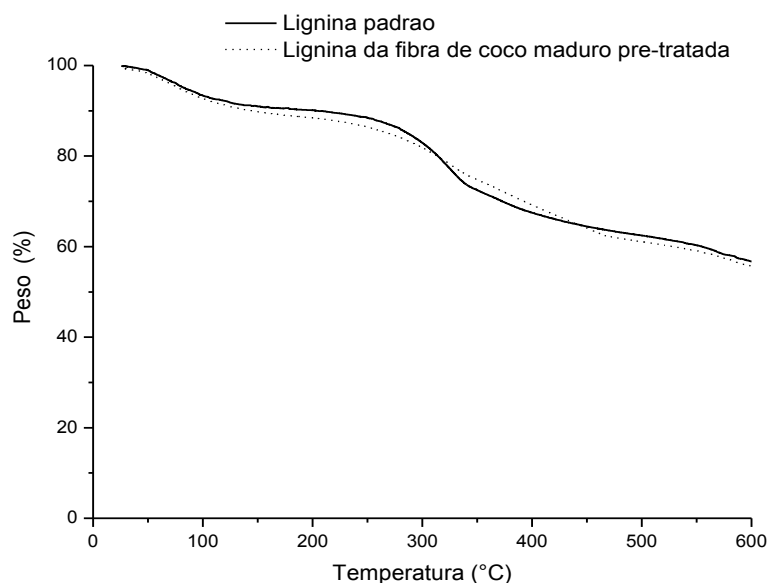


Figura 4.20. TGA da lignina padrão e da lignina recuperada do licor da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

4.4.4. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada para avaliar a digestibilidade da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS quando submetida ao ataque enzimático.

A conversão da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min) em glicose foi 90,72% (0,54 g glicose/g material), em 96 h de hidrólise enzimática (Figura 4.21). Esse resultado demonstra a acessibilidade da fibra de coco maduro pré-tratada ao ataque enzimático. Em comparação, a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 por 1 h), obteve conversão em glicose de 76,21%, em 96 h de hidrólise enzimática (conforme Figura 4.5) e a fibra de coco maduro pré-tratada por PA (200 °C por 50 min), obteve conversão em glicose de 84,10%, em 96 h de hidrólise enzimática (conforme Figura 4.12). Esses resultados evidenciam a maior conversão da fibra de coco maduro pré-tratada em glicose quando submetida ao pré-tratamento PHCHS. Em recente trabalho, Rawat *et al.* (2013) utilizaram a polpa de madeira pré-tratada por PHCHS (2,8% m/m de hidróxido de sódio a 94 °C por 1 h), obtendo conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 41,5%, em 48 h. *O E. grandis*

pré-tratado por explosão a vapor catalisado por hidróxido de sódio (7,0% m/m de hidróxido de sódio a 210 °C por 9 min), resultando na conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 65,55%, em 72 h (Park *et al.*, 2012). A palha de arroz pré-tratada por PHCHS (5,0% m/m de hidróxido de sódio a 80 °C por 1 h), resultando em uma conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 78,70%, em 72 h (Kim e Han, 2012). Além disso, Barcelos *et al.* (2013) realizaram pré-tratamento PHCHS em bagaço de cana-de-açúcar (1,0 M de hidróxido de sódio a 121 °C por 30 min), chegando a uma composição química da fase sólida de 73,74% de celulose, esse material gerou durante a hidrólise enzimática, 40,4 g/L de glicose (50,0% de rendimento), em 24 h.

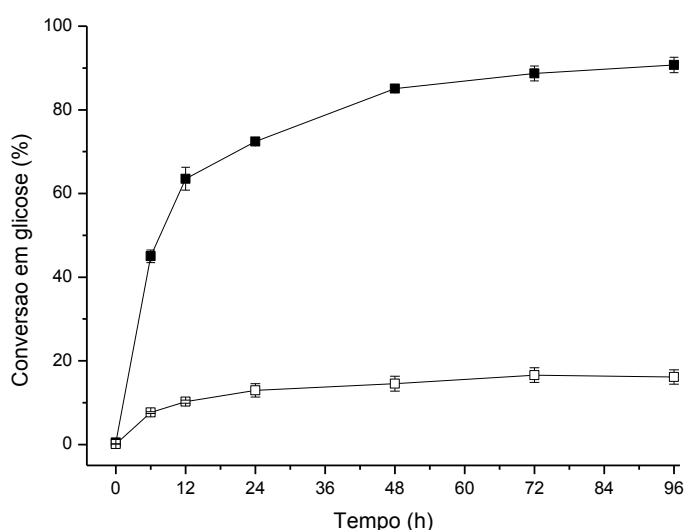


Figura 4.21. Conversão em glicose da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min). O material pré-tratado está representado pelo ícone preto e o material *in natura* está representado pelo ícone branco

A taxa inicial de hidrólise máxima (dG/dt), que ocorre nas primeiras 12 h (concentração de glicose *versus* tempo), mostrada na Figura 4.22 para a fibra de coco maduro foi 1,27 g/(L.h). Em comparação, a taxa inicial de hidrólise da fibra de coco maduro pré-tratadas por PHA-PHS e PA foram 1,49 e 0,82 g/(L.h) usando 30 FPU/g de material, respectivamente (conforme Figuras 4.6 e 4.13). Esses resultados

demonstram a susceptibilidade da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS ao ataque enzimático. Além disso, Rawat *et al.* (2013) relataram a taxa inicial de hidrólise da madeira de álamo pré-tratada por PHCHS de 1,67 g/(L.h), utilizando 15 FPU/g de celulose.

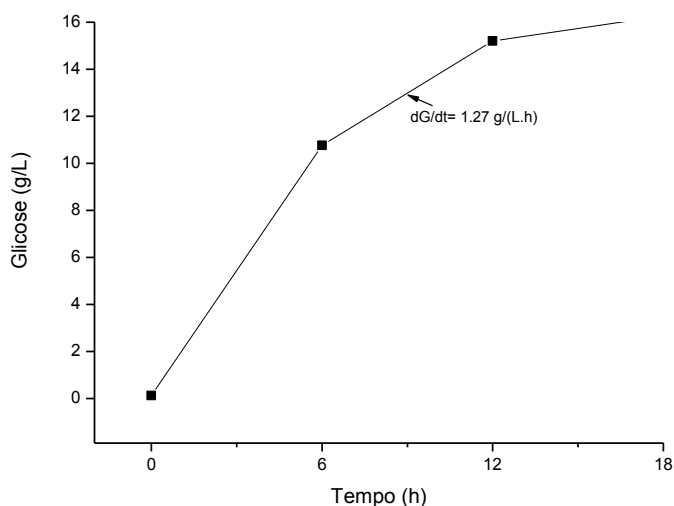


Figura 4.22. Taxa inicial de hidrólise da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

4.5. Materiais lignocelulósicos pré-tratados por organosolv usando etanol alcalino (POEA) visando à produção de etanol

4.5.1. Caracterização dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

4.5.1.1. Composição dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados

As composições químicas da fração sólida dos materiais estão apresentadas na Tabela 4.10, baseadas nas condições operacionais contidas na Tabela 3.4.

Os materiais pré-tratados por POEA apresentaram mudanças nas composições químicas, em comparação aos materiais *in natura*. A fibra de coco maduro apresentou aumento de celulose entre 9,26% e 97,01%, redução de hemicelulose entre 10,03% e 77,09%, aumento de lignina em até 0,80% e redução de lignina em até 64,27%. A casca de coco maduro apresentou aumento de celulose entre 23,46% e 121,67%, redução de hemicelulose entre 6,77% e 73,75% e redução de lignina entre 20,39% e

78,22%. A casca de coco verde apresentou aumento de celulose entre 21,70% e 107,37%, redução de hemicelulose entre 10,95% e 76,36% e redução de lignina entre 12,22% e 69,18%. O cacto apresentou aumento de celulose entre 10,13% e 90,63%, redução de hemicelulose entre 3,96% e 67,19% e redução de lignina entre 10,40% e 76,42%.

Tabela 4.10. Composições e rendimentos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Experimento	Condições			Fase sólida (%)				
	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Tempo (min)	Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
<i>In natura</i>				100,00 ± 0,00	32,18 ± 0,12	27,81 ± 0,74	25,02 ± 0,01	3,31 ± 0,02
1	160	40,0	10	89,25 ± 1,16	35,16 ± 0,18	25,02 ± 0,29	25,22 ± 0,44	2,97 ± 0,18
2	160	40,0	60	73,64 ± 1,07	45,82 ± 0,47	20,87 ± 1,10	20,02 ± 0,96	3,32 ± 0,05
3	160	80,0	60	74,43 ± 2,39	47,72 ± 1,20	17,26 ± 2,09	16,78 ± 0,10	3,26 ± 0,09
4	160	80,0	10	78,13 ± 0,53	39,84 ± 0,11	22,28 ± 1,05	19,84 ± 0,39	3,15 ± 0,14
5	200	40,0	10	74,92 ± 1,54	54,75 ± 0,21	7,35 ± 0,13	15,97 ± 0,27	3,24 ± 0,04
6	200	40,0	60	64,77 ± 0,33	60,65 ± 1,33	6,67 ± 0,33	10,46 ± 2,06	3,54 ± 0,05
7	200	80,0	60	62,89 ± 0,50	63,40 ± 0,21	6,37 ± 0,31	8,94 ± 0,18	3,65 ± 0,02
8	200	80,0	10	75,18 ± 1,18	57,04 ± 0,11	6,98 ± 0,18	14,28 ± 0,21	3,21 ± 0,29
9	180	60,0	35	66,75 ± 0,10	46,64 ± 0,28	17,71 ± 0,12	14,42 ± 0,11	3,20 ± 0,18
10	180	60,0	35	67,27 ± 1,37	47,10 ± 1,10	17,30 ± 0,42	14,13 ± 0,16	3,20 ± 0,05
11	160	60,0	35	71,34 ± 0,48	41,01 ± 1,09	23,47 ± 1,08	22,72 ± 0,40	3,05 ± 0,07
12	200	60,0	35	64,07 ± 0,34	58,41 ± 0,35	6,73 ± 1,08	14,22 ± 0,18	3,27 ± 0,07
13	180	40,0	35	66,84 ± 0,39	45,72 ± 0,23	14,68 ± 0,33	18,23 ± 0,31	3,28 ± 0,07
14	180	80,0	35	71,39 ± 0,21	55,09 ± 0,20	14,81 ± 0,42	12,10 ± 0,54	3,28 ± 0,06
15	180	60,0	10	72,88 ± 1,07	42,36 ± 0,30	18,89 ± 0,34	16,80 ± 0,21	3,23 ± 0,06
16	180	60,0	60	69,94 ± 0,48	56,11 ± 0,25	10,47 ± 0,28	11,68 ± 0,10	3,15 ± 0,14

Experimento	Condições			Fase sólida (%)				
	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Tempo (min)	Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
<i>In natura</i>				100,00 ± 0,00	29,58 ± 0,50	27,77 ± 0,79	31,04 ± 0,10	3,84 ± 0,08
1	160	40,0	10	79,75 ± 0,31	36,52 ± 0,15	25,89 ± 1,26	24,71 ± 0,11	3,43 ± 0,10
2	160	40,0	60	73,11 ± 2,02	47,38 ± 0,81	21,62 ± 0,87	20,14 ± 0,39	3,84 ± 0,06
3	160	80,0	60	75,15 ± 0,39	49,38 ± 1,11	17,89 ± 0,75	12,22 ± 0,27	3,77 ± 0,11
4	160	80,0	10	77,78 ± 0,70	44,97 ± 0,15	23,09 ± 0,74	10,99 ± 0,16	3,65 ± 0,16
5	200	40,0	10	71,64 ± 0,60	56,71 ± 0,36	7,67 ± 0,12	17,54 ± 0,19	3,75 ± 0,35
6	200	40,0	60	64,75 ± 0,40	62,80 ± 1,05	6,99 ± 0,29	14,66 ± 0,11	4,10 ± 0,11
7	200	80,0	60	61,19 ± 1,05	65,57 ± 1,21	6,67 ± 0,32	6,76 ± 0,56	4,22 ± 0,21
8	200	80,0	10	70,57 ± 0,82	60,88 ± 0,27	7,29 ± 0,18	10,17 ± 0,13	4,34 ± 0,14
9	180	60,0	35	68,64 ± 0,46	48,21 ± 0,02	18,36 ± 0,13	14,01 ± 0,59	3,70 ± 0,19
10	180	60,0	35	68,49 ± 1,37	48,65 ± 0,30	17,93 ± 0,44	13,59 ± 0,68	3,70 ± 0,26
11	160	60,0	35	74,41 ± 0,29	42,38 ± 0,31	24,30 ± 1,06	14,60 ± 0,09	3,52 ± 0,17
12	200	60,0	35	65,30 ± 0,79	60,36 ± 0,31	7,04 ± 0,38	13,29 ± 0,14	3,78 ± 0,17
13	180	40,0	35	69,73 ± 1,22	47,66 ± 0,17	15,22 ± 0,40	14,73 ± 0,16	3,80 ± 0,28
14	180	80,0	35	71,03 ± 0,28	57,03 ± 0,54	15,36 ± 0,42	9,75 ± 0,14	3,79 ± 0,26
15	180	60,0	10	75,65 ± 0,41	43,91 ± 0,58	19,57 ± 0,37	14,69 ± 0,24	3,73 ± 0,17
16	180	60,0	60	69,54 ± 0,49	58,07 ± 0,33	10,90 ± 0,29	13,41 ± 0,46	3,64 ± 0,15

C

Experimento	Condições			Fase sólida (%)				
	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Tempo (min)	Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
<i>In natura</i>				100,00 ± 0,00	33,23 ± 0,24	29,14 ± 0,22	25,44 ± 0,12	2,34 ± 0,11
1	160	40,0	10	84,73 ± 1,86	40,44 ± 0,17	25,95 ± 0,27	22,33 ± 0,27	3,04 ± 0,19
2	160	40,0	60	73,15 ± 0,53	49,85 ± 0,30	21,67 ± 0,17	17,76 ± 0,23	3,40 ± 0,25
3	160	80,0	60	72,50 ± 1,88	51,97 ± 0,35	17,90 ± 0,29	14,44 ± 0,21	3,34 ± 0,09
4	160	80,0	10	77,55 ± 0,42	43,50 ± 1,16	23,10 ± 0,17	17,55 ± 1,11	3,23 ± 0,15
5	200	40,0	10	69,69 ± 0,77	59,54 ± 0,46	7,78 ± 0,14	14,33 ± 0,11	3,32 ± 0,04
6	200	40,0	60	64,98 ± 0,92	65,91 ± 0,48	7,18 ± 0,33	9,32 ± 0,17	3,62 ± 0,05
7	200	80,0	60	57,63 ± 0,39	68,91 ± 0,33	6,89 ± 0,32	7,84 ± 0,17	3,73 ± 0,02
8	200	80,0	10	66,75 ± 1,06	61,93 ± 0,16	7,43 ± 0,20	12,55 ± 0,17	3,29 ± 0,03
9	180	60,0	35	67,76 ± 0,39	50,71 ± 0,24	18,41 ± 0,13	12,75 ± 0,11	3,27 ± 0,02
10	180	60,0	35	68,02 ± 0,28	51,29 ± 0,17	17,96 ± 0,46	12,53 ± 0,39	3,28 ± 0,05
11	160	60,0	35	70,94 ± 0,13	44,65 ± 0,18	24,40 ± 0,16	20,07 ± 0,44	3,12 ± 0,03
12	200	60,0	35	64,60 ± 0,60	63,45 ± 0,17	7,24 ± 0,18	12,66 ± 0,12	3,35 ± 0,17
13	180	40,0	35	67,91 ± 1,36	49,78 ± 0,30	15,04 ± 0,24	16,23 ± 0,13	3,36 ± 0,07
14	180	80,0	35	70,80 ± 0,15	59,90 ± 0,34	15,27 ± 0,44	10,73 ± 0,27	3,36 ± 0,16
15	180	60,0	10	74,80 ± 0,13	46,18 ± 1,22	19,68 ± 0,37	14,61 ± 0,29	3,30 ± 0,26
16	180	60,0	60	66,95 ± 0,63	60,98 ± 0,29	11,01 ± 0,31	10,07 ± 0,10	3,22 ± 0,14

D

Experimento	Condições			Fase sólida (%)				
	Temperatura (°C)	Etanol (%)	Tempo (min)	Rendimento	Celulose	Hemicelulose	Lignina Klason	Cinzas
<i>In natura</i>				100,00 ± 0,00	38,12 ± 0,75	23,50 ± 0,42	19,51 ± 0,13	5,64 ± 0,21
1	160	40,0	10	82,60 ± 1,14	41,98 ± 1,15	22,57 ± 0,24	17,48 ± 0,43	6,36 ± 0,23
2	160	40,0	60	75,69 ± 0,36	52,16 ± 0,28	18,76 ± 1,06	16,83 ± 0,17	7,38 ± 0,12
3	160	80,0	60	70,15 ± 1,12	54,46 ± 0,51	15,45 ± 0,28	12,25 ± 0,24	7,90 ± 0,11
4	160	80,0	10	76,46 ± 0,23	45,37 ± 0,17	20,09 ± 0,16	11,04 ± 1,15	7,10 ± 0,09
5	200	40,0	10	70,98 ± 1,29	62,61 ± 0,35	8,36 ± 0,11	17,62 ± 0,23	6,96 ± 0,07
6	200	40,0	60	60,98 ± 0,24	67,51 ± 0,64	7,84 ± 0,17	14,71 ± 0,48	7,60 ± 0,31
7	200	80,0	60	61,50 ± 1,06	72,67 ± 0,35	7,71 ± 0,28	4,60 ± 0,47	9,20 ± 0,16
8	200	80,0	10	70,89 ± 0,19	65,32 ± 1,17	8,02 ± 0,17	6,96 ± 1,13	8,50 ± 0,36
9	180	60,0	35	59,56 ± 0,99	53,20 ± 0,38	15,85 ± 0,12	14,07 ± 0,44	8,30 ± 1,11
10	180	60,0	35	60,25 ± 0,25	53,55 ± 0,18	15,42 ± 0,40	13,61 ± 0,29	8,29 ± 0,27
11	160	60,0	35	69,83 ± 0,76	46,68 ± 0,20	21,17 ± 0,26	14,65 ± 0,12	8,88 ± 0,18
12	200	60,0	35	56,82 ± 0,96	66,78 ± 0,14	8,00 ± 0,27	13,32 ± 0,39	8,11 ± 1,04
13	180	40,0	35	62,97 ± 0,33	52,16 ± 0,32	13,06 ± 0,27	14,79 ± 0,24	7,35 ± 0,11
14	180	80,0	35	70,24 ± 0,85	55,29 ± 0,36	13,18 ± 0,38	9,76 ± 0,17	8,53 ± 0,17
15	180	60,0	10	73,91 ± 1,02	48,22 ± 0,21	16,94 ± 0,33	14,73 ± 0,27	7,07 ± 0,19
16	180	60,0	60	61,12 ± 2,13	58,36 ± 0,29	9,22 ± 0,26	13,46 ± 0,16	8,15 ± 0,26

Os materiais pré-tratados apresentaram aumento de celulose, redução de hemicelulose e lignina, exceto em um experimento usando a fibra de coco pré-tratada que apresentou aumento de lignina de 0,80%. Resultados similares foram encontrados por alguns autores, como Pan *et al.* (2008), que realizaram pré-tratamento *organosolv* utilizando etanol (POE) em pinheiros (65,0% v/v de etanol e 1,10% m/m de ácido sulfúrico a 187 °C por 1 h), o *Pinus contorta* infectado por *Dendroctonus ponderosae* apresentou aumento de celulose de 72,49% e redução de lignina de 57,08%, o *Pinus contorta* saudável apresentou aumento de celulose de 75,40% e redução de lignina de

41,37%, quando comparado ao material *in natura*. Ruiz *et al.* (2012) realizaram POEA em palha de trigo (40,0% v/v de etanol e 0,1% m/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 20 min), inicialmente pré-tratada por PA (180 °C por 30 min). A palha de trigo pré-tratada resultou no aumento de celulose de 19,9%, redução de hemicelulose de 15,43% e redução de lignina de 39,87%. Hu *et al.* (2012) realizaram POE sobre a *Panicum virgatum* (25,0% v/v de etanol e 0,9% m/m de ácido sulfúrico a 180 °C por 1 h), resultando no aumento de celulose de 93,45%, redução de hemicelulose de 45,0% e redução de lignina de 32,81%. Garrote *et al.* (2003) realizaram POE em *E. globulus* (temperatura, tempo e concentração de etanol utilizados em diferentes experimentos a partir do planejamento experimental, em condições de 145, 160 e 175 °C; 40, 80 e 120 min; 40,0, 55,0 e 70,0%, respectivamente), obtendo rendimento de sólido entre 66,4% e 89,9%. E a composição química de *E. globulus* pré-tratado ficou entre 67,62% e 81,39% de celulose, entre 4,84% e 7,79% de hemicelulose e entre 8,84% a 18,13% de lignina. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pelos materiais submetidos ao pré-tratamento POEA, com o aumento de celulose, redução de hemicelulose e lignina no material.

No presente trabalho foram observados os efeitos relatados por Ballesteros *et al.* (2002), referente ao aumento na degradação da hemicelulose em altas temperaturas e elevados tempos de residência. E também os efeitos relatados por Kim e Han (2012), referente à redução da lignina correlacionado ao aumento linear das condições operacionais do pré-tratamento. Alfaro *et al.* (2009) relataram que a susceptibilidade dos diferentes materiais lignocelulósicos ao processo de deslignificação depende das características estruturais e do conteúdo de lignina (unidades de siringil e guaiacil). A redução da lignina contida na fase sólida pode proporcionar menor efeito inibitório as enzimas e menor adsorção das enzimas pela lignina durante a etapa de hidrólise (Ruiz *et al.*, 2011), proporcionando redução da recalcitrância do material, a partir das mudanças na estrutura e conteúdo da lignina residual contida no material pré-tratado (Hu *et al.*, 2012). Segundo Siqueira *et al.* (2013), a remoção da lignina facilita a

hidrólise enzimática do material lignocelulósico, porém não há necessidade da remoção completa da lignina no material para hidrolisar mais de 80,0% de celulose.

Os materiais pré-tratados por POEA apresentaram redução na quantidade de sólidos, sendo que para a fibra de coco maduro ficam entre 10,75% e 37,11%, casca de coco maduro entre 20,25% e 38,81%, casca de coco verde entre 15,27% e 42,37%, enquanto que para o cacto entre 17,40% e 43,18%. Esses resultados estão correlacionados ao aumento das condições operacionais no pré-tratamento (Tabela 4.10). Além disso, os materiais pré-tratados por POEA apresentaram maiores teores de celulose e rendimentos de sólidos, além de menores teores de lignina, quando comparados aos materiais pré-tratados por PHA-PHS (conforme Figura 4.1) e PA (conforme Tabela 4.4). Esses dados evidenciam a possibilidade de elevada digestibilidade dos materiais pré-tratados por POEA em glicose durante a hidrólise enzimática.

4.5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A utilização de MEV permitiu boa visualização das alterações morfológicas e estruturais dos materiais pré-tratados por POEA em relação aos materiais *in natura*. As micrografias dos materiais *in natura* e pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h) estão apresentados na Figura 4.23.

As imagens de MEV indicaram que os materiais *in natura* apresentaram a epiderme, lúmen e feixes vasculares íntegros, mostrados na Figura 4.23 (1A, 2A, 3A e 4A). O pré-tratamento POEA proporcionou fragmentações, fissuras heterogêneas e dispersas nos materiais, apresentados na Figura 4.23 (1B, 2B, 3B e 4B). Segundo Kim e Han (2012) o desenvolvimento dessas fissuras pode aumentar a área superficial e facilitar a ruptura do material, sendo um pré-requisito importante para hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose. Resultados similares foram relatados para a fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto pré-tratados por PHA e PHA-PHS (conforme Figura 4.2) e também por Ruiz *et al.* (2011),

em palha de trigo pré-tratada por POEA, a qual apresentou elevada separação das fibras lignocelulósicas e a maior exposição do material, dessa forma, mais susceptível ao ataque enzimático.

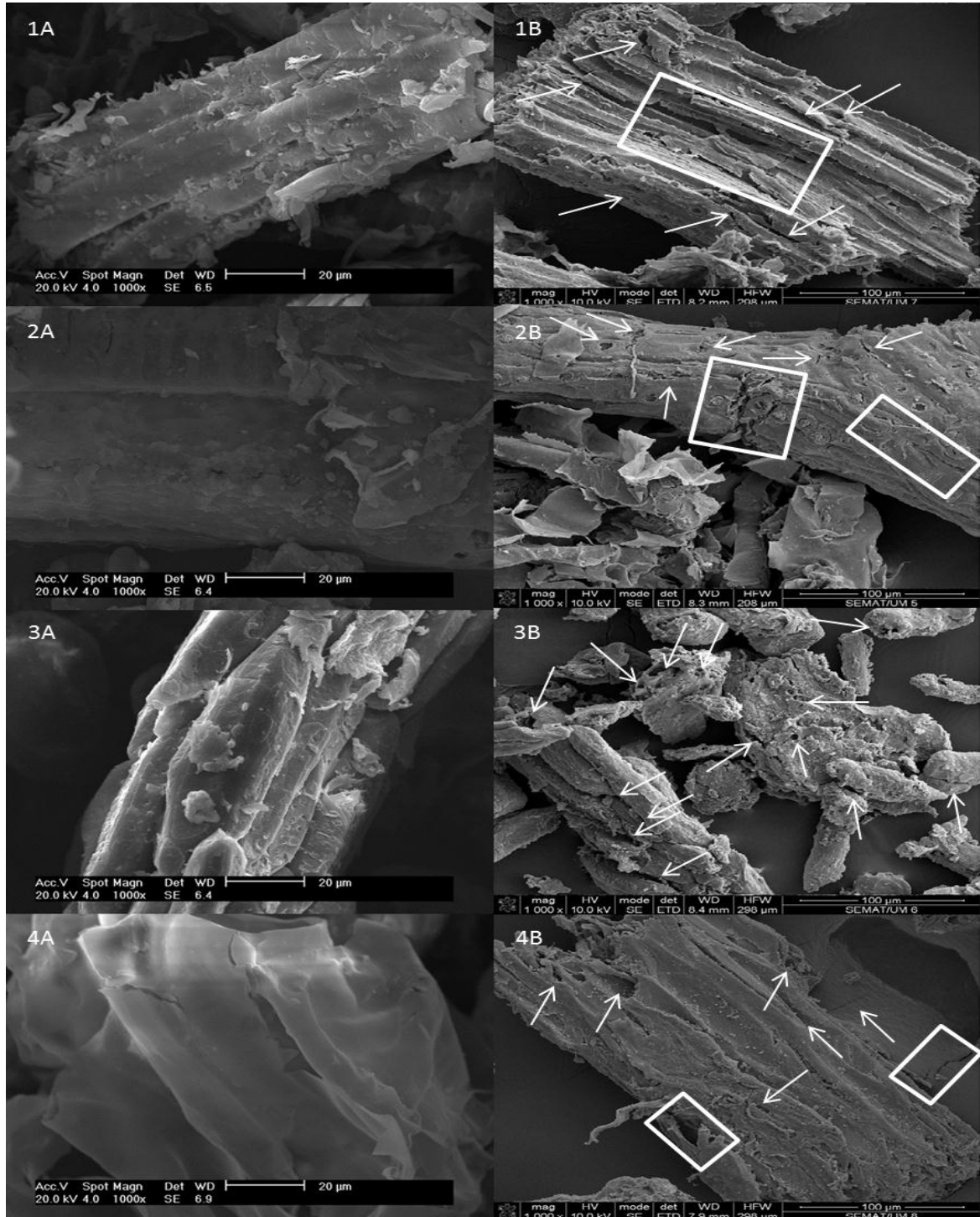


Figura 4.23. MEV dos materiais lignocelulósicos. (1A) Casca de coco verde *in natura*; (1B) Casca de coco verde pré-tratada por POEA; (2A) Fibra de coco maduro *in natura*; (2B) Fibra de coco maduro pré-tratada por POEA; (3A) Casca de coco maduro *in natura*; (3B) Casca de coco maduro pré-tratada por POEA; (4A) Cacto *in natura*; (4B) Cacto pré-tratado por POEA

4.5.1.3. Análise da difração de raios-X e índice cristalinidade

A análise de difração de raios-X e a determinação do índice de cristalinidade foram realizadas nos materiais *in natura* e pré-tratados visando analisar a estrutura cristalina.

Os índices de cristalinidade obtidos nos materiais *in natura* e pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h) foram entre 23,20% e 52,55% (Tabela 4.11) e a difração de raios-X desses materiais são apresentadas na Figura 4.24. A fibra de coco maduro, casca de coco verde e cacto submetidos ao pré-tratamento POEA apresentaram aumento nos índices de cristalinidade, quando comparado aos materiais *in natura*. Embora a casca de coco maduro pré-tratada por POEA apresentou aumento no índice de cristalinidade de apenas 4,84 pontos percentuais, em relação ao material *in natura*. Em recente trabalho, Hidenó *et al.* (2013) realizaram POE em *Japanese cypress* (50,0% v/v de etanol e 0,4% v/v de ácido clorídrico a 170 °C por 45 min) e obtiveram índice de cristalinidade de 80,9% (índice de cristalinidade do material *in natura* de 60,2%). Pan *et al.* (2008) realizaram POE em madeira (65,0% v/v de etanol e 1,10% m/m de ácido sulfúrico a 187 °C por 1 h), o *Pinus contorta* infectado por *Dendroctonus ponderosae* apresentou índice de cristalinidade de 83,0% (material *in natura* apresenta índice de cristalinidade de 73,0%) e o *Pinus contorta* saudável apresentou índice de cristalinidade de 85,0% (material *in natura* apresenta índice de cristalinidade de 75,0%). Sendo assim, Hidenó *et al.* (2013) e Pan *et al.* (2008) também relataram maiores valores nos índices de cristalinidade dos materiais pré-tratados por POE em comparação aos índices de cristalinidade dos materiais *in natura*, resultando em maiores digestibilidades desses materiais pré-tratados durante a hidrólise enzimática. Isso pode ser devido à remoção ou degradação da hemicelulose e lignina amorfa, além da exposição da celulose na superfície dos materiais pré-tratados (Hidenó *et al.*, 2013) e também pode ter sido removido celulose amorfa.

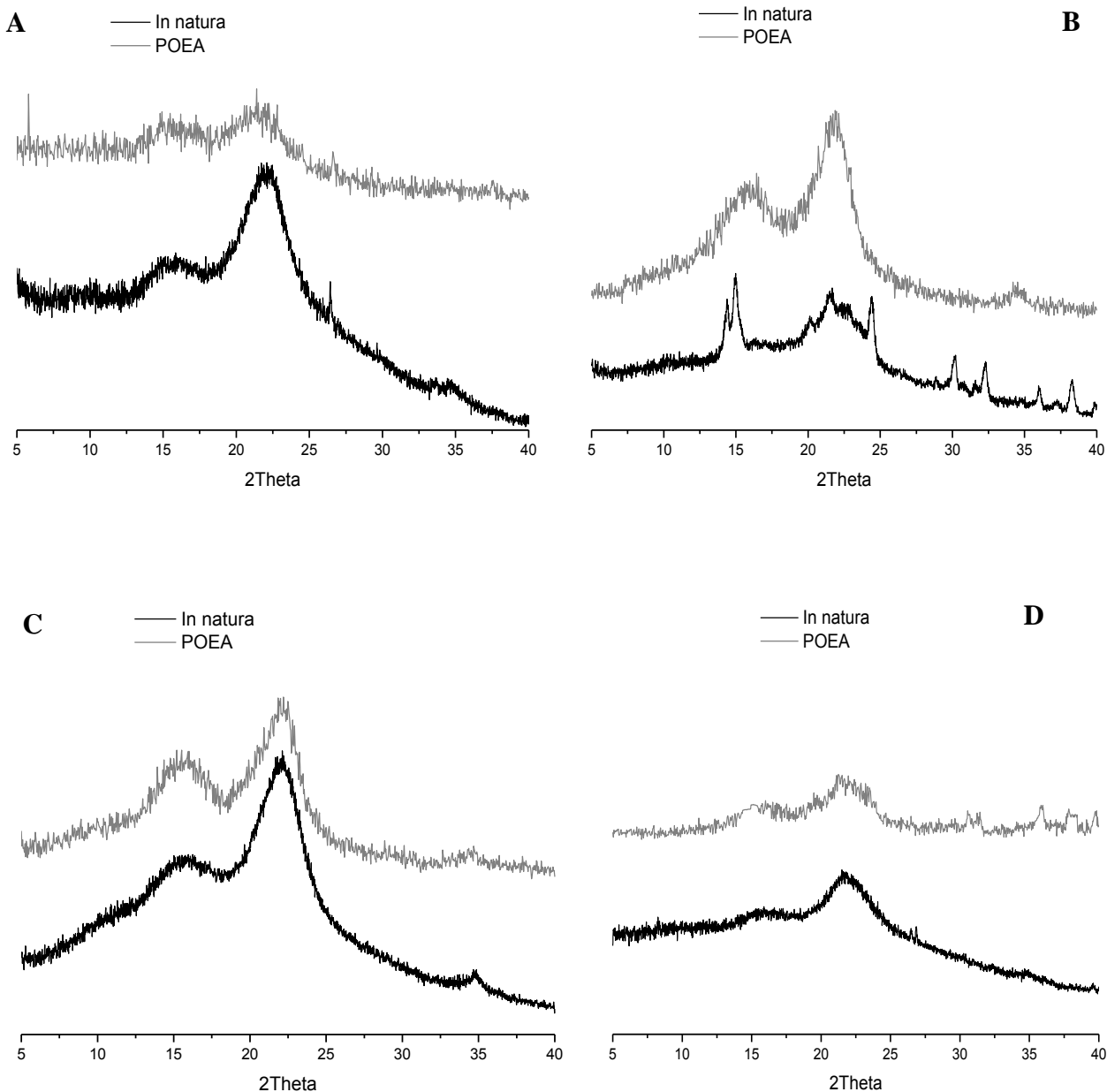


Figura 4.24. Difração de raios-X dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.11. Índice de cristalinidade da fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto *in natura* e pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Material lignocelulósico	IC (%)	
	<i>In natura</i>	POEA
Fibra de coco maduro	34,34	50,41
Casca de coco maduro	28,03	32,87
Casca de coco verde	29,31	52,55
Cacto	23,20	50,94

Os materiais pré-tratados por POEA apresentaram aumento nos índices de cristalinidade em relação aos materiais *in natura* (Tabela 4.11). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos pelos materiais pré-tratados por PHA e PHA-PHS (conforme Tabelas 4.2 e 4.3), os quais também apresentaram aumento nos índices de cristalinidade dos materiais pré-tratados em relação aos materiais *in natura*.

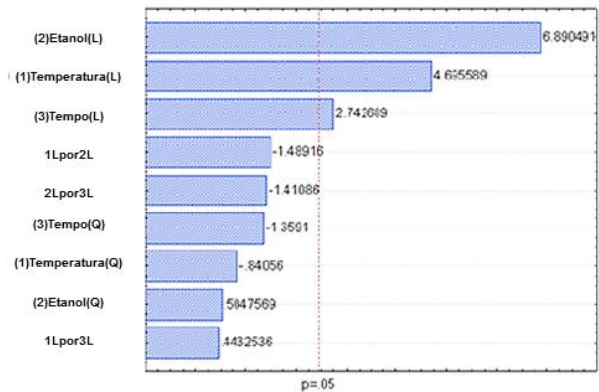
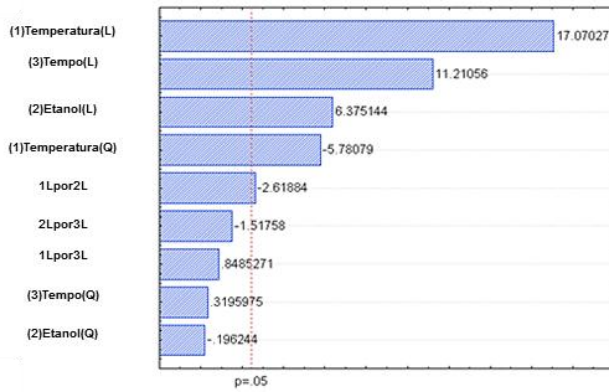
4.5.2. Planejamento experimental e análise estatística

O planejamento experimental foi realizado para verificar as variáveis que interferem no pré-tratamento dos materiais e influenciam no teor de deslignificação dos materiais pré-tratados. As condições utilizadas no planejamento experimental foram temperatura (160, 180 e 200 °C), concentração de etanol (40,0, 60,0 e 80,0%) e tempo (10, 35 e 60 min). Os efeitos proporcionados pelo pré-tratamento POEA são visualizados nos gráficos de Pareto (Figura 4.25A-D) e notam-se as influências das variáveis de temperatura, concentração de etanol e tempo sobre os materiais pré-tratados.

Os resultados da ANOVA para a deslignificação dos materiais pré-tratados por POEA apresentaram os termos lineares X_1 , X_2 e X_3 , com efeito significativo sobre a deslignificação do material em nível de confiança de 95,0%. Dessa forma, os efeitos da temperatura, concentração de etanol e tempo são positivos, quando se aumenta dos menores valores para os maiores valores (Tabela 4.12A-D). O termo quadrático X_1^2 apresenta efeito significativo sobre a deslignificação da casca de coco verde, do cacto e da fibra de coco maduro. Esse último apresenta também o efeito significativo do termo de interação X_1X_2 .

A

B



C

D

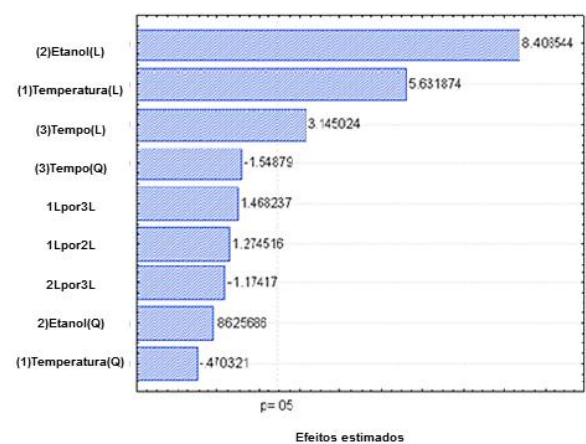
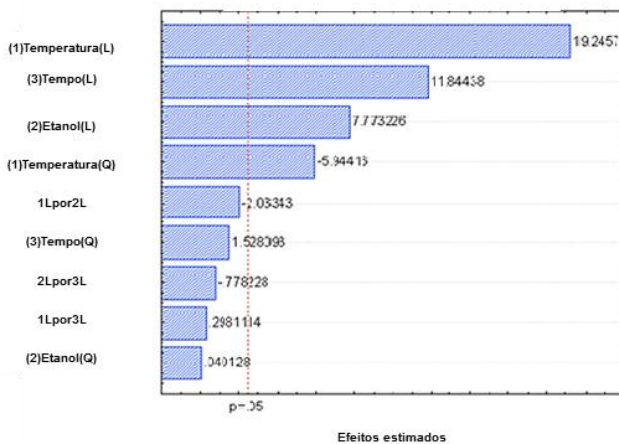


Figura 4.25. Gráficos de Pareto para os efeitos padronizados de temperatura, concentração de etanol e tempo sobre os materiais pré-tratados por POEA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Tabela 4.12. ANOVA da desdesignação dos materiais em função da temperatura (X_1), concentração de etanol (X_2) e tempo (X_3). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

Fonte	Soma quadrática	d.f.	Média quadrática	Valor F	Valor p
X_1	2443,594	1	2443,594	291,3942	0,000003 *
X_1^2	280,235	1	280,235	33,4175	0,001171 *
X_2	340,822	1	340,822	40,6425	0,000700 *
X_2^2	0,323	1	0,323	0,0385	0,850897
X_3	1053,908	1	1053,908	125,6766	0,000030 *
X_3^2	0,857	1	0,857	0,1021	0,760109
X_1X_2	57,513	1	57,513	6,8583	0,039648 *
X_1X_3	6,038	1	6,038	0,7200	0,428692
X_2X_3	19,313	1	19,313	2,3031	0,179915
Erro puro	50,315	6	8,386		
Total	4363,154	15			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 57,14.

Ftabelado: 4,10.

B

<i>Fonte</i>	<i>Soma quadrática</i>	<i>d.f.</i>	<i>Média quadrática</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
X_1	563,851	1	563,851	22,04856	0,003341 *
X_1^2	18,068	1	18,068	0,70654	0,43808
X_2	1214,184	1	1214,184	47,47887	0,000461 *
X_2^2	6,516	1	6,516	0,25478	0,631728
X_3	192,370	1	192,370	7,52234	0,033616 *
X_3^2	47,238	1	47,238	1,84716	0,222978
X_1X_2	56,711	1	56,711	2,21761	0,187021
X_1X_3	5,024	1	5,024	0,19647	0,673117
X_2X_3	50,904	1	50,904	1,99053	0,207971
Erro puro	153,439	6	25,573		
Total	2339,733	15			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 9,50.

Ftabelado: 4,10.

C

<i>Fonte</i>	<i>Soma quadrática</i>	<i>d.f.</i>	<i>Média quadrática</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
X_1	1880,738	1	1880,738	370,3975	0,000001 *
X_1^2	179,408	1	179,408	35,3330	0,001013 *
X_2	306,805	1	306,805	60,4230	0,000239 *
X_2^2	0,008	1	0,008	0,0016	0,969293
X_3	712,336	1	712,336	140,2893	0,000022 *
X_3^2	11,857	1	11,857	2,3351	0,177351
X_1X_2	20,995	1	20,995	4,1349	0,088243
X_1X_3	0,451	1	0,451	0,0889	0,775672
X_2X_3	3,075	1	3,075	0,6056	0,466006
Erro puro	30,466	6	5,078		
Total	3164,510	15			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 68,58.

Ftabelado: 4,10.

D

<i>Fonte</i>	<i>Soma quadrática</i>	<i>d.f.</i>	<i>Média quadrática</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
X_1	816,493	1	816,493	31,71800	0,001341 *
X_1^2	5,694	1	5,694	0,22120	0,654735
X_2	1820,071	1	1820,071	70,70362	0,000154 *
X_2^2	19,153	1	19,153	0,74402	0,421508
X_3	254,621	1	254,621	9,89117	0,019940 *
X_3^2	61,750	1	61,750	2,39876	0,172402
X_1X_2	41,816	1	41,816	1,62439	0,249614
X_1X_3	55,493	1	55,493	2,15572	0,192420
X_2X_3	35,490	1	35,490	1,37868	0,284816
Erro puro	154,454	6	25,742		
Total	3266,988	15			

d.f.: grau de liberdade.

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0%.

Fcalculado: 13,43.

Ftabelado: 4,10.

As superfícies de resposta foram expressas como gráficos tridimensionais de modelos polinomiais de segunda ordem, com uma função de duas variáveis que influenciam fortemente e são representadas graficamente em função da temperatura e tempo (Figura 4.26), apresentando que o aumento nas designificações dos materiais estão correlacionados ao aumento de temperatura e tempo do pré-tratamento POEA sobre os materiais utilizados.

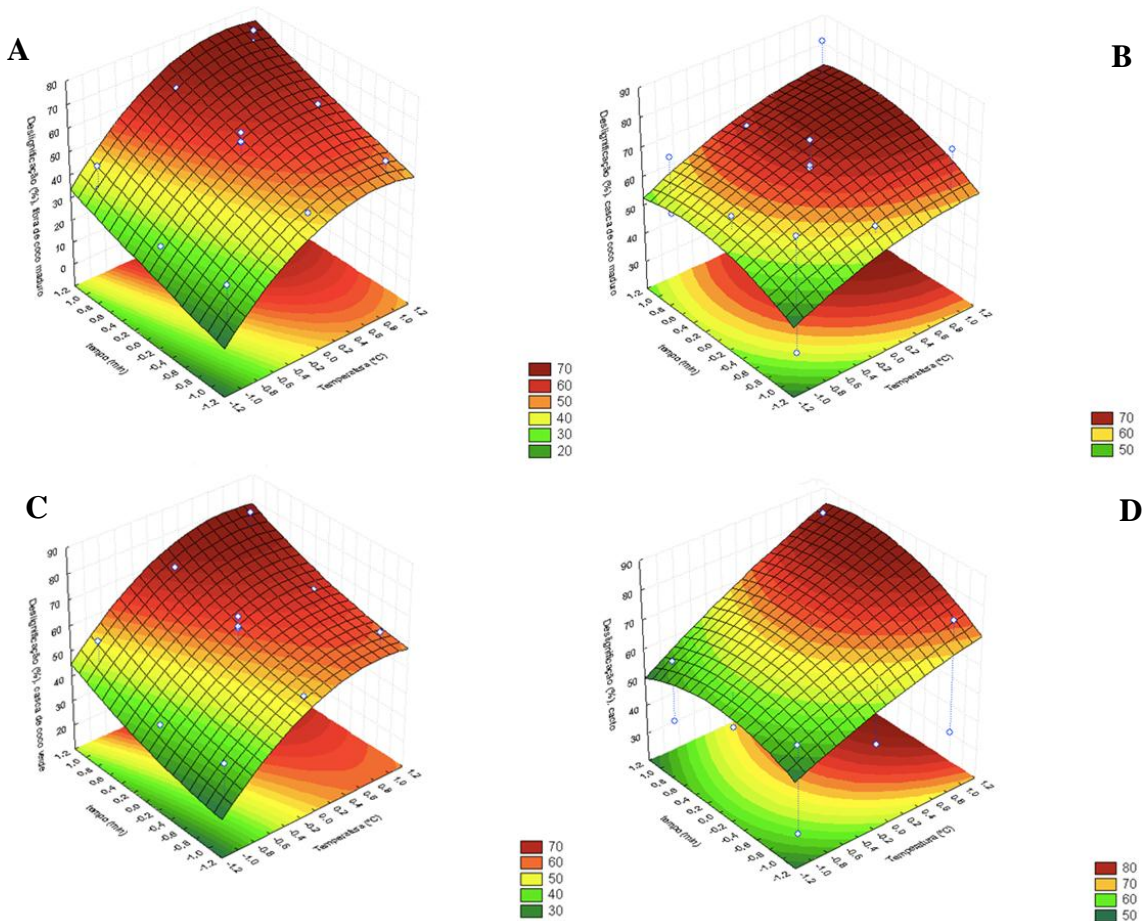


Figura 4.26. Gráficos de superfície de resposta e contorno dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA relacionados as variações de deslignificações dos materiais em função da temperatura e tempo. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

As deslignificações dos materiais foram representadas graficamente em função da temperatura e tempo (Figura 4.26) e apresentaram aumento no rendimento das deslignificações a partir do aumento da temperatura e tempo no pré-tratamento. Portanto, as variáveis de temperatura, concentração de etanol e tempo influenciam

significativamente na deslignificação dos materiais (conforme Figura 4.25) e esses dados corroboram com as composições químicas dos materiais pré-tratados (conforme Tabela 4.10), observando-se que o aumento na temperatura, concentração de etanol e tempo no pré-tratamento proporciona aumento na deslignificação dos materiais, além de promover também aumento da celulose e redução da hemicelulose nos materiais (conforme Tabela 4.10).

A análise de regressão múltipla e ANOVA dos dados experimentais foram realizadas para o ajuste do modelo matemático. Os modelos em termos de valores codificados (Tabela 3.4), expressos nas Equações 4.6 a 4.9, representados pela fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto, respectivamente, pré-tratados por POEA em função da temperatura (X_1), concentração de etanol (X_2) e tempo (X_3).

$$\begin{aligned} \text{Fibra de coco maduro} = \% \text{ Deslignificação} &= 55,24 + 15,63 * X_1 \\ &- 10,31 * X_1^2 + 5,83 * X_2 - 0,35 * X_2^2 + 10,26 * X_3 + 0,57 * X_3^2 - 2,68 X_1 * X_2 \\ &+ 0,86 X_1 * X_3 - 1,55 X_2 * X_3 \quad (R^2 = 0,9884; R^2_{adj} = 0,9711) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.6)}$$

$$\begin{aligned} \text{Casca de coco maduro} = \% \text{ Deslignificação} &= 67,13 + 7,5 * X_1 \\ &- 2,61 * X_1^2 + 11,01 * X_2 + 1,57 * X_2^2 + 4,38 * X_3 - 4,23 * X_3^2 - 2,66 X_1 * X_2 \\ &+ 0,79 X_1 * X_3 - 2,52 X_2 * X_3 \quad (R^2 = 0,9344; R^2_{adj} = 0,8761) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.7)}$$

$$\begin{aligned} \text{Casca de coco verde} = \% \text{ Deslignificação} &= 60,37 + 13,71 * X_1 \\ &- 8,24 * X_1^2 + 5,53 * X_2 + 0,05 * X_2^2 + 8,44 * X_3 + 2,12 * X_3^2 - 1,62 X_1 * X_2 \\ &+ 0,23 X_1 * X_3 - 0,62 X_2 * X_3 \quad (R^2 = 0,9903; R^2_{adj} = 0,9759) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.8)}$$

$$\begin{aligned} \text{Cacto} = \% \text{ Deslignificação} &= 56,41 + 9,03 * X_1 - 1,46 * X_1^2 \\ &+ 13,49 * X_2 + 2,69 * X_2^2 + 5,04 * X_3 - 4,83 * X_3^2 + 2,28 X_1 * X_2 \\ &+ 2,63 X_1 * X_3 - 2,10 X_2 * X_3 \quad (R^2 = 0,9527; R^2_{adj} = 0,8818) \end{aligned} \quad \text{(Equação 4.9)}$$

As Equações 4.6 a 4.9 revelaram que os modelos polinomiais de segunda ordem representam adequadamente as respostas das designificações dos materiais com coeficientes de determinação R^2 , o que indica que 98,84%, 93,44%, 99,03% e 95,27% da variabilidade de respostas poderiam ser explicadas pelos modelos. Esses valores estão de acordo com o coeficiente de determinação ajustado $R^2_{adj} = 0,971, 0,876, 0,976$ e $0,882$. Além disso, a Figura 4.27 apresenta os valores previstos *versus* valores observados pelo modelo de aplicação por regressão múltipla e observa-se que os modelos ajustam bem aos resultados.

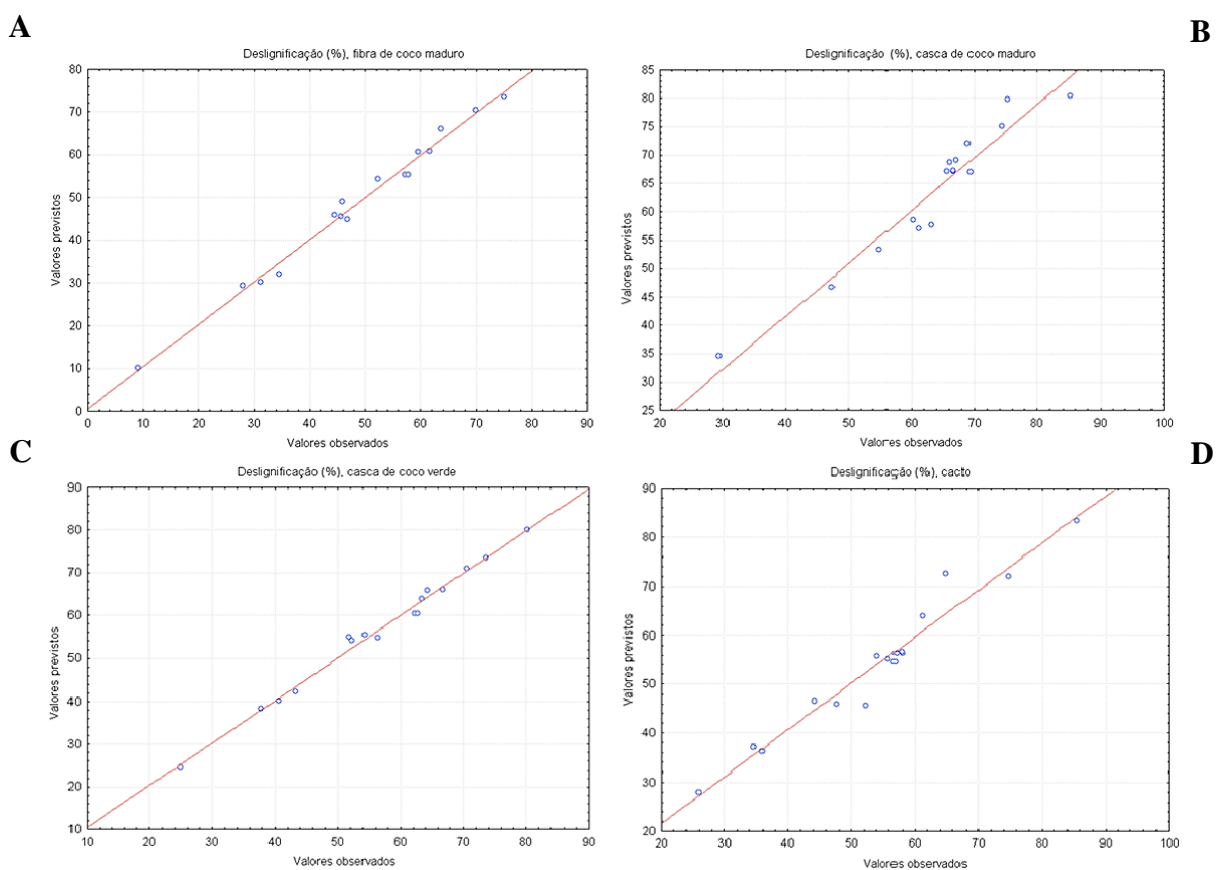


Figura 4.27. Gráficos de valores previstos *versus* valores observados dos materiais pré-tratados por POEA em relação a designificação (%). (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

4.5.3. Caracterização do licor

4.5.3.1. Composição dos licores resultantes dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA

O licor é separado por filtração da fase sólida a partir da suspensão dos materiais pré-tratados por POEA, nas condições operacionais indicadas na Tabela 3.4, apresentando variações de pH entre 5,6 e 13,3 (Tabela 4.13). Os materiais pré-tratados por POEA apresentaram redução de pH no licor, influenciado pelo aumento das condições de processo. Correlacionando-se também ao aumento da concentração de glicose, hemicelulose, HMF, furfural, lignina e compostos fenólicos totais presente nos licores. Considerando a fibra de coco maduro pré-tratada por POEA, obteve-se as maiores concentrações de glicose, hemicelulose, HMF e furfural de 1,87, 12,86, 0,23 e 0,16 g/L, respectivamente. Para a casca de coco maduro pré-tratada por POEA, obteve-se as maiores concentrações de glicose, hemicelulose, HMF e furfural de 2,00, 12,68, 0,25 e 0,16 g/L, respectivamente. A casca de coco verde pré-tratada por POEA gerou as maiores concentrações de glicose, hemicelulose, HMF e furfural de 2,20, 12,55, 0,28 e 0,16 g/L, respectivamente. O cacto pré-tratado por POEA produziu as maiores concentrações de glicose, hemicelulose, HMF e furfural de 2,43, 12,06, 0,30 e 0,15 g/L, respectivamente (Tabela 4.13). Esses licores apresentaram teores de glicose, hemicelulose, HMF, furfural, lignina e compostos fenólicos totais passíveis de serem utilizados na geração de produtos, coprodutos e subprodutos baseados no contexto de biorrefinaria.

Tabela 4.13. Composição do licor, lignina recuperada e compostos fenólicos oriundos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA. (A) Fibra de coco maduro; (B) Casca de coco maduro; (C) Casca de coco verde; (D) Cacto

A

Experimento	pH	Lignina recuperada (%)	Fase líquida (g/L)									
			Lignina recuperada			Compostos fenólicos		Glicose	Hemicelulose	HMF	Furfural	
1	9,2	82,85	1,79	±	0,16	0,10	±	0,03	0,18	1,68	0,02	0,02
2	7,9	70,53	6,19	±	0,24	2,34	±	0,11	0,82	4,16	0,10	0,05
3	8,4	78,96	8,80	±	0,03	3,85	±	0,13	0,93	6,33	0,12	0,08
4	6,2	72,63	5,58	±	0,04	2,42	±	0,06	0,46	3,32	0,06	0,04
5	8,4	75,97	9,27	±	0,22	4,23	±	0,19	1,35	12,27	0,17	0,15
6	7,5	64,29	11,43	±	0,12	6,80	±	0,24	1,71	12,68	0,21	0,16
7	7,8	74,74	13,46	±	0,25	7,51	±	0,26	1,87	12,86	0,23	0,16
8	8,8	81,09	10,35	±	0,23	5,02	±	0,21	1,49	12,50	0,19	0,16
9	8,0	69,61	10,27	±	0,09	4,95	±	0,12	0,87	6,06	0,11	0,08
10	8,1	82,11	11,43	±	0,12	5,09	±	0,13	0,90	6,31	0,11	0,08
11	8,2	79,99	5,54	±	0,33	1,08	±	0,07	0,53	2,60	0,07	0,03
12	7,9	64,28	9,73	±	0,23	5,04	±	0,22	1,57	12,65	0,20	0,16
13	8,0	66,36	7,50	±	0,10	3,17	±	0,11	0,81	7,88	0,10	0,10
14	8,3	72,61	11,05	±	0,70	6,03	±	0,19	1,37	7,80	0,17	0,10
15	9,0	80,08	9,02	±	0,25	3,84	±	0,09	0,61	5,35	0,08	0,07
16	8,5	67,39	10,42	±	0,18	6,23	±	0,20	1,44	10,41	0,18	0,13

B

Experimento	pH	Lignina recuperada (%)	Fase líquida (g/L)									
			Lignina recuperada			Compostos fenólicos		Glicose	Hemicelulose	HMF	Furfural	
1	12,0	68,00	6,22	±	0,28	0,15	±	0,04	0,26	1,15	0,03	0,01
2	10,0	75,00	11,01	±	0,11	2,28	±	0,13	0,91	3,71	0,11	0,05
3	9,0	67,29	14,02	±	0,18	5,98	±	0,14	1,03	5,95	0,13	0,07
4	6,5	62,35	13,43	±	0,29	6,55	±	0,11	0,77	2,83	0,10	0,04
5	10,4	66,29	11,32	±	0,24	3,49	±	0,21	1,47	12,09	0,18	0,15
6	6,2	66,71	13,67	±	0,24	4,84	±	0,26	1,84	12,49	0,23	0,16
7	7,0	61,75	16,33	±	0,31	8,53	±	0,28	2,00	12,68	0,25	0,16
8	8,5	68,33	15,76	±	0,27	6,93	±	0,24	1,72	12,31	0,22	0,15
9	8,9	71,49	14,55	±	0,24	5,14	±	0,13	0,96	5,67	0,12	0,07
10	8,4	69,19	14,32	±	0,27	5,34	±	0,14	0,99	5,93	0,12	0,07
11	9,5	88,20	16,73	±	0,23	4,87	±	0,86	0,61	2,10	0,08	0,03
12	7,4	84,68	18,12	±	0,26	5,48	±	0,24	1,69	12,46	0,21	0,16
13	8,0	77,49	15,21	±	0,25	4,81	±	0,13	0,93	7,55	0,12	0,09
14	8,3	73,30	17,11	±	0,27	7,13	±	0,21	1,49	7,47	0,19	0,09
15	13,3	81,97	15,32	±	0,22	4,82	±	0,10	0,70	4,95	0,09	0,06
16	8,0	66,55	13,76	±	0,25	5,42	±	0,22	1,55	10,15	0,19	0,13

C

Experimento	pH	Lignina recuperada (%)	Fase líquida (g/L)								
			Lignina recuperada	Compostos fenólicos		Glicose	Hemicelulose	HMF	Furfural		
1	12,4	78,21	4,95 ± 0,26	1,26 ± 0,07	0,50	1,11	0,06	0,01			
2	7,6	73,63	8,10 ± 0,41	3,39 ± 0,15	1,06	3,68	0,13	0,05			
3	7,8	76,41	10,55 ± 0,46	4,94 ± 0,17	1,19	5,95	0,15	0,07			
4	6,0	77,65	8,01 ± 0,35	3,49 ± 0,10	0,68	2,83	0,08	0,04			
5	8,9	63,08	9,05 ± 0,47	4,99 ± 0,23	1,64	12,02	0,21	0,15			
6	6,5	73,06	13,67 ± 0,60	7,33 ± 0,28	2,02	12,38	0,25	0,15			
7	7,0	79,98	16,33 ± 0,66	8,02 ± 0,31	2,20	12,55	0,28	0,16			
8	8,5	74,50	12,02 ± 0,52	5,82 ± 0,25	1,79	12,23	0,22	0,15			
9	7,2	67,22	10,65 ± 0,51	5,73 ± 0,16	1,11	5,64	0,14	0,07			
10	7,4	65,30	10,43 ± 0,53	5,83 ± 0,16	1,15	5,91	0,14	0,07			
11	7,9	63,19	6,08 ± 0,34	2,31 ± 0,10	0,75	2,05	0,09	0,03			
12	7,1	69,33	11,34 ± 0,54	5,77 ± 0,26	1,88	12,34	0,23	0,15			
13	7,0	68,50	9,04 ± 0,43	4,11 ± 0,15	1,06	7,66	0,13	0,10			
14	7,5	59,47	10,11 ± 0,59	6,68 ± 0,23	1,66	7,53	0,21	0,09			
15	9,0	69,79	9,28 ± 0,46	4,86 ± 0,12	0,84	4,88	0,10	0,06			
16	7,8	76,65	13,76 ± 0,58	6,98 ± 0,24	1,73	10,08	0,22	0,13			

D

Experimento	pH	Lignina recuperada (%)	Fase líquida (g/L)								
			Lignina recuperada	Compostos fenólicos		Glicose	Hemicelulose	HMF	Furfural		
1	12,0	76,28	3,87 ± 0,21	3,52 ± 0,28	0,59	3,14	0,07	0,04			
2	7,3	72,24	4,89 ± 0,28	3,82 ± 0,17	1,20	5,43	0,15	0,07			
3	7,5	65,24	7,12 ± 0,45	5,96 ± 0,19	1,34	7,42	0,17	0,09			
4	5,6	69,28	7,67 ± 0,45	6,53 ± 0,11	0,79	4,63	0,10	0,06			
5	8,6	66,69	4,67 ± 0,29	3,45 ± 0,26	1,83	11,67	0,23	0,15			
6	6,3	66,59	7,02 ± 0,43	4,82 ± 0,30	2,12	11,98	0,26	0,15			
7	6,8	69,24	11,55 ± 0,67	9,54 ± 0,34	2,43	12,06	0,30	0,15			
8	8,2	68,68	10,01 ± 0,59	8,43 ± 0,28	1,99	11,87	0,25	0,15			
9	6,9	66,22	7,37 ± 0,45	5,11 ± 0,18	1,26	7,18	0,16	0,09			
10	7,1	69,48	7,86 ± 0,46	5,33 ± 0,18	1,28	7,44	0,16	0,09			
11	7,6	69,27	6,43 ± 0,39	4,85 ± 0,12	0,87	3,99	0,11	0,05			
12	6,9	71,01	8,48 ± 0,49	5,46 ± 0,29	2,08	11,89	0,26	0,15			
13	6,8	65,83	6,71 ± 0,41	4,78 ± 0,17	1,20	8,85	0,15	0,11			
14	7,2	69,54	8,80 ± 0,52	7,13 ± 0,19	1,39	8,78	0,17	0,11			
15	8,6	67,01	5,78 ± 0,35	4,81 ± 0,13	0,96	6,52	0,12	0,08			
16	7,5	70,71	7,98 ± 0,46	5,40 ± 0,22	1,57	11,15	0,20	0,14			

4.5.3.2. Compostos fenólicos totais presentes nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA

Os materiais pré-tratados por POEA apresentaram licores com presença de compostos fenólicos. Para os licores da fibra de coco maduro variaram entre 0,10 e

7,51 g/L, para a casca de coco maduro variaram entre 0,15 e 8,53 g/L, com relação a casca de coco verde variaram entre 1,26 e 8,02 g/L e o cacto variaram entre 3,52 e 9,54 g/L (conforme Tabela 4.13). Sendo assim, os compostos fenólicos totais presente nos licores dos materiais pré-tratados por POEA foram entre 1,0 e 95,4 mg/g de material seco. Em comparação, os licores derivados do pré-tratamento PHCHS sobre a fibra de coco maduro foram entre 7,49 e 17,52 g/L de compostos fenólicos totais (compostos fenólicos totais entre 74,9 e 175,2 mg/g de material seco), ou seja, os licores do material pré-tratado por PHCHS apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos totais, quando comparado aos licores dos materiais pré-tratados por POEA. Além disso, o trabalho realizado por Faustino *et al.* (2010) analisando o licor de *E. globulus* submetido ao pré-tratamento *kraft* obtiveram compostos fenólicos totais entre 91,6 e 293,5 mg/g de material seco. Esses resultados apresentados por Faustino *et al.* (2010) e resultados obtidos pela fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS foram maiores que os resultados dos licores oriundos dos materiais pré-tratados por POEA. Embora Faustino *et al.* (2010) e o pré-tratamento PHCHS utilizaram o processo de deslignificação *kraft* e os materiais pré-tratados por POEA utilizaram o processo de deslignificação por solvente orgânico (etanol), passível de ser recuperado pelo processo de destilação do licor.

4.5.3.3. Precipitação ácida da lignina insolúvel presente nos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA

A precipitação ácida consiste no método mais usado para recuperar a lignina contida no licor (Ghatak, 2008; Egüés, 2012). Dessa forma, os licores derivados dos materiais pré-tratados por POEA foram submetidos à precipitação ácida e obteve-se nos licores da fibra de coco maduro valores entre 1,79 e 13,46 g/L de lignina recuperada, com rendimento de até 82,85%, para a casca de coco maduro estes valores ficaram entre 6,22 e 16,33 g/L, com rendimento de até 84,68%, para a casca de coco verde foi de 4,95 a 18,12 g/L, com rendimento de até 79,98% e para o cacto foi de

3,87 a 11,55 g/L, com rendimento de até 76,28% (conforme Tabela 4.13). Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Romaní *et al.* (2011), em que os autores relatam a recuperação de lignina em licor de *E. globulus* pré-tratada por POE, resultando entre 10,6 e 18,8 g/100g de material, com rendimento de 50,0%. Hu *et al.* (2012) realizaram a recuperação de lignina em licor de gramíneas pré-tratadas por POE, conseguindo rendimento de 80,0%. Brosse *et al.* (2009) realizaram a recuperação de lignina em licor de *Miscanthus giganteus* pré-tratada por POE e obteve-se rendimento de 71,0%.

Sendo assim, os licores oriundos dos materiais pré-tratados por POEA apresentaram valores entre 1,79 e 18,12 g/L de lignina recuperada, com rendimento de até 84,68% (conforme Tabela 4.13). Em comparação, os licores derivados do pré-tratamento PHCHS sobre a fibra de coco maduro resultaram entre 8,54 e 19,32 g/L de lignina recuperada, com rendimento de lignina recuperada de até 91,1% (conforme Tabela 4.9), ou seja, os resultados obtidos nas recuperações de lignina dos licores oriundos dos materiais pré-tratados por POEA estão na mesma faixa dos resultados apresentados nas recuperações de lignina dos licores oriundos do material pré-tratado por PHCHS.

4.5.3.4. Caracterização da lignina presente no licor dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA

4.5.3.4.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises por espectroscopia de infravermelho tiveram a finalidade de obter informação dos grupos químicos presentes nas ligninas (Sun *et al.*, 2013). Os espectros de FTIR foram realizados na região entre 500 e 4000 cm^{-1} . Os espectros de FTIR da lignina recuperada dos materiais pré-tratados e da lignina padrão são mostrados na Figura 4.28.

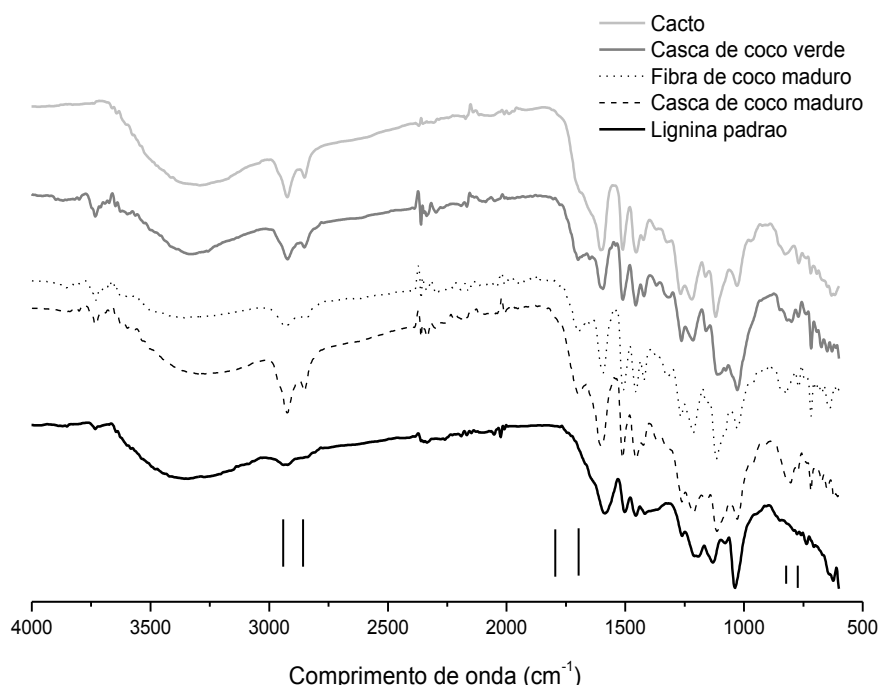


Figura 4.28. FTIR da lignina padrão e das ligninas recuperadas dos licores dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

As amostras de lignina apresentaram uma banda larga atribuída ao alongamento de OH (comprimento de onda de 3412 a 3460 cm^{-1}), ausência de picos correspondentes alongamento de C-H dos grupos metil e metileno (comprimento de onda de 2842 a 3000 cm^{-1}) e ausência de picos no grupo metil (comprimento de onda de 2689 a 2880 cm^{-1}). Os espectros das amostras em comprimento de onda de aproximadamente 1712 e 1660 cm^{-1} , não apresentaram picos, podendo-se atribuir ao não conjugado e o alongamento conjugado de C=O, respectivamente. As vibrações características dos anéis aromáticos das ligninas foram identificadas nos comprimentos de onda de 1600, 1516 e 1429 cm^{-1} (Faix, 1992; Hoareau *et al.*, 2004).

A ausência de pico no comprimento de onda de 1739 cm^{-1} é atribuída ao alongamento de CO que se estende da cetona não conjugada, carbonila e grupos éster, indicando a presença de hidroxicinamatos, tais como p-cumarato e p-ferulato (Sun *et al.*, 2000).

Ausência dos picos no comprimento de onda de 1170 e 1164 cm^{-1} no espectro das ligninas. De acordo com Tan *et al.* (2009), a ausência de picos indica ausência de

enxofre na lignina, sendo uma característica importante, pois a presença de enxofre na lignina interfere no seu aproveitamento.

4.5.3.4.2. Análise termogravimétrica (TGA) da lignina

A estabilidade térmica da lignina recuperada foi investigada por TGA e apresentada na Figura 4.29. O perfil de degradação da lignina padrão apresentou diferença em relação aos perfis de degradações das ligninas recuperadas nos licores dos materiais pré-tratados por POEA, indicando a característica heterogênea da lignina após o pré-tratamento por *organosolv*. Resultados similares sobre a característica heterogênea da lignina foram obtidos por Li *et al.* (2012b) em bambu pré-tratado por POE.

Os pesos residuais das ligninas recuperadas dos materiais pré-tratados por POEA a 600 °C foram entre 29,71 e 55,74%, enquanto que para a lignina padrão foi 56,71%. Destacando-se a proximidade entre o peso residual da lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por POEA (55,74%) e da lignina padrão (56,71%). Esses resultados corroboram com o resultado obtido pela lignina recuperada da fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS, apresentando o peso residual da lignina a 600 °C de 55,68%. Em geral, o comportamento da decomposição térmica das amostras de lignina pode ser dividido em 3 fases, como apresentados na seção 4.4.3.4.2.

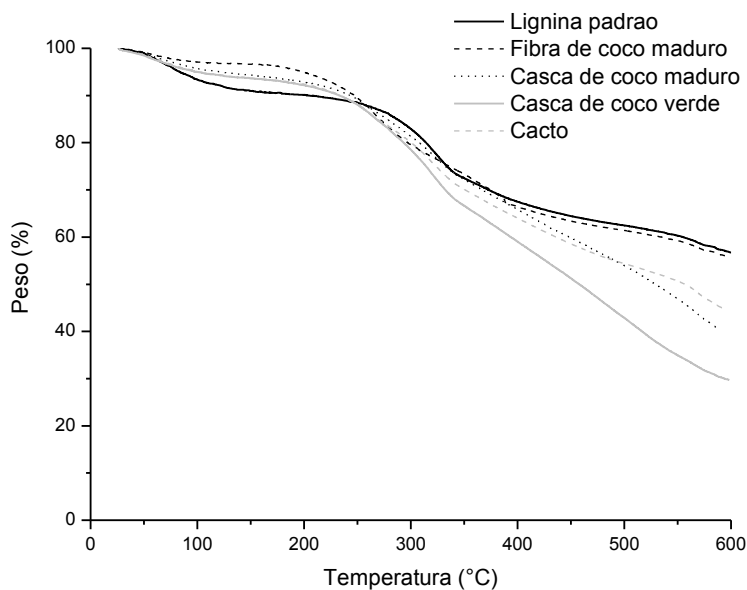


Figura 4.29. TGA da lignina padrão e das ligninas recuperadas nos licores oriundos dos materiais lignocelulósicos pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

4.5.4. Hidrólise enzimática

Os materiais utilizados na etapa de hidrólise enzimática foram selecionados de acordo com rendimento e concentração de celulose presente na fase sólida após serem submetidos ao pré-tratamento POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h) (conforme Tabela 4.10 e Figura 4.26).

As conversões da fibra de coco maduro, casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto em glicose foram 77,54% (0,55 g glicose/g material), 80,47% (0,59 g glicose/g material), 82,12% (0,62 g glicose/g material) e 84,27% (0,68 g glicose/g material), em 96 h de hidrólise enzimática, respectivamente (Figura 4.30). Esses resultados demonstram a acessibilidade dos materiais pré-tratados por POEA ao ataque enzimático. Em recente trabalho, Hu *et al.* (2012) utilizaram *Panicum virgatum* pré-tratada por POE, resultando em conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de 98,0%, em 72 h. Romaní *et al.* (2011) utilizaram *E. globulus* pré-tratado por PA seguido de POE, resultando na conversão em glicose durante a hidrólise enzimática de aproximadamente 100%, em 72 h. Ruiz *et al.* (2012) utilizaram palha de trigo pré-tratada por PA seguido de POE, resultando na conversão em glicose durante a hidrólise

enzimática de 64,04%, em 72 h. Pan *et al.* (2008) utilizaram *Pinus contorta* infectado por *Dendroctonus ponderosae* e *Pinus contorta* saudável pré-tratado por POE e obtiveram conversões de glicose, durante a hidrólise enzimática, de aproximadamente 100%, em 12 h. Esses resultados demonstram a eficiência da ação enzimática nos materiais pré-tratados por POE, fato esse, também observado neste trabalho.

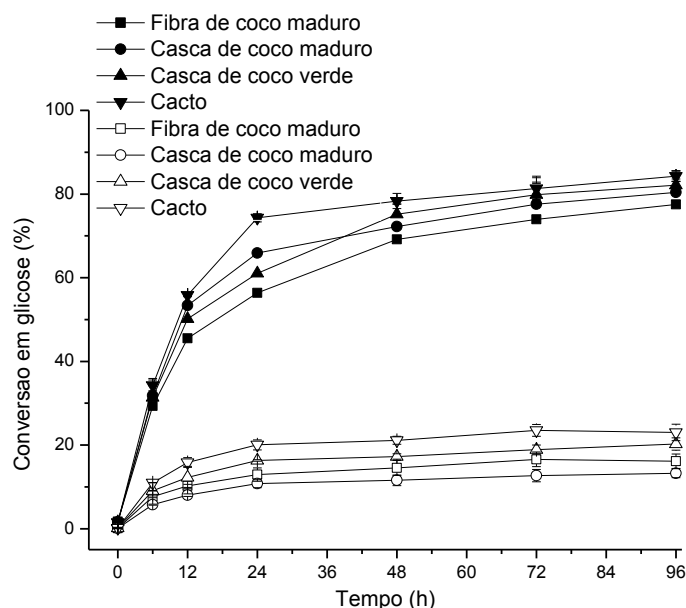


Figura 4.30. Conversão em glicose dos materiais pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h). Os materiais pré-tratados estão representados pelo ícone preto e os materiais *in natura* estão representados pelo ícone branco

Os resultados obtidos nas conversões dos materiais pré-tratados por POEA em glicose durante a hidrólise enzimática foram avaliados por ANOVA e apresentaram diferença significativa no nível de confiança de 95,0%.

O cacto pré-tratado por POEA apresentou a maior conversão em glicose (84,27%), em relação aos demais materiais pré-tratados por POEA, esse resultado pode ter sido influenciado pelo maior teor de celulose (72,67%) e o menor teor de lignina (4,64%) presente no cacto pré-tratado (conforme Tabela 4.10).

Além disso, os materiais pré-tratados por POEA apresentaram as maiores digestibilidades em glicose, quando comparados aos materiais pré-tratados por PHA-PHS, PA e PHCHS. Esses dados correlacionam-se ao fato dos materiais pré-tratados

por POEA apresentaram os maiores teores de celulose em comparação aos demais materiais pré-tratados (PHA-PHS, PA e PHCHS).

A taxa inicial de hidrólise máxima (dG/dt), que ocorre nas primeiras 12 h (concentração de glicose *versus* tempo) está apresentada na Figura 4.31, para a fibra de coco maduro e a casca de coco maduro foram 1,07 g/(L.h) e 1,30 g/(L.h), respectivamente. A casca de coco verde e o cacto tiveram a taxa inicial de hidrólise de 1,28 g/(L.h) e 1,50 g/(L.h), respectivamente. Em comparação, o trabalho realizado por Pan *et al.* (2008) relataram a taxa inicial de hidrólise de *Pinus contorta* infectado por *Dendroctonus ponderosae* e *Pinus contorta* saudável pré-tratados por POE de 1,47 g/(L.h) e 1,41 g/(L.h), respectivamente, utilizando 20 FPU/g de celulose. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho estão próximos dos resultados apresentados por Pan *et al.* (2008). Além disso, a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS e PA apresentaram a taxa inicial de hidrólise máxima de 1,49 g/(L.h) e 0,82 g/(L.h), respectivamente. A casca de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS e PA tiveram a taxa inicial de hidrólise de 1,43 g/(L.h) e 0,91 g/(L.h), respectivamente. A casca de coco verde pré-tratada por PHA-PHS e PA obtiveram a taxa inicial de hidrólise de 1,28 g/(L.h) e 0,95 g/(L.h), respectivamente. O cacto pré-tratados por PHA-PHS e PA resultaram na taxa inicial de hidrólise de 1,04 g/(L.h) e 1,03 g/(L.h), respectivamente. Esses resultados demonstram a susceptibilidade dos materiais pré-tratados por POEA ao ataque enzimático e correlacionam-se aos resultados obtidos pelas taxas iniciais de hidrólise máxima dos materiais pré-tratados por PHA-PHS e PA.

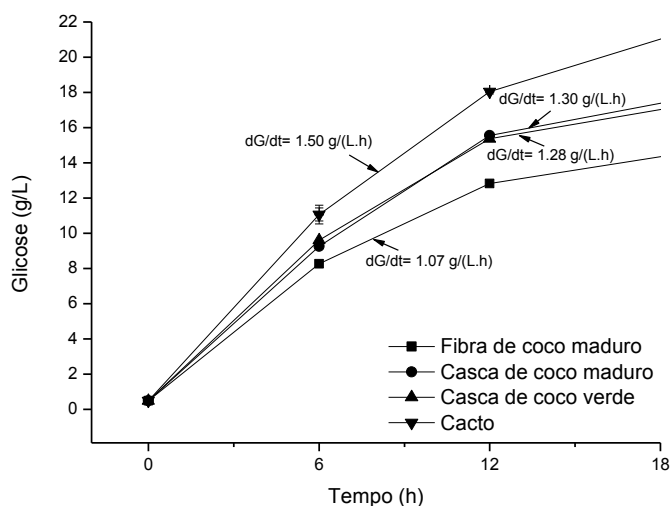


Figura 4.31. Taxa inicial de hidrólise dos materiais pré-tratados por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

4.6. Produção de etanol usando materiais lignocelulósicos pré-tratados por PHA-PHS, PA, PHCHS e POEA

As estratégias SSF e SSSF foram realizadas utilizando *P. stipitis*, *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* e os materiais pré-tratados por PHA-PHS, PA, PHCHS e POEA, selecionados por apresentarem maiores conversões em glicose durante as hidrólises enzimáticas (conforme Figuras 4.5, 4.12, 4.21 e 4.30). De acordo com Shen e Agblevor (2010), o desempenho das estratégias fermentativas pode ser avaliado por dois indicadores: rendimento de substrato em etanol (%) e a produtividade volumétrica de etanol (g/(L.h)).

4.6.1. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS

Os resultados da produção de etanol em SSF usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* e a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 25 °C por 1 h, seguido por 4,0% m/v de hidróxido de sódio sobre agitação de 100 rpm a 100 °C durante 1 h) estão apresentados na Figura 4.32

(1A, 2A e 3A). As produções de etanol foram 8,44 g/L, 9,12 g/L e 8,27 g/L para a *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*, respectivamente, no processo SSF concluído após 48 h (Tabela 4.14). O rendimento de etanol obtido pela *S. cerevisiae* foi 84,64%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,18 g/(L.h), enquanto que a *P. stipitis* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol de 79,27% e 81,71%, respectivamente. Além da *P. stipitis* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,19 g/(L.h) e 0,17 g/(L.h), respectivamente, em 48 h (Tabela 4.14). Os resultados indicam que a glicose resultante da hidrólise enzimática pode ser fermentada em etanol pela *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*, e os perfis cinéticos possuem padrão semelhante para a glicose, com rápido consumo de glicose durante a fase inicial (24 h), demonstrando que os micro-organismos são adequados para as fermentações dos açúcares em etanol pela estratégia SSF. Esses fatos também foram observados nas SSF usando a casca de coco verde pré-tratada por PA, a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS e o cacto pré-tratado por POEA.

Em recente trabalho, Chaudhary *et al.* (2012) relataram a produção de etanol em SSF usando *P. stipitis* e *Saccharum spontaneum* pré-tratada pelo processo sequencial alcalino-ácido, relatando produtividade de etanol de 0,22 g/(L.h). Em comparação, neste trabalho, a *P. stipitis* obteve produtividade de 0,19 g/(L.h). Vaithanomsat *et al.* (2011) avaliaram a eficiência na produção de etanol utilizando processo SSF e SHF usando a *S. cerevisiae* e casca de coco pré-tratado com hidróxido de sódio e relataram conversões acima de 85,0% (0,4 g/g) em ambos os casos. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho pela *S. cerevisiae* (rendimento em etanol de 84,64%). Gonçalves *et al.* (2013c) relataram a produção de etanol em SSF por *S. cerevisiae* CA11 usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS, obtendo produção, conversão e produtividade de etanol de 9,61 g/L, 90,96% e 0,20 g/(L.h), respectivamente. Gould *et al.* (1984) realizaram a produção de etanol por SSF utilizando *S. cerevisiae* e a palha de trigo pré-tratada por PHA, obtendo 90,0% do valor

de etanol teórico. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho para a SSF.

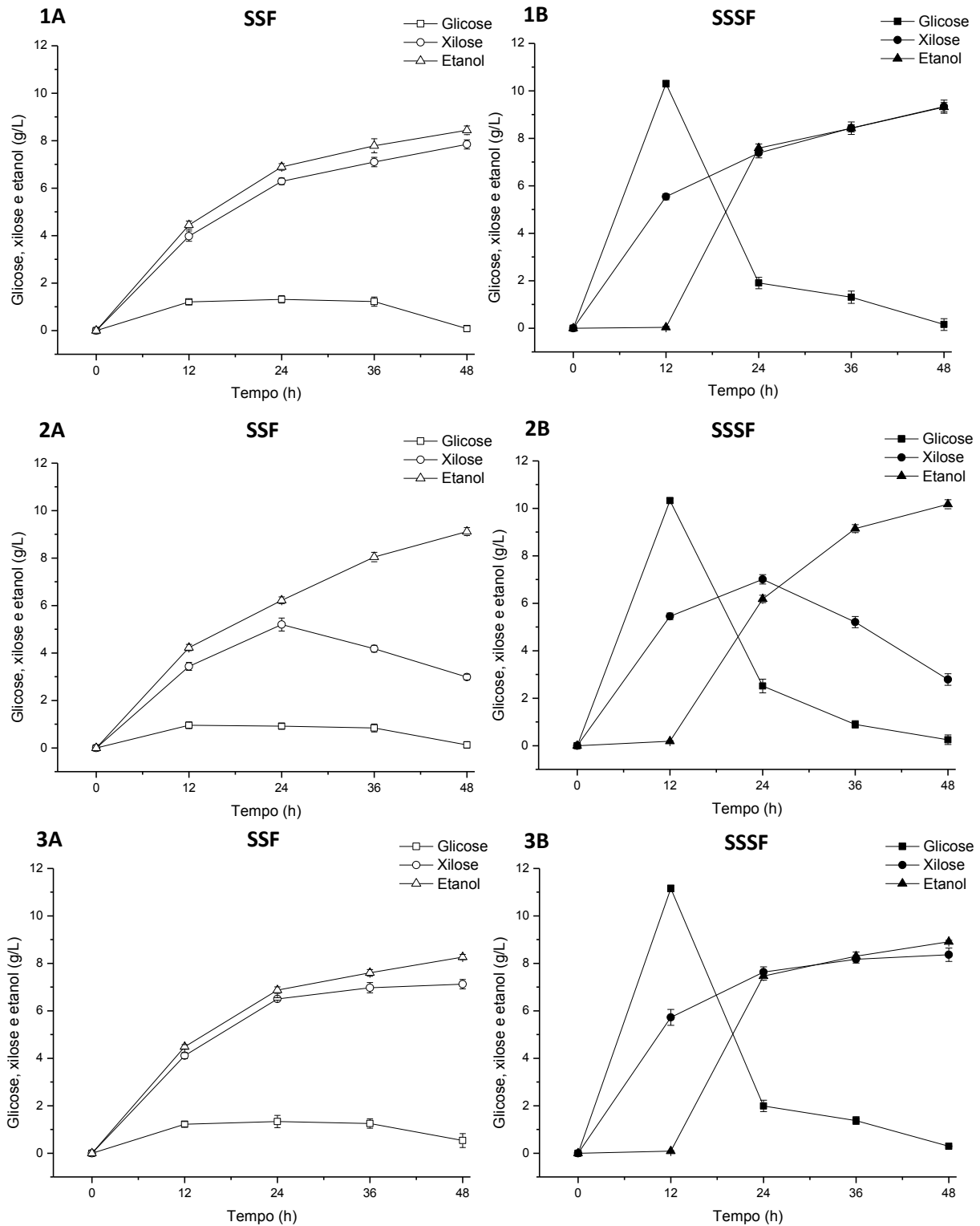


Figura 4.32. Fermentação em SSF e SSSF usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS. (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Tabela 4.14. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS

Bioprocesso	Micro-organismo	$Y_{P/S}$	Rendimento em etanol (%)	Produção de etanol (g/L)	Produtividade de etanol (g/(L.h))
SSF *	<i>S. cerevisiae</i>	0,43 ± 0,01	84,64 ± 0,61	8,44 ± 0,06	0,18 ± 0,01 **
	<i>P. stipitis</i>	0,40 ± 0,01	79,27 ± 1,56	9,12 ± 0,18	0,19 ± 0,00 **
	<i>Z. mobilis</i>	0,42 ± 0,01	81,71 ± 0,60	8,27 ± 0,06	0,17 ± 0,00 **
SSSF *	<i>S. cerevisiae</i>	0,45 ± 0,01	89,15 ± 0,73	9,32 ± 0,08	0,19 ± 0,01 **
	<i>P. stipitis</i>	0,43 ± 0,01	85,04 ± 0,54	10,17 ± 0,06	0,21 ± 0,00 **
	<i>Z. mobilis</i>	0,44 ± 0,01	85,65 ± 1,02	8,91 ± 0,11	0,19 ± 0,00 **

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% na ANOVA;

**os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% no teste T.

Os valores obtidos na produção e rendimento de etanol na estratégia SSSF utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* e a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 25 °C por 1 h, seguido por 4,0% m/v de hidróxido de sódio sobre agitação de 100 rpm a 100 °C durante 1 h) são mostrados na Figura 4.32 (1B, 2B e 3B) e Tabela 4.14. Sendo 9,32 g/L e 89,15%, 10,17 g/L e 85,04%, 8,91 g/L e 85,65% para a produção e rendimento de etanol pela *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis*, respectivamente, após 48 h. A maior produtividade foi 0,21 g/(L.h) para *P. stipitis*, enquanto a menor foi 0,19 g/(L.h) para *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, em 48 h. Os experimentos de SSSF apresentaram padrão semelhante para a disponibilidade de glicose durante a fase inicial de 12 h, com a diminuição gradual da glicose com o tempo. Esses fatos também foram observados nas SSSF utilizando a casca de coco verde pré-tratada por PA, a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS e o cacto pré-tratado por POEA. Em recente trabalho, Franco *et al.* (2012) realizaram o processo SSSF (24 h de pré-sacarificação e 24 h de SSF), utilizando *Pinus radiata* deslignificado e a *S. cerevisiae*, resultando no rendimento e produção de etanol de 90,0% e 15,5 g/L, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho para a SSSF (rendimento em etanol entre 85,65 e 89,15%).

A produção de etanol por *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS e as estratégias fermentativas SSF e SSSF

foram avaliadas estatisticamente pela ANOVA e teste T de Student (nível de confiança de 95,0%). As produções de etanol pelos micro-organismos usando SSF apresentaram diferença significativa, quando avaliadas pela ANOVA. Resultado semelhante também foi obtido pelos micro-organismos usando SSSF. A comparação entre os resultados obtidos por *S. cerevisiae* usando SSF e a *S. cerevisiae* utilizando SSSF apresentaram diferença significativa, quando avaliada pelo teste T. Resultados semelhantes também foram apresentados pela *P. stipitis* e *Z. mobilis*.

4.6.2. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando a casca de coco verde pré-tratada por PA

Os resultados da produção de etanol em SSF usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* e casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min) são mostradas na Figura 4.33 (1A, 2A e 3A), respectivamente. A produção e rendimento de etanol em SSF da *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* foram 7,44 g/L e 0,43 g/g, 8,47 g/L e 0,43 g/g, 7,30 g/L e 0,43 g/g, concluída após 48 h, respectivamente (Tabela 4.15). O rendimento de etanol da *S. cerevisiae* foi 86,90%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,15 g/(L.h), em 48 h, enquanto que a *P. stipitis* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol de 84,19% e 85,26%, respectivamente. A *P. stipitis* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,18 g/(L.h) e 0,15 g/(L.h), respectivamente, em 48 h (Tabela 4.15). Em recente trabalho, Romaní *et al.* (2012) realizaram a produção de etanol em SSF utilizando *S. cerevisiae* e *E. globulus* pré-tratado por PA, resultando na conversão em etanol de 91,1%. Romaní *et al.* (2010) realizaram a produção de etanol em SSF utilizando *S. cerevisiae* e *E. globulus* pré-tratado por PA, resultando na produção, conversão e produtividade de etanol de 15,1 g/L, 86,4% e 0,21 g/(L.h), respectivamente. Gonçalves *et al.* (2013c) relataram a produção de etanol em SSF por *S. cerevisiae* CA11 usando a casca de coco verde pré-tratada por PA, obtendo produção, conversão e produtividade de etanol de 7,61g/L, 88,85% e 0,16 g/(L.h), respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os

resultados obtidos neste trabalho para a SSF usando a casca de coco verde pré-tratada por PA.

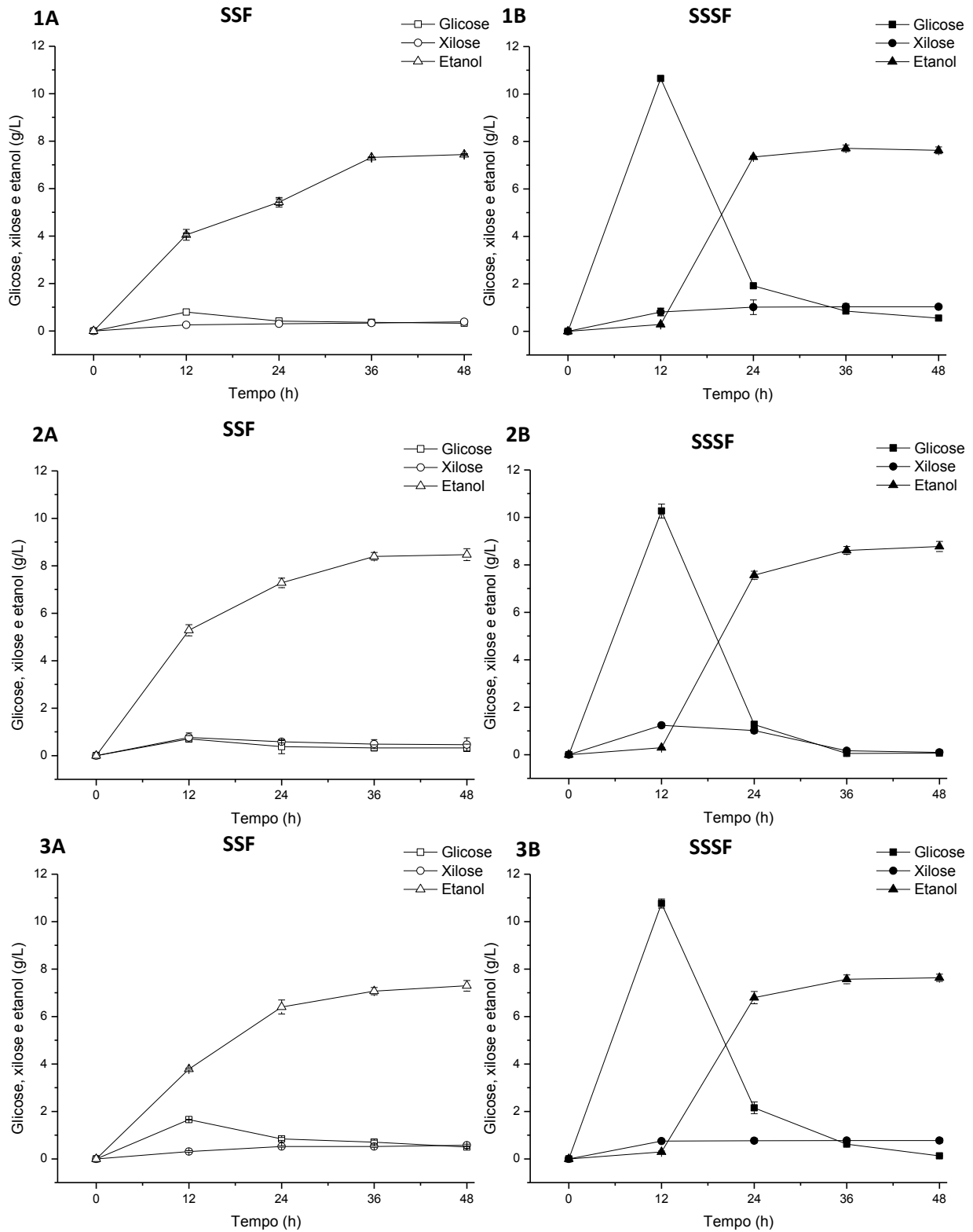


Figura 4.33. Fermentação em SSF e SSSF usando a casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min). (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Tabela 4.15. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF usando a casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min)

Bioprocesso	Micro-organismo	$Y_{P/S}$	Rendimento em etanol (%)	Produção de etanol (g/L)	Produtividade de etanol (g/(L.h))
SSF	<i>S. cerevisiae</i>	0,44 ± 0,01	86,90 ± 0,59	7,44 ± 0,17	0,15 ± 0,00 *
	<i>P. stipitis</i>	0,43 ± 0,00	84,19 ± 2,60	8,47 ± 0,26	0,18 ± 0,01
	<i>Z. mobilis</i>	0,43 ± 0,01	85,26 ± 1,45	7,30 ± 0,12	0,15 ± 0,00 *
SSSF	<i>S. cerevisiae</i>	0,45 ± 0,01	90,09 ± 1,60	7,71 ± 0,14	0,21 ± 0,00 *
	<i>P. stipitis</i>	0,44 ± 0,01	87,25 ± 2,10	8,78 ± 0,21	0,18 ± 0,00
	<i>Z. mobilis</i>	0,45 ± 0,00	89,16 ± 0,58	7,63 ± 0,05	0,16 ± 0,00 *

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% no teste T.

Os valores obtidos para a produção e rendimento de etanol com a estratégia SSSF utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* e a casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min) são mostrados na Figura 4.33 (1B, 2B e 3B). A produção e rendimento de etanol em SSSF usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* foram 7,71 g/L e 0,45 g/g, 8,78 g/L e 0,44 g/g, 7,63 g/L e 0,45 g/g, respectivamente (Tabela 4.15), após 48 h. O rendimento de etanol da *S. cerevisiae* foi 90,09%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,21 g/(L.h), em 36 h, enquanto que a *P. stipitis* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol de 87,25% e 89,16%, respectivamente. Além da *P. stipitis* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,18 g/(L.h) e 0,16 g/(L.h), respectivamente, em 48 h (Tabela 4.15).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os resultados relatados por alguns autores, como Manzanares *et al.* (2011), realizando a SSSF (24 h de pré-sacarificação e 72 h de SSF) utilizando resíduo de poda de oliveira pré-tratada por PA, que obtiveram rendimento de etanol de 50,0% do valor teórico. Elliston *et al.* (2013) realizaram a SSSF com pré-sacarificação de 12 h e elevada carga de resíduos de papel, obtiveram rendimento e produtividade de etanol de 0,28 g/g e 0,22 g/(L.h), respectivamente.

A produção de etanol por *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* utilizando a casca de coco verde pré-tratada por PA com as estratégias fermentativas SSF e SSSF foram avaliadas estatisticamente pela ANOVA e teste T (nível de confiança de 95,0%). As

produções de etanol pelos micro-organismos usando SSF não apresentaram diferença significativa, quando avaliadas pela ANOVA. Resultado semelhante também foi obtido pelos micro-organismos em SSSF. A comparação entre os resultados obtidos por *S. cerevisiae* usando SSF e *S. cerevisiae* utilizando SSSF apresentaram diferença significativa, quando avaliada pelo teste T. Resultado semelhante também foi apresentado pela *Z. mobilis*.

4.6.3. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS

Os resultados de produção de etanol em SSF usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* e a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min) estão apresentadas na Figura 4.34 (1A, 2A e 3A). A produção e rendimento de etanol em SSF usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* foram 10,91 g/L e 0,43 g/g, 10,96 g/L e 0,43 g/g, 10,81 g/L e 0,43 g/g, concluído após 48 h, respectivamente (Tabela 4.16). O rendimento de etanol de *P. stipitis* foi 87,44%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,23 g/(L.h), em 48 h, enquanto que a *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol 85,31% e 84,56%, respectivamente. A *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,30 g/(L.h), em 36 h (Tabela 4.16).

Em recente trabalho, Chaudhary *et al.* (2012) relataram a produção de etanol em SSF por *P. stipitis* usando *Saccharum spontaneum* pré-tratada pelo processo sequencial alcalino-ácido, relatando produtividade de 0,22 g/(L.h). Xia e Zhao (2009) analisaram a produção de etanol utilizando a estratégia SSF, resultando na produção de etanol de 27,8 g/L por *S. cerevisiae* ZU10 usando palha de milho pré-tratada alcalinamente. Gonçalves *et al.* (2013c) relataram a produção de etanol em SSF por *S. cerevisiae* CA11 usando fibra de coco maduro pré-tratada pelo processo PHCHS, obtendo produção, conversão e produtividade de etanol de 10,57 g/L, 82,78% e 0,22

g/(L.h), respectivamente. Vaithanomsat *et al.* (2011) estudaram a eficiência da produção de etanol utilizando a estratégia SSF e SHF com a *S. cerevisiae* usando casca de coco pré-tratado com hidróxido de sódio, relataram conversões acima de 85,0% (0,4 g/g) em ambos os casos. Esses resultados estão de acordo com os resultados relatados neste trabalho para a SSF usando a fibra de coco maduro pré-tratado por PHCHS.

Os experimentos de SSSF usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min) apresentaram a produção e rendimento de etanol para a *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* de 11,65 g/L e 0,46 g/g, 11,29 g/L e 0,46 g/g, 11,64 g/L e 0,46 g/g, respectivamente, mostrados na Figura 4.34 (1B, 2B e 3B) e Tabela 4.16, para cada micro-organismo após 48 h. O rendimento de etanol da *P. stipitis* foi 90,18%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,24 g/(L.h), em 48 h, enquanto que a *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol 91,17% e 91,03%, respectivamente. A *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,32 g/(L.h), em 36 h (Tabela 4.16). Esses resultados corroboram com os resultados relatados por Franco *et al.* (2012) em processo SSSF (24 h de pré-sacarificação e 24 h de SSF), utilizando *Pinus radiata* deslignificado e a *S. cerevisiae*, resultando no rendimento e produção de etanol de 90,0% e 15,5 g/L, respectivamente.

A produção de etanol por *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS nas estratégias fermentativas SSF e SSSF foram avaliadas estatisticamente pela ANOVA e teste T (nível de confiança de 95,0%). As produções de etanol pelos micro-organismos usando SSF não apresentaram diferença significativa, quando avaliadas pela ANOVA. Resultado semelhante também foi obtido pelos micro-organismos em SSSF. A comparação entre os resultados obtidos por *S. cerevisiae* usando SSF e *S. cerevisiae* utilizando SSSF apresentaram diferença significativa, quando avaliada pelo teste T. Resultado semelhante também foi apresentado pela *Z. mobilis*.

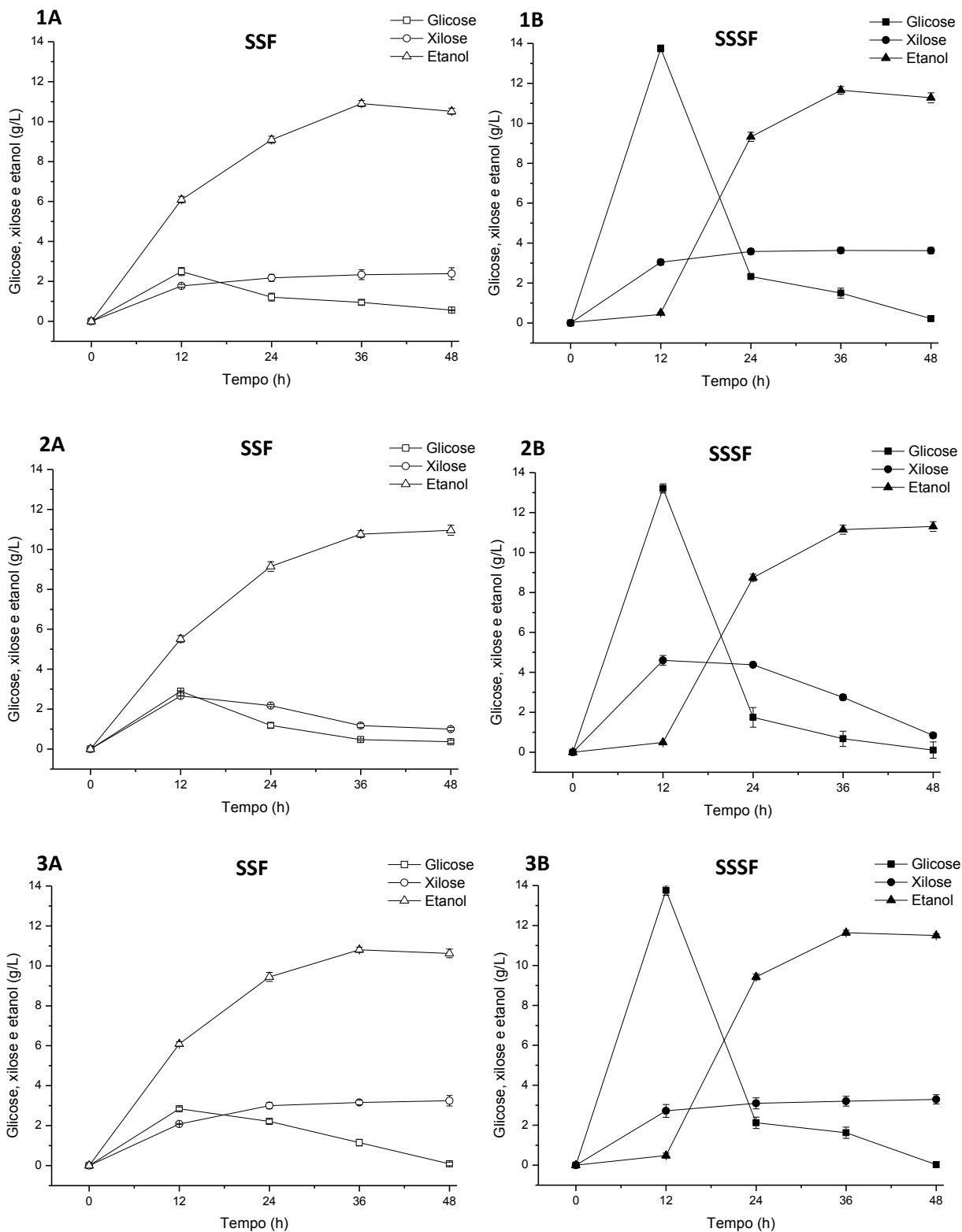


Figura 4.34. Fermentação em SSF e SSSF utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min). (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Tabela 4.16. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min)

Bioprocesso	Micro-organismo	$Y_{P/S}$	Rendimento de etanol (%)	Produção de etanol (g/L)	Produtividade de etanol (g/(L.h))
SSF	<i>S. cerevisiae</i>	0,44 ± 0,01	85,31 ± 1,17	10,91 ± 0,15	0,30 ± 0,00 *
	<i>P. stipitis</i>	0,45 ± 0,01	87,44 ± 1,79	10,96 ± 0,22	0,23 ± 0,00
	<i>Z. mobilis</i>	0,43 ± 0,01	84,56 ± 1,65	10,81 ± 0,21	0,30 ± 0,01 *
SSSF	<i>S. cerevisiae</i>	0,46 ± 0,01	91,17 ± 1,46	11,65 ± 0,19	0,32 ± 0,01 *
	<i>P. stipitis</i>	0,46 ± 0,01	90,18 ± 1,89	11,29 ± 0,24	0,24 ± 0,00
	<i>Z. mobilis</i>	0,46 ± 0,00	91,03 ± 0,68	11,64 ± 0,09	0,32 ± 0,00 *

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% no teste T.

4.6.4. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF) usando cacto pré-tratado por POEA

Os resultados da produção de etanol em SSF usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* e o cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h) são mostradas na Figura 4.35 (1A, 2A e 3A), respectivamente. A produção e rendimento de etanol em SSF para a *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* foram 12,15 g/L e 0,44 g/g, 11,86 g/L e 0,42 g/g, 11,25 g/L e 0,41 g/g, com a estratégia SSF concluída após 48 h, respectivamente (Tabela 4.17). O rendimento de etanol da *P. stipitis* foi 82,57%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,25 g/(L.h), em 48 h, enquanto que a *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol de 86,70% e 80,30%, respectivamente. A *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,34 g/(L.h) e 0,31 g/(L.h), respectivamente, em 36 h (Tabela 4.17). Em recente trabalho, Hiden *et al.* (2013) realizaram fermentação com *Kluyveromyces marxianus* em SSF usando *Japanese cypress* pré-tratada por POE, resultando em 67,0% do valor de etanol teórico. Brosse *et al.* (2009) realizaram fermentação com *S. cerevisiae* em SHF usando *M. giganteus* pré-tratada por POE, resultando em 70,0% do valor de etanol teórico. Gonçalves *et al.* (2013c) relataram a produção de etanol em SSF por *S. cerevisiae* CA11 usando cacto pré-tratado pelo processo POEA, obtendo produção, conversão e produtividade de etanol de 11,63 g/L, 83,0% e 0,24 g/(L.h), respectivamente. Esses resultados apresentados estão na mesma faixa dos resultados obtidos neste trabalho para a SSF usando o cacto pré-tratado por POEA.

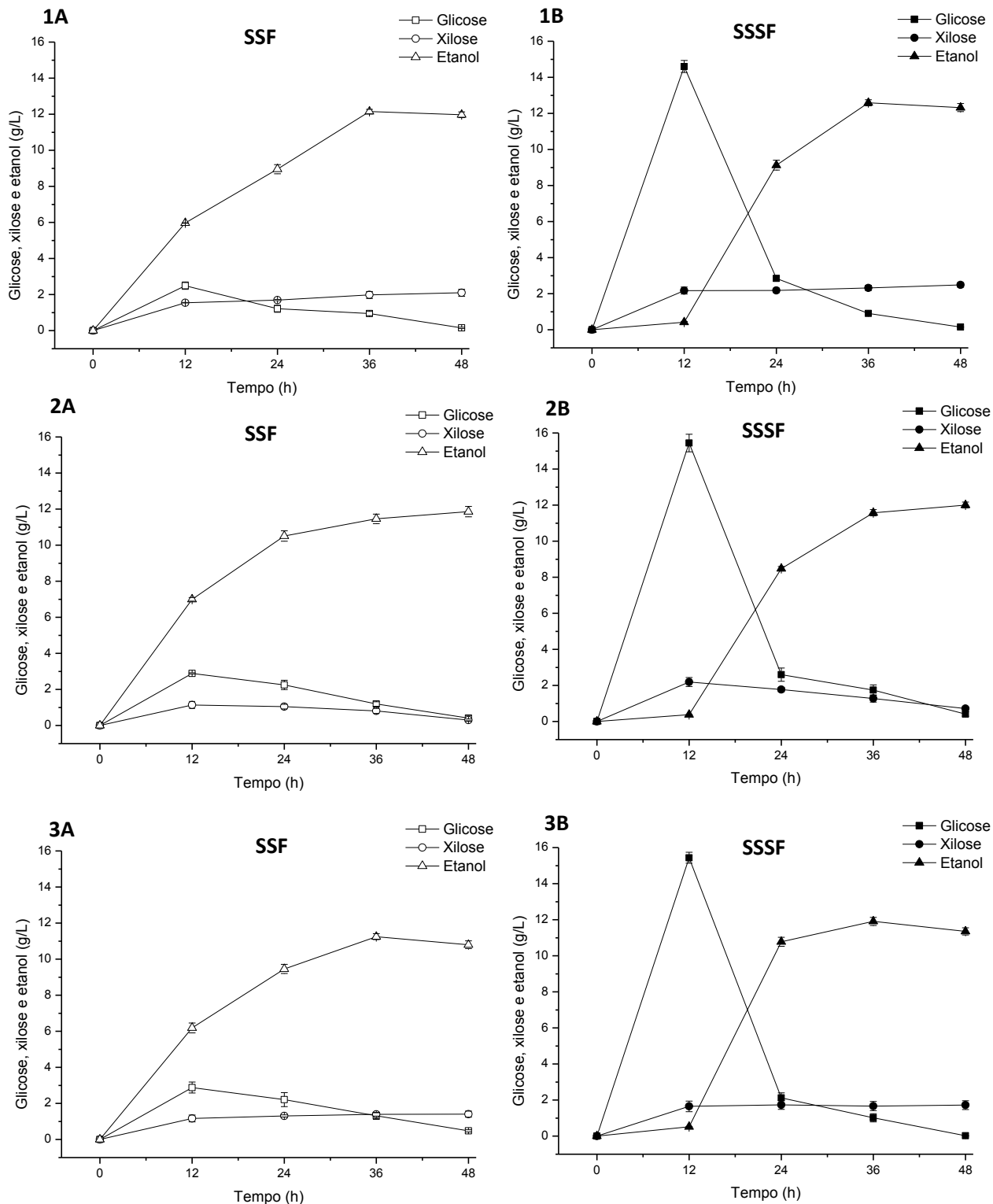


Figura 4.35. Fermentação em SSF e SSSF utilizando o cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h). (1A) *S. cerevisiae* em SSF; (1B) *S. cerevisiae* em SSSF; (2A) *P. stipitis* em SSF; (2B) *P. stipitis* em SSSF; (3A) *Z. mobilis* em SSF; (3B) *Z. mobilis* em SSSF

Tabela 4.17. Parâmetros cinéticos da fermentação de etanol utilizando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em SSF e SSSF usando o cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h)

Bioprocesso	Micro-organismo	$Y_{P/S}$	Rendimento de etanol (%)	Produção de etanol (g/L)	Produtividade de etanol (g/(L.h))
SSF *	<i>S. cerevisiae</i>	0,44 ± 0,01	86,70 ± 0,98	12,15 ± 0,24	0,34 ± 0,00
	<i>P. stipitis</i>	0,42 ± 0,01	82,57 ± 1,99	11,86 ± 0,29	0,25 ± 0,01
	<i>Z. mobilis</i>	0,41 ± 0,01	80,30 ± 0,62	11,25 ± 0,21	0,31 ± 0,00**
SSSF *	<i>S. cerevisiae</i>	0,46 ± 0,01	89,84 ± 1,51	12,59 ± 0,21	0,35 ± 0,01
	<i>P. stipitis</i>	0,43 ± 0,01	83,55 ± 1,13	12,01 ± 0,16	0,25 ± 0,00
	<i>Z. mobilis</i>	0,43 ± 0,01	85,01 ± 1,07	11,91 ± 0,20	0,33 ± 0,01**

* os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% na ANOVA;

**os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% no teste T.

Os valores obtidos na produção e rendimento de etanol usando cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h) na estratégia SSSF com a *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, *Z. mobilis* foram 12,59 g/L e 0,46 g/g, 12,01 g/L e 0,43 g/g, 11,91 g/L e 0,43 g/g, respectivamente, apresentados na Figura 4.35 (1B, 2B e 3B) e Tabela 4.17, para cada micro-organismo após 48 h. O rendimento de etanol de *P. stipitis* foi 83,55%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,25 g/(L.h), em 48 h, enquanto que a *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram rendimento de etanol de 89,84% e 85,01%, respectivamente. A *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* apresentaram produtividade volumétrica de etanol de 0,35 g/(L.h) e 0,33 g/(L.h), respectivamente, em 36 h (Tabela 4.17). Em comparação, Santos *et al.* (2012) realizaram o processo SSSF com 6 h de pré-sacarificação utilizando bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e a *S. cerevisiae* UFPEDA 1238, resultando na produção e produtividade de etanol de 27,71 g/L e 0,77 g/(L.h), respectivamente. Shen e Agblevor (2011) realizaram o processo SSSF (12 h de pré-sacarificação e 60 h de SSF), utilizando 75,0% de resíduos de algodão e 25,0% lodo de papel reciclado pré-tratados por explosão a vapor e a *S. cerevisiae*, resultando no rendimento, produção e produtividade de etanol de 71,7%, 6,17 g/L e 0,09 g/(L.h).

A produção de etanol por *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* utilizando o cacto pré-tratado por POEA com as estratégias fermentativas SSF e SSSF foram avaliadas estatisticamente pela ANOVA e teste T (nível de confiança de 95,0%). As produções de etanol pelos micro-organismos usando SSF apresentaram diferença significativa, quando avaliadas pela ANOVA. Resultado semelhante também foi obtido pelos micro-

organismos em SSSF. A comparação entre os resultados obtidos por *Z. mobilis* usando SSF e *Z. mobilis* utilizando SSSF apresentaram diferença significativa, quando avaliada pelo teste T.

A característica da *P. stipitis* em assimilar e fermentar glicose e xilose, quando comparada aos resultados obtidos nos ensaios usando *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* (micro-organismos incapazes de assimilarem e fermentarem a xilose) possibilitaram maiores produções e produtividades volumétricas de etanol pela *P. stipitis* em SSF e SSSF usando a fibra de coco pré-tratada por PHA-PHS ou a casca de coco verde pré-tratada por PA, porém com menores conversões em etanol, quando comparada a *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* (conforme Tabelas 4.14 e 4.15), devido a menor eficiência do processo fermentativo ao utilizar a xilose, quando comparada à glicose.

Além disso, o glicerol é formado como subproduto durante a produção de etanol, sobre condições de crescimento aeróbico e anaeróbico. E a produção de glicerol pelo micro-organismo pode ser influenciada pelo crescimento e fatores ambientais, como a pressão osmótica (Albertyn *et al.*, 1994; Öhgren *et al.*, 2007). Neste trabalho, as fermentações efetuadas por *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em estratégias de SSF e SSSF apresentaram concentrações mínimas de glicerol. Esses resultados estão em concordância com outros comportamentos encontrados na literatura (Öhgren *et al.*, 2007; Shen e Agblevor, 2010). Além disso, para este trabalho, *P. stipitis* não apresentou produção de xilitol durante as estratégias SSF e SSSF.

Entre os materiais pré-tratados (fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS, casca de coco verde pré-tratada por PA, fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS e cacto pré-tratado por POEA), estratégias fermentativas (SSF e SSSF) e micro-organismos (*S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*) utilizados neste trabalho destaca-se a maior produção e produtividade de etanol da estratégia SSSF usando a *S. cerevisiae* e o cacto pré-tratado por POEA, sendo 12,59 g/L e 0,35 g/(L.h), respectivamente, seguido pela *P. stipitis* (12,01 g/L e 0,25 g/(L.h)) e *Z. mobilis* (11,91 g/L e 0,33 g/(L.h)) em SSSF usando o cacto pré-tratado por POEA. Porém, o maior rendimento de etanol foi obtido

usando a estratégia SSSF, a *S. cerevisiae* e a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (91,17%), seguido pela *Z. mobilis* (91,03%) e *P. stipitis* (90,18%) usando a SSSF e a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.

Além disso, o cacto pré-tratado por POEA apresentou a maior taxa inicial de hidrólise máxima (1,50 g/(L.h)) e de digestibilidade (0,68 g de glicose/g de material seco), em comparação aos demais materiais pré-tratados (PHA-PHS, PA e PHCHS). Esses resultados corroboram com os resultados obtidos nas composições dos materiais pré-tratados, considerando o maior teor de celulose (72,67%) e o menor teor de lignina (4,60%) obtidos pelo cacto pré-tratado por POEA (conforme Tabela 4.10D) e essas características permitiram elevada eficiência na hidrólise enzimática e fermentação desse material.

Nesse sentido, os três micro-organismos obtiveram as maiores produções de etanol quando utilizado a estratégia SSSF, em comparação a SSF, sendo assim, a SSSF possibilitou maior eficiência fermentativa. Além disso, a SSSF apresentou produtividades volumétricas mais elevadas, em comparação a SSF (conforme Tabelas 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17). A maior eficiência fermentativa para a SSSF pode ser explicada pela aplicação do curto período de pré-sacarificação a 50 °C (12 h), que pode aumentar a conversão da celulose em glicose e em sequência para etanol, o que resultou também na redução promovida pela inibição enzimática, além do curto período de pré-sacarificação aumentar a solubilidade do substrato, proporcionando melhor transferência de massa no meio. E o uso de uma etapa de processo, tal como sugerido na SSSF, permite uso de elevada carga de sólido, como resultado da redução da viscosidade no meio e poderá proporcionar impacto positivo sobre o processo global. Outro aspecto importante relacionado com a produção de etanol é a necessidade de se aumentar a concentração de etanol celulósico para reduzir os custos no processo de destilação. Recentemente, Hoyer *et al.* (2013) relataram que o curto período de pré-sacarificação antes da SSF melhorara o resultado do processo. Martin *et al.* (2008) relataram que a pré-sacarificação proporcionou rápida liquefação e mistura após 6 h. De

acordo com de Souza *et al.* (2012), a pré-sacarificação poderá proporcionar efeito positivo, aumentando o rendimento e produtividade volumétrica de etanol. Além disso, relataram que a utilização de leveduras termotolerantes e a etapa de pré-sacarificação são pontos essenciais para aumento da produtividade de etanol no processo SSF. Resultados similares foram obtidos neste trabalho, indicando que a SSSF consiste na melhor estratégia fermentativa, quando comparada a SSF (conforme Tabelas 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17).

Assim, as estratégias fermentativas SHF, SSF e SSSF foram avaliadas por alguns autores, por exemplo, relatadas por Mesa *et al.* (2011), demonstrando que 1,0 tonelada de bagaço de cana-de-açúcar foi possível obter 192,0, 172,0 e 198,0 L de etanol usando SHF, SSF e SSSF, respectivamente. Relatando que SSSF é a melhor estratégia fermentativa com base no rendimento e volume de etanol. De Souza *et al.* (2012) realizaram a produção de etanol por SHF, SSF e SSF com pré-sacarificação, sendo SHF (72 h de pré-sacarificação e 8 h de fermentação); SSF-0 (24 h de SSF); SSF-24 (24 h de pré-sacarificação a 50 °C e 8 h de SSF); SSF-72 (72 h de pré-sacarificação a 50 °C e 8 h de SSF). A produtividade volumétrica foi calculada usando o menor tempo necessário para atingir a concentração máxima de etanol durante o processo. Os resultados mostram que o aumento da produtividade volumétrica de etanol por *K. marxianus* UFV-3 a 42 °C está relacionado com o tempo de pré-sacarificação, a partir de 0,43 g/(L.h), a 0 h e 1,79 g/(L.h), após 72 h de pré-sacarificação. Os maiores rendimentos de etanol foram observados na fermentação realizada após a pré-sacarificação a 50 °C, comparado ao ensaio com pré-sacarificação a 37 °C ou a 42 °C, indicando que a temperatura de pré-sacarificação é mais importante do que as temperaturas de fermentações utilizadas para a produção de etanol (37 °C e 42 °C) (de Souza *et al.*, 2012). Esses resultados demonstram a importância de realizar a etapa de pré-sacarificação antes do processo fermentativo.

A comparação das estratégias SHF, SSF e SSSF foram também relatadas por Manzanares *et al.* (2011), realizando a SHF (72 h de sacarificação e 24 h de

fermentação), SSF (72 h de SSF) e SSSF (24 h de pré-sacarificação e 72 h de SSF) utilizando resíduo de poda de oliveira pré-tratada por PA (210 °C por 10 min) e *S. cerevisiae*, obtendo produção de etanol por SHF, SSF e SSSF de 29,5 g/L (47,0% do valor de etanol teórico), 7,1 g/L (11,0% do valor de etanol teórico) e 31,1 g/L (50,0% do valor de etanol teórico), respectivamente. Öhgren *et al.* (2007) compararam os rendimentos da SHF, SSF e SSF com período de pré-sacarificação utilizando a palha de milho pré-tratada com dióxido de enxofre e vapor. Os dois experimentos de SSF apresentaram melhores rendimentos do que a SHF. Shen e Agblevor (2010) realizaram a fermentação com *S. cerevisiae* em SSF (72 h), SSSF-24 (24 h pré-sacarificação e 48 h de SSF), SSSF-12 (12 h pré-sacarificação e 60 h de SSF) utilizando celulose microcristalina. A SSSF-24 e SSSF-12 atingiram maiores produções e produtividades de etanol do que a SSF, sendo 16,0 e 14,0 g/L, 0,20 e 0,19 g/(L.h), respectivamente.

Além disso, a comparação das estratégias SHF, SSF e SSSF evidenciada por Santos *et al.* (2010), usando *S. cerevisiae* em SHF (72 h), SSF (24 h de SSF), SSSF I (16 h de pré-sacarificação e 24 h de SSF) e SSSF II (16 h de pré-sacarificação e 24 h de SSF, em 2 fases de adição de enzimas), bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e deslignificado com hidróxido de sódio. Obtiveram os melhores resultados das produtividades volumétricas de etanol em SSSF I e SSSF II, sendo 0,29 e 0,30 g/(L.h), respectivamente. A SSSF necessitou de menor tempo de processo e a pré-sacarificação permitiu rápida liquefação do bagaço. Evidenciando que a pré-sacarificação possibilita redução no tempo do processo fermentativo, quando comparado a SSF e SHF.

Diante disso, os resultados relatados por Mesa *et al.* (2011), de Souza *et al.* (2012), Manzanares *et al.* (2011), Öhgren *et al.* (2007), Shen e Agblevor (2010) e Santos *et al.* (2010) evidenciaram a SSSF como a melhor estratégia fermentativa. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

4.7. Produção de etanol em biorreator usando a SSSF

Os experimentos foram realizados em biorreator equipado com tanque agitado de 2,0 L e volume de trabalho de 1,0 L. As condições fermentativas foram baseadas em resultados obtidos nas etapas anteriores, realizadas em frascos Erlenmeyer (conforme seções 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3 e 4.6.4). Sendo selecionada a estratégia fermentativa SSSF e a *S. cerevisiae*. Os materiais pré-tratados utilizados foram a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS (7,35% v/v de peróxido de hidrogênio em pH 11,5 a 25 °C por 1 h, seguido por 4,0% m/v de hidróxido de sódio sobre agitação de 100 rpm a 100 °C durante 1 h), casca de coco verde pré-tratada por PA (200 °C e 50 min), fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS (2,5% v/v de hidróxido de sódio a 180 °C por 30 min) e cacto pré-tratado por POEA (80,0% v/v de etanol a 200 °C por 1 h).

Os resultados obtidos pelos processos fermentativos em biorreator usando a estratégia SSSF, materiais pré-tratados e *S. cerevisiae* são mostrados na Figura 4.36A-D. Esses resultados indicam que a glicose resultante da hidrólise enzimática pode ser fermentada em etanol pela *S. cerevisiae*. E os perfis cinéticos apresentaram aumento na concentração de glicose no meio de cultivo até o momento da inoculação (Figura 4.36). Além disso, os perfis cinéticos apresentaram tendência reducional na concentração de etanol a partir de 36 h de processo, devido à redução de glicose no meio de cultivo.

As produções e rendimentos de etanol usando SSSF e *S. cerevisiae* sobre a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS, casca de coco verde pré-tratada por PA, fibra de coco maduro pré-tratada pro PHCHS e cacto pré-tratado por POEA foram 9,49 g/L e 0,46 g/g, 7,62 g/L e 0,45 g/g, 10,49 g/L e 0,42 g/g, 12,42 g/L e 0,45 g/g, respectivamente (Figura 4.36 e Tabela 4.18).

O rendimento de etanol utilizando *S. cerevisiae* sobre a casca de coco verde pré-tratada por PA foi 82,08%, com produtividade volumétrica de etanol de 0,21 g/(L.h), em 48 h, enquanto que, a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS, a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS e o cacto pré-tratado por POEA obtiveram 89,80%,

89,06%, 88,65% e 0,26 g/(L.h), 0,29 g/(L.h), 0,34 g/(L.h), para o rendimento e produtividade volumétrica de etanol, respectivamente (Tabela 4.18), em 36 h.

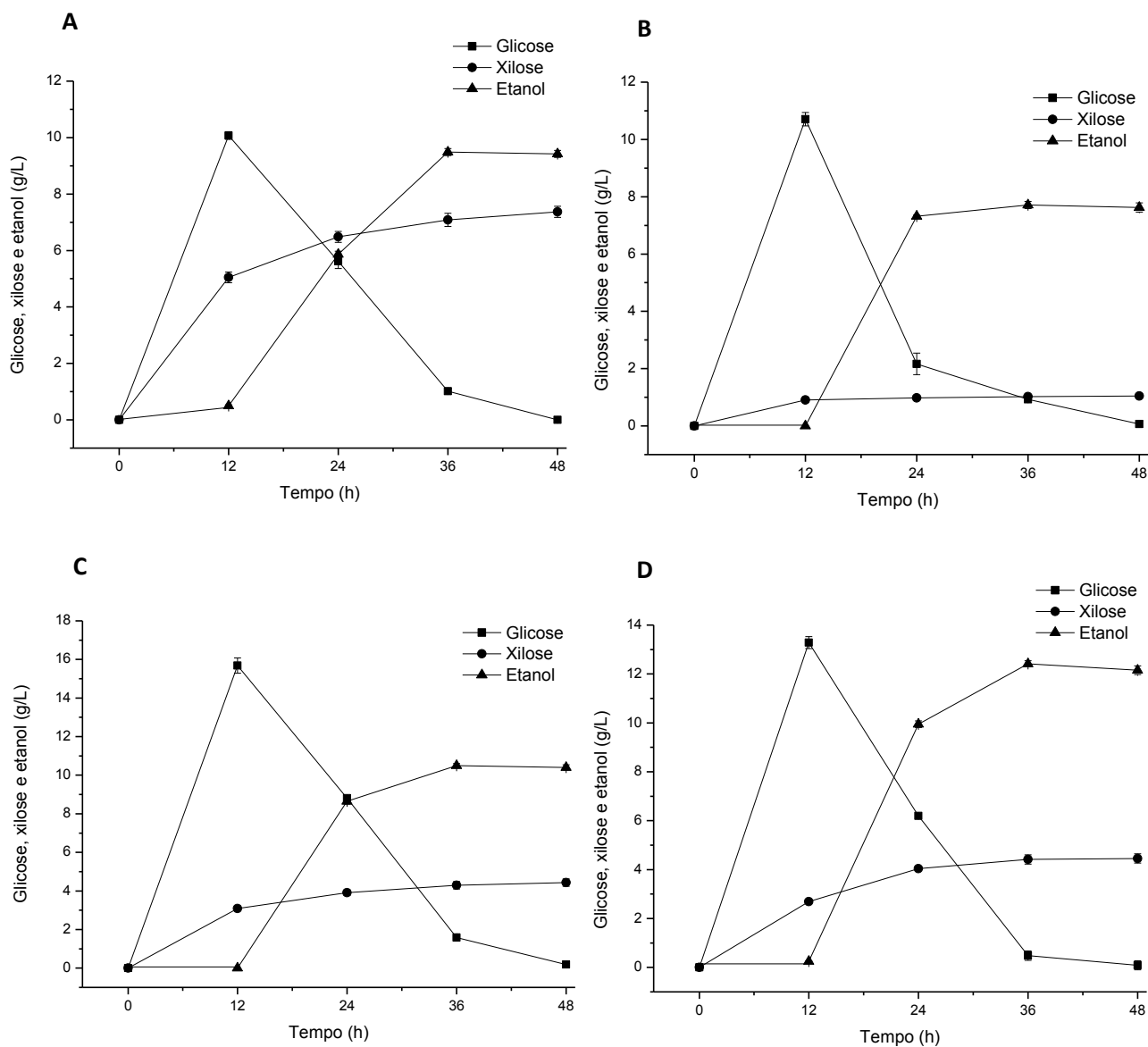


Figura 4.36. Fermentação em biorreator usando a estratégia SSSF e *S. cerevisiae*. (A) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS; (B) Casca de coco verde pré-tratada por PA; (C) Fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS; (D) Cacto pré-tratado por POEA

Tabela 4.18. Parâmetros cinéticos das fermentações em biorreator usando a estratégia SSSF, *S. cerevisiae* e materiais pré-tratados

Material lignocelulósico	Pré-tratamento	$Y_{P/S}$	Rendimento de etanol (%)	Produção de etanol (g/L)	Produtividade de etanol (g/(L.h))
Fibra de coco maduro	PHA-PHS	0,46 ± 0,01	89,90 ± 1,30	9,49 ± 0,14	0,26 ± 0,00
		0,45* ± 0,01	89,15 ± 0,73	9,32 ± 0,08	0,19 ± 0,01
Casca de coco verde	PA	0,45 ± 0,01	89,06 ± 1,16	7,62 ± 0,21	0,21 ± 0,01
		0,45* ± 0,01	90,09 ± 1,60	7,71 ± 0,14	0,21 ± 0,00
Fibra de coco maduro	PHCHS **	0,42 ± 0,01	82,08 ± 1,27	10,49 ± 0,16	0,29 ± 0,01 ***
		0,46* ± 0,01	91,17 ± 1,46	11,65 ± 0,19	0,32 ± 0,01 ***
Cacto	POEA	0,45 ± 0,01	88,65 ± 1,78	12,42 ± 0,25	0,34 ± 0,01
		0,46* ± 0,01	89,84 ± 1,51	12,59 ± 0,21	0,35 ± 0,01

* em frasco Erlenmeyer com 48 mL de volume útil

** os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% na ANOVA;

*** os valores são significativos ao nível de confiança de 95,0% no teste T.

Em recente trabalho, Rabelo *et al.* (2013) realizaram SSF em biorreator usando *S. cerevisiae* e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com hidróxido de cálcio, obtendo rendimento de etanol de 0,45 g/g. Singh e Bishnoi (2013) realizaram SSF em biorreator usando *S. cerevisiae* e palha de trigo pré-tratada por micro-ondas e solução alcalina, resultando na produção e rendimento de etanol de 16,4 g/L e 0,48 g/g, respectivamente. Esses resultados obtidos por Rabelo *et al.* (2013) e Singh e Bishnoi (2013) corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

As análises dos parâmetros cinéticos são importantes para avaliar os efeitos proporcionados pela estratégia fermentativa e aumento de escala (Kumar *et al.*, 2013). Dessa forma, os resultados obtidos em biorreator (Tabela 4.18) e os resultados obtidos nos experimentos efetuados em frascos Erlenmeyer evidenciaram proximidade (conforme Tabelas 4.14, 4.15 e 4.17), indicando eficiência no processo fermentativo decorrente do aumento volumétrico. Porém, os experimentos realizados em biorreator utilizando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS apresentaram reduções na eficiência fermentativa, quando comparado aos resultados obtidos em frascos Erlenmeyer (conforme Tabela 4.16), indicando a influência do aumento volumétrico no processo fermentativo.

Nesse sentido, as maiores produções e produtividades de etanol foram obtidas nas fermentações realizadas em biorreator e frasco Erlenmeyer usando o cacto pré-

tratado por POEA (Tabelas 4.17 e 4.18). Além disso, a fermentação realizada em biorreator usando *S. cerevisiae* e fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS apresentou maior produtividade volumétrica de etanol (0,26 g/(L.h)), em 36h, que a realizada em frasco Erlenmeyer (0,19 g/(L.h)), em 48 h (conforme Tabela 4.18). Esses dados evidenciam o menor tempo necessário para a fermentação em biorreator.

Os resultados obtidos pelas fermentações em biorreator foram analisados pela ANOVA (nível de confiança de 95,0%) e apresentaram diferença significativa. Em relação ao teste T (nível de confiança de 95,0%), houve diferença significativa apenas entre as fermentações realizadas em biorreator e as fermentações realizadas em frasco Erlenmeyer usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS.

Além disso, alguns autores realizaram processos fermentativos com diferentes volumes de meio de cultivo, como Bari *et al.* (2002) que relataram o uso de *Populus tremuloides* pré-tratado por explosão a vapor e a SSF em três escalas diferentes: frasco Erlenmeyer de 250 mL inserido em uma incubadora termostática; biorreator agitado com volume de 10,0 L; biorreator em escala piloto com volume de 50,0 L, resultando em rendimentos teóricos de etanol de 85,0% em frasco Erlenmeyer, 79,0% em biorreator agitado e 75,0% no biorreator em escala piloto. Além das proporções utilizadas de sólido-líquidos também forneceram diferenças na produção de etanol e os rendimentos obtidos através da operação fermentativa com biorreator em escala piloto são no máximo 55,0% do obtido em condições análogas à escala em frasco Erlenmeyer. Nghiem *et al.* (2011) realizaram SSSF em frasco Erlenmeyer e biorreatores com volume de 7,5, 70,0 e 300,0 L sobre a *Hordeum vulgare L.* pré-tratado, resultando na produção de etanol (v/v) de 15,07% (89,4% do valor teórico de etanol), 14,19% (84,2% do valor teórico de etanol), 14,50% (86,1% do valor teórico de etanol) e 12,86% (78,1% do valor teórico de etanol), respectivamente. Dessa forma, esses trabalhos evidenciam a tendência reducional da eficiência fermentativa do processo ao serem submetidos ao aumento volumétrico. Fato esse, similar aos resultados obtidos em biorreator para a

fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS, quando comparado aos resultados obtidos em frasco Erlenmeyer.

4.8. Fermentação alcoólica na presença de compostos inibitórios

4.8.1. Fermentação alcoólica na presença de furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico

Os parâmetros cinéticos obtidos durante os processos fermentativos usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* na presença dos compostos inibitórios (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) estão apresentados na Tabela 4.19 e cultivados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 3.5. Os resultados obtidos demonstram os efeitos sinérgicos negativos promovidos pela presença dos compostos inibitórios no meio de cultivo, proporcionando redução na produção e produtividade de etanol. Resultados similares foram relatados por Larsson *et al.* (1999), em ensaios fermentativos na presença de ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural e HMF, usados separadamente, os quais apresentaram redução na produção e produtividade de etanol devido ao aumento das concentrações desses compostos inibitórios.

Tabela 4.19. Fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* na presença de compostos inibitórios no meio de cultivo

Experimento	Micro-organismo	$Y_{x/s}$	Etanol (g/g)	Produção de etanol (g/L)	Rendimento de etanol (%)	Produtividade de etanol (g/L.h)	Produção de biomassa (g/L)	Consumo de substrato (%)
1	<i>S. cerevisiae</i>	0,067	0,32	11,59	62,29	0,24	2,92	73,04
	<i>P. stipitis</i>	0,081	0,35	5,90	69,57	0,12	1,87	32,79
	<i>Z. mobilis</i>	0,056	0,37	10,38	73,47	0,22	2,06	52,79
2	<i>S. cerevisiae</i>	0,053	0,49	9,73	96,88	0,20	1,53	39,43
	<i>P. stipitis</i>	0,098	0,41	2,10	80,89	0,08	1,41	17,98
	<i>Z. mobilis</i>	0,069	0,36	5,47	71,23	0,11	1,53	28,60
3	<i>S. cerevisiae</i>	0,047	0,40	7,97	79,39	0,17	1,41	38,53
	<i>P. stipitis</i>	0,283	0,38	1,19	74,00	0,02	1,36	5,82
	<i>Z. mobilis</i>	0,066	0,46	5,47	90,80	0,11	1,27	22,18
4	<i>S. cerevisiae</i>	0,054	0,40	5,48	78,60	0,11	1,23	27,47
	<i>P. stipitis</i>	0,168	0,21	0,90	41,86	0,02	1,22	8,16
	<i>Z. mobilis</i>	0,079	0,48	4,52	94,99	0,09	1,23	17,65
5	<i>S. cerevisiae</i>	0,040	0,36	7,97	70,88	0,17	1,37	43,48
	<i>P. stipitis</i>	0,087	0,12	1,10	23,72	0,02	1,30	17,91
	<i>Z. mobilis</i>	0,054	0,36	5,81	70,14	0,12	1,37	30,71
6	<i>S. cerevisiae</i>	0,054	0,20	2,94	39,20	0,06	1,29	29,36
	<i>P. stipitis</i>	0,146	0,19	0,85	37,83	0,02	1,16	8,78
	<i>Z. mobilis</i>	0,080	0,30	2,94	57,87	0,06	1,29	19,08
7	<i>S. cerevisiae</i>	0,056	0,16	2,38	31,36	0,05	1,32	28,78
	<i>P. stipitis</i>	0,165	0,21	0,84	41,36	0,02	1,17	7,65
	<i>Z. mobilis</i>	0,084	0,24	2,38	47,51	0,05	1,32	18,22
8	<i>S. cerevisiae</i>	0,057	0,19	2,81	37,61	0,06	1,33	29,00
	<i>P. stipitis</i>	0,196	0,22	0,78	42,92	0,02	1,21	7,05
	<i>Z. mobilis</i>	0,088	0,30	2,81	58,02	0,06	1,32	18,03
9	<i>S. cerevisiae</i>	0,053	0,17	3,24	33,87	0,07	1,48	36,93
	<i>P. stipitis</i>	0,264	0,31	0,78	60,04	0,02	1,18	4,98
	<i>Z. mobilis</i>	0,089	0,29	3,24	57,22	0,07	1,48	20,96
10	<i>S. cerevisiae</i>	0,061	0,15	1,73	29,35	0,04	1,20	22,57
	<i>P. stipitis</i>	0,145	0,15	0,79	29,16	0,02	1,29	10,43
	<i>Z. mobilis</i>	0,080	0,11	1,01	22,43	0,02	1,20	16,51
11	<i>S. cerevisiae</i>	0,074	0,16	1,34	30,47	0,03	1,13	16,59
	<i>P. stipitis</i>	0,183	0,19	0,73	37,66	0,02	1,21	7,46
	<i>Z. mobilis</i>	0,099	0,21	1,34	40,57	0,03	1,13	12,08
12	<i>S. cerevisiae</i>	0,046	0,10	1,38	18,92	0,03	1,16	27,78
	<i>P. stipitis</i>	0,148	0,15	0,66	29,89	0,01	1,16	8,43
	<i>Z. mobilis</i>	0,068	0,14	1,38	27,83	0,03	1,16	18,11
13	<i>S. cerevisiae</i>	0,061	0,15	2,01	30,09	0,04	1,29	25,50
	<i>P. stipitis</i>	0,172	0,26	1,24	50,50	0,03	1,34	9,40
	<i>Z. mobilis</i>	0,085	0,33	3,09	64,88	0,06	1,29	17,46
14	<i>S. cerevisiae</i>	0,059	0,07	0,83	13,71	0,02	1,19	23,13
	<i>P. stipitis</i>	0,208	0,22	0,88	43,95	0,02	1,33	7,64
	<i>Z. mobilis</i>	0,085	0,10	0,83	19,76	0,02	1,19	15,39
15	<i>S. cerevisiae</i>	0,066	0,08	0,86	16,58	0,02	1,17	19,98
	<i>P. stipitis</i>	0,205	0,29	0,90	56,16	0,02	1,30	6,18
	<i>Z. mobilis</i>	0,097	0,12	0,86	24,28	0,02	1,17	13,09
16	<i>S. cerevisiae</i>	0,065	0,08	0,70	16,40	0,01	1,04	16,30
	<i>P. stipitis</i>	0,226	0,30	0,67	57,99	0,01	1,02	4,41
	<i>Z. mobilis</i>	0,130	0,13	0,70	24,76	0,01	1,21	10,36
17	<i>S. cerevisiae</i>	0,050	0,14	2,11	27,60	0,04	1,24	29,30
	<i>P. stipitis</i>	0,113	0,15	1,11	29,21	0,02	1,36	14,56
	<i>Z. mobilis</i>	0,063	0,18	2,11	35,36	0,04	1,24	21,94
18	<i>S. cerevisiae</i>	0,052	0,15	2,10	29,36	0,04	1,22	27,35
	<i>P. stipitis</i>	0,111	0,16	1,09	30,72	0,02	1,29	13,59
	<i>Z. mobilis</i>	0,065	0,19	2,10	37,61	0,04	1,22	20,48
19	<i>S. cerevisiae</i>	0,049	0,13	2,13	25,34	0,04	1,25	31,82
	<i>P. stipitis</i>	0,112	0,16	1,07	30,56	0,02	1,28	13,26
	<i>Z. mobilis</i>	0,066	0,18	2,13	35,78	0,04	1,25	22,54

Os cultivos apresentaram consumo máximo de glicose no meio de cultivo de 73,04% usando *S. cerevisiae*, 32,79% para a *P. stipitis* e 52,79% usando *Z. mobilis*, esses resultados foram obtidos no experimento 1 (Tabela 4.19), o qual apresenta menores concentrações de compostos inibitórios presente no meio de cultivo (conforme Tabela 3.5).

Essas características promovidas pelos compostos inibitórios consistem em modificar o pH neutro intracelular e diminuir a viabilidade celular (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000), conseqüentemente, influenciando no crescimento celular dos micro-organismos em anaerobiose e na produção de etanol (Delgenes *et al.*, 1996; Taherzadeh *et al.*, 1999; Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Taherzadeh *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011b). Esses efeitos também foram observados nos experimentos realizados neste trabalho. De acordo com Liu *et al.* (2004), os micro-organismos industriais utilizados na produção de etanol não suportam as condições de estresse associado com o processo de conversão de biomassa durante produção de etanol celulósico.

A presença de furfural e HMF no meio de cultivo inibiram o crescimento e fermentação dos micro-organismos, esse fato também foi descrito por Liu *et al.* (2004) e Taherzadeh *et al.* (2000). Os efeitos são dependentes da concentração de furano e do micro-organismo utilizado (Almeida *et al.*, 2007). Segundo Delgenes *et al.* (1996) relatam o efeito inibitório de HMF em concentração superior a 1,0 g/L na fermentação usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*. Além da *Z. mobilis* cultivada na presença de 2,0 g/L de furfural, que apresentou inibição no crescimento e produção de etanol de 64,0% e 44,0%, respectivamente (Delgenes *et al.*, 1996).

A presença dos compostos inibitórios promoveu elevada inibição dos cultivos fermentativos de *P. stipitis*, resultados similares foram obtidos por Bellido *et al.* (2011), na presença de HMF, furfural e ácido acético causando baixo consumo de glicose durante o cultivo de *P. stipitis*. Bellido *et al.* (2011) verificaram efeito inibitório na presença de furfural em cultivo usando *P. stipitis*, observando que a assimilação de

açúcar foi completamente inibida na presença de 2,0 g/L de furfural, entretanto, esse efeito foi mais acentuado na presença de ácido acético. Em cultivo realizado com hidrolisado de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor houve a completa inibição no crescimento de *P. stipitis* (Bellido *et al.*, 2011). Díaz *et al.* (2009) relataram a redução na produtividade de etanol em cultivos de *P. stipitis* realizados com 2,0 g/L de furfural e ausência de consumo de açúcar em cultivos realizados com 4,0 g/L de furfural.

Neste trabalho a *S. cerevisiae* apresentou efeitos negativos na presença de compostos inibitórios, esses efeitos também foram relatados por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) e Lee *et al.* (2011b). Esses autores relataram que a interação sinérgica de furfural e HMF proporciona menor rendimento de etanol nos cultivos usando *S. cerevisiae*. Em análise separada de furfural e HMF, em concentrações iguais, o HMF apresentou maior efeito inibitório. Embora, as produtividades volumétricas máximas foram menores nas fermentações contendo simultaneamente HMF e furfural (Lee *et al.*, 2011b).

Os dados estatísticos apresentados na Tabela 4.20 são referentes aos efeitos sinérgicos negativos dos cultivos de *S. cerevisiae* (12, 24, 36 e 48 h), *P. stipitis* (12, 24, 36 e 48 h) e *Z. mobilis* (12, 24, 36 e 48 h) promovidos pelos compostos inibitórios presente nesses cultivos. Esses dados evidenciam a inibição dos micro-organismos promovida pelos compostos inibitórios presente nos cultivos fermentativos. Porém, os efeitos inibitórios foram mais significativos nos cultivos usando *P. stipitis*, seguido pela *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*. Em relação à influência dos compostos inibitórios, pode-se indicar de forma decrescente o efeito inibitório de cada composto (Tabela 4.20), na seguinte sequência para cada micro-organismo testado, *S. cerevisiae*: ácido fórmico, ácido acético, HMF, furfural e ácido levulínico, *P. stipitis*: ácido fórmico, HMF, ácido acético, furfural e ácido levulínico, *Z. mobilis*: ácido fórmico, ácido acético, furfural, HMF e ácido levulínico. Segundo Liu *et al.* (2004), os efeitos de diferentes inibidores variam amplamente entre os diferentes micro-organismos e normalmente, os ácidos orgânicos são mais tóxicos nas bactérias que em leveduras. Embora, os ácidos orgânicos

apresentem acentuado efeito inibitório em levedura (Huang *et al.*, 2011). Em cultivos realizados por Huang *et al.* (2011) usando *S. cerevisiae* na presença de ácidos fracos, HMF, furfural e fenóis, observaram que a *S. cerevisiae* foi mais sensível aos ácidos fracos e apresentou ausência de efeito inibitório por HMF, furfural e fenóis. Os resultados obtidos neste trabalho foram similares, principalmente pelo efeito inibitório promovido pelo ácido fórmico e ácido acético. De acordo com Huang *et al.* (2011), os ácidos fracos, principalmente o ácido fórmico e ácido acético são os principais inibidores dos micro-organismos presente no hidrolisado lignocelulósico pré-tratado.

Tabela 4.20. Análise estatística da fermentação alcoólica usando *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* na presença de compostos inibitórios no meio de cultivo

Micro-organismo	Tempo (h)	Fator	Signi./Inter.	Furfural (1)	HMF (2)	Ácido acético (3)	Ácido fórmico (4)	Ácido levulínico (5)	1 por 2	1 por 3	1 por 4	1 por 5	2 por 3	2 por 4	2 por 5	3 por 4	3 por 5	4 por 5	
<i>S. cerevisiae</i>	12	Efeito	1,3745	-0,2047	-0,2687	-0,3799	-0,8230	-0,1581	0,1710	0,0048	0,1748	0,0691	-0,0690	0,2522	-0,018	0,3524	-0,203	0,1942	
		P	0,0004	0,0216	0,0127	0,0064	0,0014	0,0355	0,0306	0,8890	0,0293	0,1527	0,1530	0,0144	0,6248	0,0075	0,0221	0,0239	
	24	Efeito	2,2157	-0,7490	-0,8361	-1,5798	-2,8459	-0,2450	0,4939	-0,493	0,2652	0,0388	0,2640	0,3800	0,7772	0,9636	-0,028	-0,124	
		P	0,0005	0,0193	0,0156	0,0044	0,0014	0,1462	0,0428	0,0429	0,1288	0,7490	0,1297	0,0694	0,0180	0,0118	0,8133	0,3602	
	36	Efeito	2,9199	-1,0512	-1,8936	-2,4026	-3,8582	-0,4751	0,4649	-0,13	0,3216	-0,587	0,6972	1,1873	0,2297	1,9122	0,3200	0,1797	
		P	0,0007	0,0237	0,0075	0,0047	0,0018	0,1023	0,1062	0,5125	0,1905	0,0707	0,0517	0,0188	0,2983	0,0074	0,1919	0,3896	
	48	Efeito	3,6407	-1,6980	-2,1838	-2,5806	-4,7415	-0,8438	1,2100	-0,0620	0,5438	-0,373	0,1639	1,2126	0,0033	2,2074	-0,118	0,7989	
		P	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0001	0,0000	0,0224	0,0003	0,0006	0,0033	0,0000	0,7630	0,0000	0,0063	0,0001	
	<i>P. stipitis</i>	12	Efeito	0,6587	-0,0357	-0,0371	-0,0238	-0,0253	0,0242	0,0437	0,0318	0,0173	-0,024	0,0340	0,0276	-0,027	0,0220	-0,053	-0,0320
			P	0,0000	0,0715	0,0669	0,1427	0,1296	0,1391	0,0494	0,0878	0,2292	0,1451	0,0780	0,1118	0,1157	0,1618	0,0348	0,0869
		24	Efeito	0,7772	-0,0634	-0,2260	-0,1543	-0,2331	0,0737	0,0522	0,0582	0,0536	-0,144	0,1452	0,2063	-0,051	0,1422	-0,086	-0,081
			P	0,0000	0,0395	0,0033	0,0070	0,0031	0,0297	0,0566	0,0463	0,0540	0,0080	0,0079	0,0039	0,0594	0,0082	0,0222	0,0248
36		Efeito	0,9542	-0,3106	-0,4244	-0,2739	-0,4049	0,2703	0,2475	0,1860	0,2423	-0,346	0,2318	0,2507	-0,277	0,4182	-0,2230	-0,208	
		P	0,0001	0,0043	0,0023	0,0055	0,0025	0,0057	0,0067	0,0119	0,0070	0,0035	0,0077	0,0066	0,0054	0,0024	0,0083	0,0095	
48		Efeito	1,2408	-0,6310	-0,8707	-0,7257	-0,8753	0,4396	0,4667	0,4032	0,4686	-0,743	0,6501	0,6889	-0,542	0,9080	-0,457	-0,387	
		P	0,0000	0,0002	0,0001	0,0002	0,0001	0,0005	0,0004	0,0006	0,0004	0,0002	0,0002	0,0002	0,0003	0,0001	0,0004	0,0006	
<i>Z. mobilis</i>		12	Efeito	1,3193	-0,5150	-0,3412	-0,4950	-1,5150	-0,1423	0,3822	-0,019	0,4551	0,2007	-0,2004	0,3081	-0,007	0,4400	-0,445	0,2144
			P	0,0005	0,01383	0,0307	0,0145	0,0017	0,1457	0,0247	0,7910	0,0176	0,0818	0,0820	0,0373	0,9208	0,0189	0,0184	0,0727
		24	Efeito	1,3366	-0,5218	-0,3457	-0,5015	-1,5348	-0,1441	0,3872	-0,019	0,4611	0,2033	-0,2031	0,3121	-0,0070	0,4458	-0,451	0,2172
			P	0,0005	0,0140	0,0311	0,0151	0,0016	0,1476	0,0250	0,8014	0,0178	0,0829	0,0830	0,0378	0,9329	0,0191	0,0186	0,0737
	36	Efeito	2,5490	-1,2464	-1,5665	-1,6423	-2,9777	-0,0870	0,9733	0,1853	0,5169	-0,14	0,2499	0,8603	-0,086	1,1520	-0,189	-0,208	
		P	0,0009	0,0170	0,0109	0,0099	0,0031	0,6507	0,0275	0,3779	0,0885	0,4858	0,2689	0,0348	0,6547	0,0199	0,3717	0,3337	
	48	Efeito	3,0820	-1,6162	-1,6617	-1,6743	-3,4145	0,0596	1,4523	0,3972	0,0462	-0,392	0,1828	0,6905	0,4559	1,3012	-0,3600	-0,105	
		P	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0241	0,0000	0,0006	0,0004	0,0006	0,0026	0,0002	0,0004	0,0001	0,0007	0,0080	

Neste trabalho, o ácido fórmico proporcionou maior efeito inibitório, quando comparado ao ácido acético e ácido levulínico. Segundo Larsson *et al.* (1999) existe diferença na toxicidade entre ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico na mesma concentração, na forma não dissociado. Devido ao menor tamanho da molécula de ácido fórmico, facilitando a sua difusão através da parede celular, proporcionado maior

toxicidade (Larsson *et al.*, 1999). De acordo com Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), essa diferença de toxicidade existe devido às diferenças na permeabilidade da parede celular e possível introdução dos compostos inibitórios na célula. O ácido fórmico geralmente está presente em menor concentração do que o ácido acético, porém é mais tóxico para *S. cerevisiae* (Hasunuma e Kondo, 2012). Almeida *et al.* (2007) relataram que o ácido fórmico inibe a *S. cerevisiae* em concentração 1,4 g/L.

Chen *et al.* (2009) realizaram a análise de crescimento celular e acúmulo de lipídios em levedura usando meio de cultivo sintético na presença de ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, furfural, HMF, valina e hidroxibenzaldeído, testados de forma isolada. Os resultados evidenciaram forte efeito inibitório do ácido fórmico, seguido pelo ácido acético e HMF. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

O ácido acético apresentou elevado potencial inibitório nos experimentos realizados com *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*. Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), o ácido acético prejudica diretamente o DNA, proteínas, ATP, NADH e a integridade da parede celular. De acordo com Bellido *et al.* (2011), o ácido acético em concentração de 3,9 e 3,5 g/L, inibiu completamente o crescimento celular e a produção de etanol por *P. stipitis*, respectivamente. A toxicidade do ácido acético na maioria dos casos tem sido atribuído à sua transição através da membrana plasmática, dissociação subsequente em acetato e prótons no pH neutro no ambiente intracelular (Larsson *et al.*, 1999), além de causar inibição das enzimas glicolíticas por acidificação intracelular e acumulação de acetatos (Palmqvist *et al.*, 1999; Taherzadeh *et al.*, 1999; Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000). O ácido acético na sua forma não dissociada é capaz de penetrar a parede celular dos micro-organismos e acidificar o citoplasma, interrompendo gradiente de proteína através da parede celular e interferindo nos processos celulares. E a redução no pH intracelular provoca aumento no consumo de ATP para neutralizar o pH por bombeamento de prótons para fora da célula, em concentrações elevadas de

ácido acético, o consumo de ATP é elevado e as células acidificam o citosol (Lee *et al.*, 2011b).

Em experimentos realizados por Larsson *et al.* (1999), o ácido levulínico foi mais inibitório que o ácido acético devido à sua maior lipofilicidade. Entretanto, no presente trabalho, ambos compostos apresentaram efeito inibitório, mas o ácido acético apresentou efeito negativo mais acentuado, conforme os valores (-0,15), (-0,24), (-0,47), (-0,84), para o ácido levulínico; e (-0,37), (-1,57), (-2,40), (-2,58), para o ácido acético em *S. cerevisiae*, em 12, 24, 36 e 48 h de cultivo, respectivamente. Além disso, (0,02), (0,07), (0,27), (0,43), para o ácido levulínico; e (-0,02), (-0,15), (-0,27), (-0,72), para o ácido acético em *P. stipitis*, em 12, 24, 36 e 48 h de cultivo, respectivamente. Finalizando, (-0,14), (-0,14), (-0,08), (0,05), para o ácido levulínico, e (-0,49), (-0,50), (-1,64), (-1,67), para o ácido acético em *Z. mobilis*, em 12, 24, 36 e 48 h de cultivo, respectivamente (conforme Tabela 4.20).

De acordo com Huang *et al.* (2011), o nível crítico de compostos inibitórios presente de forma isolada no cultivo de *S. cerevisiae* foram 4,0 g/L de ácido fórmico, 6,0 g/L de ácido acético, 4,0 g/L de HMF e 4,0 g/L de furfural. Em cultivo usando hidrolisado da palha de milho pré-tratada por explosão a vapor e *S. cerevisiae* contendo as seguintes concentrações de ácido fórmico (6,8 g/L), ácido acético (7,81 g/L), HMF (0,56 g/L) e furfural (0,71 g/L). Os resultados demonstraram inibição oriunda da concentração de ácido fórmico e ácido acético contido nesse hidrolisado. Segundo Huang *et al.*, 2011, o ácido fórmico possui efeito inibitório mais acentuado que o ácido acético. De acordo com Liu *et al.* (2004), o uso de compostos inibitórios de forma combinada foi mais tóxico do que utilizados de forma separada, mesmo quando presente em menor quantidade. Essa sinergia negativa sugere que os inibidores podem agir por mecanismos diferentes ou como cada micro-organismo se adapta a presença de cada composto inibitório (Liu *et al.*, 2004). Segundo Larsson *et al.* (1999) e Liu *et al.* (2004), os compostos inibitórios presentes no hidrolisado lignocelulósico possuem efeitos sinérgicos negativos maior que a soma dos efeitos individuais. Esses resultados corroboram com os efeitos

sinérgicos negativos observados neste trabalho e apresentados nas Tabelas 4.19 e 4.20.

Além disso, a *S. cerevisiae* apresentou assimilações de furfural e HMF durante o experimento 1 (0,77 g e 0,29 g), 2 (0,74 g e 0,19 g) e 3 (0,16 g e 0,15 g), respectivamente. A *P. stipitis* e *Z. mobilis* não apresentaram durante os experimentos assimilações de furfural e HMF. Essa diferença na quantidade assimilada entre furfural e HMF pela *S. cerevisiae* nos experimentos 1 e 2 podem ser devido a menor permeabilidade da parede celular pelo HMF, quando comparado ao furfural (Larsson *et al.*, 1999; Wikandari *et al.*, 2010). O consumo desses compostos inibitórios pela *S. cerevisiae* foram relatados por Taherzadeh *et al.* (2000) e Liu *et al.* (2004). Como enfatizado por Taherzadeh *et al.* (2000), o furfural e HMF podem ser metabolizados por bactérias e leveduras. Algumas linhagens de *S. cerevisiae* demonstram tolerâncias aos compostos furânicos, devido a capacidade de converter HMF e furfural a compostos menos nocivos (Almeida *et al.*, 2007). Delgenes *et al.* (1996), Almeida *et al.* (2007) e Taherzadeh *et al.* (1999) relatam que quando o furfural e o HMF são metabolizados, estarão presentes no meio de cultivo na forma de álcool furfurílico e o álcool HMF. No presente trabalho, esses álcoois não foram analisados, entretanto é possível que estivessem presentes nos experimentos 1, 2 e 3 da *S. cerevisiae*. A redução a álcool furfurílico é importante para amenizar o efeito do furfural, a partir de superexpressão de vários genes endógenos, sendo a redução dependente de NADH e a taxa de degradação de furfural correlacionada com a taxa de glicólise (Taherzadeh *et al.*, 1999). O HMF possui mecanismo de ação similar ao descrito para o furfural, reduzindo a formação de ATP e produção de etanol. Além de aumentar a duração da fase lag durante o cultivo (Balat e Balat, 2008). Esses compostos inibitórios estão ligados aos danos da via glicolítica, parede celular, desagregação de DNA, inibição da síntese de proteínas e RNA (Liu *et al.*, 2004; Bellido *et al.*, 2011; Liu, 2011). Em análise realizada *in vitro* por Modig *et al.* (2002) relataram que as enzimas álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase foram diretamente inibidas na presença de

HMF e furfural. O equilíbrio redox intracelular através da oxidação de NAD(P)H deve ser afetado pela redução de furfural e HMF (Palmqvist *et al.*, 1999; Liu, 2011). Além disso, não foi observado consumo de ácido acético pelos micro-organismos, resultado similar foi relatado por Taherzadeh *et al.* (1999).

Os micro-organismos testados neste trabalho apresentaram efeitos sinérgicos negativos na presença dos compostos inibitórios: furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico, porém alternativas tecnológicas e biotecnológicas poderão proporcionar melhor eficiência fermentativa desses micro-organismos, como a aclimatação dos micro-organismos ao meio de cultivo a partir da crescente adição de compostos inibitórios (Lin e Tanaka, 2006); biodesintoxicação, desintoxicação (Yu *et al.*, 2011) e nanofiltração (Qi *et al.*, 2011) dos compostos inibitórios presente no meio de cultivo; bem como usando-se micro-organismos geneticamente modificados (Neves *et al.*, 2005).

4.8.2. Fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água marinha

Considerando que a produção de etanol celulósico se encontra em estágio inicial de desenvolvimento em escala industrial (Wu *et al.*, 2009), e que a disponibilidade e utilização de água doce pode gerar problemas socioambientais para expansão da produção de etanol em nível global (Wu *et al.*, 2009; Gerbens-Leenes *et al.*, 2012; WWAP, 2012), surge como alternativa para amenizar essa problemática o uso de água marinha em bioprocessos. Nesse sentido, foram analisados os processos fermentativos submetidos a substituição da água doce utilizada no preparo do meio de cultivo dos três micro-organismos (*S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*) por água marinha. Sendo uma etapa avaliativa do potencial inibitório do uso de água marinha na produção de etanol e que proporcionará conhecimento prévio para as futuras pesquisas usando água marinha na produção de etanol celulósico.

Os perfis dos processos fermentativos de *Z. mobilis* (Figura 4.37A) apresentaram menores interferências nas fases fenomenológicas, quando comparado aos perfis dos processos fermentativos de *S. cerevisiae* (Figura 4.37B) e *P. stipitis* (Figura 4.37C), em relação a fermentação alcoólica realizada em meio de cultivo diluído com água doce e a fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água marinha.

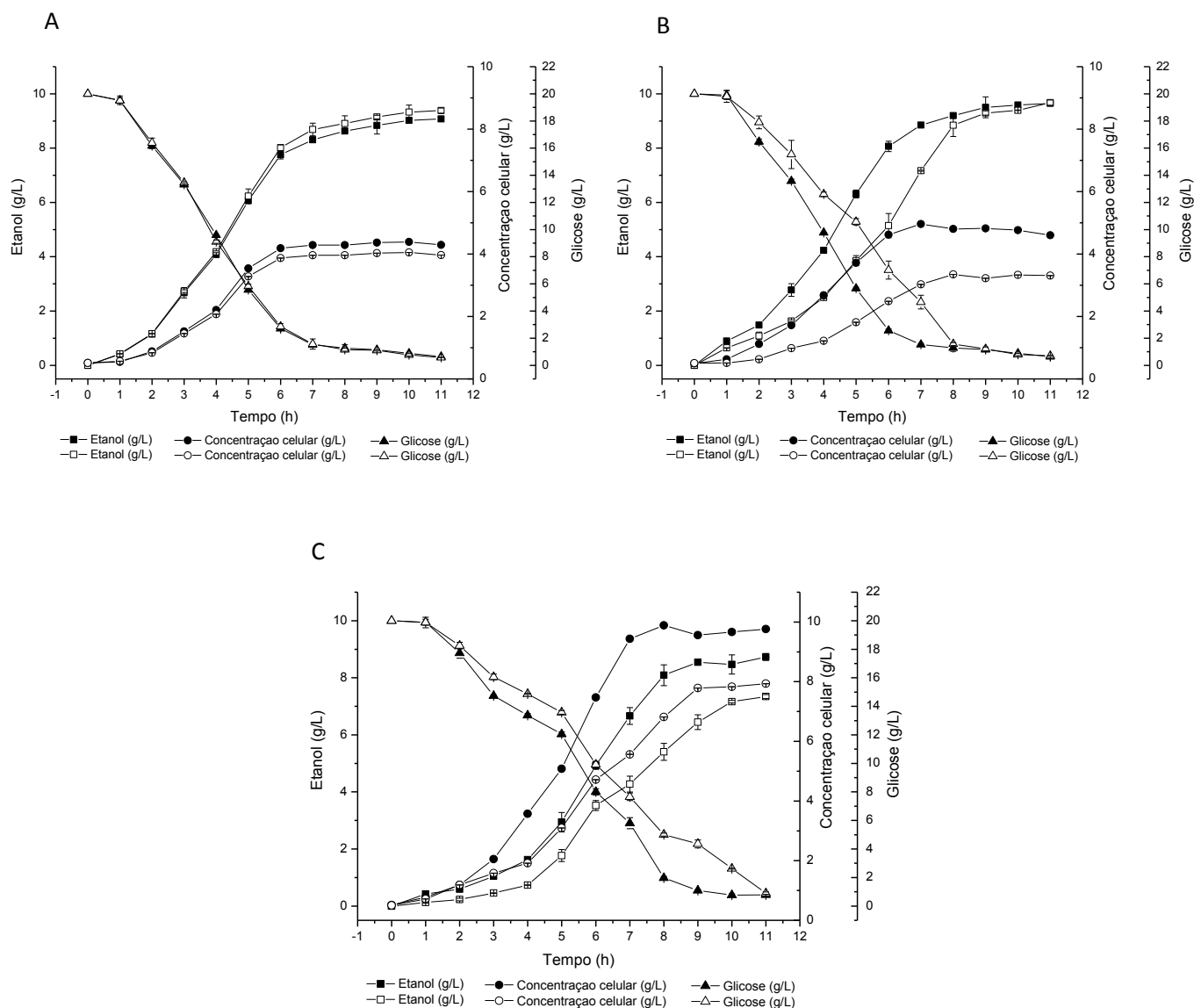


Figura 4.37. Perfil cinético da fermentação alcoólica em meio de cultivo diluído com água doce ou água marinha. (A) *Z. mobilis*; (B) *S. cerevisiae*; (C) *P. stipitis*. O meio de cultivo diluído com água doce (ícone preto) e meio de cultivo diluído com água marinha (ícone branco)

A produção de etanol e conversão de substrato em biomassa microbiana de *Z. mobilis* cultivado em água doce foram 9,27 g/L e 0,195, respectivamente, e em água marinha foram 9,44 g/L e 0,178, respectivamente (Tabela 4.21). A produção de etanol e conversão de substrato em biomassa microbiana de *S. cerevisiae* cultivado em água doce foram 9,65 g/L e 0,212, respectivamente, e em água marinha foram 9,68 g/L e 0,145, respectivamente (Tabela 4.21). A produção de etanol e conversão de substrato em biomassa microbiana de *P. stipitis* cultivado em água doce foram 8,73 g/L e 0,508, respectivamente, e em água marinha foram 7,34 g/L e 0,389, respectivamente (Tabela 4.21).

Tabela 4.21. Parâmetros cinéticos das fermentações alcoólicas de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em meio de cultivo diluído com água doce ou água marinha. Nota: 1 (*S. cerevisiae* cultivada em água doce); 2 (*S. cerevisiae* cultivada em água marinha); 3 (*P. stipitis* cultivada em água doce); 4 (*P. stipitis* cultivada em água marinha); 5 (*Z. mobilis* cultivada em água doce); 6 (*Z. mobilis* cultivadas em água marinha)

Número	$Y_{x/s}$	Etanol (g/g)	Rendimento de etanol (%)	Produção de etanol (g/L)	Produtividade de etanol (g/L.h)	Produção de biomassa (g/L)	Produtividade de biomassa (g/L.h)	μ_x	μ_p
1	0,21 ± 0,01	0,50 ± 0,01	97,71 ± 0,93	9,65 ± 0,08	0,88 ± 0,03	4,96 ± 0,09	0,42 ± 0,02	0,49 ± 0,01	0,89 ± 0,02
2	0,15 ± 0,01	0,50 ± 0,01	98,30 ± 1,40	9,68 ± 0,13	0,88 ± 0,03	3,35 ± 0,13	0,30 ± 0,01	0,37 ± 0,01	1,04 ± 0,03
3	0,51 ± 0,02	0,45 ± 0,01	89,08 ± 0,76	8,73 ± 0,08	0,79 ± 0,02	9,89 ± 0,28	0,89 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,36 ± 0,01
4	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,01	75,41 ± 0,64	7,34 ± 0,06	0,67 ± 0,02	7,93 ± 0,22	0,72 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,29 ± 0,01
5	0,20 ± 0,01	0,48 ± 0,01	93,91 ± 0,87	9,27 ± 0,07	0,84 ± 0,02	4,39 ± 0,12	0,39 ± 0,01	0,53 ± 0,01	1,11 ± 0,03
6	0,18 ± 0,01	0,49 ± 0,01	95,35 ± 1,12	9,44 ± 0,10	0,86 ± 0,03	4,05 ± 0,11	0,36 ± 0,01	0,51 ± 0,01	1,19 ± 0,03

$Y_{x/s}$ = rendimento do crescimento celular baseado no consumo de substrato; μ_x = velocidade específica de crescimento; μ_p = velocidade específica de formação de produto.

A maior diferença na produção de etanol entre as fermentações realizadas em meio de cultivo diluído com água doce e o meio de cultivo diluído com água marinha foi obtida pela *P. stipitis*, quando comparado aos demais micro-organismos (16,0%), mostrando-se assim, um micro-organismo sensível à substituição de água doce pela água marinha no meio de cultivo. Além de apresentar maiores valores na conversão de substrato em biomassa microbiana, proporcionando maior concentração celular.

As menores concentrações celulares foram observadas nos micro-organismos cultivados em meio de cultivo diluído com água marinha. De acordo com Urano *et al.* (2001), o aumento da pressão osmótica e da concentração salina proporcionam redução no crescimento celular microbiano. Além disso, foram observadas menores concentrações

celulares e conversões de substrato em biomassa microbiana nos cultivos de *Z. mobilis*, conseqüente também do uso em anaerobiose da glicose pela via Entner–Doudoroff, que difere da via Embden–Meyerhoff–Parnas utilizada pela *P. stipitis* e *S. cerevisiae* (Lin e Tanaka, 2006; Gírio *et al.*, 2010). Além da *Z. mobilis* apresentar elevada taxa específica de formação de produto (conforme Tabela 4.21), como descrito por Gírio *et al.* (2010).

Os resultados obtidos demonstraram diferenças na produção de etanol entre os microorganismos, em função do uso da água doce ou água marinha no meio de cultivo (nível de confiança de 95,0%) (Tabela 4.22). As fermentações alcoólicas de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* apresentaram influências significativas da fase fenomenológica e do meio de cultivo na análise I (fase lag), análises II e III (fase log). Durante a análise IV (fase estacionária) a *P. stipitis* apresentou influência da fase fenomenológica e do meio de cultivo, a *S. cerevisiae* apresentou apenas influência do meio de cultivo. Na fermentação alcoólica de *Z. mobilis* houve apenas a influência da fase fenomenológica no decorrer das análises I, II, III e IV. Esses dados demonstram ausência do efeito inibitório do uso da água marinha no meio de cultivo de *Z. mobilis*. Segundo Gírio *et al.* (2010), a *Z. mobilis* apresenta elevada tolerância osmótica, essa característica fisiológica também é encontrada na *S. cerevisiae*.

Tabela 4.22. Análise estatística da fermentação alcoólica de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis* em meio de cultivo diluído com água doce ou água marinha

Planejamento I														
Tempo (h)	Meio	Etanol (g/L)						Fator	<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. stipitis</i>		<i>Z. mobilis</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>Z. mobilis</i>	Efeito	P	Efeito		P	Efeito	P			
1	Água doce	0,89	0,98	0,42	0,42	0,41	0,40	Sign./Inter.	0,99	0,0000	0,46	0,0000	0,78	0,0000
2	Água doce	1,19	1,17	0,58	0,59	1,16	1,13	Fase fenomenológica	0,39	0,0011	0,08	0,0092	0,74	0,0000
1	Água marinha	0,64	0,64	0,41	0,43	0,43	0,42	Meio	-0,15	0,0313	-0,09	0,0061	0,02	0,1481
2	Água marinha	1,25	1,10	0,44	0,38	1,17	1,15	Fase fenomenológica por meio	0,14	0,0035	-0,09	0,0050	0,00	1,0000
Planejamento II														
Tempo (h)	Meio	Etanol (g/L)						Fator	<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. stipitis</i>		<i>Z. mobilis</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>Z. mobilis</i>	Efeito	P	Efeito		P	Efeito	P			
4	Água doce	4,27	4,19	1,65	1,60	4,02	4,13	Sign./Inter.	4,22	0,0000	1,64	0,0000	5,14	0,0000
5	Água doce	6,23	6,40	2,14	2,73	6,15	6,00	Fase fenomenológica	1,72	0,0002	0,92	0,0049	2,02	0,0000
4	Água marinha	2,53	2,45	0,74	0,73	4,14	4,23	Meio	-2,10	0,0001	-0,78	0,0089	0,13	0,0916
5	Água marinha	3,63	4,07	1,90	1,64	6,30	6,16	Fase fenomenológica por meio	-0,35	0,0453	0,11	0,5390	0,03	0,6702
Planejamento III														
Tempo (h)	Meio	Etanol (g/L)						Fator	<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. stipitis</i>		<i>Z. mobilis</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>Z. mobilis</i>	Efeito	P	Efeito		P	Efeito	P			
5	Água doce	6,23	6,40	2,14	2,74	6,15	6,00	Sign./Inter.	5,84	0,0000	2,91	0,0000	7,02	0,0000
6	Água doce	8,18	7,95	5,00	4,84	7,66	7,85	Fase fenomenológica	1,52	0,0067	1,61	0,0008	1,72	0,0000
5	Água marinha	3,63	4,08	1,90	1,64	6,30	6,16	Meio	-2,69	0,0000	-1,53	0,0009	0,20	0,0649
6	Água marinha	5,67	5,61	2,63	2,42	7,92	8,10	Fase fenomenológica por meio	-0,23	0,4783	-0,86	0,0081	0,04	0,5940
Planejamento IV														
Tempo (h)	Meio	Etanol (g/L)						Fator	<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. stipitis</i>		<i>Z. mobilis</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>Z. mobilis</i>	Efeito	P	Efeito		P	Efeito	P			
9	Água doce	9,27	9,73	8,10	8,20	8,94	8,72	Sign./Inter.	9,09	0,0000	7,55	0,0000	9,08	0,0000
10	Água doce	9,32	9,45	8,27	8,67	9,14	8,91	Fase fenomenológica	0,24	0,1377	0,52	0,0160	0,19	0,1523
9	Água marinha	8,34	8,52	6,60	6,29	9,24	9,04	Meio	-0,70	0,0057	-1,50	0,0003	0,30	0,0512
10	Água marinha	9,05	9,03	7,14	7,20	9,43	9,22	Fase fenomenológica por meio	0,36	0,0504	0,20	0,1976	-0,01	0,9652

Nota: Planejamento I compreende a fase lag; Planejamento II e III compreende a fase log; Planejamento IV compreende a fase estacionária

5. CONCLUSÃO

O cacto, casca de coco verde, casca de coco maduro e fibra de coco maduro submetidos aos pré-tratamentos PHA-PHS, PA, PHCHS e POEA apresentaram modificações nas composições químicas e estruturas físicas. Esses materiais submetidos às hidrólises enzimáticas proporcionaram eficientes conversões em glicose, indicando a acessibilidade dos materiais pré-tratados ao ataque enzimático. E as conversões dos materiais pré-tratados em etanol utilizando as estratégias fermentativas SSF e SSSF foram bem sucedidas, evidenciando a possibilidade de uso dos materiais pré-tratados, micro-organismos e estratégias fermentativas na produção de etanol. Em especial, a estratégia SSSF usando *S. cerevisiae* e cacto pré-tratado por POEA apresentou elevada eficiência fermentativa, sugerindo assim, a criação de um arranjo produtivo local (APL) para a produção de etanol celulósico.

As fermentações alcoólicas realizadas em biorreator utilizando *S. cerevisiae*, estratégia fermentativa SSSF e materiais pré-tratados mostraram rendimentos de etanol aproximados aos resultados obtidos pelas fermentações realizadas em frasco Erlenmeyer. Esses resultados confirmam a potencialidade dos materiais pré-tratados, micro-organismo e estratégia fermentativa utilizados em biorreator. Com destaque, das fermentações usando o cacto pré-tratado por POEA.

O furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico apresentaram efeitos sinérgicos negativos nas fermentações de *P. stipitis*, *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*. O ácido fórmico e ácido acético evidenciaram efeitos mais significativos entre os compostos inibitórios, seguido pelo HMF, furfural e ácido levulínico. Além disso, as fermentações realizadas em meio de cultivo diluído com água marinha mostraram resultados promissores, especialmente quando se utilizou a *S. cerevisiae* e a *Z. mobilis*.

REFERÊNCIAS

- Abedinifar S, Karimi K, Khanahmadi M, Taherzadeh MJ. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass Energy* 2009;33:828-33.
- Adsul MG, Ghule JE, Shaikh H, Singh R, Bastawde KB, Gokhale DV, Varma AJ. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydr Polym* 2005;62:6-10.
- Afrane G. Examining the potential for liquid biofuels production and usage in Ghana. *Energy Policy* 2012;40:444-51.
- Agostinho F, Ortega E. Integrated food, energy and environmental services production as an alternative for small rural properties in Brazil. *Energy* 2012;37:103-14.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. GPD1, which encodes glucerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 1994;14(6):4135-44.
- Alfaro A, Rivera A, Pérez A, Yáñez R, García JC, López F. Integral valorization of two legumes by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresource Technol* 2009;100:440-5.
- Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert TI, Dale BE. Pretreatment of switchgrass by ammonia fibre explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotech* 2005;121/124:1133-41.
- Almeida JRM, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund MF, Gorsich S, Lidén G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:625-38.
- Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 2007;82:340-9.
- Alonso MV, Oliet M, Perez JM, Rodriguez F. Determination of curing kinetic parameters of lignin–phenol–formaldehyde resol by several dynamic differential scanning calorimetry methods. *Thermochim Acta* 2004;419:161-7.

Alves-Prado HF, Pavezzi FC, Leite RSR, Oliveira VM, Sette LD, da Silva R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;161:333-46.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, <<http://www.anp.gov.br/?id0472>>. Acessado em 20.1.2013.

APCC. Coconut statistical yearbook. Asian and Pacific Coconut. Jakarta: Asian and Pacific Coconut Community; 1996.

Aragão WM. Coco: pós-colheita. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros; 2002.

Arruda P. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. *Trop Plant Biol* 2011;4:3-8.

Ask M, Olofsson K, di Felice T, Ruohonen L, Penttilä M, Lidén G, *et al.* Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochem* 2012;47(10):1452-9.

Ayeni AO, Hymore FK, Mudliar SN, Deshmukh SC, Satpute DB, Omoleye JA, Pandey RA. Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: Process parameters optimization using response surface methodology. *Fuel* 2013;106:187-94.

Azzam AM. Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J Environ Sci Health B* 1989;24:421-33.

Babel MS, Shrestha B, Perret SR. Hydrological impact of biofuel production: A case study of the Khlong Phlo Watershed in Thailand. *Agr Water Manage* 2011;101:8-26.

Bai Y, Ouyang Y, Pang JS. Biofuel supply chain design under competitive agricultural land use and feedstock market equilibrium. *Energ Econ* 2012;34:1623-33.

Balat M, Balat H, Öz C. Progress in Bioethanol Processing. *Prog Energy Combust* 2008;34:551-73.

Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotech* 2006;129/132:496-508.

Ballesteros I, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros M. Enzymatic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. *Process Biochem* 2002;38:187-92.

Ballesteros M, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballestros I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Proc Biochem* 2004;39:1843-8.

Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Hodge DB, Walton JD. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnol Biofuel* 2011;4:1-16.

Barcelos CA, Maeda RN, Betancur GJV, Pereira Jr N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. *Waste Biomass Valor* 2013;4:341-6.

Bari ID, Viola E, Barisano D, Cardinale M, Nanna F, Zimbardi F, Cardinale G, Braccio G. Ethanol production at flask and pilot scale from concentrated slurries of steam-exploded aspen. *Ind Eng Chem Res* 2002;41:1745-53.

Bastos VD. Ethanol, alcoholchemistry and biorefineries. BNDES Setorial, Rio de Janeiro 2007;25:5-38.

Bayrakcl AG, Koçar G. Utilization of renewable energies in Turkey's agriculture. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16:618-33.

Bekatorou A, Psarianos C, Koutinas A. Production of food grade yeasts. *Food Technol Biotech* 2006;44:407-15.

Bellido C, Bolado S, Coca M, Lucas S, González-Benito G, García-Cubero MT. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol* 2011;102:10868-74.

Bellido C, González-Benito G, Coca M, Lucas S, García-Cubero MT. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol* 2013;133:51-8.

Benito M, Isabel JL, Padilha RR, Arjona R, Daza L. Bio-ethanol steam reforming: Insights on the mechanism for hydrogen production. *J Power Sour* 2003;151:11-7.

Bergquist DA, Cavalett O, Rydberg T. Participatory emergy synthesis of integrated food and biofuel production: a case study from Brazil. *Environ Dev Sustain* 2012;14:167-82.

Bertilsson M, Olofsson K, Lidén G. Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce. *Biotechnol Biofuel* 2009;2:1-8.

Bioeletricidade, <<http://www.bioeletricidade.com/oquee.php>>. Acessado em 20.1.2013.

Bittencourt PRS, dos Santos GL, Pineda EAG, Hechenleitner AAW. Studies on the thermal stability and film irradiation effect of poly(vinyl alcohol)/kraft lignin blends. *J Therm Anal Calorim* 2005;79:371-4.

BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES; 2008.

Bobleter O, Niesner R, Röhr M. The hydrothermal degradation of cellulosic matter to sugars and their fermentative conversion to protein. *J Appl Polym Sci* 1976;20:2083-93.

Bon EPS, Gírio F, Pereira N. Enzymes in ethanol production, in: Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., Corvo, M.L. (Eds.), *Enzymes in biotechnology: production, applications and markets*. Interciência, Rio de Janeiro, 2008. pp. 241-71.

Borrion AL, McManus MC, Hammond GP. Environmental life cycle assessment of lignocellulosic conversion to ethanol: A review. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16:4638-50.

Brígida AIS, Calado VMA, Gonçalves LRB, Coelho MAZ. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. *Carbohydr Polym* 2010;79:832-8.

Brosse N, Sannigrahi P, Ragauskas A. Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* using the ethanol organosolv process for ethanol production. *Ind Eng Chem Res* 2009;48: 8328-34.

Browning BL. *Methods of wood chemistry*, first ed. Interscience, New York. 1967.

Buckeridge MS, Silva GB, Cavalari AA. Parede Celular. In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. *Fisiologia Vegetal*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 165-181. 2008.

Calado V, Barreto DW, D'Almeida JRM. The effect of a chemical treatment on the structure and morphology of coir fibers. *J Mat Sci Letters* 2000;19:2151-3.

Cara C, Romero I, Oliva JM, Sáez F, Castro E. Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Appl Biochem Biotech* 2007;136-140:379-94.

Cardona CA, Quintero JA, Paz IC. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technol* 2010;101:4754-66.

Carlsson A, van Beilen J, Moller R, Clayton D. Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. In: Bowles D, editor. *Outputs from the EPOBIO project*, Berks: CPL Press; 2007, p. 82-6.

Carvalho F, Garrote G, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM. Kinetic modeling of brewery's spent grain autohydrolysis. *Process Biochem* 2005;21:233-43.

Castro NJ, Brandão R, Dantas GA. A competitividade da bioeletricidade e a metodologia dos leilões de energia nova, Grupo de Estudos do Setor Elétrico (Gesel). Rio de Janeiro: UFRJ; 2009.

Castro SM, Castro AM. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. *Biomass Conv Bioref* 2012;2:87-107.

Cavalett O, Junqueira TL, Dias MOS, Jesus CDF, Mantelatto PE, Cunha MP, *et al.* Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. *Clean Technol Environ Policy* 2012;14:399-410.

Cavalett O, Leal M, Rydberg T. Avaliação emergética de sistema camponês de produção de álcool, alimentos e serviços ambientais. In Leal M, editor. *Agricultura e Mudanças Climáticas - Contribuição dos sistemas camponeses de produção para agricultura ecológica*. Brazil: Cooperbio; 2010, p. 115-35.

Chakar FS, Ragauskas AJ. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Ind Crop Prod* 2004;20:131-41.

Champagne P, Li C. Enzymatic hydrolysis of cellulosic municipal wastewater treatment process residuals as feedstocks for the recovery of simple sugars. *Bioresource Technol* 2009;100:5700-6.

Chaudhary G, Singh LS, Ghosh S. Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for bioethanol production. *Bioresour Technol* 2012;124:111-8.

Chen WH, Ye SC, Sheen HK. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Appl Energy* 2012;93:237-44.

Chen X, Li Z, Zhang X, Hu F, Ryu Dewey DY, Bao J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;159:591-604.

Chiesa S, Gnansounou E. Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery – Possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. *Bioresource Technol* 2011;102:427-36.

Cho DH, Shin SJ, Bae Y, Park C, Kim YH. Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol* 2011;102:4439-43.

Choi DW, Chipman DC, Bents SC, Brown RC. A techno-economic analysis of polyhydroxyalkanoate and hydrogen production from syngas fermentation of gasified biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;160:1032-46.

Choi IS, Kim JH, Wi SG, Kim KH, Bae HJ. Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. *Appl Energy* 2013;102:204-10.

Choi JW, Faix O. NMR study on residual lignins isolated from chemical pulps of beech wood by enzymatic hydrolysis. *J Ind Eng Chem* 2011;17:25-8.

Chuck CJ, Parker HJ, Jenkins RW, Donnelly J. Renewable biofuel additives from the ozonolysis of lignin. *Bioresource Technol* 2013;143:549-54.

Chum HL, Overend RP. Biomass and renewable fuels. *Fuel Process Technol* 2001;71:187-95.

Cloin J. Coconut Oil as a Biofuel in Pacific Islands: Challenges and Opportunities. Fiji Islands: SOPAC Report; 2005.

Cloin J. Coconut oil as a fuel in the Pacific Islands. *Nat Resour Forum* 2007;31:119-27

Correia JAC, Júnior JE, Gonçalves LRB, Rocha MVP. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. *Bioresource Technol* 2013;139:249-56.

Cybulska I, Lei H, Julson J. Hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis of prairie cord grass. *Energy Fuel* 2010;24:718-27.

Cysewski GR, Wilke, CR. Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single-cell protein. *Biotechnol Bioeng* 1976;18:1297-313.

Daianova L, Dotzauer E, Thorin E, Yan J. Evaluation of a regional bioenergy system with local production of biofuel for transportation, integrated with a CHP plant. *Appl Energy* 2012;92:739-49.

Dale BE, Allen MS, Laser M, Lynd LR. Protein feeds coproduction in biomass conversion to fuels and chemicals. *Biofuel Bioprod Bior* 2009;3:219-30.

Dale BE. Biofuels and water: another opportunity to “do biofuels right”. *Biofuel Bioprod Bior* 2011;5:347-9.

Dantas GA, Legey LFL, Mazzone A. Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. *Renew Sust Energy Rev* 2013;21:356-64.

Das A, Paul T, Jana A, Halder SK, Ghosh K, Maity C, Mohapatra Pradeep KD, Pati BR, Mondal KC. Bioconversion of rice straw to sugar using multizyme complex of fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. *Ind Crop Prod* 2013;46:217-25.

Datar RP, Shenkman RM, Cateni BG, Huhnke RL, Lewis RS. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 2004;86:587-94.

De Souza CJA, Costa DA, Rodrigues MQRB, dos Santos AF, Lopes MR, Abrantes ABP, Costa PS, Silveira WB, Passos FML, Fietto LG. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresource Technol* 2012;109:63-9.

Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microbial Technol* 1996;19:220-5.

Della PV. Síntese e caracterização do pigmento cerâmico de hematita, obtida a partir de carepa de aço, encapsulada em sílica amorfa obtida a partir de casca de arroz. 2005. 168f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

Dias MOS, Cunha MP, Jesus CDF, Rocha GJM, Pradella JGC, Rossell CEV, *et al.* A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? *Bioresource Technol* 2011;102:8964-71.

Dias MOS, Junqueira TL, Cavalett O, Cunha MP, Jesus CDF, Rossell CEV, *et al.* Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technol* 2012b;103:152-61.

Dias MOS, Junqueira TL, Cavalett O, Pavanello LG, Cunha MP, Jesus CDF, *et al.* Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Appl Energ* 2013;109:72-8.

Dias MOS, Junqueira TL, Jesus CDF, Rossell CEV, Maciel Filho R, Bonomi A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energ* 2012a;43:246-52.

Díaz MJ, Ruiz E, Romero I, Cara C, Moya M, Castro E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25:891-9.

Diaz-Chavez R, Berndes G, Neary D, Elia Neto A, Fall M. Water quality assessment of bioenergy production. *Biofuel Bioprod Bior* 2011;5:445-63.

Ding TY, Hii SL, Ong LGA. Comparison of pretreatment strategies for conversion of coconut husk fiber to fermentable sugars. *BioResources* 2012;7:1540-7.

Doan QC, Moheimani NR, Mastrangelo AJ, Lewis DM. Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. *Biomass Bioenerg* 2012;46:79-88.

Dowe N, Mcmillan, J. SSF experimental protocols-lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. NERL analytical procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado 2001.

Du X, Carriquiry MA. Flex-fuel vehicle adoption and dynamics of ethanol prices: lessons from Brazil. 2013;59:507-12.

Dubey AK, Gupta PK, Garg N, Naithani S. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. Carbohyd Polym 2012;88:825-9.

Eckard AD, Muthukumarappan K, Gibbons W. Enzyme recycling in a simultaneous and separate saccharification and fermentation of corn stover: A comparison between the effect of polymeric micelles of surfactants and polypeptides. Bioresource Technol 2013;132:202-9.

Egüés I, Sanchez C, Mondragon I, Labidi J. Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. Bioresour Technol 2012;103:239-48.

Ellis JT, Hengge NN, Sims RC, Miller CD. Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae. Bioresource Technol 2012;111:491-5.

Elliston A, Collins SRA, Wilson DR, Roberts IN, Waldron KW. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. Bioresour Technol 2013;134:117-26.

Etherington D. Bringing hope to remote communities with virgin coconut oil production. ACIAR Proceedings 2005;125:57-64.

Faix O. Fourier transformed infrared spectroscopy. In: Lin SY, Dence CW. editors, Springer-Verlang, Berlin-Heidelberg: 1992. pp. 93.

Fan LT, Lee YH, Gharpuray MM. The nature of lignocellulosic and their pretreatment for enzymatic hydrolysis. Adv Biochem Eng 1982;22:158-83.

Fang X, Yano S, Inoue H, Sawayama S. Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. J Biosci Bioeng 2009;107:256-61.

FAO. 2012. World Production. Available in: <www.faostat.org.br>. Acessado em 10.1.2012.

Faustino H, Gil N, Baptista C, Duarte AP. Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. Molecules 2010;15:9308-22.

Fengel D, Wegener G. Wood chemistry, ultrastructure and reactions, 1st ed., Walter de Gruyter: Berlin, 1989. 613p.

Fernandes DM, Hechenleitner AAW, Job AE, Radovanovic E, Gomez Pineda EA. Thermal and photochemical stability of poly(vinyl alcohol)/modified lignin blends. *Poly Degrad Stab* 2006;91:1192-201.

Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, Murali N. Biorefineries: current status challenges and future direction. *Energ Fuel* 2006;20:1727-37.

Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Nepomuceno AL, Molinari HBC, Bon EPS. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valor* 2010;1:65-76.

Fierro JLG. Hydrogen and syngas from biomass. *Catalysis Today*. 2012.

Fingerman KR, Torn MS, O'Hare MH, Kammen DM. Accounting for the water impacts of ethanol production. *Environ Res Lett* 2010;5:14-20.

Fletcher Jr RJ, Robertson BA, Evans J, Doran PJ, Alavalapati JRR, Schemske DW. Biodiversity conservation in the era of biofuels: risks and opportunities. *Front Ecol Environ* 2011;9:161-8,

Fornell R, Berntsson T, Åsblad A. Process integration study of a kraft pulp mill converted to an ethanol production plant - part B: Techno-economic analysis. *Appl Thermal Eng* 2012;42:179-90.

Franco H, Ferraz A, Milagres AMF, Carvalho W, Freer J, Baeza J, Mendonça RT. Alkaline sulfite/anthraquinone pretreatment followed by disk refining of *Pinus radiata* and *Pinus caribaea* wood chips for biochemical ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol* 2012;87:651-7.

Frankel P. A helping hand: Part one: could a new type of insurance help cutting edge renewable energy companies cross the valley of death? *Renew Energ Focus* 2012;13:46-9.

Fu N, Peiris P, Markham J, Bavor J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme Microb Tech* 2009;45:210-7.

Galbe M, Zacchi G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg* 2012;46:70-8.

García MA, Gonzalo A, Sánchez LJA, Arauzo JA, Simões C. Methanolysis and ethanolysis of animal fats: A comparative study of the influence of alcohols. *Chem Ind Chem Eng Quart* 2009;15:1-18.

García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanares P, Ballesteros M, Ballesteros I, González A, Negro MJ. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 2011;90:1624-30.

Garrote G, Cruz JM, Domínguez H, Parajó JC. Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of selected lignocellulosic materials. *J Chem Technol Biot* 2003;78:392-8.

Garrote G, Cruz JM, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends Food Sci Technol* 2004;15:191-200.

Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharides production. *J Food Eng* 2002;52:211-8.

Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst* 1999a;57:191-202.

Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Manufacture of xylose-based fermentation media from corncobs by posthydrolysis of autohydrolysis liquors. *Appl Biochem Biotechnol* 2001;95:195-207.

Garrote G, Domínguez H, Parajó JC. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *J Chem Technol Biotechnol* 1999b;74:1101-9.

Garrote G, Eugenio ME, Díaz MJ, Ariza J, López F. Hydrothermal and pulp processing of Eucalyptus. *Bioresource Technol* 2003;88:61-8.

Geng A, Xin F, Ip J. Ethanol production from horticultural waste treated by a modified organosolv method. *Bioresource Technol* 2012;104:715-21.

Gerbens-Leenes PW, van Lienden AR, Hoekstra AY, van der Meer TH. Biofuel scenarios in a water perspective: The global blue and green water footprint of road transport in 2030. *Global Environ Change* 2012;22:764-75.

Ghaffar SH, Fan M. Lignin in straw and its applications as an adhesive. *Int J adhes Adhes* 2014;48:92-101.

Ghatak HR. Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products and processes. *Renew Sust Energ Rev* 2011;15:4042-52.

Ghatak HR. Spectroscopic comparison of lignin separated by electrolysis and acid precipitation of wheat straw soda black liquor. *Ind Crop Prod* 2008;28:206-12.

Gheewala SH, Berndes G, Jewitt G. Perspective: the bioenergy and water nexus. *Biofuel Bioprod Bior* 2011;5:353-60.

Ghose TK. Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC). *Pure Appl Chemistry* 1987;59:257-68.

Ghosh M, Das A, Mishra AK, Nanda G. *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb Technol* 1993;15:703-9.

Girio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technol* 2010;101:4775-800.

Gnansounou E, Dauriat A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. *Bioresource Technol* 2010;101:4980-91.

Gnansounou E. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives. *Bioresource Technol* 2010;101:4842-50.

Goldemberg J, Coelho ST, Guardabassi P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energ Policy* 2008;36:2086-97.

Gonçalves AR, Benar P. Hydroxymethylation and oxidation of organosolv lignins and utilization of the products. *Bioresource Technol* 2001;79:103-11.

Gonçalves FA, Leite RSR, Rodrigues A, Argandoña EJS, Fonseca GG. Isolation, identification and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2013b;2:377-84.

Gonçalves FA, Nogueira CC, dos Santos ES, de Macedo GR. Otimização sinérgica da mistura de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Lichtheimia*

ramosa sobre a hidrólise da casca de coco maduro pré-tratada visando à produção de etanol celulósico. In: CIENTEC/UFRN. Natal: CIENTEC; 2012, p. 33.

Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, Macedo GR. Avaliação fermentativa da levedura floculante e termotolerante *Saccharomyces cerevisiae* CA11 utilizando materiais lignocelulósicos pré-tratados. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. Foz de Iguaçu, Brasil. 2013c.

Gonçalves FA, Sanjinez-Argandona EJ, Fonseca GG. Production of cellulosic ethanol and its co-products using different substrates, pretreatments, microorganisms and bioprocesses. Nat Sci 2013a;5:11-25.

Gonçalves FA, Sanjinez-Argandoña EJ, Fonseca GG. Utilization of agro-industrial residues and municipal waste of plant origin for cellulosic ethanol production. J Environ Protect 2011;2:1303-9.

Goshadrou A, Karimia K, Taherzadeh MJ. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. Ind Crop Prod 2011;34:1219-25.

Gould JM, Freer SN. High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H₂O₂. Biotechnol Bioeng 1984;26:628-31.

Gould JM. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. Biotechnol Bioeng 1985;27:225-31.

Gouveia ER, Nascimento RT, Souto-Maior AM, Rocha GJM. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Quim Nova 2009;32:1500-3.

Grande PM, Bergs C, Domínguez de María P. Chemo-enzymatic conversion of glucose into 5-hydroxymethylfurfural in seawater. ChemSusChem 2012;5:1203-6.

Grethlein AJ, Jain MK. Bioprocessing of coal-derived synthesis gas by anaerobic bacteria. Focus Trends Biotechnol 1992;10:418-23.

Gross M. Looking for alternative energy sources. Curr Biol 2012;22:103-6.

Gullón B, Yáñez R, Alonso JL, Parajó JC. Production of oligosaccharides and sugars from rye straw: A kinetic approach. Bioresource Technol 2010;101:6676-84.

Gupta R, Lee YY. Pretreatment of hybrid poplar by aqueous ammonia. *Biotechnol Progress* 2009;25(2):357-64.

Gupta R, Sharma KK, Kuhad RC. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora* a wood substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* NCIM 3498. *Bioresource Technol* 2009;100:1214-20.

Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew Sustain Energy Rev* 2010;14:1037-47.

Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol Adv* 2012;30(6):1207-18.

Hayes DJM. Second-generation biofuels: why they are taking so long. *WIREs Energy Environ* 2013;2(3):304-34.

Hendriks ATWM, Zeeman G. Review: pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 2009;100:10-8.

Hideno A, Kawashima A, Endo T, Honda K, Morita M. Ethanol-based organosolv treatment with trace hydrochloric acid improves the enzymatic digestibility of *Japanese cypress* (*Chamaecyparis obtusa*) by exposing nanofibers on the surface. *Bioresource Technol* 2013;132:64-70.

Hill J, Polasky S, Nelson E, Tilman D, Huo H, Ludwig L, *et al.* Climate change and health costs of air emissions from biofuels and gasoline. *Sustain Sci* 2009;106(6):2077-82.

Hoareau W, Trindadea WG, Siegmund B, Castellana A, Frollini E. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: Characterization and stability. *Polym Degrad Stab* 2004;86:567-76.

Hofsetz K, Silva MA. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. *Biomass Bioenerg* 2012;46:564-73.

Hönisch B, Ridgwell A, Schmidt DN, Thomas E, Gibbs SJ, Sluijs A, *et al.* The geological record of ocean acidification. *Science* 2012;335:1058-63.

Hoyer K, Galbe M, Zacchi G. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. *Process Biochem* 2013;48:289-93.

Hu G, Cateto C, Pu Y, Samuel R, Ragauskas AJ. Structural characterization of switchgrass lignin after ethanol organosolv pretreatment. *Energ Fuel* 2012;26:740-5.

Huang F, Ragauskas A. Extraction of hemicellulose from *Loblolly pine* woodchips and subsequent kraft pulping. *Ind Eng Chem Res* 2013;52:1743-9.

Huang H, Guo X, Li D, Liu M, Wu J, Ren H. Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. *Bioresource Technol* 2011;102:7486-93.

Hurtubise FG, Krassig H. Classification of fine structural characteristics in cellulose by infrared spectroscopy. Use of potassium bromide pellet technique. *Anal Chem* 1960;32:177-81.

Hussin ASM, Collins SRA, Merali Z, Parker ML, Elliston A, Wellner N, *et al.* Characterisation of lignocellulosic sugars from municipal solid waste residue. *Biomass Bioenerg* 2013;51:17-25.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil / Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro, 25, 1-88.

Jeihanipour A, Taherzadeh MJ. Ethanol production from cotton-based waste textiles. *Bioresource Technol* 2009;100:1007-10.

Jensen JW, Felby C, Jørgensen H, Rønsch GØ, Nørholm ND. Enzymatic processing of municipal solid waste. *Waste Manage* 2010;30:2497-503.

John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technol* 2011;102:186-93.

Johnson KG, Harrison BA, Schneider H, Mac Kenzie CR, Fontana JD. Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces spp.* *Enzyme Microb Technol* 1988;10:403-9.

Jutakanoke R, Leepipatpiboon N, Tolieng V, Kitpreechavanich V, Srinorakutara T, Akaracharanya A. Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioenerg* 2012;39:283-9.

Kadam KL, Chin CY, Brown LW. Flexible biorefinery for producing fermentation sugars, lignin and pulp from corn stover, *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008;35:331-41.

Kádár ZS, Szengyel ZS, Réczey K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind Crops Prod* 2004;20:103-10.

Kadla JF, Kubo S, Venditti RA, Gilbert RD, Compere AL, Griffith W. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon* 2002;40:2913-20.

Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:137-45.

Kammesa KL, Balsb BD, Daleb BE, Allena MS. Grass leaf protein, a coproduct of cellulosic ethanol production, as a source of protein for livestock. *Anim Feed Sci Tech* 2011;164:79-88.

Kang KE, Jeong GT, Sunwoo C. Pretreatment of rapeseed straw by soaking in aqueous ammonia. *Bioprocess Biosystems Eng* 2012;35:77-84.

Karagöz P, Rocha IV, Özkan M, Angelidaki I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. *Bioresource Technol* 2012;104:349-57.

Khanal SK. Conversion of agro-residues to biofuels and biobased products. Honolulu: Hawaii Natural Energy Institute; 2008.

Kim I, Han JI. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. *Biomass Bioenerg* 2012;46:210-7.

Kim KH, Hong J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. *Bioresource Technol* 2001;77:139-44.

Kim SB, Lee SJ, Jang EJ, Han SO, Park C, Kim SW. Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment. *J Ind Eng Chem* 2012;18:183-7.

Klass DL. Biomass for renewable energy, fuels and chemicals. 1^o Ed. San Diego: Academic Press. 1998, 651 p.

Kocoloski M, Griffin WM, Matthews HS. Impacts of facility size and location decisions on ethanol production cost. *Energ Policy* 2011;39:47-56.

Koh LP, Ghazoul J. Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. *Biol Conserv* 2008;141:2450-60.

- Koizumi T. Biofuel and food security in China and Japan. *Renew Sust Energ Rev* 2013;21:102-9.
- Koornneef J, van Breevoort P, Hamelinck C, Hendriks C, Hoogwijk M, Koop K, *et al.* Global potential for biomass and carbon dioxide capture, transport and storage up to 2050. *Int J Greenhouse Gas Control* 2012;11:117-32.
- Kristensen JB, Thygesen LG, Felby C, Jørgensen H, Elder T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol Biofuel* 2008;16:1-5.
- Kumakura M, Kojima T, Kaetsu I. Pretreatment of lignocellulosic wastes by combination of irradiation and mechanical crushing. *Biomass* 1982;2:299-308.
- Kumar S, Dheeran P, Singh SP, Mishrac IM, Adhikaric DK. Kinetic studies of ethanol fermentation using *Kluyveromyces sp.* IPE453. *J Chem Technol Biotechnol* 2013;88: 1874-84.
- Kurakake M, Ide N, Komaki T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Curr Microbiol* 2007;54:424-8.
- Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microbial Technol* 1999;24:151-9.
- Leão A, Rowell R, Tavares N. Applications of natural fibers in automotive industry in Brazil-thermoforming process. In: Prasad PN, Mark JE, Kandil SH, Kaifi ZH, editors. *Science and technology of polymer and advanced materials*. New York: Plenum Press; 1998. p. 755-61.
- Le Duy, A., Zajic, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point applied to growth and product formation, *Biotechnol Bioeng* 1973;15:805-10.
- Lee H, Cho DH, Kim YH, Shin SJ, Kim SB, Han SO, *et al.* Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds. *Biotechnol Bioproc Eng* 2011b;16:755-60.
- Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol* 1997;56: 1-24.

Lee KS, Hong ME, Jung SC, Ha SJ, Yu BJ, Koo HM, *et al.* Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 2011a;108:621-31.

Leite RSR, Alves-Prado HF, Cabral H, Pagnocca FC, Gomes E, da Silva R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microb Technol* 2008;43:391-5.

Li MF, Sun SN, Xu F, Sun RC. Sequential solvent fractionation of heterogeneous bamboo organosolv lignin for value-added application. *Sep Purif Technol* 2012b;101: 18-25.

Li S, Zhang X, Andresen JM. Production of fermentable sugars from enzymatic hydrolysis of pretreated municipal solid waste after autoclave process. *Fuel* 2012a;92:84-8.

Liang M, Kim MH, He QP, Wang J. Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. *J Biosci Bioeng* 2013;116:319-26.

Liang X, Yoshida T, Uryu T. Direct saccharification and ethanol fermentation of cello-oligosaccharides with recombinant yeast. *Carbohydr Polym* 2013;91:157-61.

Lin CSK, Luque R, Clark JH, Webb C, Du C. A seawater-based biorefining strategy for fermentative production and chemical transformations of succinic acid. *Energy Environ Sci* 2011;4:1471-9.

Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;69:627-42.

Liu C, Wyman CE. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresour. Technol.* 2005;96:1978-1985.

Liu S, Abrahamson LP, Scott GM. Biorefinery: Ensuring biomass as a sustainable renewable source of chemicals, materials, and energy. *Biomass Bioenerg* 2012;39:1-4.

Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, Berhow MA, Kurtzman CP, Gorsich SW. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:345-52.

Liu ZL. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;90:809-25.

Lora JH, Glasser WG. Recent industrial applications of lignin: A sustainable alternative to nonrenewable materials. *J Polym Environ* 2002;10:39-48.

Lu J, Brigham CJ, Gai CS, Sinskey AJ. Studies on the production of branched-chain alcohols in engineered *Ralstonia eutropha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96:283-97.

Lu J, Li X, Yang R, Yang L, Zhao J, Liu Y, Qu Y. Fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bio-ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol* 2013;144:539-47.

Lu XB, Zhang YM, Angelidaki I. Optimization of H₂SO₄ catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technol* 2009;100:3048-53.

Luo C, Brink D, Blanch H. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. *Biomass Bioenerg* 2002;22:125-38.

Luo L, van der Voet E, Huppes G. Biorefining of lignocellulosic feedstock - Technical, economic and environmental considerations. *Bioresource Technol* 2010;101:5023-32.

Lynd LR, Woods J. Perspective: A new hope for Africa. *Nature* 2011;474:20-1.

Machado IMP, Atsumi S. Cyanobacterial biofuel production. *J Biotechnol* 2012;162:50-6.

Maia TA, Bellido JDA, Assaf EM, Assaf JM. Produção de hidrogênio a partir da reforma a vapor de etanol utilizando catalisadores Cu/Ni/-Al₂O₃. *Quim Nova* 2007;30:339-45.

Mais U, Esteghlalian A, Saddler J. Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. *Appl Biochem Biotechnol* 2002;98:463-72.

Mandels M, Andreotti R, Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol Bioeng Symp* 1976;6:21-3.

Manzanares P, Negro MJ, Oliva JM, Sáez F, Ballesteros I, Ballesteros M. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *J Chem Technol Biotechnol* 2011;86:881-7.

Mao H, Genco J, van Heiningen A, Pendse H. Kraft mill biorefinery to produce acetic acid and ethanol: technical economic analysis. *BioResources* 2010;5(2):525-44.

Marques S, Alves L, Roseiro JC, Gírio FM. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass Bioenergy* 2008;32:400-6.

Martín C, Thomsen MH, Hauggaard-Nielsen H, Thomsen AB. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover–ryegrass mixtures. *Bioresource Technol* 2008;99:8777-82.

Matulova M, Nouaille R, Capek P, Péan M, Forano E, Delort AM. Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. *Appl Environl Microb* 2005;71:1247-53.

McIntosh S, Vancov T, Palmer J, Spain M. Ethanol production from Eucalyptus plantation thinning. *Bioresource Technol* 2012;110:264-72.

Mckillip WJ, Collin G, Höke H. Furan and derivatives. In: Elvers B, Hawkins S, Ravenscroft M, Rounsaville JF, Schulz G, editors. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Washington: VCH Publishers; 1989, p. 119-21.

Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Prog Energy Combust Sci* 2012;38(4):522-50.

Mesa L, González E, Romero I, Ruiz E, Cara C, Castro E. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. *Chem Eng J* 2011;175:185-91.

Mielenz JR, Bardsley JS, Wyman CE. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresource Technol* 2009;100:3532-39.

Modig T, Liden G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J* 2002;363:769-76.

Mohaghegi A, Dowe N, Schell D, Chou YE, Eddy E, Zhang M. Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnol Lett* 2004;26:321-5.

Mohammadi M, Najafpour GD, Younesi H, Lahijani P, Uzir MH, Mohamed AR. Bioconversion of synthesis gas to second generation biofuels: A review. *Renew Sust Energ Rev* 2011;15:4255-73.

Mohammadi M, Younesi H, Najafpourea G, Mohamed AR. Sustainable ethanol fermentation from synthesis gas by *Clostridium ljungdahlii* in a continuous stirred tank bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol* 2012;87:837-43.

Mohseni F, Magnusson M, Görling M, Alvfors P. Biogas from renewable electricity – Increasing a climate neutral fuel supply. *Appl Energ* 2012;90:11-6.

Mojovic L, Pejcin D, Rakin M, Pejcin J, Nikolic S, Djukic-Vukovic A. How to improve the economy of bioethanol production in Serbia. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16:6040-7.

Montgomery DC. Design and analysis of experiments. John Wiley, New York. 1997.

Moreno C, Ortiz L. Construindo a soberania energética e alimentar: experiências autônomas de produção de combustíveis renováveis na agricultura familiar e de enfrentamento do agronegócio da energia. Porto Alegre: Núcleo Amigos da Terra; 2007.

Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 2005; 96:673-86.

Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem* 2006;41:1913-23.

Muensri P, Kunanopparat T, Menut P, Siri wattanayotin S. Effect of lignin removal on the properties of coconut coir fiber/wheat gluten biocomposite. *Composites Part A* 2011;42:173-9.

Munasinghe PC, Khanal SK. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresource Technol* 2010;101:5013-22.

Mussatto SI, Machado EMS, Carneiro LM, Teixeira JA. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Appl Energ* 2012;92:763-8.

Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew Sust Energ Rev* 2010;14:578-97.

Nelson ML, O'Connor RT. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *J Appl Polym Sci* 1964a;8:1325-41.

Nelson ML, O'Connor RT. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal latticed type. Part I. Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. *J Appl Polym Sci* 1964b;8:1311-24.

Neves LCM, Pessoa Jr. A, Vitolo M. Production of glucose 6-phosphate dehydrogenase from genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* grown by batch fermentation process. *Biotechnol Progress* 2005;21:1136-9.

Nghiem NP, Taylor F, Johnston DB, Shetty JK, Hicks KB. Scale-up of ethanol production from winter barley by the edge (enhanced dry grind enzymatic) process in fermentors up to 300 l. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;165:870-82.

Novozymes, Brazil's first cellulosic ethanol. *Focus Catal* 2012;9:6.

NREL. National Renewable Energy Laboratory, <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acessado em 11.09.2012.

Obama P, Ricochon G, Muniglia L, Brosse N. Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion. *Bioresour Technol* 2012;112:156-63.

O'Connor RT, DuPré EF, Mitcham D. Applications of infrared absorption spectroscopy to investigations of cotton and modified cottons. *Text Res J* 1958;28: 382-92.

Öhgren K, Vehmaanperä J, Siika-Aho M, Galbe M, Viikari L, Zacchi G. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme Microb Tech* 2007;40:607-13.

Öhrman OGW, Weiland F, Pettersson E, Johansson AC, Hedman H, Pedersen M. Pressurized oxygen blown entrained flow gasification of a biorefinery lignin residue. *Fuel Process Technol* 2013;115:130-8.

Ojokoh AO, Uzeh RE. Production of *Saccharomyces cerevisiae* biomass in papaya extract medium. *Afr J Biotechnol* 2005;4(11):1281-4.

Olajire AA. CO₂ capture and separation technologies for end-of-pipe applications - A review. *Energ* 2010;35:2610-28.

Oliveira DS, Meherb-Dini C, Franco CML, Gomes E, da Silva R. Production of crude xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 aiming the baking process. *J Food Sci* 2010;75:588-94.

Ortega E, Watanabe M, Cavalett O. A produção de etanol em micro e minidestilarias. In: Cortez LAB, Lora EES, Gómez EO, editors. *Biomassa para energia*, Campinas: Editora Unicamp; 2008, p. 241-327.

Ortega E, Watanabe M, Cavalett O. A produção de etanol em micro e mini-destilarias. Campinas: Editora Unicamp; 2006.

Otto M, Berndes G, Fritsche U. The bioenergy and water nexus. *Biofuel Bioprod Bior* 2011;5:343-6.

Overend RP, Chornet E. Fractionation of lignocellulosic by steam-aqueous pretreatments. *Philos. T Roy Soc Lond A* 1987;321:523-36.

Pal S, Banik SP, Khowala S. Mustard stalk and straw: A new source for production of lignocellulolytic enzymes by the fungus *Termitomyces clypeatus* and as a substrate for saccharification. *Ind Crop Prod* 2013;41:283-8.

Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentat Laser ion of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol* 2000;74:25-33.

Palmqvist E, Meinander Q, Grage H, Hahn-Hägerdal B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng* 1999;63:46-55.

Pan X, Arato C, Gilkes N, Gregg D, Mabee W, Pye K, Xiao Z, Zhang X, Saddler J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and coproducts. *Biotechnol Bioeng* 2005;90:473-81.

Pan X, Xie D, Yu RW, Saddler JN. The bioconversion of mountain pine beetle-killed lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. *Biotechnol Bioeng* 2008;101:39-48.

Pan XJ, Gilkes N, Kadla J, Pye K, Saka S, Gregg D, Ehara K, Xie D, Lam D, Saddler J. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnol Bioeng* 2006;94:851-61.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technol* 2000;74:69-80.

Parekh SR, Yu S, Wayman M. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;25:300-4.

Parida AK, Das AB. Salt tolerance and salinity effects on plants a review. *Ecotox Environ Safe* 2005;60:324-49.

Parikh K. Sustainable development and low carbon growth strategy for India. *Energy* 2012;40:31-8.

Park JY, Kang M, Kim JS, Lee JP, Choi WI, Lee JS. Enhancement of enzymatic digestibility of *Eucalyptus grandis* pretreated by NaOH catalyzed steam explosion. *Bioresource Technol* 2012;123:707-12.

Pellegrini LF, Oliveira Jr S. Combined production of sugar, ethanol and electricity: Thermo-economic and environmental analysis and optimization. *Energy* 2011;36:3704-15.

Pereira CLF, Ortega E. Sustainability assessment of large-scale ethanol production from sugarcane. *J Clean Prod* 2010;18:77-82.

Pessoa Jr A, Roberto IC, Menossi M, Santos RR, Ortega Filho S, Penna TCV. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. *Appl Biochem Biotechnol* 2005;121-124:59-70.

Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technol* 2011;102:17-25.

Popp A, Krause M, Dietrich JP, Lotze-Campen H, Leimbach M, Beringer T, *et al.* Additional CO₂ emissions from land use change - Forest conservation as a precondition for sustainable production of second generation bioenergy. *Ecol Econ* 2012;74:64-70.

Posten C, Schaub G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels - a process view. *J Biotechnol* 2009;142:64-9.

Puri M, Abraham RE, Barrow CJ. Biofuel production: Prospects, challenges and feed stock in Australia. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16:6022-31.

Qi B, Luo J, Chen X, Hang X, Wan Y. Separation of furfural from monosaccharides by nanofiltration. *Bioresource Technol* 2011;102:7111-8.

Qiu H, Sun L, Huang J, Rozelle S. Liquid biofuels in China: Current status, government policies, and future opportunities and challenges. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16:3095-3104.

Quintero JA, Moncada J, Cardona CA. Techno-economic analysis of bioethanol production from lignocellulosic residues in Colombia: a process simulation approach. *Bioresource Technol* 2013;139:300-7.

Rabelo SC, Amezquita Fonseca NA, Andrade RR, Maciel Filho R, Costa AC. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass Bioenerg* 2011;2600-7.

Rabelo SC, Maciel Filho R, Costa AC. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* 2008;144:87-100.

Rabelo SC, Maciel Filho R, Costa AC. Lime pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Appl Biochem Biotechnol* 2013;169: 1696-1712.

Ramchandran D, Rajagopalan N, Strathmann TJ, Singh V. Use of treated effluent water in ethanol production from cellulose. *Biomass Bioenerg* 2013;56:22-8.

Rawat R, Kumbhar BK, Tewari L. Optimization of alkali pretreatment for bioconversion of poplar (*Populus deltoides*) biomass into fermentable sugars using response surface methodology. *Ind Crop Prod* 2013;44:220-6.

Realf MJ, Abbas C. Industrial Symbiosis. *J Ind Ecol* 2003;7(3-4);5-9.

Reddy HKY, Srijana M, Reddy MD, Reddy G. Coculture fermentation of banana agro-waste to ethanol by cellulolytic thermophilic *Clostridium thermocellum* CT2. *Afr J Biotechnol* 2010;9:1926-34.

Rencoret J, Marques G, Gutiérrez AL, Nieto J, Jiménez-Barbero AT, del Río MJC. Isolation and structural characterization of the milled-wood lignin from *Paulownia fortunei* wood. *Ind Crop Prod* 2009;30:137-43.

Retamal N, Duran JM, Fernandez J. Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus [*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller]. *J Sci Food Agric* 1987;40:213-8.

Rocha MVP, Rodrigues THS, Melo VMM, Gonçalves LRB, Macedo GR. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38(8):1099-107.

Rodrigues AC, Leitão AF, Moreira S, Felby C, Gama M. Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution. *Bioresource Technol* 2012;110:526-33.

Rødsrud G, Lersch M, Sjöde A. History and future of world's most advanced biorefinery in operation. *Biomass Bioenerg* 2012;46:46-59.

Romaní A, Garrote G, Alonso JL, Parajó JC. Bioethanol production from hydrothermal pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Bioresource Technol* 2010;101:8706-2.

Romaní A, Garrote G, López F, Parajó JC. *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresource Technol* 2011;102:5896-5904.

Romaní A, Garrote G, Parajó JC. Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by simultaneous saccharification and fermentation operating at high solids loading. *Fuel* 2012;94:305-12.

Ruanglek V, Maneewatthana D, Tripetchkul S. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem* 2006;41:1432-7.

Rudolf A, Baudel H, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B, Lidén G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:783-90.

Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Rev Brasil Bot* 2004;27:205-11.

Ruiz HA, Rodríguez-Jasso RM, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renew Sust Energ Rev* 2013;21:35-51.

Ruiz HA, Ruzene DS, Silva DP, Silva FMD, Vicente AA, Teixeira JA. Development and characterization of an environmentally friendly process sequence (autohydrolysis and organosolv) for wheat straw delignification. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;164:629-41.

Ruiz HA, Vicente AA, Teixeira JA. Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process. *Ind Crop Prod* 2012;36:100-7.

Ruiz HA. Process development for bioethanol production using wheat straw biomass. Thesis. 2011. University of Minho, Portugal.

Sachs I. *Eco desenvolvimento: crescer sem destruir*. São Paulo: Vértice; 1988.

Saha BC, Cotta MA. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. *J Chem Technol Biotechnol* 2007;82:913-9.

Sakaki T, Shibata M, Sumi T, Yasuda S. Saccharification of cellulose using a hot-compressed water-flow reactor. *Ind Eng Chem Res* 2002;41:661-5.

Sanders J, Scott E, Weusthuis R, Mooibroek H. Bio-refinery as the bioinspired process to bulk chemicals. *Macromol Biosci* 2007;7:105-17.

Santos JRA, Gouveia ER, Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira Prod Agroindustrial* 2009;11:27-33.

Santos JRA, Lucena MS, Gusmão NB, Gouveia ER. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. *Ind Crop Prod* 2012;36:584-8.

Santos JRA, Souto-Maior AM, Gouveia ER, Martin C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Quim Nova* 2010;33:904-8.

Sastri B, Lee A. *World biofuels production potential: understanding the challenges to meeting the U.S. Renewable fuel standard*. Washington: United States Department of Energy Office of Policy and International Affairs; 2008.

Schaeffer R, Szklo AS, Lucena AFP, Borba BSMC, Nogueira LPP, Fleming FP. Energy sector vulnerability to climate change: A review. *Energ* 2012;38:1-12.

Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA, 2001. 541p.

Schornagel J, Niele F, Worrell E, Böggemann M. Water accounting for (agro)industrial operations and its application to energy Pathways. *Resour Conserv Recy* 2012;61:1-15.

Schorr D, Diouf, PN, S, Tatjana. Evaluation of industrial lignins for biocomposites production. *Ind Crop Prod* 2014;52:65-73.

Schuchardt ULF, Ribeiro ML, Gonçalves AR. The petrochemical industry in the next century: how to replace petroleum as raw material. *Quim Nova* 2001;24:247-51.

Scordia D, Cosentino SL, Lee JW, Jeffries TW. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass Bioenerg* 2012;39:296-305.

Segal L, Creely J, Martin AJ, Conrad C. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Tex Res J* 1959;29: 786-94.

Selig MJ, Vinzant TB, Himmel EM, Decker SR. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;155:397-406.

Selim MH, Elshafei AM, El-Diwany AI. Production of single cell protein from yeast strains grown in egyptian vinasse. *Bioresource Technol* 1991;36:157-60.

Sendich E, Laser M, Kim S, Alizadeh H, Laureano-Perez L, Dale B, Lynd L. Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price. *Bioresource Technol* 2008;99:8429-35.

Senthilraja P, Kathiresan K, Saravanakumar K. Comparative analysis of bioethanol production by different strains of immobilized marine yeast. *J Yeast Fungal Res* 2011;2:113-6.

Sheehan J. Engineering direct conversion of CO₂ to biofuel. *Nat Biotechnol* 2009;27:1128-9.

Sheikh MMI, Kim CH, Lee JY, Kim SH, Kim GC, Lee JY, *et al.* Production of bioethanol from waste money bills – A new cellulosic material for biofuels. *Food Bioprod Process* 2013;91:60-5.

Shen J, Agblevor FA. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011;34:33-43.

Shen J, Agblevor FA. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. *Biomass Bioenerg* 2010;34:1098-107.

Shi AZ, Koh LP, Tan H. The biofuel potential of municipal solid waste. *GCB Bioenerg* 2009;1:317-20.

Silva CF, Arcuri SL, Campos CR, Vilela DM, Alves JGLF, Schwan RF. Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. *Waste Manage* 2011;31:108-14.

Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysates. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1306-15.

Singh A, Bishnoi NR. Enzymatic hydrolysis optimization of microwave alkali pretreated wheat straw and ethanol production by yeast. *Bioresource Technol* 2012;108:94-101.

Singh A, Bishnoi NR. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. *Ind Crop Prod* 2013;41:221-6.

Singh A, Bajar S, Bishnoi NR. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. *Fuel* 2014a;116:699-702.

Singh LK, Majumder CB, Ghosh S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. *Biochem Eng J* 2014b;82:150-7.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method Enzymol* 1999;299:152-78.

Siqueira G, Várnai A, Ferraz A, Milagres AMF. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Appl Energ* 2013;102:399-402.

Sivakumar G, Vail DR, Xu J, Burner DM, Lay Jr JO, Ge X, *et al.* Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *Eng Life Sci* 2010;10(1):8-18.

Sluiter A, Hames B, Hyman D, Payne C, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Wolfe J. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. National Renewable Energy Laboratory: Golden, Colorado. 2008.

Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory: Golden, Colorado. 2005.

Socol CR, Vandenberghe LP, Medeiros AB, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, Pitarelo AP, *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technol* 2010;101(13):4820-5.

Soni SK, Soni R. Regulation of cellulase synthesis in *Chaetomium erraticum*. *BioResources* 2010;5:81-98.

SOPAC. Liquid Biofuels in Pacific Island Countries. SOPAC Miscellaneous Report. Fiji Islands: SOPAC Report; 2007.

Sousa ELL, Macedo IC. Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. Luc São Paulo: Projetos de Comunicação; 2010.

Srirangan K, Akawi L, Moo-Young M, Chou CP. Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Appl Energ* 2012;100:172-86.

Starfelt F, Daianova L, Yan J, Thorin E, Dotzauer E. The impact of lignocellulosic ethanol yields in polygeneration with district heating - A case study *Appl Energ* 2012;92:791-9.

Sukumaran RK, Singhanian RR, Mathew GM, Pandey A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renew Energ* 2009;34:421-4.

Sullivan TP, Sullivan DS, Lindgren PMF, Ransome DB, Bull JG, Ristea C. Bioenergy or biodiversity? Woody debris structures and maintenance of red-backed voles on clearcuts. *Biomass Bioenerg* 2011;35(10):4390-8.

Sun JX, Sun XF, Sun RC, Su YQ. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 2004;56:195-204.

Sun R, Tomkinson J, Zhu W, Wang SQ. Delignification of maize stem by peroxymonosulfuric acid, peroxyformic acid, peracetic acid and hydrogen peroxide. 1. Physicochemical and structural characterization of the solubilized lignins. *J Agric Food Chem* 2000;48:1253-62.

Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 2002;83:1-11.

Sun YC, Xu JK, Xu F, Sun RC. Efficient separation and physicochemical characterization of lignin from eucalyptus using ionic liquid–organic solvent and alkaline ethanol solvent. *Ind Crop Prod* 2013;47:277-85.

Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 1999;87:169-74.

Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:701-8.

Tan RR, Culaba AB, Purvis MRI. Carbon balance implications of coconut biodiesel utilization in the Philippine automotive transport sector. *Biomass Bioenerg* 2004;26:579-85.

Tan SSY, MacFarlane DR, Upfal J, Edye LA, Doherty WOS, Patti AF, Pringle JM, Scott JL. Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. *Green Chem* 2009;11:339-45.

TAPPI Standard Test Methods. <www.tappi.org> Acessado em 20.1.2013.

Tejado A, Pena C, Labidi J, Echeverria JM, Mondragon I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technol* 2007;98:1655-63.

Thompson DN, Chen HC, Grethlein HE. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Bioresource Technol* 1992;39(2):155-63.

Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J Biotechnol* 1995;41:1-17.

Tye YY, Lee KT, Abdullah WNW, Leh CP. Second-generation bioethanol as a sustainable energy source in Malaysia transportation sector: Status, potential and future prospects. *Renew Sust Energ Rev* 2011;15:4521-36.

Ueno R, Urano N, Kimura S. Characterization of thermotolerant, fermentative yeasts from hot spring drainage. *Fish Sci* 2001;67(1):138-45.

Ugalde UO, Castrillo JI. Single cell proteins from fungi and yeasts. In: Khachatourians GG, Arora DK, Berka RM, editors. London: Elsevier; 2005, p. 123-50.

Uihlein A, Schebek L. Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: An assessment. *Biomass Bioenerg* 2009;33:793-802.

Umikalsan MS, Ariff AB, Zulkifli HS, Tong CC, Hassan MA, Karim MIA. The treatment of oil palm empty fruit bunch fiber for subsequent use as substrate for cellulase production by *Chaetomium globosum*. *Bioresource Technol* 1997;62:1-9.

UNICA. União da Indústria de Cana-de-açúcar, <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acessado em 31.05.2012.

Urano N, Yamazaki M, Ueno R. Distribution of halotolerant and/or fermentative yeasts in aquatic environments. *J Tokyo Univ Fish* 2001;87:23-9.

Vaithanomsat P, Apiwatanapiwat W, Chumchuent N, Kongtud W, Sundhrarajun S. The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. *Kasetsart J* 2011;45:159-64.

Villar JC, Caperos A, Garcia-Ochoa F. Oxidation of hardwood kraft lignin to phenolic derivatives with oxygen as oxidant. *Wood Sci Technol* 2001;35:245-55.

Visser EM, Oliveira Filho D, Martins MA, Steward BL. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. *Biomass Bioenerg* 2011;35:489-94.

vom Stein T, Grande PM, Sibilla F, Commandeur U, Fischer R, Leitner W, Domínguez de María, P. Salt-assisted organic-acid catalyzed depolymerization of cellulose. *Green Chem* 2010;12:1844-9.

Wang G, Liu C, Hong J, Ma Y, Zhang K, Huang X, Zou S, Zhang M. Comparison of process configurations for ethanol production from acid- and alkali-pretreated corncob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without B-glucosidase expression. *Bioresource Technol* 2013;142:154-61.

Wang Z, Keshwani DR, Redding AP, Cheng JJ. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technol* 2010;101:3583-5.

Wei C, Cheng C. Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the structural features and the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biotechnol Bioeng* 1985;27:1418-26.

Wetterlund E, Leduc S, Dotzauer E, Kindermann G. Optimal localization of biofuel production on a European scale. *Energ* 2012;41:462-72.

Wikandari R, Miklalti R, Syamsiyah S, Muriana R, Ayuningsih Y. Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigenous microbial isolate for bioethanol production. *Agric J* 2010;5:105-9.

Wilkins MR, Atiyeh HK. Microbial production of ethanol from carbon monoxide. *Curr Opin Biotech* 2011;22:326-30.

Wirawan F, Cheng C, Kao W, Lee D, Chang J. Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. *Appl Energy* 2012;100:19-26.

Wood TM, Garcia-Campayo V. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1990;1(2/3):147-67.

Wu JM, Liu RH. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr Polym* 2012;90:116-21.

Wu M, Mintz M, Wang M, Arora S. Water consumption in the production of ethanol and petroleum gasoline. *Environ Manage* 2009;44:981-97.

WWAP. World Water Assessment Programme. The United Nations World Water Development Report 4: Managing Water under Uncertainty and Risk. Paris: UNESCO; 2012.

Wyman CE, Decker SR, Himmel ME, Brady JW, Skopec CE, Viikari L. Em Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility; Dumitriu, S., ed.; Dekker: New York, 2005, cap. 43.

Xiang Q, Lee YY. Oxidative cracking of precipitated hardwood lignin by hydrogen peroxide. *Appl Biochem Biotechnol* 2000;84-86:153-62.

Xian-Zhao L, Chun-Zhi W, Qing S, Chao-Kui L. Field performance of halophytic species under irrigation with saline drainage water in the San Joaquin Valley of California. *Herald J Agr Food Sci Res* 2012;1(3):44-51.

Xiao LP, Shi ZJ, Xu F, Sun RC. Characterization of lignins isolated with alkaline ethanol from the hydrothermal pretreated *Tamarix ramosissima*. *Bioenerg Res* 2013;6: 519-32.

Xiao Z, Zhang X, Greff DJ, Saddler JN. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;113-116:1115-26.

Xing MN, Zhang XZ, Huang H. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. *Biotechnol Adv* 2012;30(4):920-9.

Xu F, Shi YC, Wang D. X-ray scattering studies of lignocellulosic biomass: A review. *Carbohydr Polym* 2013;94:904-17.

Yan X, Tan DKY, Inderwildi OR, Smith JAC, King DA. Life cycle energy and greenhouse gas analysis for agave-derived bioethanol. *Energy Environ Sci* 2011;4:3110-21.

Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking lowcost cellulosic ethanol. *Biofuel Bioprod Biorefin* 2008;2:26-40.

Yang HP, Yan R, Chen HP, Lee DH, Zheng CG. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 2007;86:1781-8.

Yoneda N, Kusano S, Yasui M, Pujado P, Wilcher S. Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid. *Appl Catal A* 2001;221:253-65.

Yu J, Zhang T, Zhong J, Zhang X, Tan T. Biorefinery of sweet sorghum stem. *Biotechnol Adv* 2012;30(4):811-6.

Yu Y, Feng Y, Xu C, Liu J, Li D. Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technol* 2011;102:5123-8.

Yuan WJ, Zhao XQ, Ge XM, Bai FW. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J Appl Microbiol* 2008;105:2076-83.

Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding SY. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Curr Opin Biotech* 2014;27:38-45

Zhang C, Qi W, Wang F, Li Q, Su R, He Z. Ethanol from corn stover using SSF: an economic assessment. *Energy Source Part B* 2011;6:136-44.

Zhang K, Feng H. Fermentation potentials of *Zymomonas mobilis* and its application in ethanol production from low-cost raw sweet potato. *African J Biotech* 2010;9:6122-8.

Zhao J, Xia L. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. *Fuel Process Technol* 2009;90:1193-7.

Zhao X, Cheng K, Liu D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl Microbiol Biot* 2009;82:815-27.

Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuel Bioprod Biorefin* 2012;6:561-79.

Zhao XB, Wang L, Liu DH. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. *J Chem Technol Biot* 2007;82:1115-21.

Zheng S, Yang M, Yang Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater. *Bioresource Technol* 2005;96(10):1183-7.

Zhu Z, Zhu M, Wu Z. Pretreatment of sugarcane bagasse with $\text{NH}_4\text{OH-H}_2\text{O}_2$ and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production. *Bioresour Technol* 2012;119:199-207.

Ziaie-Shirkolaei YZ, Mohammadi-Rovshandeh J, Rezayati-Charani P, Khajeheian MB. Influence of dimethyl formamide pulping of wheat straw on cellulose degradation and comparison with kraft process. *Bioresource Technol* 2008;99:3568-78.

As referências encontram-se de acordo com a norma do periódico *Renewable and Sustainable Energy Reviews Technology*. Disponível em: <http://www.journals.elsevier.com/renewable-and-sustainable-energy-reviews/>. [Dezembro, 2013].

ANEXOS

Divulgações científicas

Apresentação em eventos

- Bioethanol production from hydrothermally pretreated coconut fibre mature catalyzed with sodium hydroxide. In: 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Clearwater Beach, FL, 2014.
- Produção de etanol através de *Saccharomyces cerevisiae* PE2 usando fibra e casca de coco maduro, casca de coco verde e cacto pré-tratados. In: 27° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
- Produção de etanol por *Pichia stipitis* e *Zymomonas mobilis* em SSF e SSSF usando fibra de coco maduro pré-tratada pelo processo hidrotérmico catalisado com hidróxido de sódio. In: 27° Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
- Avaliação fermentativa da levedura floculante e termotolerante *Saccharomyces cerevisiae* CA11 utilizando materiais lignocelulósicos pré-tratados. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM 2013.
- Hidrólise enzimática, sacarificação e fermentação simultânea de materiais lignocelulósicos usando *Saccharomyces cerevisiae* CA11. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM 2013.
- Effect of High-solids loading on enzymatic hydrolysis using pretreated autohydrolysis coconut shell. In: XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering, 2013, Cancun. Bioenergy and Biofuels, 2013.
- Otimização sinérgica da mistura de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Lichtheimia ramosa* sobre a hidrólise da casca de coco maduro pré-tratada visando à produção de etanol celulósico. In: CIENTEC/UFRN, 2012.

Artigos

- Gonçalves FA, dos Santos ES, de Ribeiro GR. The alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. Under review in Industrial Crops and Products.
- Gonçalves FA, dos Santos ES, de Ribeiro GR. Use of low cost cultivars in the production of cellulosic ethanol in Brazil: a proposal to utilization of micro-distillery using agroindustrial and urban waste. Under review in Renewable and Sustainable Energy Reviews.
- Gonçalves FA, Ruiz HA, Nogueira CC, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. Fuel 131;66-76. Doi:10.1016/j.fuel.2014.04.021
- Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Enzymatic hydrolysis of cactus, green coconut shell, coconut fibre mature and mature coconut shell pretreated by autohydrolysis, fermentation in SSF and SSSF by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*. Under preparation.
- Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in SSF and SSSF from coconut fibre mature by hydrothermal pretreatment catalyzed by sodium hydroxide. Under preparation.
- Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Enzymatic hydrolysis of cactus, green coconut shell, coconut fibre mature and mature coconut shell pretreated by organosolv and comparison of bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*. Under preparation.
- Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in semi-simultaneous saccharification and fermentation in bioreactor in coconuts and cactus pretreated. Under preparation.

- Gonçalves FA, dos Santos ES, de Ribeiro GR. Optimizing synergistic mixture of enzymes produced by *Lichtheimia ramosa* and *Trichoderma reesei* under hydrolysis of delignified coconut fibre mature and bioethanol production in semi-simultaneous saccharification and fermentation strategy. Under review in Industrial Crops and Products.
- Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Bioethanol production by flocculant and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* CA11 using coconuts and cactus pretreated. Under preparation.
- Gonçalves FA, Ruiz HA, dos Santos ES, Teixeira JA, de Macedo GR. Bioethanol production by microorganism flocculant and non-flocculant using delignified coconut fibre mature. Under preparation.

Apêndice

Tabela 1. ANOVA da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados por PHA-PHS

Hidrólise enzimática - PHA-PHS						
Anova: factor único						
SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Fibra de coco maduro	2	152,41	76,205	0,70805		
Casca de coco maduro	2	148,99	74,495	0,02205		
Casca de coco verde	2	140,40	70,2	1,0082		
Cacto	2	136,87	68,435	0,25205		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	78,8214375	3	26,274	52,80239656	0,001128012	6,591382
Dentro de grupos	1,99035	4	0,4976			
Total	80,8117875	7				

Tabela 2. ANOVA da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados por PA

Hidrólise enzimática - Autohidrólise						
Anova: factor único						
SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Fibra de coco maduro	2	168,19	84,095	0,68445		
Casca de coco maduro	2	178,41	89,205	1,49645		
Casca de coco verde	2	185,04	92,52	0,3528		
Cacto	2	181,82	90,91	1,6562		
ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	80,01265	3	26,671	25,46207	0,004565	6,591382
Dentro de grupos	4,1899	4	1,0475			
Total	84,20255	7				

Tabela 3. ANOVA da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados por POEA

Hidrólise enzimática - POEA				
Anova: factor único				
SUMÁRIO				
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fibra de coco maduro	2	155,08	77,54	0,08
Casca de coco maduro	2	160,84	80,42	1,5488
Casca de coco verde	2	164,24	82,12	0,0648
Cacto	2	168,55	84,275	0,45125

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	48,5130375	3	16,171	30,15784	0,003313	6,591382
Dentro de grupos	2,14485	4	0,5362			
Total	50,6578875	7				

Tabela 4. ANOVA dos micro-organismos usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS em SSF e SSSF.

SSF						
Anova: factor único						
SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
S. cerevisiae	2	169,28	84,64	0,374854526		
P. stipitis	2	158,54	79,27	2,430019287		
Z. mobilis	2	163,42	81,71	0,356278567		

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	28,91693333	2	14,45846667	13,72138853	0,030935382	9,552094496
Dentro de grupos	3,16115238	3	1,05371746			
Total	32,07808571	5				

SSSF

Anova: factor único

SUMÁRIO				
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
S. cerevisiae	2	178,3	89,15	0,532658883
P. stipitis	2	170,08	85,04	0,294826266
Z. mobilis	2	171,3	85,65	1,05037196

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	19,67613333	2	9,838066667	15,71695731	0,025715933	9,552094496
Dentro de grupos	1,877857108	3	0,625952369			
Total	21,55399044	5				

Tabela 5. Análise de teste T dos micro-organismos usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHA-PHS em SSF e SSSF

S. cerevisiae

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Média	84,64	89,15
Variância	0,374854526	0,532658883
Observações	2	2
Variância agrupada	0,453756705	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-6,6952225	
P(T<=t) uni-caudal	0,010794345	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,021588691	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

P. stipitis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>P. stipitis</i>	<i>P. stipitis</i>
Média	79,27	85,04
Variância	2,430019	0,294826266
Observações	2	2
Variância agrupada	1,362423	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-4,94333	
P(T<=t) uni-caudal	0,019285	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,03857	
t crítico bi-caudal	4,302653	

Z. mobilis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. mobilis</i>
Média	81,71	85,65
Variância	0,356278567	1,05037196
Observações	2	2
Variância agrupada	0,703325263	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-4,698055177	
P(T<=t) uni-caudal	0,021221617	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,042443234	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Tabela 6. ANOVA dos micro-organismos usando a casca de coco verde pré-tratada por PA em SSF e SSSF

SSF

Anova: factor único

SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
S. cerevisiae	2	173,7991457	86,89957	0,338030254		
P. stipitis	2	168,3717444	84,18587	6,747507473		
Z. mobilis	2	170,5102297	85,25511	0,760568073		

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	7,474462178	2	3,737231	1,428950049	0,366495748	9,552094496
Dentro de grupos	7,8461058	3	2,615369			
Total	15,32056798	5				

SSSF

Anova: factor único

SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
S. cerevisiae	2	178,1158479	89,05792	0,034094		
P. stipitis	2	174,494338	87,24717	3,91692		
Z. mobilis	2	178,3214051	89,1607	0,33803		

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4,634005113	2	2,317003	1,620642	0,333251	9,552094
Dentro de grupos	4,289045057	3	1,429682			
Total	8,92305017	5				

Tabela 7. Análise de teste T dos micro-organismos usando a casca de coco verde pré-tratada por PA em SSF e SSSF

S. cerevisiae

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Média	86,89957285	89,05792395
Variância	0,3852677	0,034094365
Observações	2	2
Variância agrupada	0,209681032	
Hipótese de diferença	0	
gl	2	
Stat t	-4,713489224	
P(T<=t) uni-caudal	0,021091522	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,042183044	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

P. stipitis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>P. stipitis</i>	<i>P. stipitis</i>
Média	84,18587219	87,247169
Variância	6,747507473	3,916920438
Observações	2	2
Variância agrupada	5,332213956	
Hipótese de diferença	0	
gl	2	
Stat t	-1,325719533	
P(T<=t) uni-caudal	0,158043944	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,316087888	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Z. mobilis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. mobilis</i>
Média	85,25511487	89,16070257
Variância	0,760568073	0,338030254
Observações	2	2
Variância agrupada	0,549299163	
Hipótese de diferença	0	
gl	2	
Stat t	-5,269651864	
P(T<=t) uni-caudal	0,017087861	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,034175721	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Tabela 8. ANOVA dos micro-organismos usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS em SSF e SSSF

SSF

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
S. cerevisiae	2	170,6294645	85,31473	1,364412871
P. stipitis	2	174,8791916	87,4396	3,193759073
Z. mobilis	2	169,1152083	84,5576	2,738300832

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	8,929442638	2	4,464721	1,835703958	0,301547435	9,552094496
Dentro de grupos	7,296472776	3	2,432158			
Total	16,22591541	5				

SSSF

Anova: factor único

SUMÁRIO				
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
S. cerevisiae	2	182,3305	91,16527	2,131895
P. stipitis	2	180,3551	90,17756	3,558478
Z. mobilis	2	182,0552	91,02761	0,464279

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,144724805	2	0,572362	0,27899	0,774242	9,552094
Dentro de grupos	6,154652964	3	2,051551			
Total	7,299377769	5				

Tabela 9. Análise de teste T dos micro-organismos usando a fibra de coco maduro pré-tratada por PHCHS em SSF e SSSF

S. cerevisiae

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Média	85,31473223	91,16526728
Variância	1,364412871	2,131895112
Observações	2	2
Variância agrupada	1,748153992	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-4,424923254	
P(T<=t) uni-caudal	0,023732911	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,047465821	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

P. stipitis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>P. stipitis</i>	<i>P. stipitis</i>
Média	87,4395958	90,17756262
Variância	3,193759073	3,558478473
Observações	2	2
Variância agrupada	3,376118773	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-1,490113404	
P(T<=t) uni-caudal	0,137330891	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,274661782	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Z. mobilis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. mobilis</i>
Média	84,5576	91,02761
Variância	2,738301	0,464279
Observações	2	2
Variância agrupada	1,60129	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-5,11293	
P(T<=t) uni-caudal	0,018094	
t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,036189	
t crítico bi-caudal	4,302653	

Tabela 10. ANOVA dos micro-organismos usando o cacto pré-tratado por POEA em SSF e SSSF

SSF

Anova: factor único

SUMÁRIO						
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
S. cerevisiae	2	173,4058348	86,70291739	0,954571482		
P. stipitis	2	165,1327067	82,56635337	3,966326194		
Z. mobilis	2	160,5935462	80,29677309	0,386562005		

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	42,20056082	2	21,10028041	11,92676817	0,03734	9,552094
Dentro de grupos	5,307459682	3	1,769153227			
Total	47,5080205	5				

SSSF

Anova: factor único

SUMÁRIO					
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	
S. cerevisiae	2	179,6863684	89,8431842	2,279926929	
P. stipitis	2	167,0920086	83,54600432	1,267125004	
Z. mobilis	2	170,0143466	85,00717331	1,136018954	

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	43,45099373	2	21,72549686	13,91746829	0,030347	9,552094
Dentro de grupos	4,683070887	3	1,561023629			
Total	48,13406461	5				

Tabela 11. Análise de teste T dos micro-organismos usando o cacto pré-tratado por POEA em SSF e SSSF

<i>S. cerevisiae</i>		
Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Média	86,70291739	89,8431842
Variância	0,954571482	2,279926929
Observações	2	2
Variância agrupada	1,617249206	
Hipótese de diferenç	0	
gl	2	
Stat t	-2,469323992	
P(T<=t) uni-caudal	0,066118666	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,132237332	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

<i>P. stipitis</i>		
Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>P. stipitis</i>	<i>P. stipitis</i>
Média	82,56635337	83,546
Variância	3,966326194	1,267125
Observações	2	2
Variância agrupada	2,616725599	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-0,605608931	
P(T<=t) uni-caudal	0,303172867	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,606345735	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Z. mobilis

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Z. mobilis</i>	<i>Z. mobilis</i>
Média	80,29677309	85,00717331
Variância	0,386562005	1,136018954
Observações	2	2
Variância agrupada	0,76129048	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-5,398618131	
P(T<=t) uni-caudal	0,016320252	
t crítico uni-caudal	2,91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0,032640504	
t crítico bi-caudal	4,30265273	

Tabela 12. ANOVA das SSSF realizadas em biorreator

SUMÁRIO				
<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fibra de coco maduro	2	179.5937	89.79686588	1.677627329
Casca de coco verde	2	180.1714	90.08571018	2.556353799
Fibra de coco maduro	2	164.1595	82.07973049	1.601290106
Cacto	2	177.2998	88.64988281	3.155608206

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	85.13869618	3	28.37956539	12.62593524	0.01655141	6.591382116
Dentro de grupos	8.990879441	4	2.24771986			
Total	94.12957562	7				

Tabela 13. Análise de teste T das SSSF realizadas em biorreator e as SSSF realizadas em frascos Erlenmeyer

PHA_PHS	
Fibra de coco maduro	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Fibra de coco maduro</i>	<i>Fibra de coco maduro</i>
Média	89.79686588	89.15
Variância	1.677627329	0.532658883
Observações	2	2
Variância agrupada	1.105143106	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	0.615325605	
P(T<=t) uni-caudal	0.300514218	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.601028436	
t crítico bi-caudal	4.30265273	

PA	
Casca de coco verde	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Casca de coco verde</i>	<i>Casca de coco verde</i>
Média	90.08571018	89.05792395
Variância	2.556353799	0.034094365
Observações	2	2
Variância agrupada	1.295224082	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	0.903088562	
P(T<=t) uni-caudal	0.230897791	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.461795582	
t crítico bi-caudal	4.30265273	

PHCHS**Fibra de coco maduro**

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Fibra de coco maduro</i>	<i>Fibra de coco maduro</i>
Média	82.07973049	91.16526728
Variância	1.601290106	2.131895112
Observações	2	2
Variância agrupada	1.866592609	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-6.650063929	
P(T<=t) uni-caudal	0.010936654	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.021873308	
t crítico bi-caudal	4.30265273	

POEA**Cacto**

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Cacto</i>	<i>Cacto</i>
Média	88.64988281	89.8431842
Variância	3.155608206	2.279926929
Observações	2	2
Variância agrupada	2.717767568	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	2	
Stat t	-0.723842352	
P(T<=t) uni-caudal	0.27218946	
t crítico uni-caudal	2.91998558	
P(T<=t) bi-caudal	0.544378919	
t crítico bi-caudal	4.30265273	