



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JIMMY SOARES

**Produção de etanol a partir do coco verde utilizando
cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriais**

VITÓRIA

2016

JIMMY SOARES

**Produção de etanol a partir do coco verde utilizando
cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriais**

Tese de Doutorado apresentada ao Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes.

VITÓRIA-ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

S676p Soares, Jimmy, 1986 -
Produção de etanol a partir do coco verde utilizando cepas de
Saccharomyces cerevisiae industriais / Jimmy Soares – 2016.
162 f. : il.

Orientador: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Coorientador: Antonio Alberto Ribeiro Fernandes.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cocos. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Etanol. I. Fernandes, Patricia
Machado Bueno. II. Fernandes, Antonio Alberto Ribeiro. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ponto Espírito Santo - Universidade Federal do Espírito Santo

DEFESA DE TESE

ALUNO: JIMMY SOARES

TÍTULO DO PROJETO: "Produção de Etanol a Partir do Coco Verde Utilizando Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriais".

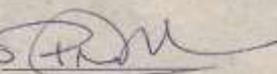
PROFESSORA ORIENTADORA: Patricia Machado Bueno Fernandes

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Profª. Drª. Patricia Machado Bueno Fernandes
RENORBIO/UFES (Orientadora)

Satisfatório 

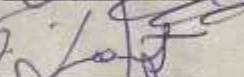
Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
RENORBIO/UFES (Coorientador)

Satisfatório 

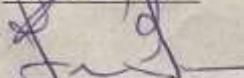
Prof. Dr. José Aires Ventura
RENORBIO/UFES (Titular)

Satisfatório 

Profª. Drª. Jane Meri Santos
UFES (Titular)

Satisfatório 

Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
UnB (Titular)

Satisfatório 

Prof. Dr. Johan Maria Jozef Ghislenus Thevelein
Katholieke Universiteit Leuven (Titular)

Satisfatório 

TIPO DE SESSÃO: Aberta

DIA: 30 de novembro de 2016

HORÁRIO: 09h00

LOCAL: Universidade Federal do Espírito Santo – Núcleo de Biotecnologia, 2º andar, auditório.

Em memória do meu avô, Waldemar Ferreira da Silva.

AGRADECIMENTOS

À Rede Nordeste de Biotecnologia;

À Universidade Federal do Espírito Santo;

À Katholieke Universiteit Leuven;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

À Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes;

Ao Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes;

Ao Prof. Dr. Johan M. Thevelein;

Ao Dr. Mekonnen M. Demeke;

À Dr^a. Maria R. Foulquié-Moreno;

Ao Prof. Dr. Alex Verplaetse;

Ao Prof. Dr. Bert F. Sels;

Ao Prof. Dr. José Aires Ventura;

Ao Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres;

À Prof^a. Dr^a. Jane Meri Santos;

À Prof^a. Dr^a. Diolina Moura Silva;

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Fontes Lelis;

Ao Dr. Marcelo do Amaral Martins;

Ao Prof. Dr. Warley de Souza Borges;

Ao Dr. Eduardo de Almeida Soares e família;

À Dra. Anna Kremer;

Ao Dr. Christopher J. Guérin;

À Dyadic Netherlands B.V.;

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo;

Ao grupo de pesquisa do Laboratory of Molecular Cell Biology da Katholieke Universiteit Leuven e

À minha família e amigos.

RESUMO

Cocos nucifera L., o coco, é um fruto de grande importância comercial e apresenta variadas aplicações na indústria alimentícia. No Brasil, os produtos do coco são coco ralado, leite, água e óleo de coco. Adicionalmente, o envase da água de coco em embalagens longa vida é considerado um produto com grande potencial em função da facilidade de distribuição e maior tempo de prateleira em supermercados. A água de coco é obtida do coco verde, e a biomassa remanescente não possui destinação adequada, sendo um problema nas cidades produtoras. O coco verde é composto de celulose, hemicelulose e lignina, e os dois primeiros componentes podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis para a produção de etanol. O etanol é um combustível renovável com grande potencial na mitigação dos problemas atrelados ao consumo de combustíveis fósseis. O presente estudo discorre sobre a produção de etanol a partir de hidrolisados do coco submetidos ao pré-tratamento alcalino, e fermentados por diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Os hidrolisados de coco foram produzidos com altas cargas de sólidos em batelada simples ou alimentada visando uma elevada concentração de açúcares. O mesocarpo, a principal estrutura do coco verde, foi avaliado em diferentes condições de pré-tratamento para a produção de hidrolisados, como a concentração da solução alcalina, a duração do pré-tratamento e a carga enzimática. O uso da alta de carga de sólidos em batelada simples e o ajuste do processo possibilitaram que 7-8% (m/v) de açúcares fossem obtidos, e resultaram em uma produção de etanol de 3,7% (v/v) utilizando uma cepa de levedura de etanol 2G. Também foi possível reduzir a carga de enzimas no processo sem afetar consideravelmente a produção de açúcares e etanol. Contudo, o uso da batelada simples na produção de hidrolisado do coco verde inteiro resultou em apenas 6,2% (m/v) de açúcares. Empregou-se então a batelada alimentada na produção de hidrolisados visando contornar algumas das limitações da batelada simples. A batelada alimentada resultou em hidrolisados do mesocarpo e do coco com mais açúcares, 9,7% (m/v) e 7,2% (m/v), respectivamente. O hidrolisado do mesocarpo produzido por batelada alimentada foi facilmente fermentado, e resultou em 4,3% (v/v) de etanol. A fermentação do hidrolisado do coco foi lenta em função da presença de inibidores de fermentação, e a produção de etanol foi de 3,8% (v/v). A remoção dos inibidores do coco resultaram numa fermentação mais rápida do hidrolisado de coco; entretanto o processo de

remoção dos inibidores resultou na perda de açúcares, e uma menor produção de etanol de 2,5% (v/v) foi observada. Os processos utilizados no presente trabalho para a produção de etanol a partir do coco são simples se comparados a outros processos propostos para esta biomassa, assim como resultaram em maiores produções de etanol. A produção de cerca de 4% (v/v) de etanol a partir do coco evidencia o potencial desta biomassa, podendo agregar valor à cadeia produtiva do coco.

Palavras-chave: coco, bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*, alta carga de sólidos, lignocelulose, pré-tratamento alcalino.

ABSTRACT

Cocos nucifera L., coconut, is a palm of high commercial importance with various applications in the food industry. The coconut products in Brazil are the shredded coconut, coconut milk, coconut water, and coconut oil. Additionally, the aseptic packaging of coconut water is considered a high potential product due the improved distribution and extended expiration date. Coconut water is obtained from the green coconut fruits, but the remaining biomass does not have a useful destination and is a waste problem in the in cities of the main producer countries. The green coconut is composed by cellulose, hemicellulose and lignin, and the cellulose and hemicellulose can be converted in fermentable sugars to produce bioethanol. Bioethanol is a renewable biofuel with potential to address the problems caused by the fossil fuels consumption. This study comprises the ethanol production from coconut hydrolysates submitted to an alkaline pretreatment, and fermented by different *Saccharomyces cerevisiae* strains. High-solid loadings of biomass in a simple batch or fed-batch processes were used to produce hydrolysates with high sugar level. The main coconut structure is the mesocarp, and this structure was investigated in different pretreatment conditions for the hydrolysate production, like the alkali concentration, pretreatment duration and enzyme load. High-solid load in a single batch produced 7-8% (w/v) sugars, which resulted in 3.7% (v/v) ethanol when fermented by a 2G yeast strain. The commercial enzyme load was also reduced with minor modifications in the sugar and ethanol yield. On the other hand, the production of hydrolysates using the whole green coconut fruit using single batch resulted in only 6.2% (w/v) sugars. The fed-bath aimed to contour some limitation of the single batch and produce hydrolysates with more sugars. The fed-batch resulted in hydrolysates from the mesocarp and coconut with more sugars, 9.7% (w/v) and 7.2% (w/v), respectively. Mesocarp hydrolysate from the fed-batch process was easily fermented and resulted in 4.3% (v/v) ethanol. Coconut hydrolysate showed a slow fermentation due the presence of fermentation inhibitors, and the ethanol titer was 3.8% (v/v). The removal of inhibitors resulted in a fast fermentation of the coconut hydrolysate, however the inhibitors removal step resulted in sugar loss, and a lower ethanol titer of 2.5% (v/v). The processes established in this study to produce ethanol from coconut are simple when compared to other processes proposed to this biomass, and also resulted in higher ethanol titer. The production in the range of 4% (v/v) ethanol from coconut

showed the potential of this biomass, which should benefit the coconut producer countries.

Keywords: coconut, bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, high-solid load, lignocellulose, alkali pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais países produtores de coco	25
Figura 2 - Coco verde e suas estruturas	29
Figura 3 - Principais países produtores de etanol	35
Figura 4 - Esquema da estrutura da parede celular da planta e corte transversal de microfibrilas.	38
Figura 5 - Características da celulose	40
Figura 6 - Características da hemicelulose	42
Figura 7 - Estrutura dos três monolignóis e seus resíduos	44
Figura 8 - Desenho esquemático de uma biorrefinaria.....	45
Figura 9 - Esquema de uma matriz lignocelulósica e possíveis modificações em decorrência dos pré-tratamentos.....	46
Figura 10 - Saponificação de um complexo entre carboidrato e lignina com pré-tratamento alcalino.	48
Figura 11 - Esquema do mecanismo de degradação enzimática da celulose.....	52
Figura 12 - Esquema de algumas estruturas de hemicelulose e enzimas que atuam na sua degradação.....	53
Figura 13 - Média de composição de biomassas lignocelulósicas e os monossacarídeos e inibidores resultantes de pré-tratamento e hidrólise.....	55
Figura 14 - Efeito de furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos em <i>S. cerevisiae</i>	56
Figura 15 - Esquemas de processos de etanol 2G	60
Figura 16 - Rotas metabólicas das hexoses glicose, manose e galactose	64

Figura 17 - Rotas metabólicas das pentoses xilose e arabinose.....	65
Figura 18 - Efeito da solução de NaOH na produção de hidrolisados do PMC	82
Figura 19 - Efeito da solução de NaOH na produção de hidrolisados do PMC	83
Figura 20 - Efeito do tempo de retenção na produção de hidrolisados do PMC	86
Figura 21 - Conversão de açúcares do PMC após diferentes pré-tratamentos e cargas de enzimas durante a sacarificação	88
Figura 22 - Conversão de açúcares do PMC após diferentes pré-tratamentos e cargas de enzimas durante a sacarificação	89
Figura 23 - Eficiência de diferentes pré-tratamentos e sacarificação do PMC	90
Figura 24 - Produção de glicose e manose em função do tempo durante a sacarificação do PMC utilizando diferentes cargas de enzimas.....	92
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura do PMC	94
Figura 26 – Perfil fermentativo e produção de etanol de diferentes cepas em HMC	96
Figura 27 - Perfil fermentativo da <i>S. cerevisiae</i> GSE16-T18 em HMC.....	98
Figura 28 - Efeito da solução de NaOH e o tempo de retenção na produção de hidrolisados do PCV em batelada simples	113
Figura 29 - Efeito da solução de NaOH e o tempo de retenção na formação de inibidores de hidrolisados do PCV em batelada simples	114
Figura 30 - Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na produção de hidrolisados do PCV em batelada alimentada.....	116
Figura 31 - Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na formação de inibidores de hidrolisados do PMC em batelada alimentada.....	116
Figura 32 - Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na produção de hidrolisados do PMC em batelada alimentada	119

Figura 33 - Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na formação de inibidores de hidrolisados do PMC em batelada alimentada.....	119
Figura 34 - Eficiência de diferentes cargas de sólidos após a sacarificação do coco verde e seu mesocarpo.....	121
Figura 35 - Curvas de sacarificação do coco e seu mesocarpo.....	123
Figura 36 - Curva de sacarificação de PMC com e sem extrativos.....	124
Figura 37 - Modificações estruturais no coco (PCV) e seu mesocarpo (PMC) pelo pré-tratamento e sacarificação.....	126
Figura 38 - Fermentação do HMC-2 e HCV-1 utilizando diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i>	128
Figura 39 - Inibidores na fração líquida nos hidrolisados HMC-2 e HCV-1.....	129
Figura 40 - Curva de fermentação da <i>S. cerevisiae</i> GSE16-T18 em diferentes hidrolisados do coco.....	132
Figura 41 - Inibidores na fração líquida nos hidrolisados HCV-2 e HCV-E.....	133
Figura 42 - Fluxograma do processo de pré-tratamento e sacarificação por batelada alimentada do PMC, PCV e PCE-E, e fermentação.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características agronômicas das variedades de coqueiro	26
Tabela 2 - Produção de coco, área plantada e produtividade do coqueiro dos principais estados brasileiros produtores em 2012	30
Tabela 3 - Efeito de diferentes pré-tratamentos na composição e estrutura de materiais lignocelulósicos.....	46
Tabela 4 - Resumo de algumas das principais vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	50
Tabela 5 - Características de microrganismos em relação a produção industrial de etanol	62
Tabela 6 - Diferentes condições de pré-tratamento e sacarificação utilizadas nos experimentos A, B, C, D e E.....	74
Tabela 7 - Etanol e açúcares residuais da fermentação utilizando <i>S. cerevisiae</i> GSE16-T18.	99
Tabela 8 - Etanol e açúcares residuais da fermentação de diferentes hidrolisados utilizando <i>S. cerevisiae</i> GSE16-T18.....	133
Tabela 9 - Perfil de ácidos graxos do HCV-2 e HCV-E	135
Tabela 10 - Resultados da produção de açúcares em hidrolisados produzidos utilizando diferentes tipos de biomassa do coco, regimes de batelada, e cargas de sólido, e máximo etanol obtido da fermentação dos hidrolisados utilizando <i>S. cerevisiae</i> GSE16-T18	136

LISTA DE SIGLAS

Alc-H₂O₂/NaOH - pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio seguido de pré-tratamento alcalino

AFEX - expansão da fibra em amônia (do inglês *Ammonia Fiber Expansion*)

ATP - trifosfato de adenosina

ca. - do latim *circa*, cerca

CB - atividade da celobiase (do inglês *Cellobiase activity*)

cm - centímetro

et al. - e outros (do latim *et alia*)

e.g. - por exemplo (do latim *exempli gratia*)

DNS - reagente composto de ácido 3,5-dinitrosalicílico

DO600 - densidade óptica em 600 nm

Etanol 1G - etanol de primeira geração produzido da sacarose ou amido

Etanol 2G - etanol de segunda geração produzido da lignocelulose

etc. - e outras coisas mais (do latim *et cetera*)

EtOH - etanol

FPU - unidade de papel de filtro (do inglês *Filter Paper Cellulase Units*)

h - hora

ha - hectare

HCV - hidrolisado do coco verde

HMC - hidrolisado do mesocarpo do coco verde

HMF - 5-hidroximetil-2-furaldeído

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência por troca de ligantes (do inglês *High-performance Ligand-exchange Liquid Chromatography*)

IELC - cromatografia por exclusão iônica (do inglês *Ion Exclusion Chromatography*)

kV - quilovolt

m - metro

MF - massa fresca

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

MPa - megapascal

MS - massa seca

m/m - massa por massa

m/v - massa por volume

n - tamanho amostral

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

n.d. - não detectado

n.f. - não fermentado

PCV - pó do coco verde

pH - potencial hidrogeniônico

PMC - pó do mesocarpo do coco verde

RP-HPLC - cromatografia líquida por fase reversa (do inglês *Reverse Phase Liquid Chromatography*)

rpm - rotações por minuto

ROS - espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

SHF - sacarificação e fermentação separadas (do inglês *Separated Hydrolysis and Fermentation*)

SSF - sacarificação simultânea à fermentação

SSSF - sacarificação semi-simultânea à fermentação

ST - sólidos totais

UV - ultravioleta

v/v - volume por volume

v/v/v - volume por volume por volume

°C - grau Celsius

µm - micrômetro

∅ - diâmetro

xg - força g

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Cocoicultura	24
1.2. Resíduos da cadeia produtiva do coco	30
1.3. Produção de hidrolisados lignocelulósicos e etanol a partir do coco	32
1.4. O etanol 1G e 2G	34
1.5. Biomassa lignocelulósica: celulose	38
1.6. Biomassa lignocelulósica: hemicelulose.....	40
1.7. Biomassa lignocelulósica: lignina.....	42
1.8. Pré-tratamentos para a produção de etanol 2G.....	44
1.9. Sacarificação da biomassa lignocelulósica pré-tratada	50
1.10. Inibidores da biomassa lignocelulósica.....	53
1.11. Pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica com alta carga de sólidos por batelada simples e alimentada	57
1.12. Estratégias de sacarificação e fermentação	59
1.13. Fermentação de hidrolisados lignocelulósicos.....	60
2. OBJETIVOS	66
2.1. Objetivo geral	66
2.2. Objetivos específicos	66
3. PRODUÇÃO DE HIDROLISADO LIGNOCELULÓSICO DO MESOCARPO DE COCO VERDE POR BATELADA SIMPLES COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS.....	68

3.1. Introdução	68
3.2. Materiais e métodos	69
3.2.1. Extração do mesocarpo do coco verde e determinação de extrativos em água	69
3.2.2. Atividade enzimática	70
3.2.3. Experimentos de pré-tratamento e sacarificação	72
3.2.4. Cepas e produção de inóculo	74
3.2.5. Fermentação dos hidrolisados do mesocarpo do coco verde (HMC) utilizando cepas de etanol 1G e 2G	75
3.2.6. Análise de açúcares, inibidores e produtos de fermentação	76
3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura	78
3.2.8. Delineamento experimental	78
3.3. Resultados e discussão	79
3.3.1. Experimento A: efeito da solução de NaOH na produção de hidrolisados	80
3.3.2. Experimento B: efeito da duração do pré-tratamento na produção do hidrolisado	84
3.3.3. Experimentos C e D: efeitos de diferentes condições de pré-tratamento e sacarificação na produção de hidrolisados	87
3.3.4. Curvas de sacarificação da produção de hidrolisados utilizando diferentes cargas enzimáticas	91
3.3.5. Efeitos de pré-tratamento e sacarificação na morfologia do pó do mesocarpo de coco	92
3.3.6. Fermentação dos HMC por cepas de levedura de etanol 1G e 2G	95

3.4. Conclusões	99
4. PRODUÇÃO DE HIDROLISADO LIGNOCELULÓSICO DO COCO VERDE E SEU MESOCARPO UTILIZANDO BATELADA ALIMENTADA COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS	100
4.1. Introdução	100
4.2. Materiais e métodos	101
4.2.1. Processamento do coco verde e extração do seu mesocarpo	101
4.2.2. Extrativos em etanol do coco inteiro	102
4.2.3. Atividade enzimática	102
4.2.4. Experimento de pré-tratamento e sacarificação do PCV utilizando batelada simples	103
4.2.5. Experimentos de pré-tratamento e sacarificação do PCV, PCV-E e o PMC utilizando batelada alimentada	104
4.2.6. Cepas e produção de inóculo	105
4.2.7. Fermentação dos HMC-2, HCV-1, HCV-2 e HCV-E utilizando cepas de etanol 1G e 2G	106
4.2.8. Análise de açúcares, inibidores e produtos de fermentação	106
4.2.9. Extração e determinação de ácidos graxos	107
4.2.10. Microscopia eletrônica de varredura	108
4.2.11. Delineamento experimental	108
4.3. Resultados e discussão	109
4.3.1. Efeito da solução de NaOH e tempo de retenção na produção de hidrolisados do PCV utilizando batelada simples	110

4.3.2. Efeito da solução de NaOH e carga de sólidos na produção do PCV e PMC utilizando batelada alimentada	114
4.3.3. Eficiência dos processos por bateladas simples e alimentada	120
4.3.4. Curvas de sacarificação do PMC, PCV e PCV-E.....	122
4.3.5. Efeitos de pré-tratamento e sacarificação na morfologia do PCV e PMC	124
4.3.6. Fermentação dos HMC-2, HCV-1, HCV-2 e HCV-E utilizando cepas de etanol 1G e 2G	127
4.3.7. Perfil de ácidos graxos nos hidrolisados HCV-2 e HCV-E.....	134
4.4. Conclusões	135
4.5. Fluxograma do processo final	137
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
6. APÊNDICE	157
6.1. Apêndice A: produção de hidrolisado do PMC utilizando 18% (m/v) de ST destoxificados por lavagem	157
6.2. Apêndice B: produção de hidrolisado do PMC utilizando 10% (m/v) de ST destoxificados por lavagem	158
6.3. Apêndice C: produção de hidrolisado do PMC utilizando 20% (m/v) de ST.....	159
6.4. Apêndice D: produção de hidrolisado do PCV utilizando diferentes soluções de NaOH.....	160
6.5. Apêndice E: produção de PCV verde utilizando batelada alimentada com etapa de destoxificação.....	161
6.6. Apêndice F: fermentação do HCV-1 utilizando cepa de etanol 2G	162

1. INTRODUÇÃO

Existem cerca de 1,2 bilhão de veículos automotores no mundo, uma média de 174 veículos para cada 1.000 habitantes, e mais de 80 milhões de veículos são produzidos anualmente (OICA, 2015). Contudo, alterações climáticas, diminuição dos recursos petrolíferos, conflitos geográficos, alto custo de importações e dependência de combustíveis fósseis são alguns dos problemas associados à manutenção da frota global de veículos. O uso de biocombustíveis líquidos (e.g. bioetanol, biodiesel e biobutanol) é uma das alternativas mais promissoras para atenuar tais problemas, e o histórico brasileiro de produção e consumo de etanol é um bom exemplo disso (GOLDEMBERG, 2007).

O etanol é produzido em larga escala e com preço competitivo a partir da cana-de-açúcar (Brasil), milho (Estados Unidos), beterraba e trigo (França), sendo denominado etanol de primeira geração (etanol 1G). Adicionalmente, o uso da lignocelulose como matéria-prima para produção de etanol está se tornando técnica e economicamente viável após décadas de intensa pesquisa e desenvolvimento (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Os progressos na produção do etanol de segunda geração (etanol 2G) culminaram com a inauguração das primeiras plantas comerciais na década de 2010 (BRETHAUER; STUDER, 2015). Tais eventos foram um marco no setor de biocombustíveis e as plantas industriais encontram-se em diferentes continentes (BRETHAUER; STUDER, 2015). As matérias-primas utilizadas são resíduos da agricultura como o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de trigo. Adicionalmente, as opções de biomassa lignocelulósica são diversas em relação às reservas de combustíveis fósseis (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008), e possibilitam que o etanol 2G seja produzido em diversos países.

O coco é considerado uma biomassa lignocelulósica potencial para a produção de etanol (GONÇALVES et al., 2014, 2015). A produção global de coco é de

aproximadamente 55 milhões de toneladas ao ano (FAOSTAT, 2015). O coqueiro está presente em regiões tropicais e tem como principais produtores a Indonésia, Filipinas, Índia e Brasil (FAOSTAT, 2015). O cenário para a produção de etanol a partir do coco é interessante, uma vez que estes países já consomem este biocombustível (EIA, 2015).

O coco é consumido de diversas formas nos diferentes países (SPC, 1983). Entretanto, várias partes do fruto não são comestíveis e representam cerca de metade do peso do fruto, que geralmente pesa mais de 1 kg em massa fresca (MF) (PASSOS; CARDOSO; ARAGÃO, 2009). Os grandes volumes de resíduos de coco são um problema nas cidades produtoras (ESMERALDO et al., 2010).

O fruto do coqueiro é composto de celulose, hemicelulose e lignina (GONÇALVES et al., 2014, 2015). Diversos pré-tratamentos podem ser utilizados para modificar a biomassa do coco para a obtenção de maiores rendimentos em açúcares fermentescíveis (ALBUQUERQUE, 2013; BUJANG et al., 2013; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011). Adicionalmente, diferentes formas de alimentação dos reatores, como uso da alta carga de sólidos ou o regime de batelada (simples ou alimentada) podem ser empregados para a obtenção de hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis, além de reduzir os gastos com energia e água, e assegurar um alto rendimento em etanol (MODENBACH; NOKES, 2012, 2013). O regime de batelada simples consiste em uma única adição de biomassa durante as etapas de pré-tratamento e sacarificação, ao passo que na batelada alimentada a adição da biomassa no reator é realizada de forma gradual.

Um pré-tratamento adequado da biomassa lignocelulósica deve apresentar boa relação custo/benefício, solubilizar açúcares, melhorar a sacarificação, evitar a degradação de açúcares, e a formação de inibidores das enzimas celulolíticas e dos microrganismos utilizados na fermentação (KUMAR et al., 2009). Dentre os diversos métodos reportados na literatura, o pré-tratamento alcalino destaca-se por operar em baixas temperaturas e pressões, resultar em menor degradação de açúcares, assim como remover substâncias amorfas (e.g. lignina e hemicelulose) (KUMAR et al., 2009). Adicionalmente, o pré-tratamento alcalino não necessariamente precisa de uma etapa de purificação da lama pré-tratada antes da sacarificação ou fermentação

para a remoção de inibidores, o que evita a perda de açúcares no processo (MODENBACH; NOKES, 2012).

Neste estudo, parâmetros diversos para produção de hidrolisados lignocelulósicos, tais como concentração de solução alcalina, tempo de retenção, dosagem de enzimas, carga de sólidos, tipos de batelada (simples e alimentada) foram avaliados para a produção de hidrolisados do coco verde. Este estudo reporta a produção de hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis, sendo produzidos por métodos simples. Os hidrolisados lignocelulósicos foram fermentados por leveduras industriais de processos de etanol 1G e 2G, para a avaliação da fermentabilidade dos mesmos.

1.2. A cocoicultura

O coqueiro possui ampla distribuição em regiões tropicais e grande importância para o homem (JOHNSON, 1998). O uso do coqueiro ou seus derivados é bastante remoto, e foi introduzido no Brasil em 1553 pelos portugueses (SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002). Entretanto, as primeiras plantações comerciais no mundo ocorreram somente ca. 1840 em função do aumento da demanda por óleo decorrente do desenvolvimento do primeiro processo industrial de fabricação de sabão (HARRIES, 1978).

A grande expansão da cocoicultura ocorreu nas primeiras décadas do século XX (HARRIES, 1978). A produção de coco no Brasil também cresceu consideravelmente, indo de 139 milhões de frutos em 1942 para 1,3 bilhão de frutos em 2001 (GUTIÉRREZ-CUENCA; COSTA, 2001). O cultivo de coco teve início na

Bahia e se estendeu por grande parte dos estados brasileiros, totalizando 280 mil ha cultivados (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

O coco possui diversas aplicações, mundialmente a copra (polpa com 6% de umidade) é comercializada para a produção de óleo e coco seco, enquanto que no Brasil a agroindústria produz principalmente coco ralado, leite e água de coco (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). Os maiores produtores em 2013 foram a Indonésia, Filipinas, Índia, Brasil e Sri Lanka (Figura 1) (FAOSTAT, 2015). A cocoicultura é realizada principalmente por pequenos agricultores em todo o mundo, cerca de 70% da exploração do coqueiro no Brasil é realizada em propriedades com até 10 ha (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). A modernização das técnicas de cultivo e o uso de diferentes variedades de coco tem possibilitado um aumento expressivo da produtividade sem aumento da área plantada (FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002).

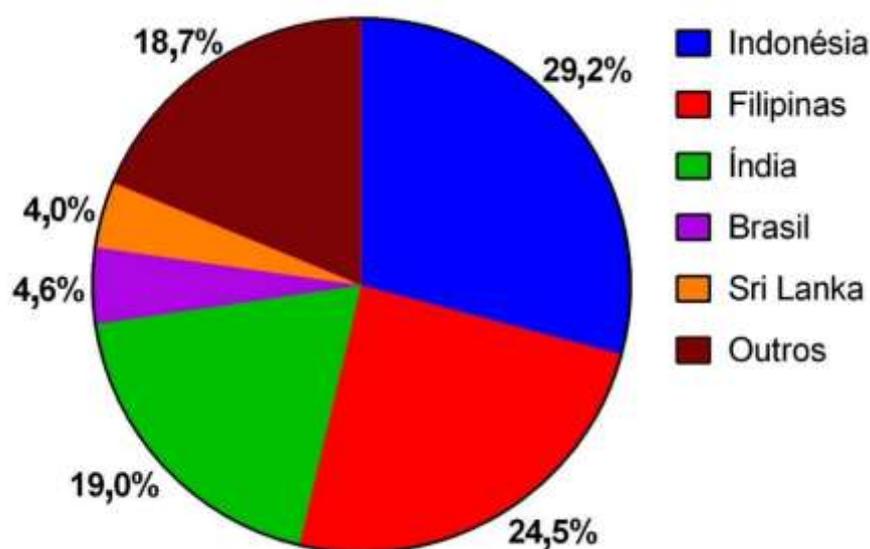


Figura 1: Principais países produtores de coco. Fonte: FAOSTAT, 2015.

A espécie *C. nucifera* é a única no gênero *Cocos*, pertencente à família *Arecaceae* (LIANG et al., 2014). Duas variedades da espécie *C. nucifera* são amplamente cultivadas no Brasil, *C. nucifera* var. *typica* e *C. nucifera* var. *nana*, respectivamente conhecidas como variedades gigante e anã (BENASSI; FANTON; SANTANA, 2013). O coco seco é comumente obtido da variedade gigante sendo esta a primeira variedade introduzida no Brasil, ao passo que a variedade anã é utilizada principalmente para produção da água de coco; também existem híbridos obtidos do

cruzamento das duas variedades que podem ser utilizados para ambas as aplicações (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). As principais características das diferentes variedades de coco estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Principais características agronômicas das variedades de coqueiro.

Características	Variedade		
	Anão	Híbrido	Gigante
Altura da planta (m)	10	20	30
Crescimento	Lento	Intermediário	Rápido
Tamanho do fruto	Pequeno	Intermediário	Grande
Formato do fruto	Arredondado	Intermediário	Quinado
Vida útil da planta (anos)	30 a 40	50 a 60	60 a 80
Início do florescimento (anos)	2 a 3	3 a 4	5 a 7
Rendimento (frutos/planta/ano)	120 a 180	120 a 150	60 a 80
Água de coco por fruto (mL)	300 a 400	400 a 500	500 a 600
Exigência de clima e solo	Muito exigente	Exigente	Rústico
Produção de copra	Baixa	Média/alta	Alta
Utilização	Água de coco	Agroindústria, culinária e água de coco	Agroindústria e culinária

Fonte: Benassi et al., 2013.

O coco é uma drupa fibrosa, de grande tamanho, formato variável, que pode ser arredondado, oblongo ou ovoide (BENASSI; FANTON; SANTANA, 2013). As estruturas do coco maduro aberto, observadas de fora para dentro, de acordo com Benassi et al. (2013) são:

- Epicarpo: película fina, lisa, com diferentes colorações, que envolve externamente o fruto;
- Mesocarpo: camada espessa e fibrosa;
- Endocarpo: camada dura, de coloração escura;
- Tegumento: camada final de coloração marrom, localizada entre o endocarpo e o albúmen sólido;

- Albúmen sólido: polpa do fruto, camada branca e muito oleosa;
- Albúmen líquido: água de coco;
- Embrião: estrutura localizada próxima a um dos três orifícios.

A colheita do coco para a produção de água ocorre entre os 5 e 7 meses após a floração, período de maior rendimento da água e açúcares como frutose e glicose; neste período também se inicia a formação do albúmen sólido (FONTES; FERREIRA, 2006; FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002; MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). Algumas das estruturas do coco verde podem ser observadas na Figura 2. O albúmen sólido encontra-se completamente desenvolvido por volta de 11 e 12 meses após a floração, quando é colhido para a produção de coco seco (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

A copra utilizada para extração do óleo de coco não é explorada comercialmente no Brasil, diferentemente de todos os outros países produtores que utilizam o coco como fonte oleaginosa (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). No nordeste brasileiro concentra-se a maior parte da produção de coco seco do país, sendo a cultura predominantemente extensiva ou extrativista (FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002). Entretanto, a expansão da cococultura em diferentes estados brasileiros ocorreu em decorrência do maior consumo de água de coco no país, com destaque para o Espírito Santo que expandiu a área plantada de 1,3 mil ha para 10,9 mil ha entre 1990 e 2012 (FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002; MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). Os principais estados produtores de coco no Brasil estão listados na tabela 2.

O Espírito Santo teve 10,9 mil ha dedicados à cococultura em 2012, e um rendimento médio de 15,87 mil frutos/ha (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). Entre 2001 e 2010 a produtividade brasileira passou de 5.123 frutos/ha para 6.810 frutos/ha em função do emprego de variedades melhoradas, ajustes no cultivo como espaçamento, tratos culturais e manejo fitossanitário (BENASSI; FANTON; SANTANA, 2013).

A expansão da produção de coco verde no Brasil se deve à mudança de hábitos alimentares, assim como a oferta da água de coco esterilizada e envasada que possui uma validade de meses, enquanto que a qualidade da água no fruto decai em

cerca de 10 dias (ARAGÃO; ISBERNER; CRUZ, 2001). A água de coco é considerada uma solução isotônica natural, levemente ácida, estéril e de baixo valor calórico (BENASSI; FANTON; SANTANA, 2013).

O aumento do consumo de água de coco no Brasil apresentou crescimento considerável nos últimos anos, indo de 22 milhões de litros em 2004 para 116,4 milhões de litros em 2012 (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014). A água de coco compreendeu 4% do segmento brasileiro de bebidas e frutas prontas para beber em 2013 (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

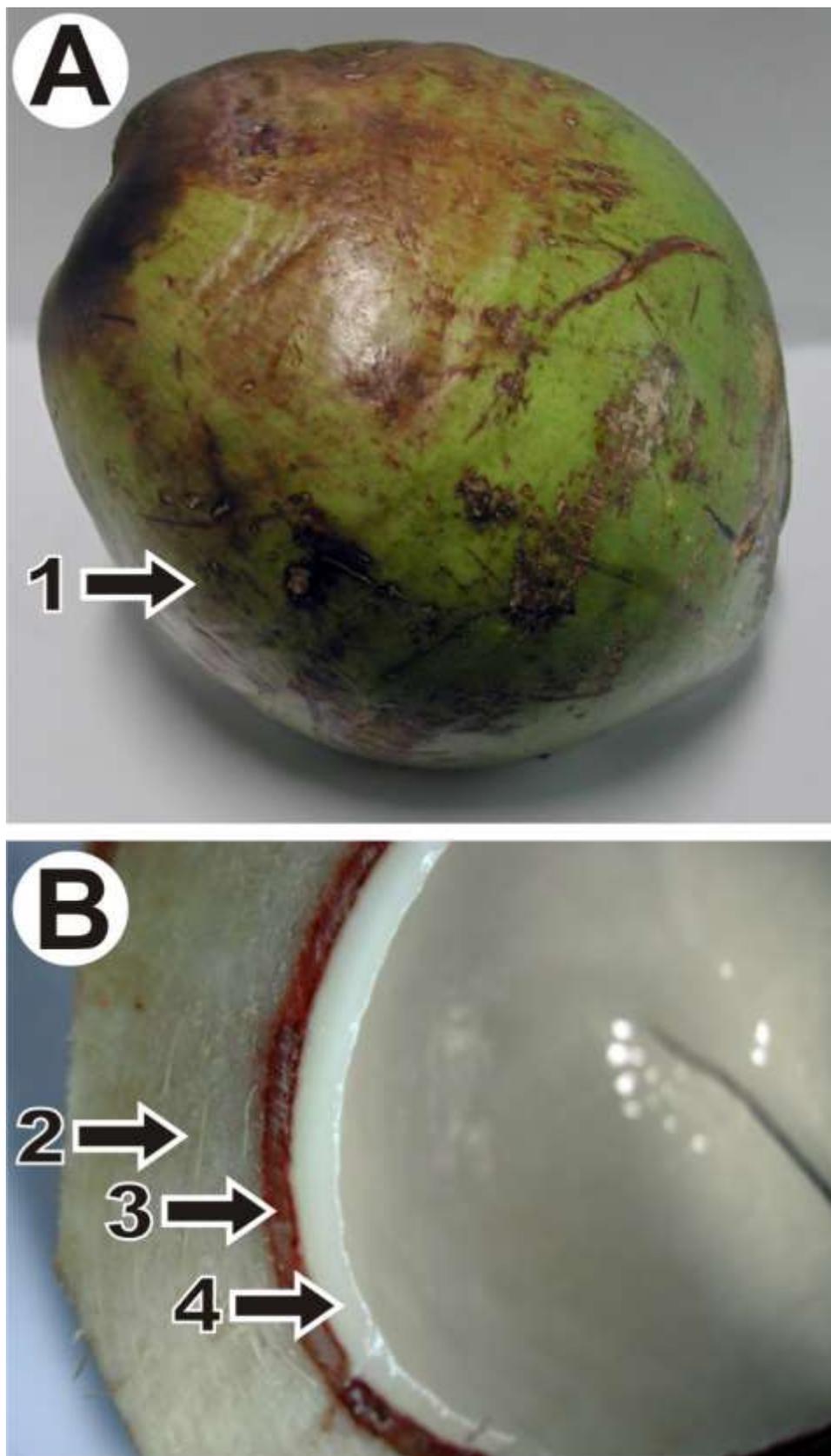


Figura 2: Coco verde e suas estruturas. A – coco verde, B – coco verde sem epicarpo e albúmen líquido. Legenda: 1 – epicarpo, 2 – mesocarpo, 3 – endocarpo, 4 – albúmen sólido.

Tabela 2: Produção de coco, área plantada e produtividade do coqueiro dos principais estados brasileiros produtores em 2012.

Estado	Produção (mil frutos)	Área plantada (ha)	Produtividade (mil frutos/ha)
Bahia	553.759	75.827	7,30
Ceará	272.060	45.202	6,01
Sergipe	242.852	39.486	6,15
Pará	231.400	23.584	9,81
Espírito Santo	173.716	10.941	15,87
Pernambuco	106.625	8.264	12,90
Rio de Janeiro	70.013	4.546	15,40
Rio Grande do Norte	62.293	20.384	3,05
Paraíba	57.456	9.817	5,85
Alagoas	29.287	6.218	4,71

Fonte: MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014.

1.2. Resíduos da cadeia produtiva do coco

A produção de água de coco, coco seco ou derivados também resulta na geração de coprodutos ou resíduos agroindustriais. O coco é um fruto de massa considerável, as variedades gigante e híbrida passam de 1 kg (MF) (PASSOS; CARDOSO; ARAGÃO, 2009). A água de coco representa cerca de 1/3 do peso do fruto nas

variedades anã e híbrida (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014), e o restante do fruto não possui aplicação na alimentação.

A produção da copra do coco maduro resulta em resíduos, a casca é deixada no campo ou utilizada como fertilizante em função da grande quantidade de potássio (VAN DAM, 2002). As fibras do coco, extraídas do mesocarpo do fruto, podem ser utilizadas para fabricação de escovas, vassouras, cordas e fios para redes, bolsas, esteiras, e enchimento de colchões. Entretanto, apenas uma pequena quantidade de fibras é utilizada para este fim e o rendimento da produção de fibras é baixo (80-90 g por fruto) (VAN DAM, 2002). Além do baixo rendimento, a produção de fibras também está associada com a poluição de regiões costeiras da Índia, devido à grande quantidade de compostos fenólicos que é liberada pelo (DIVYA; PRASANTH; SADASIVAN, 2014). Uma patente foi publicada sobre o uso da casca de coco verde para a produção de carboximetilcelulose para a produção de aglomerantes na indústria de pelotização (STEGMILLER et al., 2013).

Além da produção da fibra de coco, diversas outras aplicações são propostas como a substituição da areia por pó da casca de coco na fabricação de cimento (BRASILEIRO; VIEIRA; BARRETO, 2013). O pó do mesocarpo do coco (do inglês *pith*), obtido da produção da fibra de coco, corresponde a aproximadamente 70% (m/m) do mesocarpo do coco, e também pode ser utilizado como substrato agrícola (VAN DAM et al., 2004). Na farmacologia, o uso de extratos do coco ou do coqueiro foram efetivos no combate à inflamações, bactérias, parasitas e convulsões (LIMA et al., 2015; SILVA et al., 2013). Entretanto, os mecanismos de ação e o isolamento de compostos potenciais ainda carecem de elucidações (LIMA et al., 2015; SILVA et al., 2013). A casca do coco também pode ser utilizada na adsorção de metais pesados (RAULINO et al., 2014). O endocarpo do coco maduro, por sua vez, é utilizado na produção de carvão nos países asiáticos (VAN DAM et al., 2004).

O coco durante seu processo de maturação passa por modificações estruturais, como o aumento da quantidade de lignina e polissacarídeos no mesocarpo (VAN DAM et al., 2004). O acúmulo de ácidos fenólicos no mesocarpo também ocorre durante o desenvolvimento do coco (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005). O mesocarpo do coco é composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (ESMERALDO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2014; RENCORET et al., 2013;

VAN DAM et al., 2004). O alto teor de lignina do coco, cerca de 1/3 do mesocarpo, inviabiliza o seu uso nas indústrias de papel e celulose (VAN DAM et al., 2004). Entretanto, as quantidades de celulose por volta de 30% (m/m), e hemicelulose entre 12-26% (m/m) (GONÇALVES et al., 2014; VAN DAM et al., 2006), são interessantes para a produção de etanol (GONÇALVES et al., 2014).

Uma possível vantagem da produção de etanol a partir do coco consiste na possibilidade de se utilizar uma grande fração da sua biomassa (celulose e hemicelulose), se comparado, por exemplo, à extração de fibras apenas do mesocarpo ou a produção de carvão do endocarpo. Considerando o peso médio do coco híbrido de 1,2 kg (MF), e a quantidade média de água de coco de 475 mL (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014), espera-se uma produção de resíduos do coco de 0,725 kg por fruto. Logo, estima-se uma produção de resíduos de coco de aproximadamente 125,9 mil toneladas (MF) no Espírito Santo, uma vez que o estado possui uma produção anual de 173,7 milhões de frutos (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2014).

1.3. Produção de hidrolisados lignocelulósicos e etanol a partir do coco

O uso do coco para produção de hidrolisados lignocelulósicos ocorreu na década de 2010 (ALBUQUERQUE et al., 2016; BUJANG et al., 2013; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011). Os diferentes estágios de maturação do fruto, assim como as suas diversas aplicações, refletem as variações do uso do coco para a produção de etanol 2G. Já foram reportados estudos utilizando a borra resultante da produção de leite de coco (BUJANG et al., 2013), a casca do coco (DING; HII; ONG, 2012), as cascas do coco

verde e madura, e as fibras do coco maduro (ALBUQUERQUE et al., 2016; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011).

O uso da borra da produção de leite de coco resultou em baixo teor de glicose, 0,38 g/L, em função do uso de uma baixa carga de sólidos (1/50, m/v); assim como não foram utilizadas enzimas celulolíticas, as hidrólises foram realizadas com ácido sulfúrico ou metanol (BUJANG et al., 2013). O uso de pré-tratamentos térmico, alcalino, alcalino assistido por micro-ondas e ácido combinados com o uso de enzimas celulolíticas resultaram em hidrolisados da casca de coco com mais açúcares redutores (máximo de 2,79 g/L), mesmo utilizando uma baixa carga de sólidos (1/50, m/v) (DING; HUI; ONG, 2012). O pré-tratamento alcalino com NaOH e altas temperaturas também foi utilizado na casca de coco verde em outros trabalhos, e resultou em concentrações de glicose entre 0,6 e 2,3% (m/v) (ALBUQUERQUE et al., 2016; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011).

O uso da alta pressão hidrostática (300 MPa) na sacarificação da casca do coco verde utilizando enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* resultou em uma maior taxa de hidrólise em relação à sacarificação em pressão ambiente (0,1 MPa) (ALBUQUERQUE et al., 2016). A realização da sacarificação sem agitação em condição de alta pressão hidrostática (300 MPa) mostrou-se uma alternativa à sacarificação com agitação em pressão ambiente (0,1 MPa), a alta pressão hidrostática aumentou principalmente a atividade da β -glicosidase (ALBUQUERQUE, 2013). Ainda a respeito da produção de hidrolisados da casca do coco verde, observou-se que enzimas produzidas pelo fungo *Penicillium variable* isolado da casca do coco apresentaram uma maior taxa de sacarificação em comparação com enzimas comerciais (Celluclast 1.5L e Novozyme 188) comercializadas pela empresa Novozymes S.A. (Dinamarca) (ALBUQUERQUE et al., 2016).

A fermentação de hidrolisados do coco também foi investigada, sendo utilizadas cepas de *S. cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* e *Zymomonas mobilis*, que resultaram em uma produção de etanol entre 8,3-10,2 g/L (GONÇALVES et al., 2014). Neste estudo foram utilizadas as cascas dos cocos verde e maduro, e fibras do coco maduro que foram submetidas a um pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio seguido de um pré-tratamento alcalino (Alc-H₂O₂/NaOH), e a

fermentação ocorreu em regimes de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) ou sacarificação semi-simultânea à fermentação (SSSF) (GONÇALVES et al., 2014). O efeito do pré-tratamento hidrotérmico também foi investigado nas cascas de cocos verdes e maduros, e fibras do coco maduro, a quantidade de etanol produzido por *S. cerevisiae*, *S. stipitis* e *Z. mobilis* ficou entre 7,3-8,8 g/L em regimes de SSF e SSSF (GONÇALVES et al., 2015). A fermentação de hidrolisado do coco verde obtido em pré-tratamento alcalino por *S. cerevisiae* resultou em 2,3% (m/v) de etanol (VAITHANOMSAT et al., 2011). Estes resultados sugerem que o coco é uma potencial biomassa para a produção de etanol, entretanto um processo simples e robusto faz-se necessário para a adequação à realidade industrial de forma a agregar valor e reduzir a geração de resíduos da cocoicultura.

1.4. O etanol 1G e 2G

As crises do petróleo foram determinantes para adoções de políticas para o uso do etanol no Brasil (GOLDEMBERG, 2007) e nos Estados Unidos (SOLOMON; BARNES; HALVORSEN, 2007). Além das flutuações do preço e oferta no mercado externo, os combustíveis fósseis não são renováveis e a sua combustão é associada à problemas ambientais, como as mudanças climáticas (GOLDEMBERG, 2007). As fontes de açúcares fermentescíveis utilizadas na produção de álcool são a cana-de-açúcar no Brasil e o milho nos Estados Unidos (SOLOMON; BARNES; HALVORSEN, 2007). O milho também é utilizado no Canadá e China, assim como a cana-de-açúcar é utilizada na Índia para a produção de etanol (MUSSATTO et al., 2010). A produção de etanol nos Estados Unidos e no Brasil foram respectivamente 54,1 e 23,4 bilhões de litros, e juntos os dois países corresponderam a mais de 80% da produção mundial em 2014 (RFA, 2014) (Figura 3).

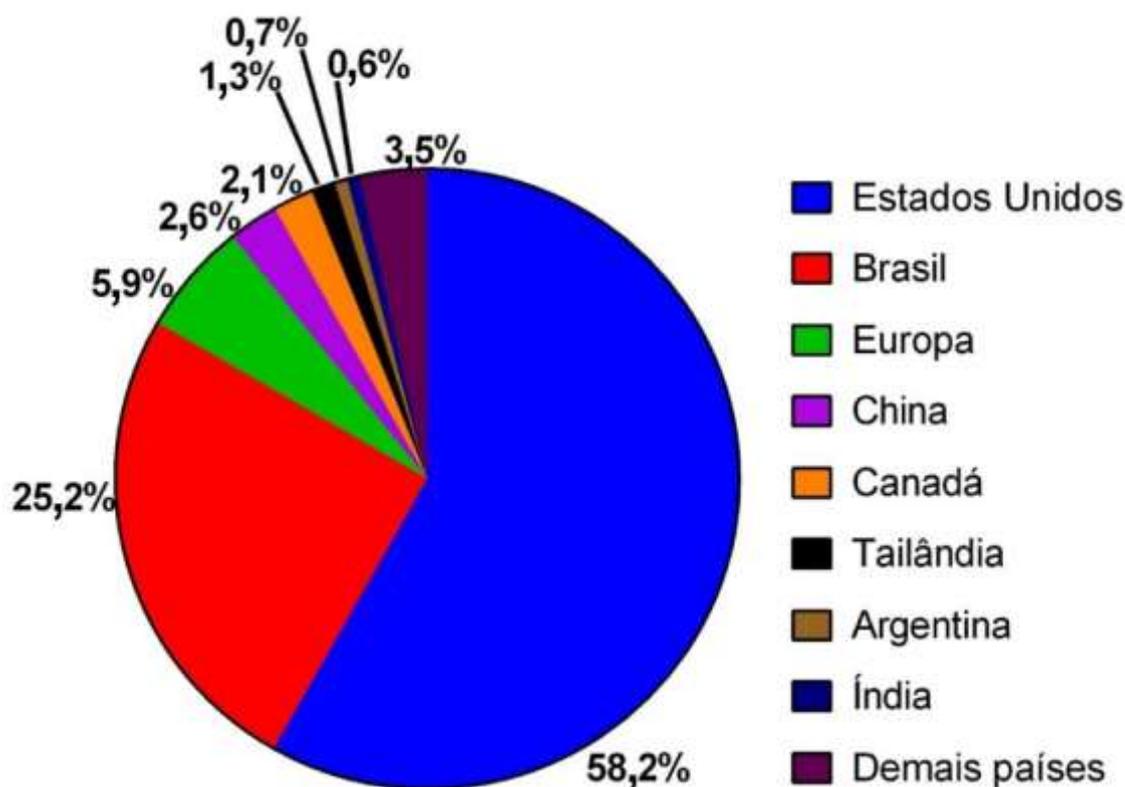


Figura 3: Principais países produtores de etanol. Fonte: RFA, 2014.

Em adição, é virtualmente impossível substituir toda a demanda de combustível por etanol de milho nos Estados Unidos, enquanto que o Brasil teria que ampliar o cultivo de cana-de-açúcar de 1% para 10% das terras agricultáveis (GOLDEMBERG, 2007; OLIVEIRA; VAUGHAN; RYKIEL JÚNIOR, 2005). A substituição, ainda que parcial dos combustíveis fósseis, demanda de uma maior diversificação no uso de matérias-primas, assim como o desenvolvimento e aprimoramento de processos e tecnologias. Além da cana-de-açúcar e o milho, outras matérias-primas são utilizadas na produção de etanol 1G, sendo elas: beterraba sacarina (Europa), sorgo (Índia), trigo (China, Canadá, Europa) e mandioca (Tailândia) (MUSSATTO et al., 2010). Paralelamente ao uso de açúcares de reserva de plantas na produção de etanol, existe também a possibilidade do uso de açúcares estruturais da lignocelulose para a produção de etanol.

As primeiras descrições de enzimas capazes de degradar a celulose em unidades menores ocorreram no início da década de 1950 (VIKARI; VEHMAANPERÄ; KOIVULA, 2012). Quando ocorreu a crise do petróleo em 1973, as pesquisas sobre o uso da lignocelulose como fonte de açúcares fermentescíveis ainda eram

relativamente recentes, e o alto custo de produção das enzimas tornava a tecnologia inviável (VIAKARI; VEHEMAANPERÄ; KOIVULA, 2012).

Após décadas de intensa pesquisa, a criação de grupos científicos, e investimentos públicos e privados, a tecnologia de etanol 2G entrou em fase de aplicação industrial. O custo das enzimas celulolíticas foi reduzido em cerca de 30 vezes ao longo dos anos (SOLOMON; BARNES; HALVORSEN, 2007). Além disso, a biomassa lignocelulósica possui ampla distribuição geográfica se comparada aos combustíveis fósseis, garantindo maior segurança e reduzindo a dependência entre países (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Estima-se que cerca de 5 bilhões de toneladas em massa seca de resíduos agrários são produzidos anualmente, sendo este um ponto favorável do etanol 2G, por não demandar a expansão de terras agricultáveis ou competir com a produção de alimentos (CLARK; LUQUE; MATHARU, 2012). Unidades comerciais de etanol 2G já estão em operação na Itália, onde as matérias-primas utilizadas são a cana-do-reino, e as palhas de trigo e arroz. A usina de etanol 2G brasileira no estado do Alagoas emprega o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, e nos Estados Unidos a forragem (folha e caule) do milho é utilizada (BRETHAUER; STUDER, 2015).

Ainda que diversas biomassas sejam utilizadas para produção de etanol 1G e 2G, os princípios básicos são os mesmos, iniciando-se pela obtenção de uma solução com açúcares, que é fermentada, e o etanol produzido é separado por destilação (MUSSATTO et al., 2010). Entretanto, a obtenção dos açúcares fermentescíveis é diversa e dependente do tipo de biomassa (CANILHA et al., 2012; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

O processo de extração de açúcares da cana-de-açúcar é relativamente simples, a biomassa passa por uma etapa de moagem, e os açúcares são prontamente fermentados (MUSSATTO et al., 2010). A tecnologia para produção de etanol de biomassas ricas em amido é um pouco mais complexa, e demanda de uma etapa de liquefação a altas temperaturas (90-110 °C), e o uso das enzimas α -amilase e amiloglicosidase para a conversão do amido em glicose (MUSSATTO et al., 2010; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A extração de açúcares da lignocelulose por outro lado apresenta maior complexidade em função da variedade de fontes de biomassa e processos (HU; RAGAUSKAS, 2012; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A

lignocelulose é um complexo material fibroso que compõe as paredes celulares de plantas (SERRANO-RUIZ; WEST; DUMESIC, 2010). As paredes celulares vegetais são difíceis de degradar, porque desempenham funções como suporte da estrutura vegetal e protegem a planta de ameaças ambientais, tais como o vento ou herbivoria (YOON; ZHAO; SHANKS, 2013).

A biomassa lignocelulósica pode ser agrupada em 6 grupos de acordo com a origem da biomassa: resíduos de agricultura (e.g. bagasso da cana-de-açúcar e palha de trigo), coníferas (e.g. abeto e araucária), folhosas (e.g. sucupira e ipê), resíduos de papel e celulose (e.g. jornais e papel de escritório), herbáceas (e.g. feno de alfafa e grama) e resíduos sólidos urbanos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Apesar das diferentes origens, as plantas terrestres são compostas de celulose, hemicelulose e lignina (HU; RAGAUSKAS, 2012). Células vegetais possuem uma espessa parede celular (0,1-10 μm) que confere rigidez a célula e previne ataque por patógenos (CHUNDAWAT et al., 2011). Geralmente as fibrilas de celulose são envoltas pela hemicelulose, e os espaços são preenchidos por lignina (Figura 4) (LEE; HAMID; ZAIN, 2014). Celulose (20-50% MS), hemicelulose (15-35% MS) e lignina (10-30% MS) são os principais constituintes de células vegetais, ao passo que proteínas (3-10% MS), lipídeos (1-5% MS), açúcares solúveis (1-10% MS) e minerais (5-10% MS) são os menores constituintes (CHUNDAWAT et al., 2011). Os processos de etanol 2G baseiam-se na extração de açúcares de dois componentes principais da biomassa, as celulose e hemicelulose, também denominada holocelulose (KUMAR et al., 2009). Por outro lado, o outro componente principal das células vegetais, a lignina pode dificultar a conversão dos açúcares da holocelulose (ALVIRA et al., 2010).

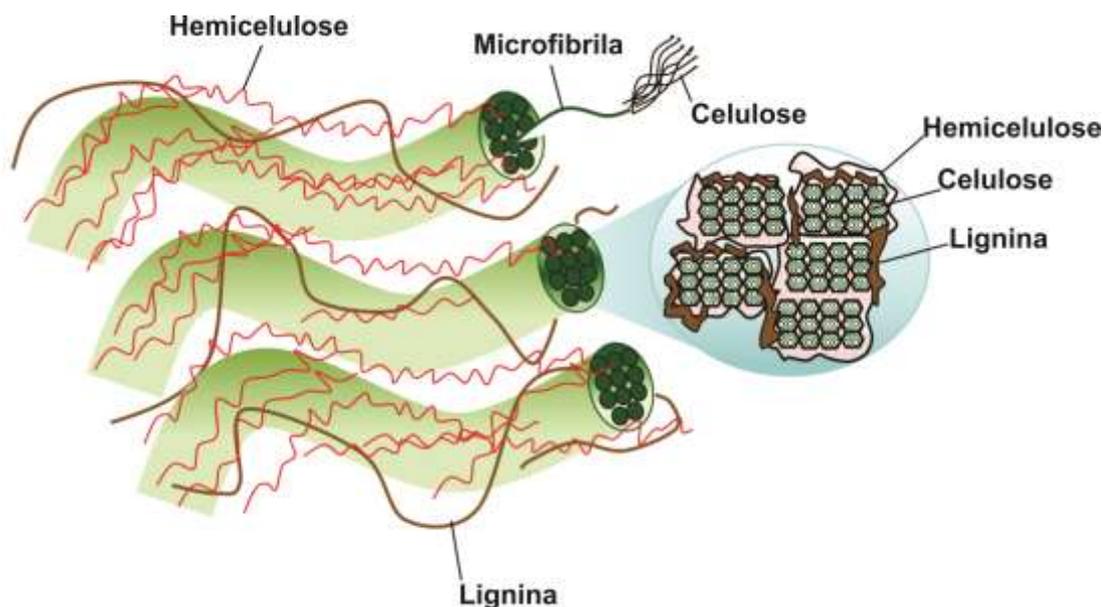


Figura 4: Esquema da estrutura da parede celular da planta e corte transversal de microfibrilas. Cadeias de moléculas de celulose embebidas numa matriz de hemicelulose e lignina. Fonte: adaptado de Lee et al., 2014.

1.5. Biomassa lignocelulósica: celulose

Considerada o biopolímero mais abundante da Terra, a celulose está presente em bactérias, fungos, algas e plantas (MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015). A celulose desempenha papel fundamental na organização da parede celular, além de atuar no hábito de crescimento da planta (SOMERVILLE, 2006). Sendo composta unicamente por glicose apresentando ligações β -(1 \rightarrow 4)-glicosídicas, a celulose possui o carbono anomérico C1 na configuração β , e cada unidade de glicose é rotacionada em aproximadamente 180° em relação à molécula vizinha, formando o dissacarídeo celobiose (Figura 5A) (CHUNDAWAT et al., 2011; MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015).

As unidades glicose da celulose são agregadas firmemente em microfibrilas (3-5 nm de diâmetro), estas por sua vez são mantidas próximas via fortes ligações de hidrogênio (Figura 5B) (CHUNDAWAT et al., 2011). Cada glicose forma duas ligações de hidrogênio com a outra glicose ligada no carbono C4, as hidroxilas dos carbonos C3 e C6 fazem duas ligações de hidrogênio com o oxigênio do anel e a hidroxila do carbono C2 (Figura 5A) (MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015). As interações moleculares estabilizam a orientação coplanar dos anéis de glicopiranoose, resultando num polímero em forma de fita (MCNAMARA; MORGAN; ZIMMER, 2015).

As microfibrilas da celulose possuem de 500 a 14.000 unidades de glicose (SOMERVILLE, 2006). As fibras nas células são compostas de feixes das microfibrilas estabilizadas lateralmente por ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila nas cadeias lineares de celulose (HU; RAGAUSKAS, 2012). A estrutura cristalina da celulose é conferida pelo empilhamento de cadeias de celulose (VIDAL et al., 2011), enquanto que regiões com um menor grau de organização são conhecidas como regiões amorfas (Figura 5C) (COSGROVE, 1997).

O elevado índice de cristalinidade também pode resultar em uma taxa inferior de hidrólise em função de uma estrutura mais estável e resistente à ataques químicos e enzimáticos (HU; RAGAUSKAS, 2012). O coco verde possui um índice de cristalinidade de 29,3% e o coco maduro de 28%, sendo um índice baixo se comparado às coníferas que tem um índice de cristalinidade de 71,6% (GONÇALVES et al., 2014, 2015). Os pré-tratamentos Alc-H₂O₂/NaOH e hidrotérmico aumentaram o índice de cristalinidade do coco em decorrência da remoção da hemicelulose e a celulose amorfa, mas não foram feitas correlações entre o índice de cristalinidade e a taxa de hidrólise (GONÇALVES et al., 2014, 2015).

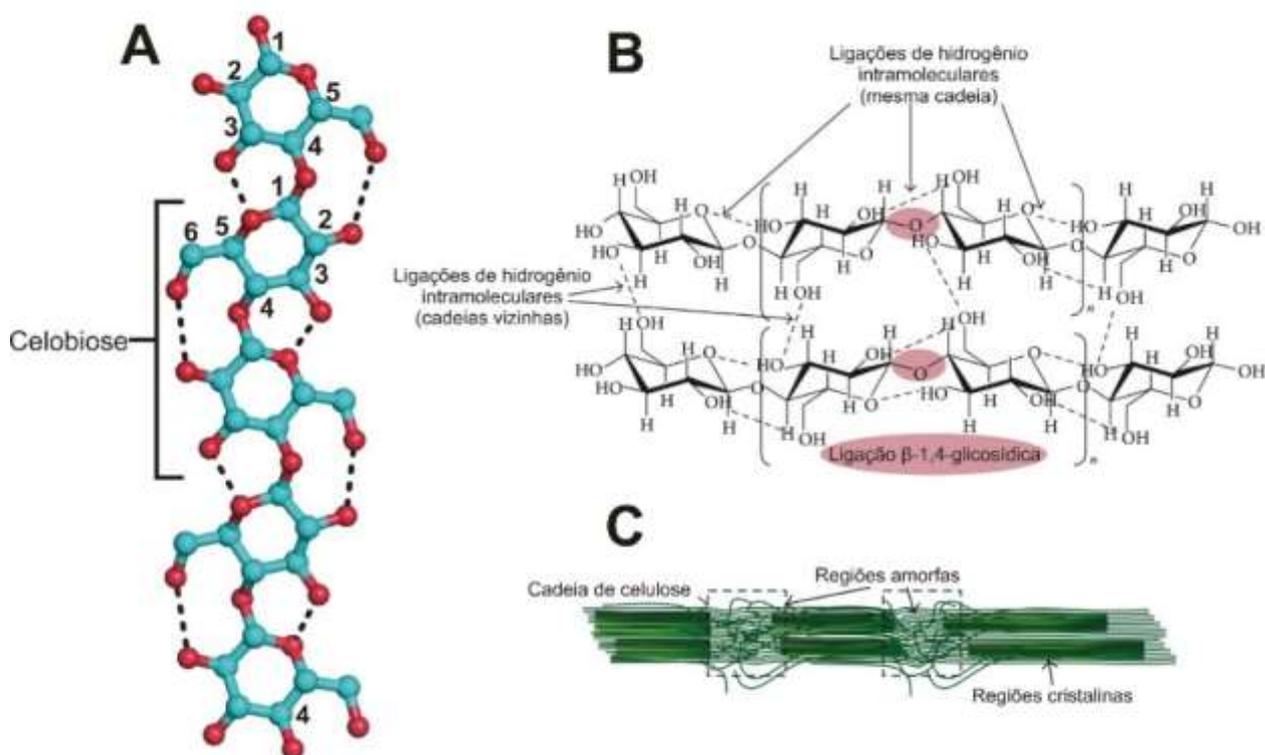


Figura 5: Características da celulose. **(A)** Celulose é um polímero de glicose em formato de fita. As unidades individuais de glicose são unidas por ligações glicosídicas entre os carbonos C1 e C4, e o carbono C1 adota configuração anomérica. Cada unidade de glicose é rotacionada em aproximadamente 180 °C em relação ao carbono vizinho e forma duas ligações de hidrogênio com a unidade adjacente (linha pontilhada). **(B)** Estrutura química de uma cadeia de celulose linear paralela. **(C)** Esquema de regiões amorfas e cristalinas da celulose. Fonte: adaptado de Lee et al., 2014; McNamara et al., 2015.

1.6. Biomassa lignocelulósica: hemicelulose

O papel mais importante da hemicelulose é o fortalecimento da parede celular pela interação com a celulose e lignina (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A hemicelulose é amorfa, hidrofílica, não possui estrutura definida e apresenta um grau de polimerização baixo, que varia entre 50 e 300 (HU; RAGAUSKAS, 2012; PAULY; KEEGSTRA, 2010).

As hemiceluloses representam 15-35% da biomassa vegetal e apresentam composição bastante diversificada, podendo conter pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos (ácido glicorônico, metilgalacturônico e galacturônico); assim como traços de ramnose e fucose (GÍRIO et al., 2010). Além disso, as microfibrilas de celulose podem ser revestidas por hemicelulose com ramificações de grupo acetil que podem dificultar o ataque de enzimas (HU; RAGAUSKAS, 2012). Apesar da diversidade, duas hemiceluloses são mais abundantes, as glicoarabinoxilanas e as galactoglicomananas (CHUNDAWAT et al., 2011).

As heteromananas são agrupadas em quatro classes: manana, glicomanana, galactomanana e galactoglicomanana (PAULY et al., 2013). Manana e galactomanana (Figura 6A) possuem a sua estrutura principal composta apenas de β -(1 \rightarrow 4)-manose, ao passo que glicomanana e galactoglicomanana possuem β -(1 \rightarrow 4)-manose e β -(1 \rightarrow 4)-glicose (PAULY et al., 2013). Da produção de óleo de coco a partir da copra obtêm-se uma torta residual rica em β -(1 \rightarrow 4)-manana (HOSSAIN; ABE; HIZUKURI, 1996). A composição da torta residual é composta por 70% (m/m) de manose, 20% (m/m) de glicose e pequenas quantidades de arabinose e galactose; sendo este um dos raros casos de biomassa rica em manose (TAKAHASHI et al., 1983).

Xiloglicanas são comuns na parede primária de dicotiledôneas (20-30%, m/m), e podem formar ligações com as microfibrilas de celulose, resultando numa rede que atua como o principal suporte da parede celular primária (PAULY et al., 2013). A xiloglicana consiste de uma estrutura principal com unidades de β -(1 \rightarrow 4)-glicose com três unidades de α -(1 \rightarrow 6)-xilose consecutivas ligadas às glicoses (Figura 6B) (REITER, 2002).

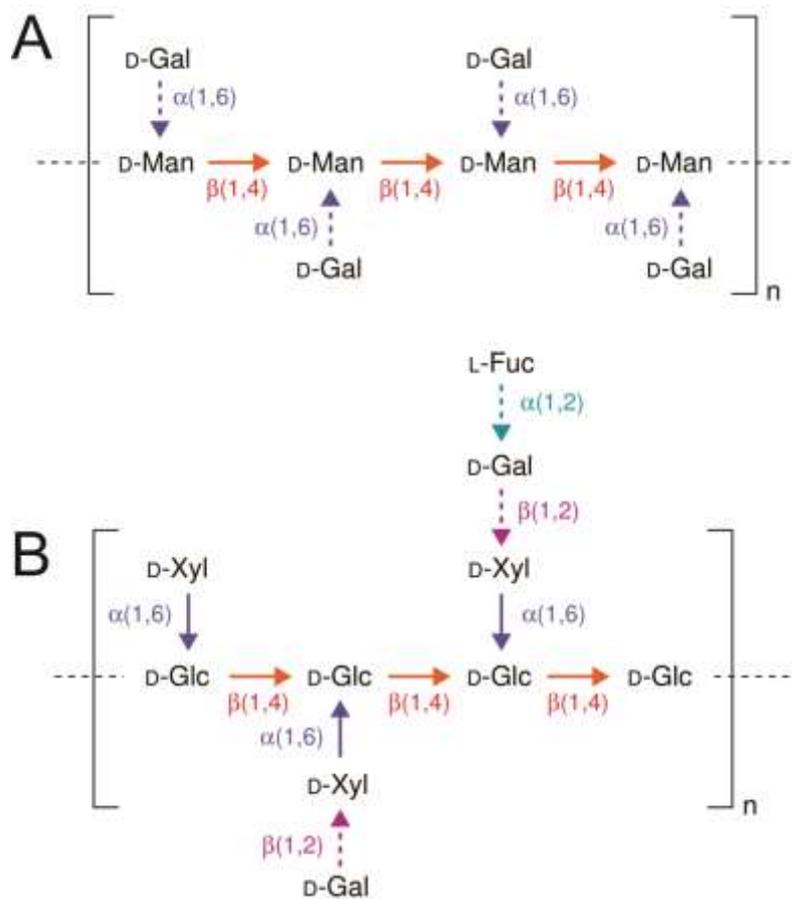


Figura 6: Características da hemicelulose. **(A)** Esquema da galactomanana. **(B)** Esquema da xiloglicana. Setas com linha sólida indicam unidades de açúcar que não se modificam (estrutura principal), enquanto que setas com linhas pontilhadas denotam posições em que podem ocorrer diferentes açúcares. Legenda: L-Fuc – fucose, D-Gal – galactose, D-Glc – glicose, D-Man – manose e D-Xyl - xilose. Fonte: adaptado de Reiter, 2002.

1.7. Biomassa lignocelulósica: lignina

Todas as plantas vasculares sintetizam a lignina, que compreende uma grande parcela do carbono fixado na biosfera, sendo apenas menos abundante do que a celulose (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010). Resistência à ataques microbianos, impermeabilização e rigidez às células vegetais são as principais funções da lignina (KUMAR et al., 2009). A impermeabilização da parede celular garante o transporte

de água e solutos pelo sistema vascular (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003), assim como evita a perda de água pela planta (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

A lignina apresenta grande variabilidade em termos de composição e estrutura, podendo variar de acordo com o organismo, tipo de célula, assim como fatores bióticos e abióticos uma vez que o processo de lignificação ocorre ao longo do desenvolvimento da planta (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

Dentre os principais constituintes da biomassa lignocelulósica, a lignina apresenta maior diversidade em termos de ligações e ramificações em sua estrutura (WHETTEN et al., 1998). A lignina é considerada um polímero formado de três álcoois, também chamados de monolignóis: álcool *p*-coumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (WHETTEN et al., 1998). Quanto os monolignóis são incorporados às ligninas estes passam a ser respectivamente referidos como *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil (Figura 7) (BONAWITZ; CHAPPLE, 2010).

A lignina atua como uma barreira natural ao ataque microbiano e às enzimas celulolíticas, logo faz-se necessária uma etapa de remoção ou modificação de sua estrutura para uma eficiente conversão da celulose (HU; RAGAUSKAS, 2012). Enzimas celulolíticas também podem se ligar irreversivelmente à lignina, o que pode demandar de elevada dosagem enzimática para uma hidrólise satisfatória (HU; RAGAUSKAS, 2012).

A lignina do coco ainda não foi completamente estudada, porém já constatou-se que a fibra do mesocarpo é rica em guaiacil, tendo uma baixa razão siringil/guaiacil (0,23) (RENCORET et al., 2013). A composição da lignina pode afetar o processo de deslignificação, biomassas com alta razão siringil/guaiacil são mais susceptíveis à degradação porque a lignina apresenta baixa repolimerização após o pré-tratamento, e também menos ramificações (TIMILSENA et al., 2013). Um processo de etanol 2G com enfoque na deslignificação do coco já foi reportado, entretanto o pré-tratamento (Alc-H₂O₂/NaOH) é complexo e demanda de considerável quantidade de reagentes (GONÇALVES et al., 2014).

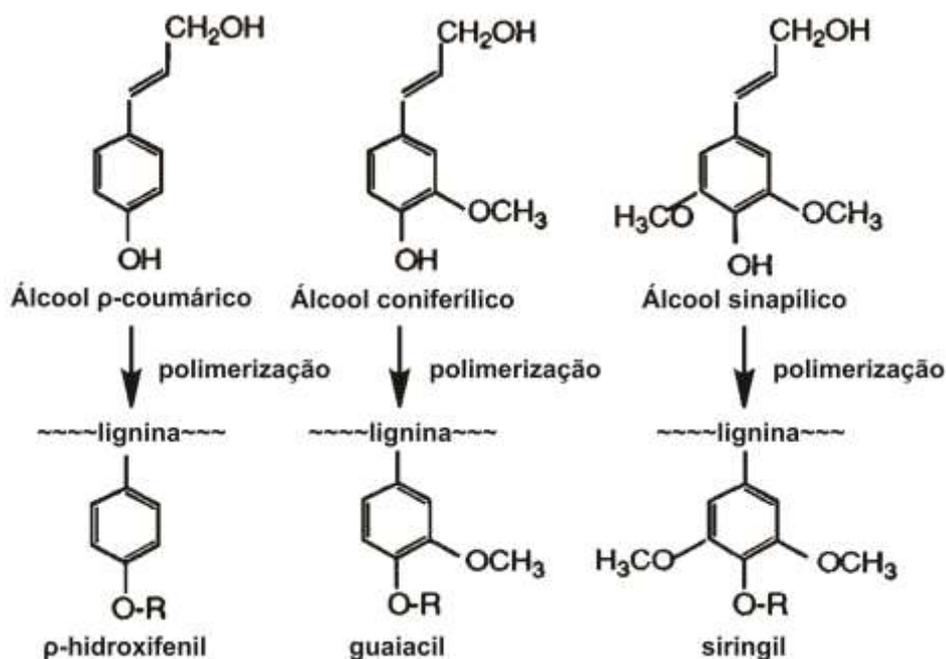


Figura 7: Estrutura dos três monolignóis e seus resíduos. O grupo R do oxigênio dos resíduos pode ser um próton no caso de hidroxila livre ou outro resíduo de monolignol. Fonte: adaptado de Whetten et al., 1998.

1.8. Pré-tratamento para produção de etanol 2G

As etapas básicas da produção do etanol 2G são a redução do tamanho da biomassa, o pré-tratamento físico-químico, a hidrólise química ou enzimática, a fermentação, e a destilação do etanol (Figura 8) (MUSSATTO et al., 2010). Devido à complexidade da matriz lignocelulósica, faz-se necessário o uso de pré-tratamentos que modificam a estrutura lignocelulósica, tornando-a mais susceptível à degradação enzimática (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Os pré-tratamentos podem ser agrupados em pré-tratamentos físicos (e.g. moagem e irradiação por micro-ondas), químicos (e.g. alcalino, ácido, oxidativo e líquidos iônicos), físico-químicos (e.g. explosão a vapor, hidrotérmico e expansão da fibra em amônia), e biológicos (e.g. uso de fungos decompositores de lignocelulose) (SUN et al., 2016). Entretanto, não

existe um processo específico para a conversão da lignocelulose em função da heterogeneidade das diferentes biomassas lignocelulósicas (ALVIRA et al., 2010).

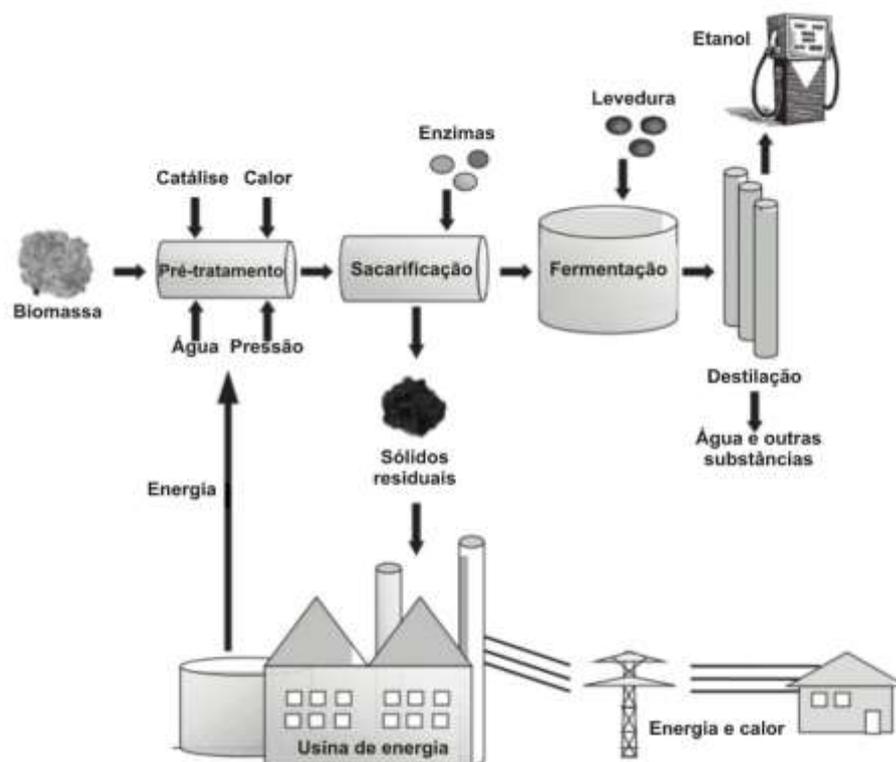


Figura 8: Desenho esquemático de uma biorrefinaria. A biomassa lignocelulósica é submetida ao pré-tratamento, sacarificação e fermentação. O etanol é destilado, e da fração aquosa pode-se obter outros compostos de valor comercial. Os sólidos residuais podem ser queimados para geração de energia e esta pode ser utilizada na própria planta ou comercializada. Fonte: adaptado de Modenbach & Nokes, 2012.

A tabela 3 sumariza alguns dos efeitos de diferentes pré-tratamentos em biomassas lignocelulósicas. A figura 9 demonstra alguns dos possíveis efeitos dos pré-tratamentos na matriz lignocelulósica como a remoção da lignina, e a hidrólise de ligações glicosídicas em hemiceluloses formando complexos entre carboidratos e lignina, resultando na exposição da celulose (ZENG et al., 2014).

Tabela 3: Efeito de diferentes pré-tratamentos na composição e estrutura de materiais lignocelulósicos.

Método de pré-tratamento	Remoção de lignina	Remoção de hemicelulose	Aumento da área de superfície	Redução da cristalinidade da celulose	Aumento da porosidade	Geração de inibidores
Moagem	S	S	E	E	S	R
Alcalino	E	E	E	S	E	R
Ácido	M	E	E	S	M	E
Oxidativo	E	S	S	S	E	R
Organosolv	E	R	E	S	M	R
Líquidos iônicos	M	R	E	E	E	R
Explosão a vapor	R	E	E	R	E	E
Hidrotérmico	M	E	M	S	M	E
AFEX ^a	M	R	E	E	E	R
Biológico	E	M	E	S	E	R

Legenda: S – sem efeito, R – efeito reduzido, M – efeito médio e E – efeito elevado.

^aAFEX: expansão da fibra em amônia (do inglês *Ammonia Fiber Expansion*)

Fonte: adaptado de Sun et al., 2016.

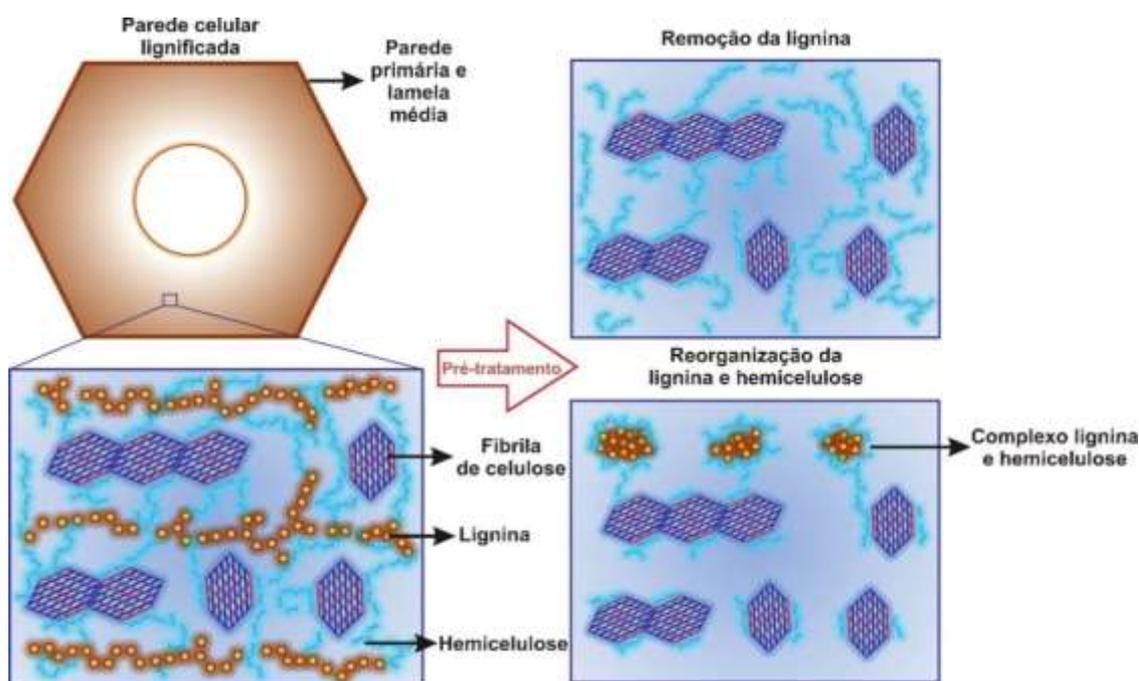


Figura 9: Esquema de uma matriz lignocelulósica e possíveis modificações em decorrência dos pré-tratamentos. A lignina pode agir como uma barreira física, impedindo o acesso de enzimas à celulose

durante a sacarificação. A remoção ou realocação da lignina, assim como a formação de complexos entre a lignina e açúcares da hemicelulose podem resultar numa melhor sacarificação da celulose. Fonte: adaptado de Zeng et al., 2014.

A redução e a moagem da biomassa são realizadas antes dos pré-tratamentos e sacarificação com o propósito de melhorar a taxa de conversão de açúcares (TAHERZADEH; KARIMI, 2008), sendo também relacionada com questões logísticas de transporte e armazenamento da biomassa lignocelulósica (VIDAL et al., 2011). A cominuição da biomassa é variável, e o material pode apresentar dimensões entre μm e mm dependendo do moinho utilizado. Diferentes tipos de moinhos são propostos na literatura tais como moinho de bolas, moinho martelo, moinho de facas e moinho de disco (VIDAL et al., 2011). Entretanto, o uso da moagem é limitado, e resulta numa baixa conversão de açúcares da lignocelulose, cerca de 50%, se utilizada sem outros pré-tratamentos (VIDAL et al., 2011).

Dentre os pré-tratamentos químicos, destaca-se o pré-tratamento ácido por ser amplamente utilizado, e também porque o uso de ácido pode resultar na hidrólise da celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). O pré-tratamento ácido tem como principal objetivo solubilizar a hemicelulose tornando a celulose mais acessível à enzimas celulolíticas (SUN et al., 2016). A borra resultante da produção de leite de coco submetida à hidrólise ácida com 1% (v/v) de H_2SO_4 a $130\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min, sem pré-tratamento prévio, resultou em 0,38% (m/v) de glicose (BUJANG et al., 2013). A casca do coco também apresentou rendimento inferior à 1% (m/v) de açúcares redutores quando tratada com 1% (v/v) de H_2SO_4 a $40\text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm por 24 h (DING; HUI; ONG, 2012). Alguns pormenores do pré-tratamento ácido são a corrosão de equipamentos, a formação de inibidores da fermentação e a degradação de açúcares (ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento hidrotérmico, por sua vez, produz menores quantidades de inibidores (GÍRIO et al., 2010). A biomassa é aquecida com água sob altas temperaturas (e.g. $160\text{-}240\text{ }^\circ\text{C}$), sendo utilizadas altas pressões para manter a água em estado líquido (HU; RAGAUSKAS, 2012). O pré-tratamento hidrotérmico parte do princípio que os principais constituintes da lignocelulose possuem diferentes estabilidades térmicas, sendo a decomposição da hemicelulose mais fácil do que a da celulose e lignina (SUN et al., 2016). As cascas de cocos verdes e maduras, e as fibras do coco maduro submetidas ao tratamento hidrotérmico apresentaram uma

redução da hemicelulose entre 50,2 e 74,7% (m/m), e aumentos na celulose entre 23,4 e 48,6% (m/m), e na lignina entre 16,4 e 62,7% (m/m); a fração líquida obtida do pré-tratamento apresentou açúcares por volta de 2% (m/v), sendo os principais a glicose, xilose e arabinose (GONÇALVES et al., 2015). Após o pré-tratamento hidrotérmico a 200 °C por 50 min as biomassas do coco apresentaram um teor de celulose entre 43,9 e 51,6% (m/m) (GONÇALVES et al., 2015). O pré-tratamento hidrotérmico apresenta desvantagens como o elevado consumo de água e energia, e a solubilização da biomassa, em especial a hemicelulose (AGBOR et al., 2011; HU; RAGAUSKAS, 2012).

O pré-tratamento alcalino é outro processo bastante empregado, atua principalmente na remoção da lignina e a hemicelulose, e pode ser conduzido em temperatura ambiente (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Vários reagentes são utilizados no pré-tratamento alcalino como NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃ e amônia, sendo os dois primeiros os mais utilizados (SUN et al., 2016). Alguns dos efeitos do pré-tratamento alcalino em materiais lignocelulósicos são a redução do grau de polimerização e a tumefação da celulose, levando ao aumento da área de superfície interna (HU; RAGAUSKAS, 2012). Regiões amorfas são mais susceptíveis ao pré-tratamento alcalino do que as regiões cristalinas, sendo as primeiras mais facilmente hidrolisadas, o que resulta num aumento da cristalinidade da celulose após o pré-tratamento (HU; RAGAUSKAS, 2012). O pré-tratamento alcalino também resulta na saponificação de ligações éster entre a hemicelulose e a lignina (Figura 10).

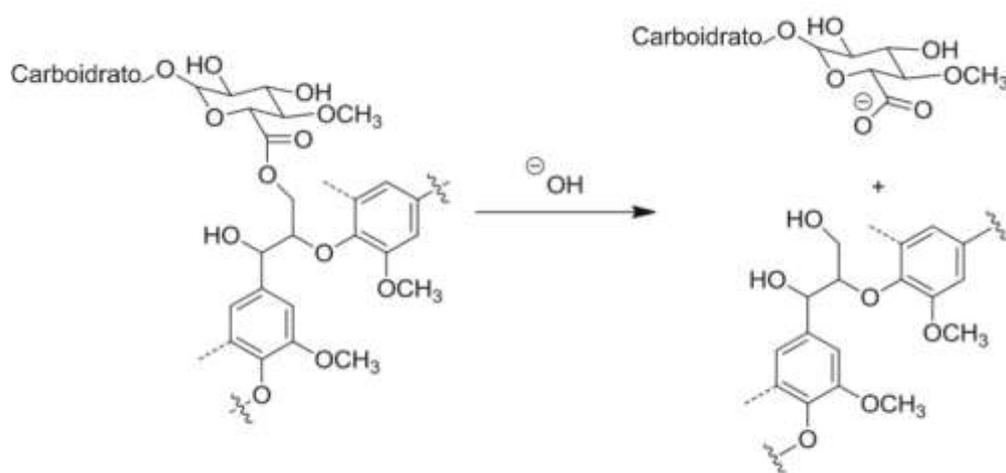


Figura 10: Saponificação de um complexo entre carboidrato e lignina com pré-tratamento alcalino. Fonte: adaptado de Hu & Ragauskas, 2012.

O pré-tratamento alcalino, dentre os diversos pré-tratamentos, foi amplamente utilizado nas pesquisas com coco (ALBUQUERQUE et al., 2016; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011). O uso do pré-tratamento alcalino no coco teve como objetivo principal a remoção da lignina para uma melhor conversão da celulose em glicose (ALBUQUERQUE et al., 2016; GONÇALVES et al., 2014; LOSS, 2011).

O uso de NaOH no pré-tratamento da casca de coco verde resultou em maior concentração de glicose, aproximadamente 0,6% (m/v), e sobressaiu-se em relação aos pré-tratamentos ácido (H_2SO_4), oxidativo (H_2O_2) e biológico com *A. niger* (LOSS, 2011). Um longo pré-tratamento (24 h) alcalino em baixa temperatura (40 °C) também resultou num melhor rendimento em açúcares redutores em comparação aos pré-tratamentos hidrotérmico e ácido (DING; HII; ONG, 2012). O pré-tratamento alcalino na casca de coco verde seguido de sacarificação em alta pressão hidrostática (300 MPa) resultou em cerca de 0,85% (m/v) de glicose, enquanto a sacarificação em pressão ambiente resultou em aproximadamente 0,8% (m/v) de glicose (ALBUQUERQUE et al., 2016). O pré-tratamento Alc- H_2O_2 /NaOH nas cascas de cocos verdes e maduras, e as fibras do coco maduro resultaram em hidrolisados com concentrações de glicose próximas à 2% (m/v) nas 8 horas que antecederam o início da fermentação em regime de SSSF (GONÇALVES et al., 2014).

O peróxido de hidrogênio em condições alcalinas cliva ligações entre carbonos na lignina, auxiliando na etapa de deslignificação por pré-tratamento alcalino (GONÇALVES et al., 2014). A deslignificação com agentes oxidantes é mais cara do que pré-tratamentos com ácido ou base, sendo usualmente aplicado como um pré-tratamento secundário a um primeiro pré-tratamento para remoção da lignina residual (SUN et al., 2016).

Existem diversos métodos de pré-tratamento reportados na literatura, e estes apresentam pontos positivos e negativos (Tabela 4). O pré-tratamento alcalino tem se mostrado promissor na produção de etanol 2G (ALBUQUERQUE et al., 2016; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014; LOSS, 2011). Por outro lado, o uso do coco ou seus derivados ainda não foi investigado em pré-tratamentos alcalinos robustos, que visam a produção e fermentação de hidrolisados com altos teores de açúcares.

Tabela 4: Resumo de algumas das principais vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

Método de pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Biológico	Degrada lignina e hemicelulose; Baixo consumo de energia;	Taxa de hidrólise inferior;
Moagem	Reduz a cristalinidade da celulose;	Elevado consumo de energia;
Explosão a vapor	Modifica a lignina e solubiliza a hemicelulose; Bom custo/benefício; Alto rendimento em glicose e hemicelulose;	Forma inibidores; Degrada a hemicelulose parcialmente;
AFEX	Aumenta área de superfície; Menor formação de inibidores;	Baixa eficiência em biomassa muito lignificada; Insumos caros;
Ozonólise	Reduz a quantidade de lignina; Menor formação de inibidores;	A geração de ozônio apresenta custo bastante elevado;
Organosolv	Hidrolisa a lignina e hemicelulose;	Alto custo; Solventes precisam ser reciclados;
Ácido diluído	Menos corrosivo do que ácido concentrado; Altas taxas de conversão em glicose;	Formação de inibidores;
Líquidos iônicos	Reduz a cristalinidade da lignocelulose;	Líquidos iônicos apresentam alto custo;
Alcalino	Reduz o conteúdo da lignina e hemicelulose; Baixo custo.	Poluente; Alto custo para recuperação da base.

Fonte: adaptado de Alvira et al., 2010; Sun et al., 2016.

1.9. Sacarificação da biomassa lignocelulósica pré-tratada

Depois de pré-tratada, a biomassa lignocelulósica é submetida a uma etapa de conversão de polissacarídeos à monossacarídeos, com grande enfoque na celulose,

e este processo pode ocorrer por via ácida ou enzimática (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A hidrólise ácida da celulose é realizada com H_2SO_4 ou HCl , e pode exigir altas temperaturas (e.g. 190-240 °C). A hidrólise ainda resulta na degradação de açúcares e formação de inibidores (e.g. furanos); o processo também pode demandar de elevadas concentrações de ácido tornando-se inviável (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Outros problemas são a baixa seletividade do processo, corrosão de equipamentos e geração de resíduos (MÄKI-ARVELA et al., 2011).

A hidrólise da celulose utilizando enzimas celulolíticas não resulta na formação de inibidores como a hidrólise ácida (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). O fungo *T. reesei* é o fungo mais investigado devido à sua grande produção de enzimas celulolíticas, sendo considerado um organismo modelo no estudo da hidrólise enzimática (WANG et al., 2012). Dentre as enzimas utilizadas na degradação da celulose destacam-se a β -(1→4)-endoglicanase (família 5 das hidrolases de glicosídeo ou GH5) que cliva as ligações internas na cadeia de celulose, as β -(1→4)-exoglicosidases (GH6 e GH7), também conhecidas como celobiohidrolases, que clivam moléculas de glicose nas terminações redutora e não redutora da celulose, e as β -glicosidases (GH3) que hidrolisam a celobiose em duas moléculas de glicose (GLASS et al., 2013). A degradação da celulose ocorre de forma sinérgica, inicialmente a endoglicanase atua de forma randômica na região interna da celulose e resulta na exposição de porções redutoras e não redutoras, que são então clivadas pelas celobiohidrolases dando origem à celobiose, que por fim é hidrolisada à glicose por β -glicosidases (Figura 11) (WANG et al., 2012).

A conversão da hemicelulose em monossacarídeos é essencial para a viabilidade de uma biorrefinaria, assim como pode facilitar o acesso das enzimas que hidrolisam a celulose (JORDAN et al., 2012). A maior complexidade da hemicelulose em relação à celulose reflete também a necessidade de diferentes enzimas na sacarificação, como por exemplo as β -(1→4)-endoxilanases (GH10 e GH11) e β -(1→4)-endomananases (GH5.7) que clivam respectivamente as cadeias principais da xilana e manana em oligossacarídeos menores; sendo que estes oligossacarídeos podem ser clivados à xilose e manose pelas β -xilosidase (GH43 e GH3) e β -manosidase (GH2), respectivamente (Figura 12) (GLASS et al., 2013; VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

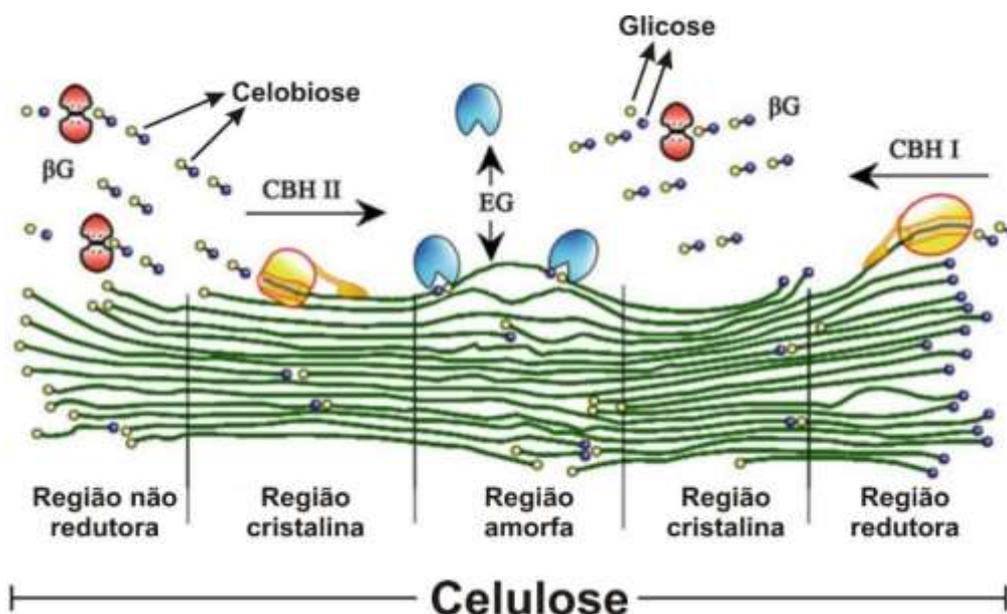


Figura 11: Esquema do mecanismo de degradação enzimática da celulose. A endoglicosidase (EG) cliva a região interna da celulose, as regiões redutoras e não redutoras são hidrolisadas pelas celobiohidrolases (CBH I e II), e a celobiose é hidrolisada à glicose pela β -glicosidase (β G). Fonte: adaptado de Wang et al., 2012.

A hemicelulose possui na cadeia principal de xilose ou manose, e uma série de outros compostos tais como arabinose, galactose e acetato que compõe a cadeia lateral, e que precisam ser removidas pelas respectivas enzimas α -L-arabinofuranosidase, α -galactosidase e acetilxilana esterase, de forma a permitir o acesso das hemicelulases à cadeia principal da hemicelulose (Figura 12) (GLASS et al., 2013; VAN DYK; PLETSCHE, 2012). A feruloil esterase é outra importante enzima acessória que cliva ligações entre a lignina e a hemicelulose (Figura 12) (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

A identificação da quantidade mínima de enzimas necessárias para converter a biomassa em açúcares fermentescíveis de forma eficiente faz-se necessária para redução dos custos de processo (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Geralmente são consideradas enzimas fundamentais as endoglicanase, celobiohidrolases (CBH I e II), β -glicosidase, endoxilanase e β -xilosidase, entretanto a demanda por enzimas específicas pode variar de acordo com a biomassa (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

A respeito da hidrólise do coco, a hidrólise ácida com HCl resultou num rendimento de glicose inferior, aproximadamente 0,35 g/L, se comparado com a hidrólise enzimática que resultou em aproximadamente 0,65 g/L (LOSS, 2011). As cascas de cocos verdes e maduros, e fibras do coco maduro hidrolisadas utilizando uma carga

de 30 FPU/g de sólido pré-tratado por Alc-H₂O₂/NaOH resultaram numa conversão da celulose de aproximadamente 74% (GONÇALVES et al., 2014); ao passo que os mesmo tipos de biomassa submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico resultaram numa conversão de cerca de 89% (GONÇALVES et al., 2015).

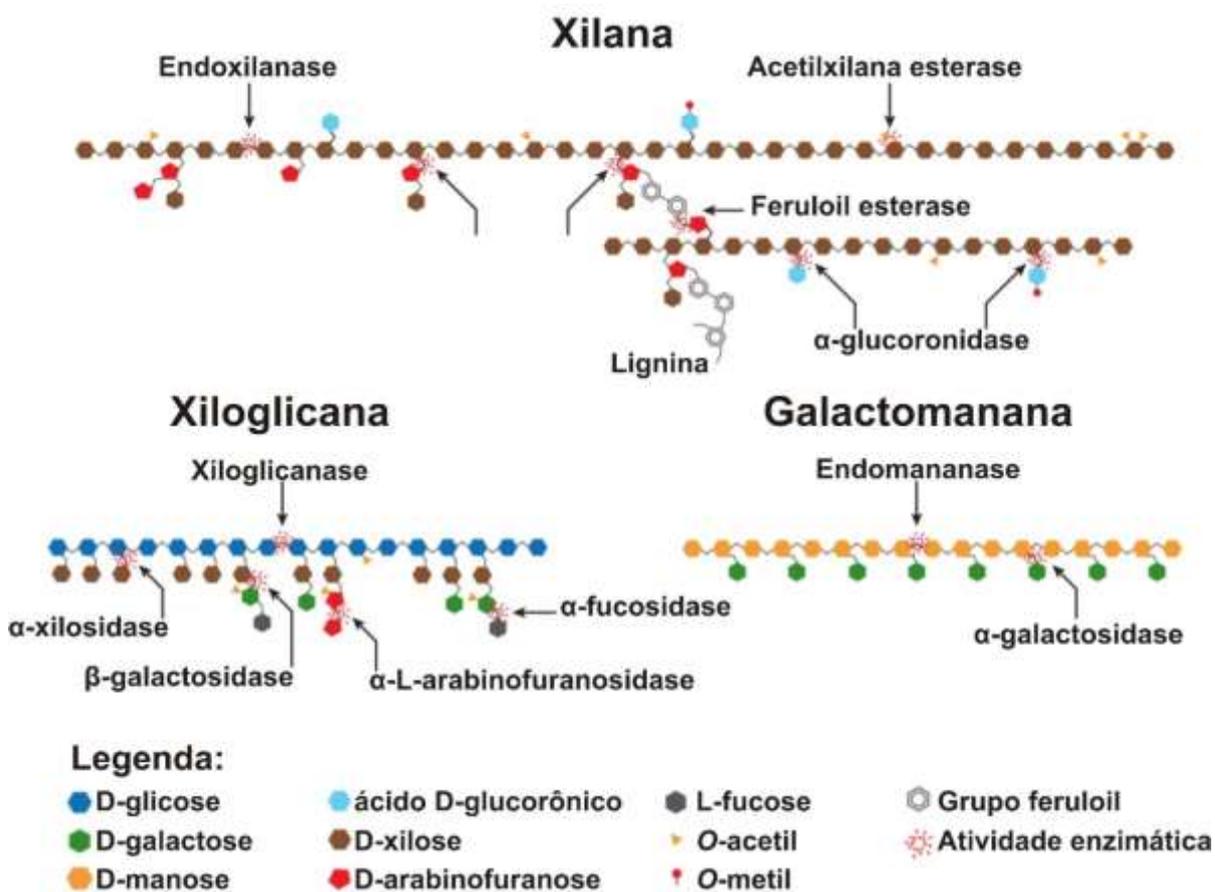


Figura 12: Esquema de algumas estruturas de hemicelulose e enzimas que atuam na sua degradação. Xilana, xiloglicana e galactomanana e regiões de hidrólise (setas) de algumas das principais enzimas celulolíticas. Fonte: adaptado de Glass et al., 2013.

1.10. Inibidores da biomassa lignocelulósica

A sacarificação e a fermentação podem ser afetadas por inibidores gerados durante o pré-tratamento (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). A formação de

inibidores depende da fonte de lignocelulose, o tipo e a intensidade do pré-tratamento (PIENKOS; ZHANG, 2009). Algumas classes de inibidores são conhecidas e comuns em diferentes biomassas e processos, sendo elas os furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos (Figura 13) (PIENKOS; ZHANG, 2009).

Os furanos 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) e furfural são resultantes da desidratação de hexoses e pentoses, respectivamente (Figura 13) (ALMEIDA et al., 2007). O furfural e HMF podem inibir o crescimento da levedura, assim como a produção de etanol pela inibição de enzimas como a álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e aldeído desidrogenase (Figura 14) (ALMEIDA et al., 2007). A levedura *S. cerevisiae* em condições de anaerobiose é capaz de converter furfural e HMF em compostos menos tóxicos, os álcool furfurílico e 2,5-bis-hidroximetilfurano, respectivamente (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Por outro lado, a redução de furanos pode resultar na depleção de NAD(P)H, que é um importante cofator para a levedura (ALMEIDA et al., 2007).

Os ácidos fracos são produzidos de duas formas, o ácido acético é resultante da deacetilação da hemicelulose, e os ácido levulínico e ácido fórmico são produzidos por condições de pré-tratamento que resultam na degradação do HMF e furfural (Figura 13) (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Ácidos fracos são lipossolúveis e podem difundir através da membrana plasmática, dentro da célula ocorre a dissociação do ácido que modifica o pH do citosol de neutro para ácido (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A célula, para compensar a acidificação citosólica, bombeia prótons para o meio extracelular via ATPases localizadas na membrana celular, entretanto ATP é consumido neste processo resultando em um menor crescimento (Figura 14) (ALMEIDA et al., 2007).

Os efeitos dos ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico no rendimento em etanol são similares e não há efeito sinérgico entre eles (ALMEIDA et al., 2007). Outros ácidos fracos, como o ácido salicílico, podem se dissolver na membrana interna da mitocôndria e perturbar o gradiente de prótons de forma a desconectar a ligação entre a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa, inibindo assim a regeneração de ATP (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

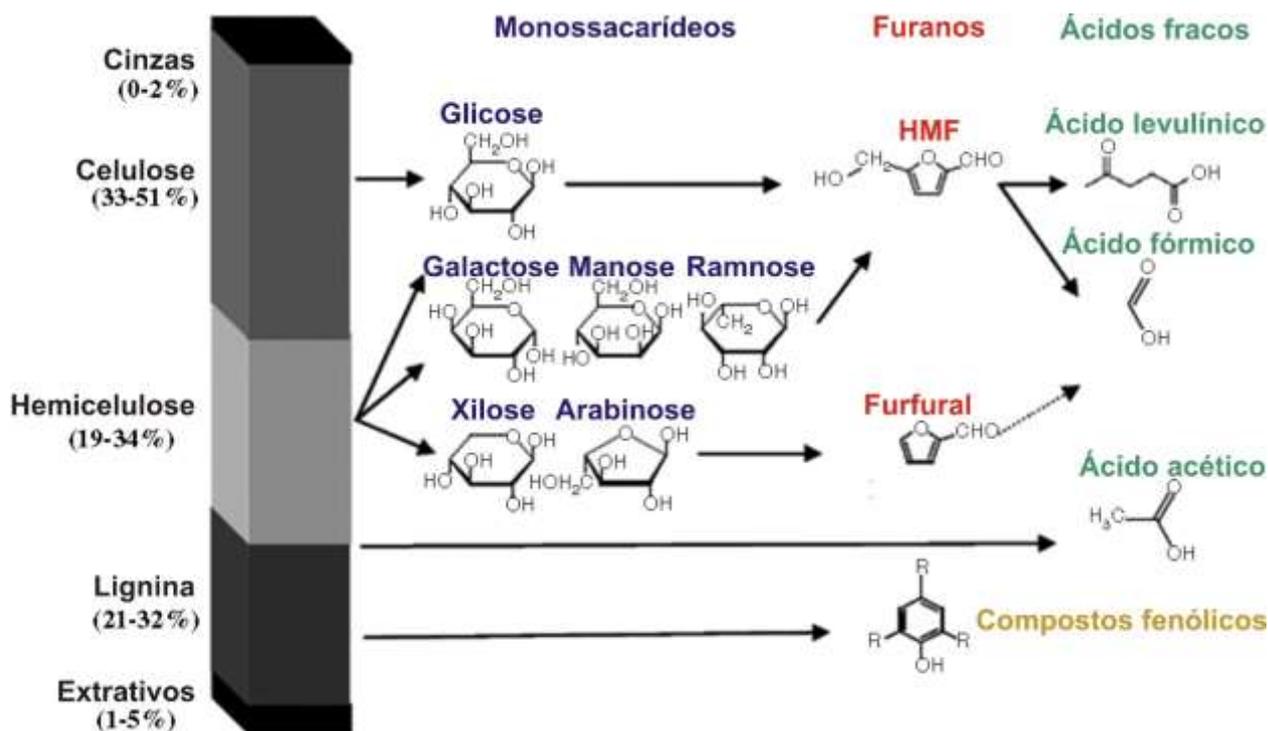


Figura 13: Média de composição de biomassas lignocelulósicas, e os monossacarídeos e inibidores resultantes de pré-tratamento e hidrólise. Fonte: adaptado de Almeida et al., 2007.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas pelas vias das pentoses fosfatadas, chiquimato e fenilpropanóide, e compõem a lignina (Figura 13), assim como atuam na defesa contra doenças (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014). Alguns dos compostos fenólicos mais comuns em biomassas lignocelulósicas são o ácido 4-hidroxibenzóico, a vanilina e o catecol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), entretanto existe um grande número de compostos fenólicos, e a identificação dos mesmos é laboriosa (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Os efeitos dos compostos fenólicos em *S. cerevisiae* são específicos para cada composto e podem inibir o crescimento celular, prolongar a fase *lag*, reduzir do rendimento em etanol, aumentar a produção de acetato ou de glicerol (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014). Outros efeitos nas células são alterações na integridade de membrana celular e no gradiente de prótons através da membrana mitocondrial (Figura 14) (ALMEIDA et al., 2007). Alguns ácidos fenólicos já foram identificados no mesocarpo de coco, sendo eles o ácido 4-hidroxibenzóico, ácido ferúlico, ácido coumárico, 4-hidroxibenzaldeído e ácido vanílico, e acredita-se que atuam na proteção contra microrganismos (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005). As β -

glicosidases também podem ser inibidas ou desativadas por compostos fenólicos (XIMENES et al., 2011).

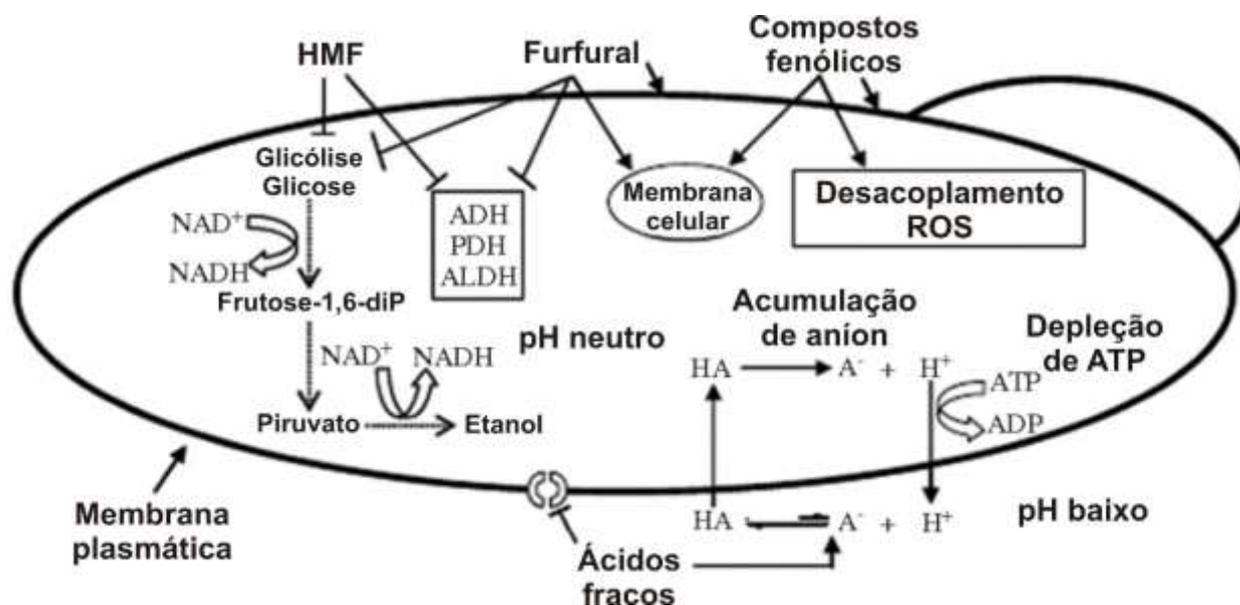


Figura 14: Efeito de furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos em *S. cerevisiae*. O HMF resulta na inibição da álcool desidrogenase (ADH), piruvato desidrogenase (PDH) e aldeído desidrogenase, assim como inibe a glicólise por inibição enzimática ou depleção de cofatores. O furfural apresenta os mesmos efeitos inibitórios do HMF e pode causar danos à membrana celular. Ácidos fracos causam a depleção de ATP, acumulação intracelular de anion e inibição da assimilação de aminoácidos aromáticos. Compostos fenólicos podem resultar no desacoplamento de proteínas, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos à membrana celular. Fonte: adaptado de Almeida et al., 2007.

Além de compostos fenólicos naturalmente presentes no mesocarpo de coco, alguns inibidores já foram identificados na fração líquida do coco submetida ao pré-tratamento hidrotérmico, sendo eles o HMF, furfural e ácido acético (GONÇALVES et al., 2015). Entretanto, a fração líquida do presente trabalho não foi utilizada para fermentação (GONÇALVES et al., 2015). A identificação de potenciais inibidores do coco faz-se importante para o desenvolvimento de processos industriais e leveduras robustas.

Outros possíveis inibidores são o próprio etanol produzido durante a fermentação que pode resultar em perda da viabilidade celular, redução do crescimento e transporte de glicose em *S. cerevisiae* (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). Podem ocorrer também efeitos sinérgicos entre diferentes tipos de inibidores, tal como o efeito combinado do ácido acético e furfural que afeta a taxa de crescimento, a produção de biomassa e a produção de etanol (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Os hidrolisados de coco reportados na literatura foram obtidos de processos com etapa de destoxificação, que consiste em lavar os sólidos pré-tratados para a remoção de possíveis inibidores (ALBUQUERQUE, 2013; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011). A lavagem do material é uma etapa adicional de manuseamento da biomassa que pode resultar na perda de biomassa e açúcares solubilizados, resultando numa produção de etanol inferior (MODENBACH; NOKES, 2012). Adicionalmente, a lavagem pode remover pequenas partículas de celulose que podem ser mais fáceis de serem hidrolisadas do que partículas maiores (MODENBACH; NOKES, 2013). A destoxificação pode não ser uma etapa essencial em processos de etanol 2G, sendo que a sua remoção do processo pode não afetar significativamente a sacarificação e a fermentação (MODENBACH; NOKES, 2013).

1.11. Pré-tratamento e hidrólise da biomassa lignocelulósica com alta carga de sólidos por batelada simples e batelada alimentada

O aumento da quantidade de açúcares em um hidrolisado pode resultar em maiores concentrações etanol após a fermentação, menor consumo de água, e menor gasto energético com aquecimento, homogeneização e destilação (MODENBACH; NOKES, 2012). O emprego de processos robustos, utilizando concentrações elevadas de açúcares também permite que a planta industrial seja menor e mais barata, e produza o equivalente à uma planta maior e que utiliza menores concentrações de biomassa (MODENBACH; NOKES, 2013).

A alta carga de sólidos em batelada simples pode ser utilizada no pré-tratamento, na hidrólise ou em ambas etapas, sendo que a carga de sólidos é superior a 15% (m/m), mas geralmente não passa de 20% (m/m) (MODENBACH; NOKES, 2012). A limitação na quantidade máxima de sólidos se deve principalmente ao aumento da

viscosidade e ausência de água no meio (MODENBACH; NOKES, 2012). O limitante a respeito da carga máxima de sólidos relaciona-se principalmente ao menor uso de água no pré-tratamento, esta desempenha importante papel na redução da viscosidade pela solubilização de açúcares e na transferência de massa (MODENBACH; NOKES, 2012).

O emprego da batelada alimentada visa contornar os problemas da batelada simples via adição gradual de biomassa durante a sacarificação, que resulta num hidrolisado menos viscoso e de fácil homogeneização (MODENBACH; NOKES, 2013). Basicamente, utiliza-se uma parte da biomassa na sacarificação, e após sua liquefação é adicionada uma nova quantidade de biomassa ao hidrolisado; desta forma pode-se utilizar cargas de sólidos de até 30% (m/m) sem resultar em hidrolisados pastosos, sendo que estes são difíceis de manusear e são indesejados em processos industriais (MODENBACH; NOKES, 2013).

Alguns pormenores da batelada alimentada são a longa sacarificação (*e.g.* 72 h), e uma menor taxa de conversão de celulase em função da inibição das enzimas celulolíticas, e mais inibidores em relação à processos que usam menos de 15% (m/m) de biomassa (MODENBACH; NOKES, 2013).

A batelada simples com baixa carga de sólidos foi amplamente empregada na produção de hidrolisados do coco (ALBUQUERQUE et al., 2016; BUJANG et al., 2013; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011). Entretanto, não foram reportadas concentrações de açúcares próximas de 8% nestes estudos, sendo que teoricamente este o valor pode resultar numa concentração de etanol (4%) mínima para uma destilação viável (MODENBACH; NOKES, 2013). O emprego da alta carga de sólidos faz-se necessário para que a produção de etanol do coco seja viável.

1.12. Estratégias de sacarificação e fermentação

A produção de hidrolisado e a fermentação podem ocorrer em três configurações distintas conhecidas como sacarificação separada da fermentação (do inglês *Separated Hydrolysis and Fermentation*, ou SHF), SSF e o bioprocesso consolidado (do inglês *Consolidated Bioprocess* ou CBP) (Figura 15) (ZHAO et al., 2011). A SHF permite que a sacarificação e a fermentação sejam realizadas em condições ótimas de temperatura, pH, carga enzimática e carga de substrato (Figura 15A) (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Porém, o acúmulo de glicose pode inibir as β -glicosidases, assim como o acúmulo de celobiose pode retroinibir as exoglicanases e celobiohidrolases durante a sacarificação (ZHAO et al., 2011).

A SSF visa dirimir os problemas de retroinibição da SHF realizando a sacarificação juntamente com fermentação, evitando assim uma alta concentração de açúcares no hidrolisado. Desta forma, o tempo do processo, o consumo de energia e a dosagem de enzimas do processo podem ser reduzidos (Figura 15B) (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Um ponto desfavorável da SSF se deve a diferença de temperatura ótima para a sacarificação (e.g. 50 °C) e fermentação (e.g. 35 °C) (ZHAO et al., 2011). A SSF mostrou-se uma opção interessante para a fermentação de hidrolisados do coco, e resultou entre 0,7 e 1% (m/v) de etanol quando fermentadas por *S. cerevisiae*, *S. stipitis* e *Z. mobilis* (GONÇALVES et al., 2014, 2015).

O CBP tem enfoque na redução dos elevados custos das celulases, este processo compreende a produção de enzimas celulolíticas, a sacarificação e a fermentação em uma única etapa (Figura 15C) (YAMADA; HASUNUMA; KONDO, 2013). O grande desafio do CBP é a obtenção de um organismo capaz de realizar a dupla função de sacarificar e fermentar com potencial industrial, geralmente as enzimas celulolíticas secretadas por tais microrganismos apresentam atividade inferior às do *T. reesei* (YAMADA; HASUNUMA; KONDO, 2013). Ainda que bastante promissor, o CBP ainda encontra-se em estágio de desenvolvimento (ZHAO et al., 2011).

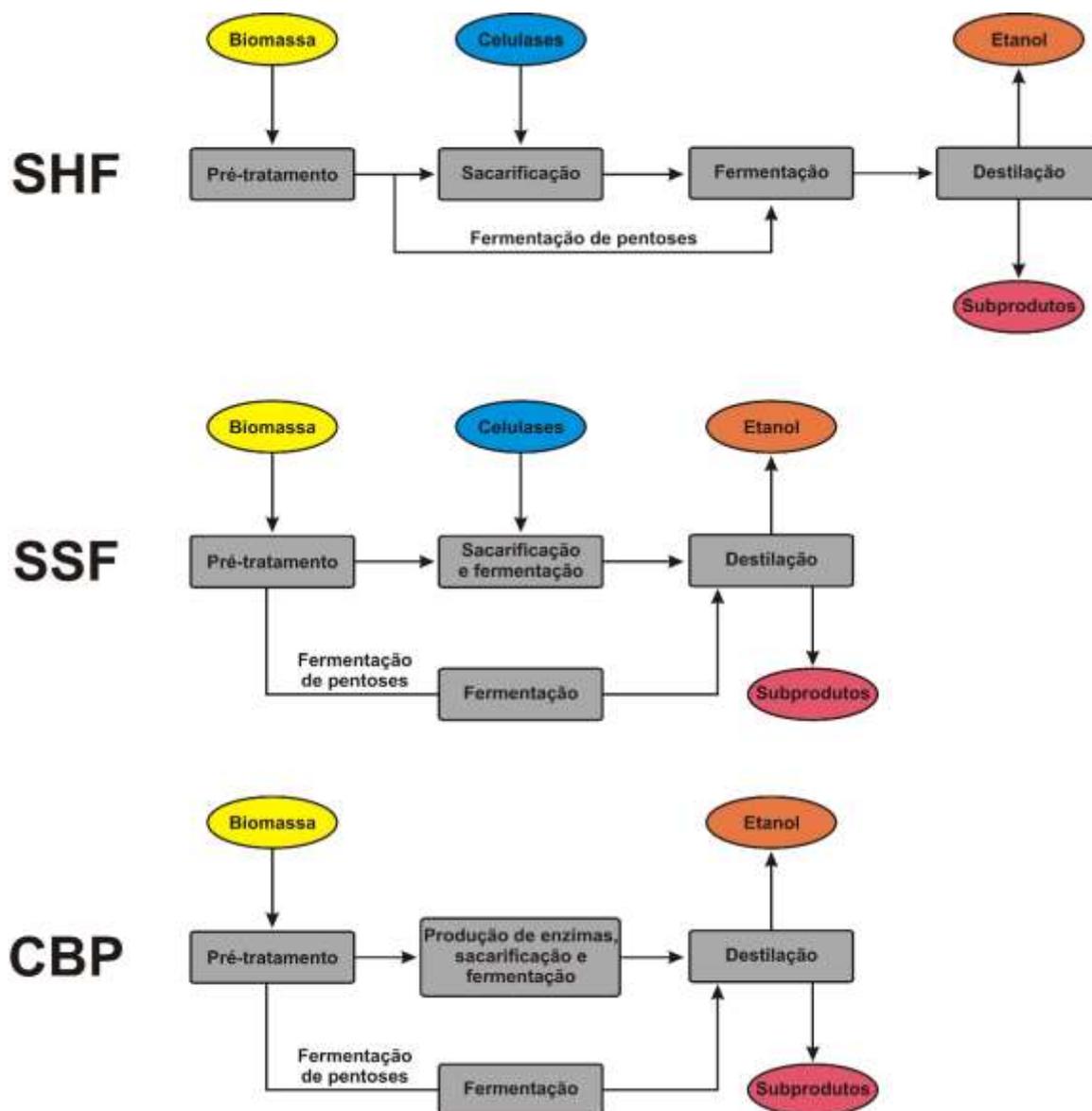


Figura 15: Esquemas de processos de etanol 2G. Fonte: adaptado de Zhao et al., 2011.

1.13. Fermentação de hexoses e pentoses de hidrolisados lignocelulósicos

Assim como em processos de etanol 1G, *S. cerevisiae* apresenta características importantes para seu uso em processos de etanol 2G, como a tolerância a altas

concentrações de etanol (e.g. 20%), e o pH levemente ácido (e.g. 4,5) (ZHAO et al., 2011). Adicionalmente, *S. cerevisiae* fermenta hexoses (e.g. glicose, manose e galactose) eficientemente, apresenta alta taxa fermentativa e rendimentos próximos do máximo teórico (0,51 g de etanol/g de hexose) (MADHAVAN et al., 2012). Outras características que conferem à levedura *S. cerevisiae* importância no cenário do etanol 2G são as condições estabelecidas para atender à demanda comercial, como por exemplo a produção, transporte e armazenamento da cepa (DEMEKE et al., 2013a).

Dentre as bactérias, destaca-se a *Zymomonas mobilis* que possui elevados rendimentos em etanol, assim como resistência a elevadas concentrações de etanol (e.g. 12%) (ZHAO et al., 2011). Entretanto, *Z. mobilis* e *S. cerevisiae* são incapazes de consumir as pentoses (xilose e arabinose), e *Z. mobilis* também não fermenta manose e galactose, além de não ser resistente a pH ácidos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007a).

Microrganismos capazes de fermentar pentoses, como a levedura *S. stipitis*, não apresentam resistência aos inibidores de hidrolisados lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Um dos grandes desafios da produção de etanol 2G é a obtenção de organismos capazes de fermentar diferentes açúcares com alta especificidade para etanol, e também serem resistentes aos inibidores lignocelulósicos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007a). A tabela 5 sumariza algumas características de alguns microrganismos no que diz respeito à aplicação industrial.

A glicose é o principal monossacarídeo em grande parte dos hidrolisados lignocelulósicos e a sua fermentação por *S. cerevisiae* é próxima do limite teórico máximo de 2 moles de etanol e CO₂ para cada mole de glicose (MADHAVAN et al., 2012). O transporte de glicose na célula de *S. cerevisiae* ocorre por difusão facilitada e seu catabolismo ocorre pela via glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas (VAN MARIS et al., 2006). Dentro da célula a glicose sofre fosforilação pela hexocinase, e a glicose-6-fosfato é oxidada por uma série de reações até a formação de 2 piruvatos, que em condições de anaerobiose, são convertidos à etanol pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (Figura 16) (MADHAVAN et al., 2012). Durante a fermentação também pode ocorrer a formação de acetato pela

ação da acetaldéido desidrogenase, e também de glicerol pelas glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fostato fosfatase (Figura 16) (MADHAVAN et al., 2012).

Tabela 5: Características de microrganismos em relação a produção industrial de etanol.

Organismo	Consumo natural do açúcar					Produtos principais		Tolerância			Necessidade de O ₂	Faixa de pH
	Glu	Man	Gal	Xil	Ara	EtOH	Outros	Acl	Aci	Hid		
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	Neutro
<i>Z. mobilis</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	Neutro
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	-	-	+	-	++	++	++	-	Ácido
<i>S. stipitis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	Ácido

Legenda: Glu – glicose, Man – manose, Gal – galactose, Xil – xilose, Ara – arabinose, EtOH – etanol, Acl – álcoois, Aci – ácidos, Hid – hidrolisados. Fonte: adaptado de Hahn-Hägerdal et al., 2007.

A manose é a segunda hexose mais abundante em hidrolisados lignocelulósicos e apresenta um rendimento em etanol igual ao da glicose quando fermentada por *S. cerevisiae*, ambas hexoses também compartilham os mesmos transportadores, apesar da afinidade da manose ser menor do que a da glicose (MADHAVAN et al., 2012). A manose é fosforilada por uma hexocinase ao entrar na célula, e a manose-6-fosfato é isomerizada a frutose-6-fostato pela fosfomanose isomerase, sendo então metabolizada pela via Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 16). A galactose por sua vez é assimilada principalmente via proteína transportadora *GAL2* e dentro da célula é convertida à glicose-6-fosfato por enzimas induzidas por galactose da via Leloir, a glicose-6-fostato então é direcionada para a glicólise e fermentação (Figura 16) (MADHAVAN et al., 2012).

A fermentação de pentoses em *S. cerevisiae* não ocorre naturalmente, sendo alvo de investigação desde a década de 1970 (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). A xilose é a pentose mais abundante em hidrolisados lignocelulósicos, e o seu transporte para o meio intracelular em *S. cerevisiae* dá-se por transportadores como *HXT1* (baixa afinidade), *HXT4* e *HXT5* (média afinidade) e *HXT7* e *GAL2* (alta afinidade); entretanto o transporte de xilose é lento na presença de altas concentrações de glicose (MADHAVAN et al., 2012). A xilose pode ser metabolizada por duas vias metabólicas heterólogas diferentes, numa delas são expressos genes da xilose redutase dependente de NADPH e xilitol desidrogenase dependente de NAD⁺ de *S.*

stipitis, que convertem a xilose em xilulose em 2 etapas (Figura 17); entretanto estas enzimas modificam o balanço de NADPH/NADH e resultam em grande produção de xilitol (DEMEKE et al., 2013a). A expressão da xilose isomerase é a outra alternativa para a fermentação de xilose e também não afeta o balanço de NADPH/NADH, uma vez que a xilose é diretamente isomerizada a xilulose (Figura 17) (DEMEKE et al., 2013a). A xilulose em ambas as vias pode ser direcionada para a via das pentoses fosfatadas, e os produtos intermediários (gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato) podem ser utilizados na via Embden-Meyerhof-Parnas e na fermentação (Figura 17) (MADHAVAN et al., 2012).

A conversão de arabinose em etanol exige algumas etapas adicionais em relação à xilose. O transporte de arabinose em *S. cerevisiae* é realizado pela proteína transportadora *GAL2* (MADHAVAN et al., 2012). As enzimas arabinose isomerase, ribulocinase e ribulose-5-fosfato epimerase de *E. coli* podem ser expressas em *S. cerevisiae* para conversão da arabinose a xilulose-5-fosfato que é direcionada para a via das pentoses fosfatadas, via glicolítica e fermentação (Figura 17) (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). A outra via que pode ser expressa em *S. cerevisiae* para consumo da arabinose, presente em fungos, é mais complexa e demanda de 4 reações de oxirredução pelas enzimas aldose redutase, arabinitol-4-desidrogenase, xilulose redutase e xilitol desidrogenase (Figura 17) (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007b). Entretanto esta segunda via também pode afetar o balanço de NADPH/NADH da célula (MADHAVAN et al., 2012).

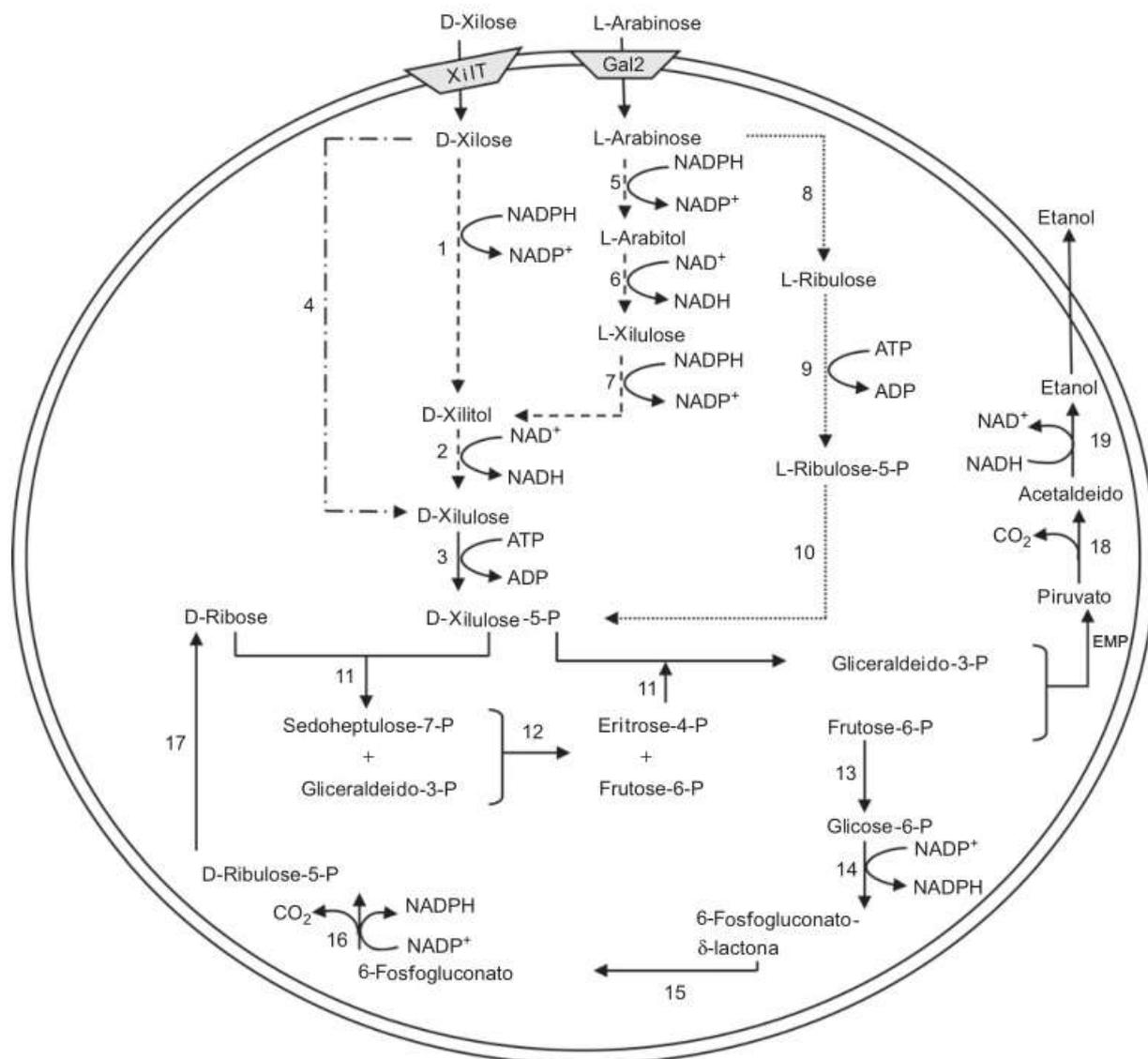


Figura 17: Rotas metabólicas das pentoses xilose e arabinose. Legenda: 1 – xilose redutase, 2 – xilitol desidrogenase, 3 – xilulocinase, 4 – xilose isomerase, 5 – aldose redutase, 6 – arabitól desidrogenase, 7 – xilulose redutase, 8 – arabinose isomerase, 9 – ribulocinase, 10 – ribulose-5-fosfato-4-epimerase, 11 - transcetolase, 12 – transaldolase, 13 – glucose-6-fosfato isomerase, 14 – glicose-6-fosfato desidrogenase, 15 – 6-fosfogliconolactonase, 16 – 6-fosfogliconato desidrogenase, 17 – ribose-5-fosfato cetoisomerase, 18 – piruvato descarboxilase, 19 – álcool desidrogenase, XilT – transportador de xilose, Gal2 – galactose permease, EMP – via Embden-Meyerhof-Parnas. Linhas pontilhadas representam as vias de bactérias, linhas tracejadas representam as vias de fungos e as linhas traçadas e pontilhadas representam a via da xilose isomerase presente em bactérias e alguns fungos. Fonte: adaptado de Madhavan et al., 2012.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir hidrolisados da casca de coco verde e seu mesocarpo utilizando alta carga de sólidos utilizando diferentes condições de pré-tratamento alcalino em regimes de batelada simples e alimentada, e avaliar a fermentabilidade dos mesmos utilizando linhagens de *S. cerevisiae* de processos de etanol 1G e 2G.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar os principais monossacarídeos nos hidrolisados do coco verde e do seu mesocarpo;
- Identificar possíveis inibidores de fermentação presentes nos hidrolisados do coco verde e do seu mesocarpo;
- Avaliar o efeito de diferentes condições de pré-tratamento alcalino na produção de hidrolisados lignocelulósicos do coco verde e de seu mesocarpo;
- Verificar a influência da utilização de bateladas simples e alimentada na produção de hidrolisados;
- Identificar modificações estruturais no mesocarpo em função do pré-tratamento e hidrólise;

- Avaliar a fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos utilizando cepas de *S. cerevisiae* industriais de etanol 1G e 2G.

3. PRODUÇÃO DE HIDROLISADO LIGNOCELULÓSICO DO MESOCARPO DE COCO VERDE POR BATELADA SIMPLES COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS

3.1. Introdução

Este item discorre sobre o uso da batelada simples com alta carga de sólidos, 18% (m/v) de ST em base de massa seca (MS), no pré-tratamento do mesocarpo do coco verde. O mesocarpo é a principal estrutura no coco, sendo formada pelas fibras e o pó da casca de coco (do inglês *pith*) (VAN DAM et al., 2004). Optou-se por utilizar apenas o mesocarpo do coco porque existem mais estudos a respeito desta estrutura, tais como a descrição de compostos fenólicos (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005), composição da lignina (RENCORET et al., 2013), composição do mesocarpo em diferentes estágios de desenvolvimento (VAN DAM et al., 2004); assim como o uso do mesocarpo ou apenas suas fibras para a produção de hidrolisados lignocelulósicos (ALBUQUERQUE, 2013; DING; HUI; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011).

O coco verde apresenta grande quantidade de açúcares solúveis, e durante o seu amadurecimento observa-se um aumento na quantidade de lignina e celulose (VAN DAM et al., 2006). A destoxificação após o pré-tratamento não foi realizada para evitar a perda dos açúcares solúveis, uma vez que estes são recuperados durante esta etapa do processo, e também para avaliar possíveis inibidores de fermentação presentes no coco verde. Além de possíveis inibidores comuns em processos de etanol 2G (e.g. ácido acético, furfural e HMF) (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), o coco é rico em ácidos fenólicos (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005). Foram monitorados 12 possíveis inibidores das enzimas celulolíticas e de fermentação durante a produção dos hidrolisados do mesocarpo do coco verde. Os parâmetros avaliados nos pré-tratamentos foram a concentração da solução de

NaOH, o tempo de retenção e a carga enzimática. O regime de SHF foi utilizado para um melhor detalhamento e compreensão da sacarificação e fermentação.

As fermentações dos hidrolisados sem destoxificação foram realizadas com duas cepas de levedura industriais, as *S. cerevisiae* Ethanol Red e *S. cerevisiae* GSE16-T18. A levedura *S. cerevisiae* Ethanol Red, é uma cepa de etanol 1G comercializada pela Fermentis/Lesaffre (França) e apresenta elevada resistência, alto rendimento em etanol, e viabilidade, mesmo em fermentações de alta gravidade. A cepa de etanol 2G, *S. cerevisiae* GSE16-T18, foi desenvolvida no *Laboratory of Molecular Cell Biology* da *Katholieke Universiteit Leuven* (Bélgica), sendo derivada da *S. cerevisiae* GSE16, e apresenta elevada fermentação de glicose, e xilose pela via da xilose isomerase, assim como resistência à inibidores de hidrolisados lignocelulósico (DEMEKE et al., 2013a, 2013b). A levedura *S. cerevisiae* GSE16 foi a primeira cepa industrial a fermentar xilose a etanol com elevados rendimentos (DEMEKE et al., 2013a).

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Extração do mesocarpo do coco verde e determinação de extrativos em água

Os frutos verdes utilizados neste estudo foram doados por comerciantes de Vitória (Espírito Santo). Os frutos de coco sem o albúmen líquido ($n = 40$, dividido em 2

bateladas de 20 frutos) foram lavados com água corrente. O mesocarpo do fruto foi extraído manualmente com uma faca de aço inoxidável dentada, e a biomassa foi reduzida em cubos entre 2 e 6 cm. Todo o mesocarpo foi utilizado. O mesocarpo foi seco a 105 °C em estufa com circulação de ar forçada até redução da umidade em menos de 5% (m/m), o que permitiu o uso subsequente do moinho de disco vibratório. O mesocarpo seco foi triturado em moinho de disco vibratório equipado com um conjunto de moagem de aço temperado por 90 segundos e velocidade de 1.100/min. A biomassa triturada foi padronizada em uma peneira de 212 µm, e o pó do mesocarpo do coco verde (PMC) foi armazenado a 4 °C. A primeira batelada foi utilizada nos experimentos A, B, C e D, e a segunda batelada no experimento E.

Os extrativos em água do PMC foram determinados conforme LEE et al. (2014). O PMC foi adicionado em frasco do tipo Erlenmeyer e adicionou-se 10 volumes de água ultrapura, o frasco foi fechado com rolha e mantido a 90 °C em banho ultratermostatizado por 2 h. A suspensão foi então filtrada e a biomassa foi seca a 105 °C para determinação dos sólidos sem extrativos, ao passo que a fração líquida foi mantida a -20 °C para a quantificação de açúcares.

3.2.2. Atividade enzimática

O coquetel enzimático AlternaFuel CMAX é composto de celulasas, β-glicosidases, hemicelulasas e arabinases, e foi gentilmente doado pela Dyadic International, Inc. (Estados Unidos). As atividades de papel de filtro e das celobiasas do coquetel enzimático foram determinadas conforme Ghose (1987) e são descritas a seguir.

A atividade de papel de filtro corresponde à atividade celulásica total, sendo expressa em unidades de papel de filtro por mL ou FPU/mL (do inglês *Filter Paper*

Cellulase Units). O método consiste na hidrólise de um substrato de celulose (papel filtro Whatman nº1 (GE Healthcare, Estados Unidos) pelo coquetel enzimático, seguido da quantificação de glicose liberada pelo método de determinação de açúcares redutores totais com ácido 3,5-dinitrosalicílico (reagente DNS). Reagiu-se 0,5 mL de coquetel enzimático em diferentes diluições com uma tira de papel filtro Whatman nº1 (GE Healthcare, Estados Unidos) de 50 mg em 1 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) a 50 °C por 1 h. A incubação ocorreu em banho ultratermostatizado. O tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) foi utilizado na diluição do coquetel enzimático. A reação enzimática foi interrompida pela adição 3 mL de reagente DNS e a reação colorimétrica ocorreu pelo aquecimento do meio reacional a 98 °C em banho ultratermostatizado por 5 min, sendo em seguida resfriada por 5 min em banho de gelo. Adicionou-se 20 mL de água ultrapura, homogeneizou-se em agitador vortex, e o meio reacional foi então centrifugado a 5000 xg por 10 min para remoção de particulados do papel de filtro. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm e a quantidade de açúcares redutores produzidos foi determinada a partir da curva padrão de glicose. Brancos da reação colorimétrica e dos extrato enzimáticos sem o substrato foram realizados. A concentração do coquetel enzimático necessária para liberar 2 mg de glicose foi determinada a partir de regressão linear, e o valor obtido foi utilizado na equação 1. O valor de 0,37 corresponde às unidades de enzima necessárias para se produzir 2 mg de glicose nas condições descritas no ensaio enzimático. A atividade do extrato enzimático foi de 78,7 FPU/mL.

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Concentração enzimática para produzir 2 mg de glicose}} \text{ unidades mL}^{-1} \quad (1)$$

A atividade da celobiase foi determinada pela produção de glicose a partir da hidrólise da celobiose, sendo expressa em atividade da celobiase por mL ou CB/mL (do inglês *Cellobiase activity*). Incubou-se 1 mL do coquetel enzimático em diferentes diluições por 5 min a 50 °C em banho ultratermostatizado. O tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) foi utilizado na diluição do coquetel enzimático. Adicionou-se 1 mL de 15 mM de celobiose diluída em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8), e a reação foi conduzida por 30 min a 50 °C. A reação foi interrompida por incubação a 98 °C por 5 min, sendo em seguida resfriada em banho de gelo por 5 min. O produto

da reação, a glicose, foi determinada com o kit de glicose oxidase/peroxidase, e a leitura ocorreu em espectrofotômetro no comprimento de onda de 505 nm. Brancos da reação colorimétrica e dos extrato enzimáticos sem substrato foram realizados. Obteve-se a concentração de enzima necessária para liberar 2 mg de glicose a partir de regressão linear, e aplicou-se a equação 2. O valor de 0,0926 corresponde às unidades de enzima necessárias para se produzir 1 mg de glicose nas condições descritas no ensaio enzimático. A atividade do extrato enzimático foi de 1322,9 CB/mL.

$$CB = \frac{0,0926}{\text{Concentração enzimática para produzir 1 mg de glicose}} \text{ unidades mL}^{-1} \quad (2)$$

3.2.3. Experimentos de pré-tratamento e sacarificação

Os experimentos de pré-tratamento e sacarificação (A, B, C, D e E) consistiram na identificação de parâmetros relevantes para a otimização do processo de conversão de açúcares do PMC, assim como avaliar a produção de potenciais inibidores de sacarificação e fermentação. O processo consistiu na impregnação da biomassa com solução alcalina, retenção da lama no reator por período específico, neutralização da lama, e sacarificação. Todos os pré-tratamentos ocorreram em temperatura ambiente (25 °C), e utilizou-se 18% (m/v) de ST (MS) no início dos pré-tratamentos. As soluções alcalinas utilizadas nos pré-tratamentos foram preparadas com NaOH.

Impregnação: esta etapa consistiu na homogeneização do PMC com a solução alcalina. Após a adição da solução alcalina e do PMC nos reatores (frasco Erlenmeyer), e uma rápida homogeneização foi realizada utilizando agitador

magnético. Os reatores foram então incubados em agitador do tipo orbital a 200 rpm e 25 °C por 1 h para garantir a completa homogeneização da biomassa. Diferentes soluções alcalinas foram utilizadas nos experimentos (Tabela 6).

Tempo de retenção: após a etapa de impregnação, a biomassa foi mantida em contato com a solução alcalina por diferentes tempos de retenção (Tabela 6). O pré-tratamento foi encerrado com a neutralização da lama com ácido sulfúrico concentrado, e o pH foi ajustado para 6,0. A lama pré-tratada não foi lavada antes da sacarificação. Amostras foram retiradas dos experimentos A e B para análise de solubilização de açúcares. Adicionou-se azida sódica na concentração de 0,02% (m/v) para prevenir possíveis contaminações microbianas durante a sacarificação (GONÇALVES et al., 2014).

Sacarificação: diferentes cargas enzimáticas foram utilizadas na sacarificação conforme a tabela 6. Os reatores foram mantidos a 200 rpm e 50 °C por 96 h. Em função das diferentes cargas enzimáticas (Tabela 6), água ultrapura estéril foi adicionada nos tratamentos de sacarificação com as menores cargas enzimáticas para evitar diferentes diluições dos hidrolisados. A adição da azida sódica, das enzimas celulolíticas e da água ultrapura estéril resultaram numa diluição dos ST de 18% (m/v) para cerca de 17% (m/v). Amostras foram retiradas para análise de açúcares e inibidores após a sacarificação (96 h) nos experimentos A, B, C e D. Amostras foram retiradas em diferentes tempos entre 0 e 96 h no experimento E para determinar o progresso da sacarificação. Os hidrolisados do experimento E foram utilizados nos experimentos de fermentação.

Tabela 6: Diferentes condições de pré-tratamento e sacarificação utilizadas nos experimentos A, B, C, D e E.

Experimento	Pré-tratamento (impregnação e tempo de retenção ^a)		Sacarificação
	Solução de NaOH, % (m/v)	Tempo de retenção no reator, horas	Carga enzimática, FPU/g de biomassa (MS)
A	1; 2; 3 e 4	24	15
B	2	0; 1; 2; 4; 6; 8; 12 e 24	15
C	2	0 e 2	15; 7,5 e 3,75
D	1;2; 3 e 4	0	15 e 7,5
E ^b	1	0	15 e 7,5

^aTempo de retenção no reator após 1 h da etapa de impregnação.

^bExperimento utilizado para as curvas de sacarificação e fermentação.

3.2.4. Cepas e produção de inóculo

As cepas *S. cerevisiae* Ethanol Red *MATa/α* e *S. cerevisiae* GSE16-T18 *MATa/α* foram utilizadas nos experimentos de fermentação. O meio de cultura YEPD foi utilizado na produção de inóculos. A composição do YEPD foi de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de D-glicose. As fontes de carbono e nitrogênio foram autoclavadas (121 °C por 20 min) em separado, e foram misturadas quando as soluções atingiram temperatura ambiente para evitar a reação de Maillard. Esta reação ocorre entre aminoácidos e os carboidratos redutores que compõe o meio de cultura, e pode resultar na alteração da composição do mesmo. As condições de crescimento aeróbico foram 30 °C e 200 rpm.

3.2.5. Fermentação dos hidrolisados do mesocarpo do coco verde (HMC) utilizando cepas de etanol 1G e 2G

O pH dos HMC do experimento E foram ajustados para 5,5 utilizando 4 M de NaOH ou ácido sulfúrico concentrado. Adicionou-se ureia na concentração de 2 g/L como fonte de nitrogênio nos hidrolisados. As culturas de *S. cerevisiae* Ethanol Red e *S. cerevisiae* GSE16-T18 foram obtidas por centrifugação (3000 xg, 5 min e 4 °C), e as células lavadas com água ultrapura estéril, o processo foi realizado em duplicata. As cepas foram inoculadas na densidade óptica de 600 nm (DO600) de 1.

As fermentações foram realizadas em condições semi-anaeróbicas em vials de vidro de 20 mL com septo de politetrafluoretileno e silicone, o septo foi preso ao vial com tampa com abertura central. A liberação do CO₂ da fermentação ocorreu via agulha com algodão na parte superior e a ponta inferior inserida no septo. Os reatores foram previamente esterilizados em autoclave (121 °C por 20 min). Os reatores foram continuamente agitados com barra magnética a 100 rpm e 35 °C. A fermentação foi monitorada por perda de peso, decorrente da produção de CO₂, em balança analítica com resolução de 0,1 mg entre 0 e 103 h. Amostras foram retiradas para a quantificação de etanol em 103 h.

As curvas de fermentação de *S. cerevisiae* GSE16-T18 foram iniciadas na DO600 de 4, e foram realizada sem condições semi-anaeróbicas em frascos reagente com uma saída lateral inferior conectada à um tubo de silicone para amostragem. Na abertura superior do frasco reagente foi colocada uma rolha com um capilar preenchido de algodão para evitar o acúmulo de CO₂ produzido durante a fermentação. Os reatores foram previamente esterilizados em autoclave (121 °C por 20 min). Os reatores foram continuamente agitados com barra magnética a 100 rpm a 35 °C. Amostras de fermentação foram retiradas entre 0 e 72 h para análise de açúcares e produtos de fermentação.

3.2.6. Análise de açúcares, inibidores e produtos de fermentação

As amostras obtidas durante os experimentos de extrativos em água, pré-tratamento, sacarificação e fermentação foram centrifugadas a 10000 \times g por 10 min, e o sobrenadante filtrado em 0,22 μ m. As amostras filtradas foram diluídas utilizando água ultrapura quando necessário. Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C antes das análises.

A cromatografia líquida de alta eficiência por troca de ligantes (do inglês *High-performance Ligand-exchange Liquid Chromatography* ou *HPLEC*) foi utilizada para confirmar os açúcares, e a cromatografia por exclusão iônica (do inglês *Ion Exclusion Chromatography* ou *IELC*) foi utilizada como método padrão. A *IELC* foi utilizada porque as amostras de hidrolisado de coco contêm impurezas como proteínas, sais e subprodutos da lignina que podem danificar rapidamente a coluna cromatográfica utilizada na *HPLEC*. O método utilizado na *IELC* não separa manose, xilose e galactose, e a manose foi escolhida como padrão por ser mais representativa nas amostras.

A *HPLEC* foi realizada num sistema Waters (Waters Corporation, Estados Unidos) composto por uma bomba isocrática Waters 1515 conectada em um degaseificador em linha Waters AF, um detector por índice de refração Waters 2414 e um amostrador automático Waters 717 plus. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Bio-Rad Aminex HPX-87P (300 \times 7,8 mm) (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos) mantida em um módulo aquecedor de coluna Waters a 85 °C. As pré-colunas utilizadas foram duas Bio-Rad Micro-Guard De-Ashing (30 \times 4,6 mm) e uma Micro-Guard Carbo-P (30 \times 4,6 mm) (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos), sendo mantidas em temperatura ambiente e conectadas na coluna analítica. Água ultrapura filtrada em 0,22 μ m foi utilizada como fase móvel, e o fluxo foi de 0,6 mL/min. A aquisição e integração de dados foi realizada no programa Waters Breeze 3.30 SPA. Os padrões utilizados foram: D-celobiose, D-glicose, D-xilose, D-manose, D-galactose e L-arabinose.

Os seguintes compostos foram verificados por *IELC*: D-celobiose, D-glicose, D-manose, L-arabinose, glicerol, etanol, HMF e furfural. Utilizou-se o mesmo sistema Waters da *HPLC*. Entretanto, a coluna utilizada foi uma Waters Ion Exclusion (7,8 × 300 mm) (Waters Corporation, Estados Unidos) mantida a 75 °C. A pré-coluna Waters IC-Pak Ion Exclusion (Waters Corporation, Estados Unidos) foi conectada na coluna analítica e mantida em temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ na concentração de 5 mM, e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. A quantificação de ácidos fracos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) foi realizada utilizando os mesmos sistema Waters e coluna cromatográfica, entretanto o fluxo foi reduzido para 0,6 mL/min, e a coluna foi mantida a 45 °C (XIE et al., 2011).

Compostos fenólicos foram determinados por espectrofotometria conforme o método proposto por Escarpa e González (2001). Homogeneizou-se 500 µL de amostra, 500 µL de reagente Folin Ciocalteu e 10 mL de 1 M de Na₂CO₃; a reação foi então mantida no escuro em temperatura ambiente por 1 h. O produto da reação colorimétrica foi lido em 750 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão por ser um composto fenólico representativo para ácidos hidroxibenzóicos (ESCARPA; GONZÁLEZ, 2001), e o mesocarpo do coco é naturalmente rico em ácido 4-hidroxibenzóico (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005).

Os ácidos fenólicos foram quantificados conforme o método descrito por Vanbeneden; Delvaux; Delvaux (2006), sendo baseado em cromatografia líquida por fase reversa (do inglês *Reverse Phase Liquid Chromatography* ou *RP-HPLC*), entretanto utilizou-se um espectrofotômetro no UV-Visível no lugar de um detector eletroquímico. O sistema Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão) de *RP-HPLC* consistiu de bomba por gradiente binário Shimadzu LC-20AB, um detector UV-Visível Shimadzu SPD-20A e um amostrador automático SIL-HTA. O conjunto de colunas utilizado foi uma Macherey-Nagel Nucleosil 100-10 C₁₈ (250 × 4 mm) e uma pré-coluna Macherey-Nagel Nucleosil 100-10 C₁₈ (8 × 4 mm) (Macherey-Nagel, Alemanha), ambas as colunas foram mantidas em temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi uma solução de 745/245/10 (v/v/v) de água ultrapura/metanol/ácido fosfórico, e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. A aquisição e integração de dados foi realizada no programa Shimadzu LCsolution 1.25. Os padrões utilizados foram: ácido 4-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido p-

coumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico e vanilina. O comprimento de onda utilizado para o ácido p-coumárico foi de 310 nm e 280 nm para os demais ácidos fenólicos.

3.2.7. Microscopia eletrônica de varredura

O mesocarpo do coco, o PMC e amostras após o pré-tratamento e sacarificação do experimento E foram secas a 50 °C. As amostras foram colocadas em *stubs* de microscopia eletrônica de varredura de alumínio (\varnothing 12mm) cobertos por meio de adesivos de carbono (Electron Microscopy Sciences, Estados Unidos). As amostras foram metalizadas com uma camada de aproximadamente 5 nm de platina (Quorum Q150T ES, Quorum Technologies, Reino Unido). As imagens foram obtidas utilizando sistema Zeiss Auriga Crossbeam (Carl Zeiss AG, Alemanha) sob alto vácuo e operado entre 1,5 e 3 kV.

3.2.8. Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso em duplicata.

3.3. Resultados e discussão

Diferentes processos foram investigados utilizando uma alta carga de sólidos de 18% (m/v) de ST (MS) em regime de batelada simples na produção de hidrolisados do PMC visando elevadas concentrações de açúcares. As fibras e o pó do mesocarpo não foram separadas. O mesocarpo do coco é composto de 30% (m/v) de fibras e 70% (m/v) de pó; e o pó do mesocarpo do coco verde (6-7 meses) possui uma quantidade substancial de extrativos (VAN DAM et al., 2004). O PMC utilizado neste estudo apresentou uma elevada quantidade de extrativos em água ($49 \pm 2,1\%$, m/m), sendo que 44,1% (m/m) da composição dos extrativos foram açúcares, sendo: $23,9 \pm 0,07\%$ (m/m) de glicose, $12,8 \pm 0,06\%$ (m/m) de manose, $3 \pm 0,2\%$ (m/m) de celobiose, e $4,4 \pm 0,2\%$ (m/m) de arabinose. A fração de celulose e hemicelulose foi previamente descrita por GONÇALVES et al. (2014), sendo de $32,9 \pm 0,9\%$ (m/m) de celulose e $26,5 \pm 0,5\%$ (m/m) de hemicelulose.

O pré-tratamento foi realizado em temperatura ambiente para evitar a formação de inibidores (GONÇALVES et al., 2015), assim como a degradação de açúcares. O pré-tratamento alcalino apresentou resultados promissores na produção de hidrolisados da casca e palha de arroz (CABRERA et al., 2014). A remoção ou redução de subprodutos do pré-tratamento é importante para evitar efeitos inibitórios na sacarificação e fermentação (CAVKA; JÖNSSON, 2013; XIMENES et al., 2011). Entretanto, a etapa de destoxificação também pode resultar em um processo mais complexo, elevado consumo de água e energia, e perda de açúcares solúveis dos extrativos em água do PMC. Portanto, a destoxificação da lama pré-tratada não foi realizada neste trabalho, e a produção de potenciais inibidores foi monitorada em paralelo. Os processos de pré-tratamento e sacarificação foram concebidos de forma simples, tendo em vista a aplicação industrial.

3.3.1. Experimento A: efeito da solução de NaOH na produção de hidrolisados

Soluções de NaOH com concentrações entre 1 e 4% (m/v) foram utilizadas no pré-tratamento do PMC (Tabela 6). Pré-tratamentos com soluções com menos de 1% (m/v) de NaOH ou mesmo água geralmente resultam em menor conversão da lignocelulose em açúcares fermentescíveis, e portanto não foram utilizadas neste estudo (MCINTOSH; VANCOV, 2011; REZENDE et al., 2011; YAMASHITA et al., 2010). Os pré-tratamentos alcalinos resultaram em uma considerável solubilização de açúcares (celbiose, glicose, manose e arabinose) do PMC (Figura 18A). O uso da solução a 1% (m/v) de NaOH resultou no maior rendimento em açúcares, $30,2 \pm 0,03$ g de açúcares/100 g de biomassa (MS), e a concentração de açúcares foi de $5,1 \pm 0,004\%$ (m/v) (Figura 18A). A produção de açúcares foi 28,1% maior do que o máximo teórico possível de açúcares da fração de extrativos do PMC, que era de 21,7 g de açúcares/100 g de biomassa (MS). A produção de açúcares acima do esperado sugere uma parcial solubilização da hemicelulose pelo pré-tratamento alcalino. A solubilização da hemicelulose do coco por solução alcalina também foi observada por Van Dam et al. (2004).

O aumento da concentração da solução de NaOH na etapa de pré-tratamento afetou a solubilização de açúcares de forma diferente, houve um decréscimo nas concentrações de glicose e manose, e um pequeno aumento nas concentrações de celbiose e arabinose (Figura 18A). As altas concentrações de açúcares solubilizados pelo pré-tratamento (Figura 18A) sugerem que a destoxificação deve ser evitada para não ocorrer a perda de açúcares.

Enzimas comerciais foram então utilizadas para a conversão de açúcares estruturais da celulose e hemicelulose do PMC (Figura 18B). A sacarificação resultou num aumento de cerca de 2% (m/v) de glicose e 1% (m/v) de manose, resultando em hidrolisados com mais de 8% (m/v) de açúcares. A quantidade de açúcares convertidos pela sacarificação foi similar entre os diferentes pré-tratamentos, apesar da quantidade de glicose e manose decrescer com o aumento da concentração da

solução de NaOH (Figura 18B). O pré-tratamento com a solução a 1% (m/v) de NaOH seguido de sacarificação resultou em $8,7 \pm 0,1\%$ (m/v) de açúcares, enquanto que a solução a 4% (m/v) de NaOH resultou em $7,7 \pm 0,2\%$ (m/v) de açúcares (Figura 18B). A degradação de açúcares durante o pré-tratamento alcalino também foi observada quando se utilizou a folha e caule de milho (ZHU; WAN; LI, 2010). Adicionalmente, subprodutos da lignina podem inibir as células resultando em uma menor concentração de açúcares (XIMENES et al., 2011). O processo com solução a 1% (m/v) de NaOH resultou em maiores níveis de açúcares após o pré-tratamento e sacarificação (Figuras 18A e 18B), e o rendimento em açúcares foi de $51,6 \pm 0,7$ g de açúcares/100 g de biomassa (MS) utilizada no pré-tratamento. O coco verde demonstrou um rendimento de sólidos baixo (38,4%) após o pré-tratamento com $\text{Alc-H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$ (GONÇALVES et al., 2014). O rendimento de sólidos se refere a biomassa recuperada após o pré-tratamento. O presente trabalho demonstrou que é possível produzir uma elevada quantidade de açúcares baseada na quantidade inicial de biomassa utilizando um pré-tratamento brando e sem a etapa de destoxificação. Em adição, o uso da solução a 1% (m/v) de NaOH também resulta em menor consumo de ácido na etapa de neutralização que ocorre após o pré-tratamento.

Quantificou-se inibidores formados durante o pré-tratamento, e como esperado, as concentrações de ácidos fracos e compostos fenólicos aumentaram em função do aumento da concentração de NaOH (Figuras 19A e 19B). Estes resultados corroboram com outros estudos que demonstraram que a concentração de inibidores nos hidrolisados é dependente do tipo de biomassa e condições de pré-tratamento (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). O ácido acético é produzido pela deacetilação da hemicelulose durante o pré-tratamento (VAN DER POL et al., 2015). O ácido fórmico é obtido da degradação do HMF e furfural, e a degradação do HMF também pode resultar em ácido levulínico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Entretanto, não foram detectados os ácido levulínico, HMF e furfural neste estudo (Figura 19A). O ácido fórmico pode ter sido formado pela degradação de polissacarídeos, o que está de acordo com a redução de açúcares e aumento da concentração de NaOH (Figuras 18B e 19A). O uso da alta de sólidos resultou em uma considerável produção de ácidos fracos (ácido acético e ácido fórmico), entre

0,55 e 0,66% (m/v) (Figura 19A). Valores similares foram reportados apenas para hidrolisados de bagaço submetido ao pré-tratamento ácido (MARTINEZ et al., 2001).

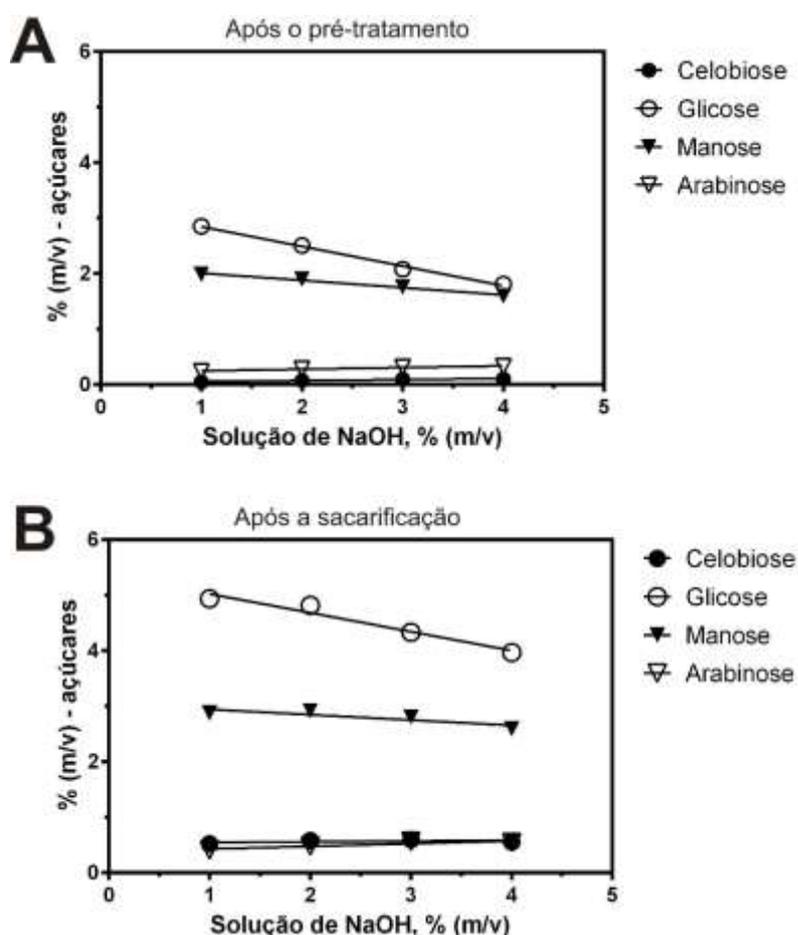


Figura 18: Efeito da solução de NaOH na produção de hidrolisados do PMC. Açúcares na fração líquida (A) após diferentes pré-tratamentos e sem sacarificação, e (B) após a sacarificação do PMC.

Os compostos fenólicos são derivados da despolimerização da lignina (VAN DER POL et al., 2015), degradação de açúcares (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013); assim como podem ser naturalmente encontrados na biomassa, tal como o mesocarpo do coco (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005). Além dos inibidores comuns em hidrolisados lignocelulósicos, o mesocarpo do coco é rico em alguns fenólicos específicos, especialmente o ácido 4-hidroxibenzóico (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005). Portanto, tais inibidores foram quantificados durante a produção dos hidrolisados do PCM. A concentração de ácido 4-hidroxibenzóico aumentou proporcionalmente com a concentração da solução de NaOH utilizada no pré-tratamento (Figura 19B). Outros ácidos fenólicos do mesocarpo do coco foram menos afetados ou não detectados (Figura 19B). A

severidade do pré-tratamento também resultou numa maior concentração de compostos fenólicos no hidrolisado (Figura 19A). A diferença entre os compostos fenólicos (Figura 19A) e os fenóis ácidos (Figura 19B) sugere a presença de outros compostos aromáticos além dos identificados neste estudo.

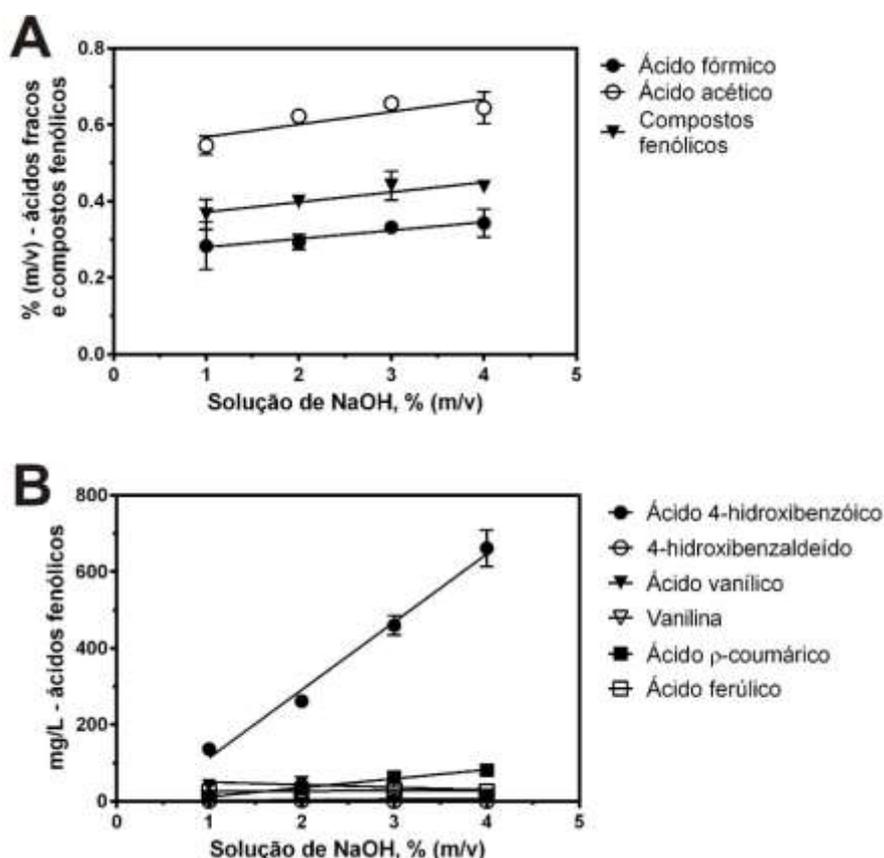


Figura 19: Efeito da solução de NaOH na produção de hidrolisados do PMC. (A) Inibidores e (B) ácidos fenólicos na fração líquida após diferentes pré-tratamentos no PMC. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

A redução de potenciais inibidores também foi priorizada durante o melhoramento do processo deste estudo, uma vez que podem ocorrer efeitos sinérgicos entre diferentes inibidores (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A remoção de inibidores por lavagem resulta em considerável perda de biomassa solubilizada durante o pré-tratamento, conforme observado no pré-tratamento do coco verde com Alc-H₂O₂/NaOH (GONÇALVES et al., 2014). Além disso, a destoxificação da biomassa após o pré-tratamento inviabilizou o uso de 18% (m/v) de ST (MS) na sacarificação, porque resultou em um hidrolisado pastoso e homogeneização deficiente (Apêndice A). A solubilização da biomassa pelo pré-tratamento e a não destoxificação foram necessárias para o emprego da alta carga de sólidos na

sacarificação do PMC. A sacarificação da biomassa pré-tratada e destoxificada foi possível com a carga de sólidos de 10% (m/v) (Apêndice B), porém a concentração de glicose ($2,2 \pm 0,2\%$, m/v) obtida após a sacarificação foi de apenas 44,5% (m/m) se comparada com o pré-tratamento sem com destoxificação com solução a 1% (m/v) de NaOH e 18% (m/v) de ST (MS) (Figura 18A).

3.3.2. Experimento B: efeito da duração do pré-tratamento na produção do hidrolisado

A duração do pré-tratamento (tempo de retenção) foi outro parâmetro avaliado na produção de hidrolisados do PMC (Tabela 6). Após a impregnação do PMC com a solução alcalina, as lamas foram mantidas por diferentes tempos de retenção antes da neutralização com ácido. A impregnação da biomassa ocorreu por 1 h para assegurar a homogeneização da biomassa e a solução alcalina. O uso de 18% (m/v) de ST (MS) foi o máximo possível no sistema do presente estudo. Cargas de sólidos superiores a 18% (m/v) de ST (MS) resultaram em hidrolisados pastosos e homogeneização deficiente (Apêndice C). Possivelmente, uma maior carga de sólidos ou uma rápida impregnação da lama possam ser empregadas utilizando diferentes tipos de reatores ou surfactantes para reduzir a viscosidade da lama (MODENBACH; NOKES, 2013). A concentração de solução a 2% (m/v) de NaOH foi escolhida porque os resultados foram similares à solução a 1% (m/v) de NaOH no experimento A (Figura 18B).

A etapa de impregnação (0 h, sem tempo de retenção) foi suficiente para solubilizar açúcares do PMC (Figura 20A). Em geral, a duração do pré-tratamento exerceu pouco efeito nos açúcares (Figuras 20A e 20B), e observou-se uma pequena

redução na concentração dos açúcares com o aumento do tempo de retenção. A sacarificação resultou num aumento de 2,6% (m/v) de glicose e 1,1% (m/v) de manose (Figuras 20A e 20B), estes resultados demonstram que apenas o pré-tratamento não foi capaz de degradar os açúcares estruturais, sendo necessário o uso de enzimas celulolíticas para a conversão da hemicelulose e também da celulose.

Entretanto, a intensificação do tempo de residência aumentou a concentração dos inibidores, e o ácido acético foi o inibidor mais abundante (Figuras 21A e 21B). A maior produção de ácido acético pela deacetilação da hemicelulose do coco também foi observada em condições mais severas de tempo de retenção e temperatura em pré-tratamento hidrotérmico (GONÇALVES et al., 2015). O efeito do tempo de retenção foi mais acentuado quando combinado com altas temperaturas em pré-tratamento hidrotérmico do coco para a produção de hidrolisados com mais açúcares (GONÇALVES et al., 2015). O pré-tratamento hidrotérmico do coco com tempo de retenção de 50 min em comparação ao pré-tratamento com tempo de retenção de 10 min resultou em um aumento da fração de celulose em função da maior remoção da hemicelulose (GONÇALVES et al., 2015). Entretanto, o uso de altas temperaturas neste estudo foi evitado, pois objetivou-se estudar o efeito do pré-tratamento em temperatura ambiente. Quando eliminado o tempo de retenção, a concentração de açúcares foi 7,9% superior se comparado com o pré-tratamento com tempo de retenção de 24 h (Figura 20B), e uma quantidade inferior de inibidores foi produzida (Figuras 20C e 20D).

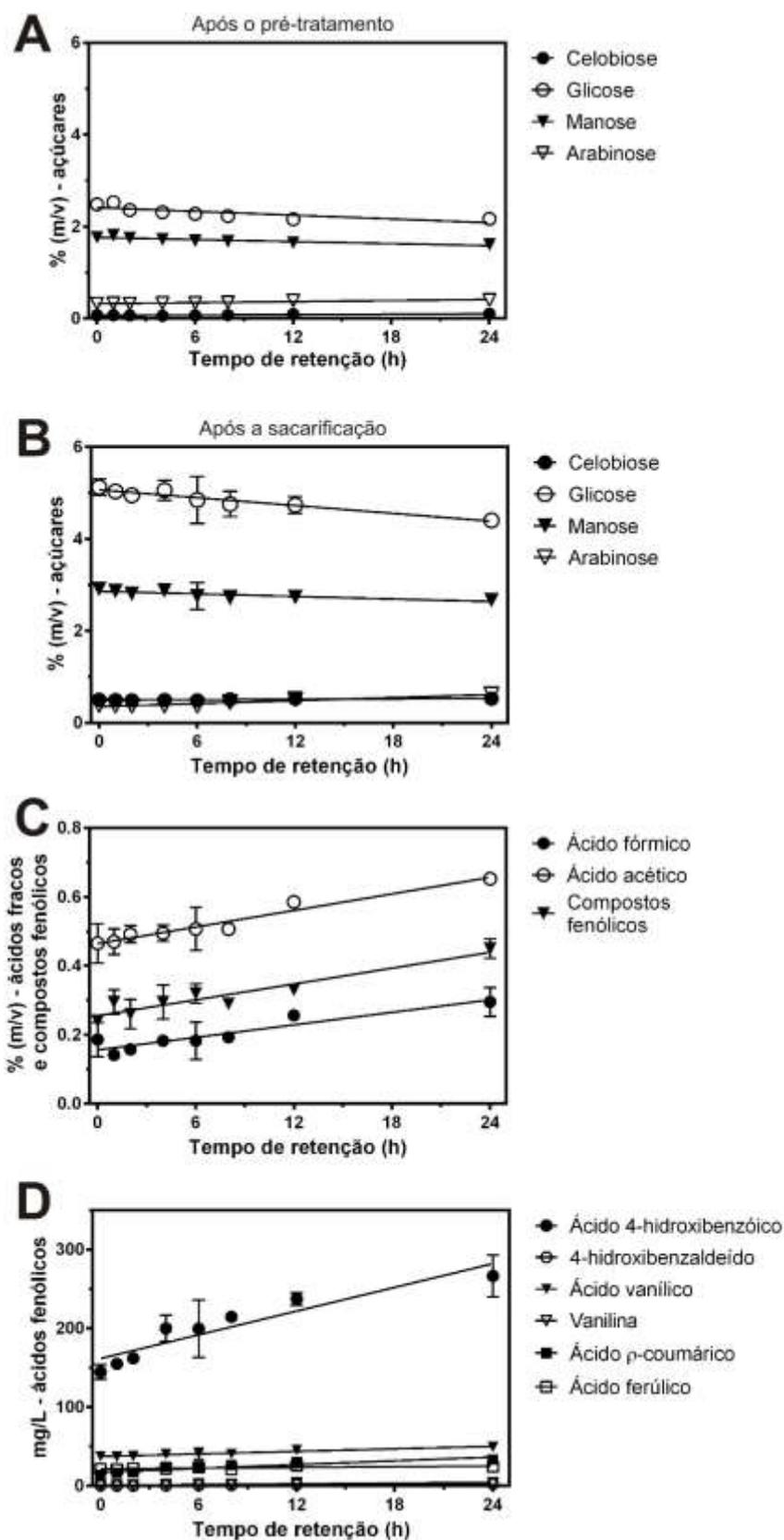


Figura 20: Efeito do tempo de retenção na produção de hidrolisados do PMC. Açúcares na fração líquida (A) após diferentes pré-tratamentos e sem sacarificação, e (B) após a sacarificação do PMC. (C) Inibidores e (D) ácidos fenólicos na fração líquida após diferentes pré-tratamentos no PMC. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

3.3.3. Experimentos C e D: efeitos de diferentes condições de pré-tratamento e sacarificação na produção de hidrolisados

A redução da dosagem de enzimas comerciais e a duração da sacarificação são as razões principais para se investigar e otimizar processos de pré-tratamento (ALVIRA et al., 2010). O efeito combinado da carga enzimática e do tempo de retenção foi avaliado na produção de hidrolisados do PMC (Tabela 6). A sacarificação foi realizada utilizando diferentes concentrações de enzimas comerciais (15; 7,5 e 3,75 FPU/g de biomassa, MS). A carga de enzima de 15 FPU/g de biomassa (MS) é comumente utilizada na produção de hidrolisados lignocelulósicos, entretanto alguns estudos já demonstraram a possibilidade de reduzir a carga enzimática em processos que utilizam altas cargas de sólidos (MODENBACH; NOKES, 2013).

A maior carga enzimática resultou num aumento na conversão de açúcares da biomassa, especialmente glicose e manose (Figura 21). Entretanto, a redução da carga enzimática não reduziu a conversão de açúcares na mesma magnitude; e.g. o uso de metade da carga enzimática (7,5 FPU/g de biomassa, MS) no pré-tratamento sem tempo de retenção resultou em uma redução de 9,4% na conversão de açúcares (Figura 21).

As concentrações de açúcares decresceram com a intensificação do tempo de retenção (Figura 21). Geralmente, a intensificação das condições de pré-tratamento (e.g. tempo de retenção, temperatura e concentração de álcali) melhora a sacarificação (MCINTOSH; VANCOV, 2011). Contudo, pré-tratamentos comumente priorizam modificações na matriz lignocelulósica para se obter uma alta conversão da celulose, e a fração solubilizada da biomassa após o pré-tratamento é removida antes da sacarificação (TIAN et al., 2010). Por outro lado, a intensificação de parâmetros num processo com alta carga de sólidos e não destoxificação sugeriram que um pré-tratamento mais brando é uma melhor alternativa, uma vez que observou-se uma menor degradação de açúcares, e como consequência um hidrolisado com maior concentração final de açúcares.

A inibição de celulases ocorre principalmente por açúcares derivados da xilose (KIM et al., 2011), entretanto as hexoses foram mais representativas nos HMC. Os compostos fenólicos são outros potenciais inibidores de celulases, que podem inativar ou precipitar β -glicosidades (XIMENES et al., 2011). Estes compostos estavam presentes nos HMC (Figuras 19A, 19B, 20A e 20B). Para uma mesma condição de pré-tratamento (e.g. sem tempo de retenção) o uso de mais enzimas resultou em mais açúcares (Figura 21), o que sugere a inibição ou desativação das celulases pelos compostos fenólicos. Entretanto, adsorção em lignina, inibição por açúcares e outros compostos do PMC não podem ser desconsiderados. Um experimento final foi realizado para investigar a dosagem enzimática e a concentração da solução de NaOH.

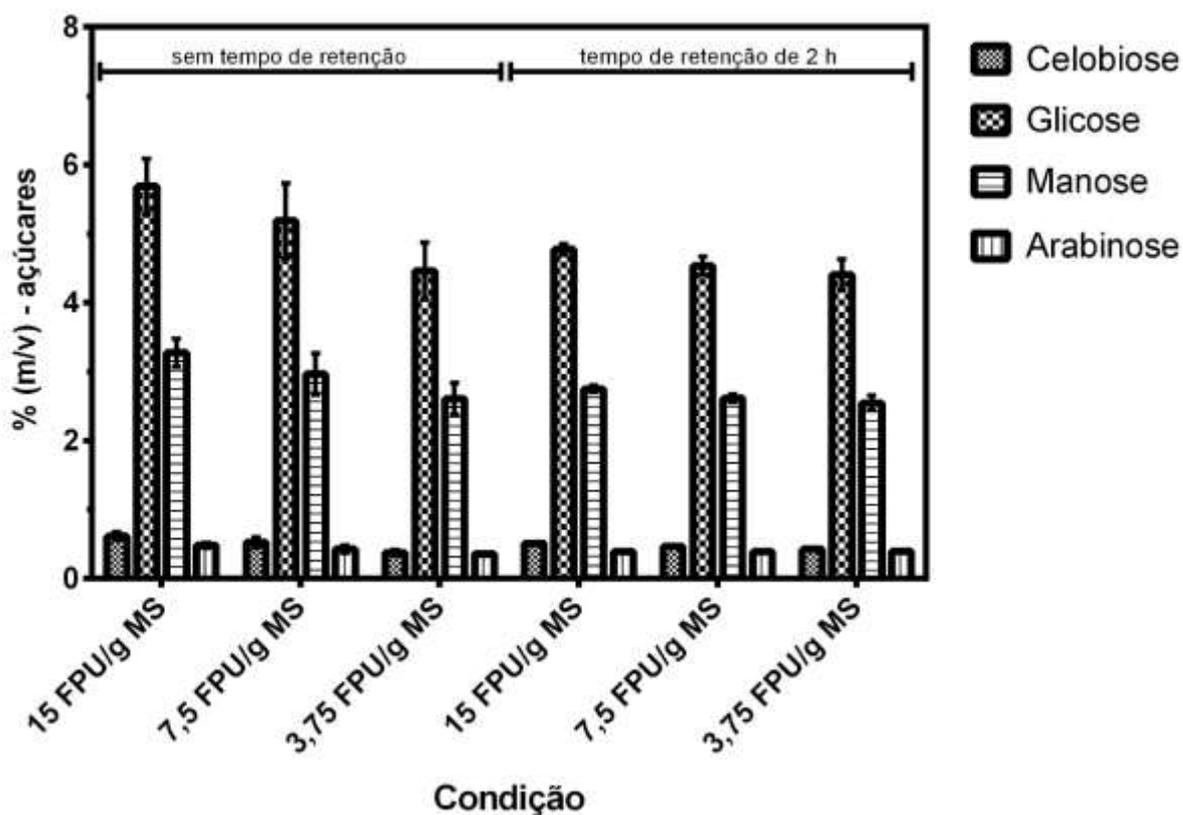


Figura 21: Conversão de açúcares do PMC após diferentes pré-tratamentos e cargas de enzimas durante a sacarificação. O PMC na concentração de 18% (m/v) de ST (MS) foi pré-tratado com solução a 2% (m/v) de NaOH em diferentes condições de tempo de retenção.

As dosagens de 15 e 7,5 FPU/g de biomassa (MS) foram baseadas no experimento C. O PMC foi pré-tratado com soluções de NaOH nas concentrações a 1, 2, 3 e 4% (m/v), e sem o tempo de retenção (Tabela 6). A sacarificação com 7,5 FPU/g de biomassa (MS) resultou numa concentração de açúcares 7,1% menor quando

comparada com a carga de 15 FPU/g de biomassa (MS) (Figura 22). Os resultados sugerem ausência de correlação entre a concentração da solução de NaOH e a carga enzimática na conversão de açúcares (Figura 22). A carga de enzimas foi o parâmetro mais importante, enquanto que o aumento da concentração da solução de NaOH não melhorou a sacarificação (Figuras 18B e 22).

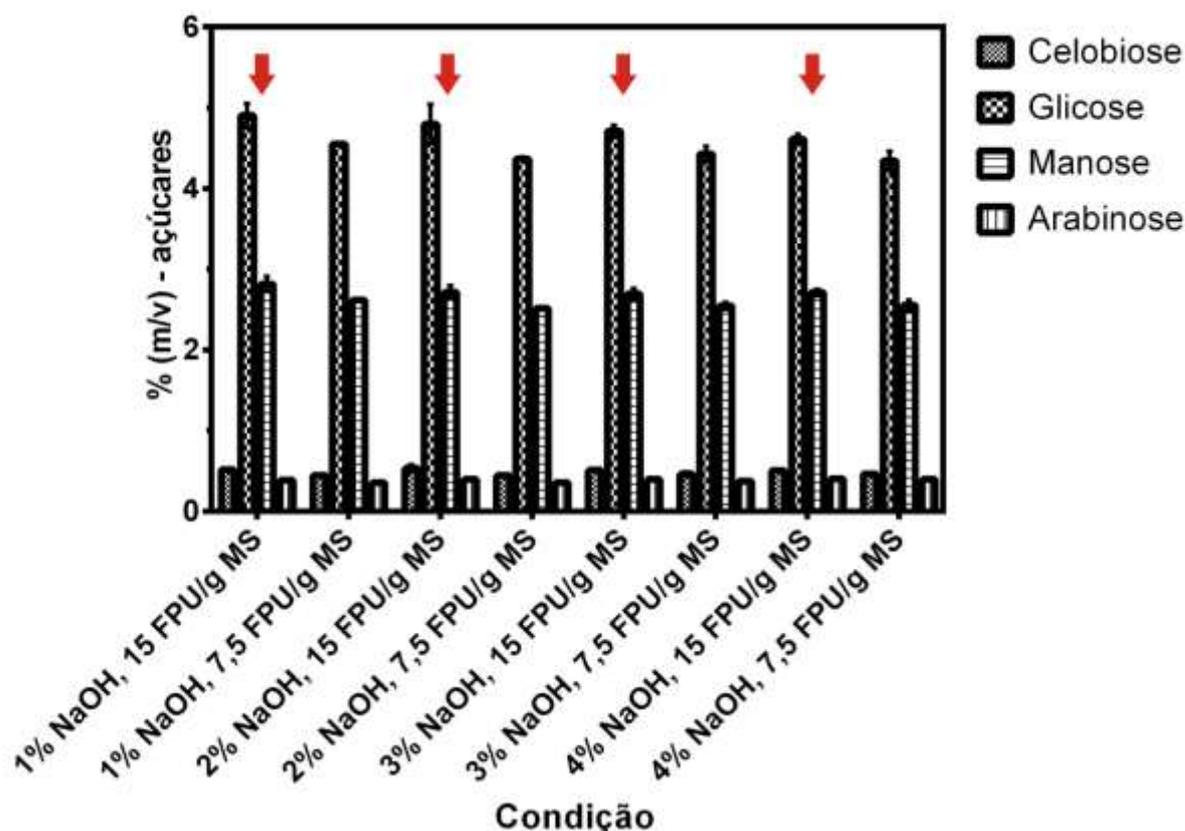


Figura 22: Conversão de açúcares do PMC após diferentes pré-tratamentos e cargas de enzimas durante a sacarificação. Os tratamentos utilizando a carga enzimática 15 FPU/g de biomassa (MS), indicados por setas vermelhas, resultaram em uma maior produção de açúcares se comparados com os tratamentos com 7,5 FPU/g de biomassa (MS).

Após os experimentos de otimização foi possível reduzir a duração do pré-tratamento de 25 h (1 h de tempo de retenção e mais 24 h de tempo de retenção) para 1 h sem afetar o rendimento em açúcares. A figura 23 demonstra a eficiência dos experimentos A e D, sendo possível confirmar que as mudanças nos parâmetros não afetaram consideravelmente a eficiência do processo inicial em comparação ao processo otimizado. As reduções da concentração da solução alcalina e do tempo de retenção no pré-tratamento resultaram em menor produção de ácido acético (Figuras 19A e 20C). Os compostos fenólicos foram o segundo principal grupo de

inibidores nos hidrolisados, e a eliminação do tempo de retenção foi um parâmetro importante para a redução destes inibidores (Figuras 20A e 20B).

A concentração da solução a 1% (m/v) de NaOH foi escolhida porque consome menos base e ácido para sua neutralização, produz menos ácido acético (Figura 19A), e mais açúcares (18B e 22). O processo inicial utilizando 15 FPU/g de biomassa (MS) resultou em um rendimento de açúcares de $51,6 \pm 0,7$ g de açúcares/100 g de biomassa (MS), enquanto que os processos otimizados (sem tempo de retenção) resultaram em rendimento de açúcares de $50,3 \pm 1,1$ e $46,3 \pm 0,05$ g de açúcares/100 g de biomassa (MS) utilizando 15 e 7,5 FPU/g de biomassa (MS), respectivamente (Figura 23). Conversões de biomassa na faixa de 50% são comuns em experimentos utilizando alta carga de sólidos, mesmo quando pré-tratamentos mais intensos são utilizados, como a explosão a vapor ou extrusão a 100 °C (MODENBACH; NOKES, 2013). Embora o uso da alta carga de sólidos resulte em altas concentrações de açúcares, o rendimento em açúcares diminui em função da inibição e adsorção de celulasas, e alta viscosidade da lama (MODENBACH; NOKES, 2013).

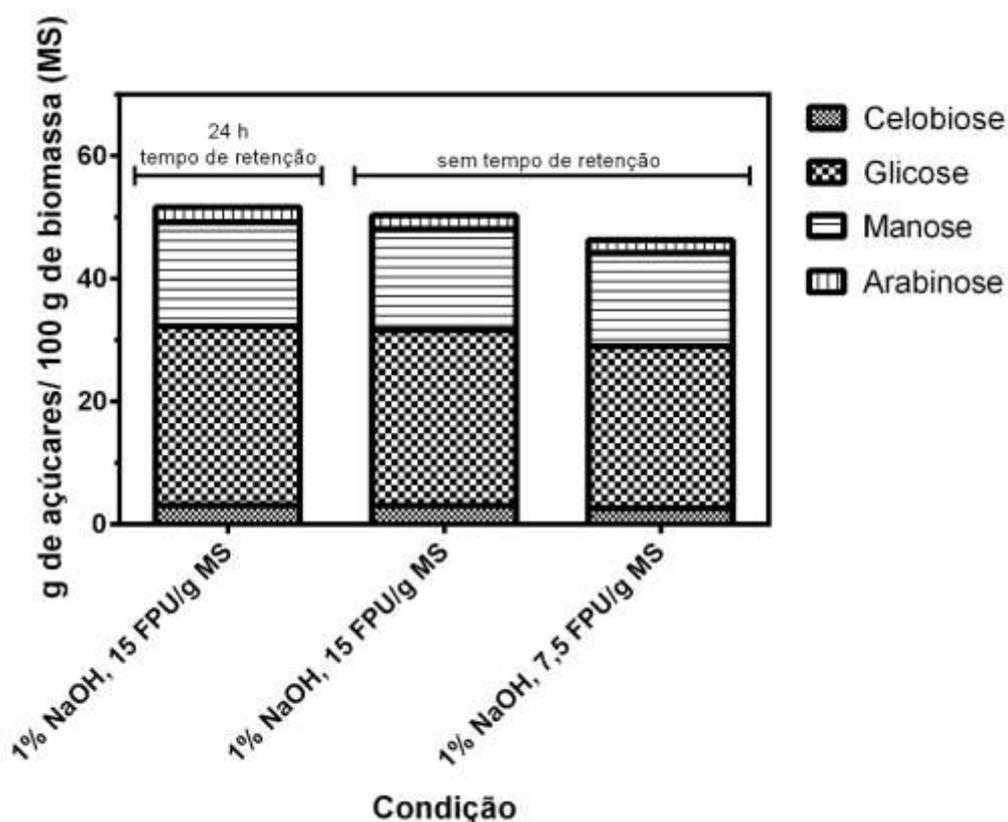


Figura 23: Eficiência de diferentes pré-tratamentos e sacarificação do PMC.

3.3.4. Curvas de sacarificação da produção de hidrolisados utilizando diferentes cargas enzimáticas

A solução a 1% (m/v) de NaOH e as cargas enzimáticas de 15 e 7,5 FPU/g de biomassa (MS) foram utilizadas para a produção de hidrolisados de PMC para a curva de sacarificação, modificações estruturais (microscopia eletrônica de varredura) e experimentos de fermentação. O uso de 15 e 7,5 FPU/g de biomassa (MS) resultaram em $7,52 \pm 0,04$ e $7,34 \pm 0,1\%$ (m/v) de açúcares, respectivamente (Figura 24). A concentração de glicose aumentou nas primeiras 4 h da sacarificação e chegou ao máximo em 48 h (Figura 24). A concentração de manose aumentou substancialmente (Figura 24), ao passo que as concentrações de arabinose e celobiose mantiveram-se quase que inalteradas (dados não reportados). A alta conversão de açúcares nas primeiras horas de sacarificação pode ser devido à mudanças na superfície específica da biomassa, e consumo preferencial da celulose amorfa que é facilmente digerida em comparação com a celulose cristalina (CABRERA et al., 2014). Outra possibilidade é que a não destoxificação da lama por lavagem após o pré-tratamento preserva pequenas partículas de celulose, que são mais fáceis de converter do que partículas de celulose maiores (MODENBACH; NOKES, 2013).

Curvas de sacarificação reportadas neste estudo (Figura 24) apresentaram uma rápida conversão, sendo similares à curvas de sacarificação do coco submetido aos pré-tratamentos Alc-H₂O₂/NaOH e hidrotérmico (GONÇALVES et al., 2014, 2015). Entretanto, em ambos os casos reportados na literatura a fração líquida foi removida após o pré-tratamento, e apenas os sólidos foram utilizados na sacarificação (GONÇALVES et al., 2014, 2015). A não destoxificação neste estudo evitou a perda de açúcares, e juntamente com uso de uma alta de sólidos resultaram em hidrolisados com mais açúcares (Figura 24). Outros trabalhos reportaram concentrações de glicose entre 1-2% (m/v) (GONÇALVES et al., 2014, 2015), ou quantidades de açúcares inferiores a 1% (m/v) (ALBUQUERQUE, 2013; BUJANG et al., 2013; DING; HII; ONG, 2012; LOSS, 2011). Além da maior produção de açúcares, as cargas enzimáticas utilizadas neste trabalho foram menores do que a

carga enzimática de 30 FPU/g de biomassa (MS) reportada em outros estudos com coco para a produção de hidrolisados (GONÇALVES et al., 2014, 2015).

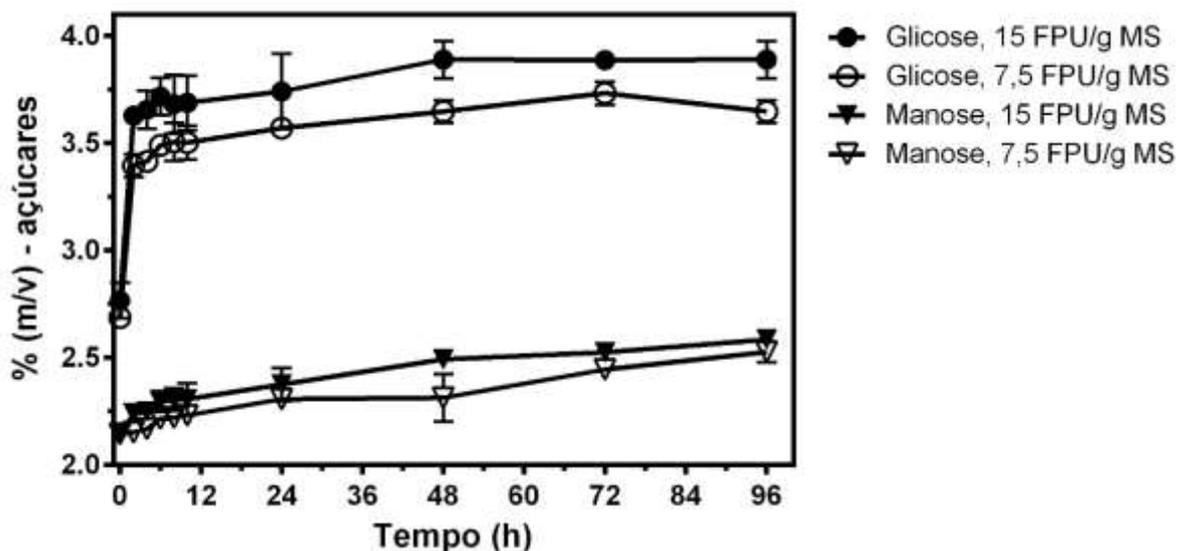


Figura 24: Produção de glicose e manose em função do tempo durante a sacarificação do PMC utilizando diferentes cargas de enzimas.

3.3.5. Efeitos de pré-tratamento e sacarificação na morfologia do pó do mesocarpo de coco

As fibras do mesocarpo de coco são envoltas pelo pó do mesocarpo (VAN DAM et al., 2004). O pó do mesocarpo consiste de um tecido parenquimatoso elástico parecido com a cortiça, sendo também o componente principal desta estrutura do fruto (VAN DAM et al., 2004). Observa-se na figura 25A as cavidades (estruturas circulares) distribuídas ao longo da fibra, e também vários cristais localizados sobre as cavidades da fibra (Figura 25A). Estes cristais estão presentes como óxidos nas plantas e conferem rugosidade à superfície da fibra (NANAYAKKARA; ISMAIL;

WIJESUNDARA, 2005). O pré-tratamento alcalino aparentemente afetou mais as células parenquimatosas do pó do mesocarpo do que as fibras do mesocarpo (Figura 25B). O pó do mesocarpo do coco é composto de células com parede celular delgada (VAN DAM et al., 2004), ao passo que as células da fibra do mesocarpo do coco são espessas e lignificadas (NANAYAKKARA; ISMAIL; WIJESUNDARA, 2005).

Após a sacarificação, observou-se o aumento da rugosidade da fibra, e menor presença de células parenquimatosas do pó do mesocarpo presentes na superfície das fibras, as bordas das cavidades também foram parcialmente degradadas e os cristais foram removidos expondo a câmara da cavidade (Figura 25C). O meio das fibras é composto de células com alto teor de celulose, e são cercadas por células esclerenquimatosas espessas e lignificadas (NANAYAKKARA; ISMAIL; WIJESUNDARA, 2005); provavelmente este arranjo protege as fibras das enzimas celulolíticas. Como esperado, a expansão da fibra não ocorreu em ausência de altas pressões e temperaturas. Condições severas talvez resultem na remoção da lignina ou exposição das partes internas da fibra às enzimas celulolíticas, resultando numa hidrólise da biomassa. Entretanto, o pó do mesocarpo é o componente principal desta da parte do coco, e sofreu modificações durante o pré-tratamento e sacarificações propostos neste estudo (25B e 25C).

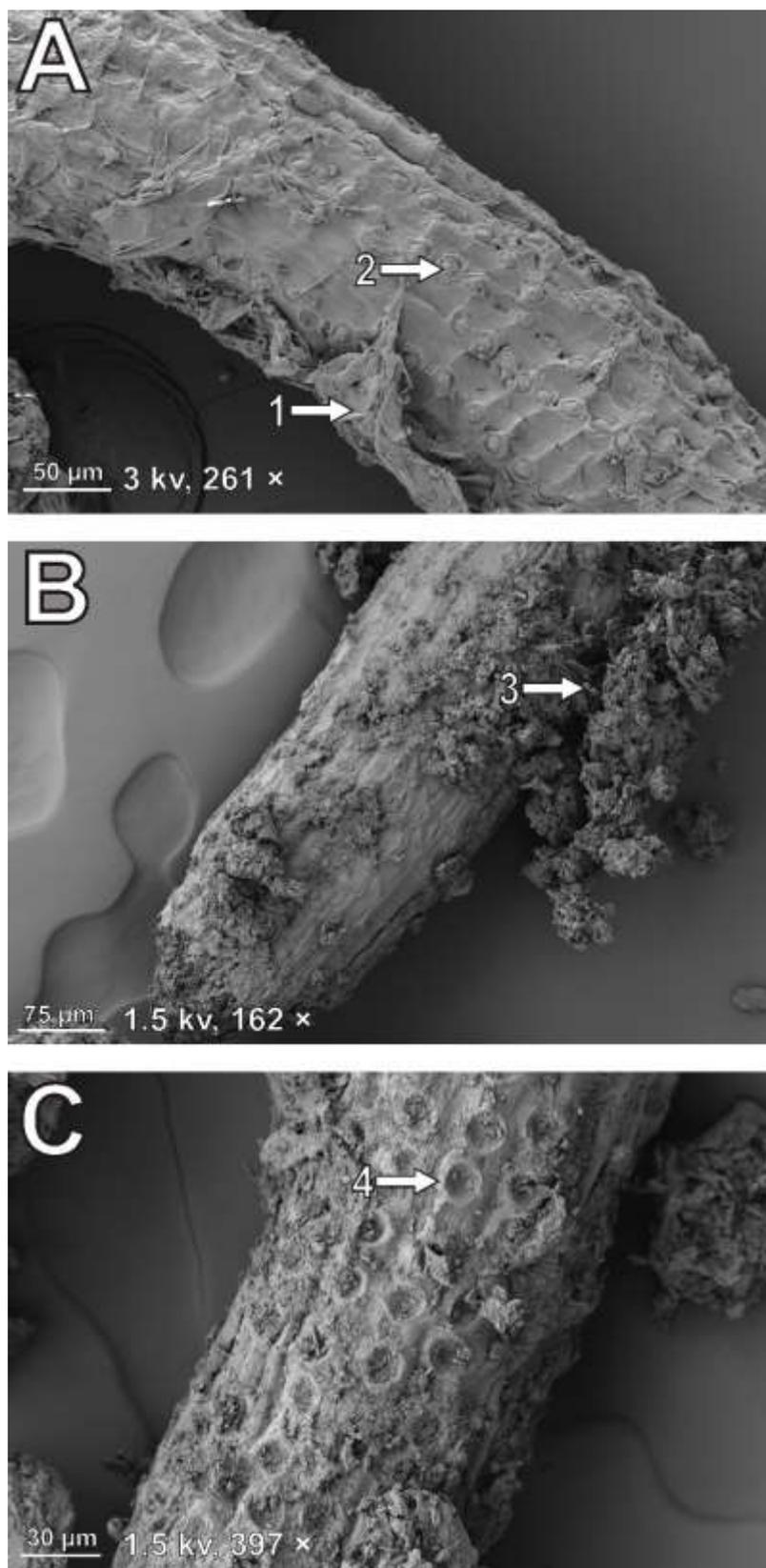


Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura do PMC. (A) pó do mesocarpo (1) e a fibra com as cavidades em sua superfície (2); (B) pré-tratado utilizando solução a 1% (m/v) de NaOH com uma substancial modificação no pó do mesocarpo (3); e (C) digerido pelas enzimas celulolíticas com modificações na estrutura da cavidade da fibra (4). O PMC na concentração de 18% (m/v) de ST (MS) foi pré-tratado com solução a 1% (m/v) de NaOH. A sacarificação foi realizada por 96 h a 50 °C, e a carga enzimática foi de 15 FPU/g de biomassa (MS).

3.3.6. Fermentação dos HMC por cepas de levedura de etanol 1G e 2G

Após a otimização e produção de hidrolisados do PMC, a fermentabilidade dos hidrolisados foi avaliada utilizando duas cepas industriais de *S. cerevisiae*, Ethanol Red e GSE16-T18. As glicose e manose representaram 90,1% dos açúcares presentes no HMC, e ambas hexoses são naturalmente fermentadas por cepas de *S. cerevisiae* (MADHAVAN et al., 2012). O perfil fermentativo dos HMC foi similar para ambas as cepas (Figuras 27A e 27B), mas a cepa de etanol 2G, GSE16-T18, foi melhor do que a Ethanol Red (Figura 26A e 26B). Os perfis fermentativos não apresentaram uma fase *lag* significativa, confirmando que os hidrolisados não foram tóxicos para as cepas avaliadas (Figuras 26A e 26B). O uso de diferentes cargas enzimáticas também não afetou a produção de etanol (Figura 26B). Após a fermentação, foram analisados os açúcares remanescentes por *HPLC* para separar manose e xilose. O HMC continha uma pequena quantidade de xilose ($0,4 \pm 0,3\%$, m/v) em comparação às hexoses, e a xilose foi consumida por GSE16-T18 e não por Ethanol Red, resultando assim em uma maior produção de etanol.

Os perfis de fermentação utilizando a cepa GSE16-T18 demonstraram a cofermentação de glicose e manose. A glicose, mas não a manose, foi completamente consumida em 3 h (Figuras 27A e 27B). A produção de etanol chegou ao platô em 18 h (Figuras 27A e 27B). O consumo completo de manose em hidrolisados lignocelulósicos por cepas de *S. cerevisiae* já foi reportado (DEMEKE et al., 2013a, 2013b). O hidrolisado de abeto não foi tóxico para a fermentação de manose por *S. cerevisiae* GSE16 (DEMEKE et al., 2013b), e a GSE16-T18 é derivada desta cepa.

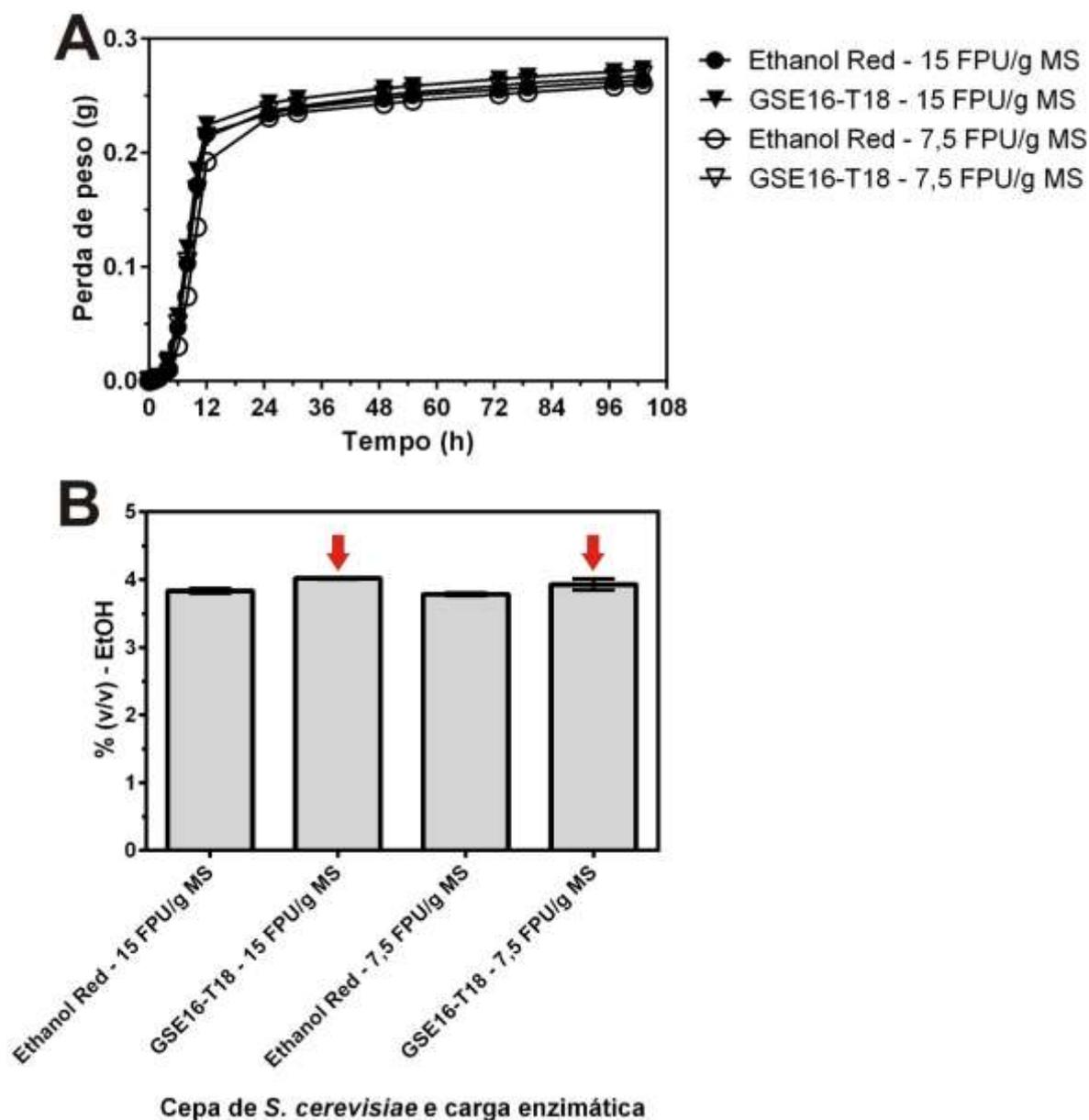


Figura 26: Perfil fermentativo e produção de etanol de diferentes cepas em HMC. (A) Fermentação do HMC utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae*. A perda de peso (produção de CO₂) foi medida em fermentações semi-anaeróbicas do HMC a 35 °C, pH 5,5. (B) Etanol produzido utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae* após 103 h de fermentação. A cepa GSE16-T18 apresentou maiores concentrações finais de etanol (setas vermelhas) em comparação com a Ethanol Red.

A produção de etanol e o consumo de manose terminaram ao mesmo tempo (Figuras 27A e 27B), o que sugere retroinibição em função do acúmulo do etanol, sozinho ou em sinergismo com outros inibidores do HMC (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Outro monossacarídeo que pode resultar num melhor rendimento em etanol é a arabinose. A levedura *S. cerevisiae* GSE16-T18 possui uma via heteróloga de fermentação de arabinose, entretanto esta não é funcional

(DEMEKE et al., 2013a, 2013b). Portanto a arabinose não foi consumida durante a fermentação (Figuras 27A e 27B).

Como os primeiros resultados de fermentação dos HMC (Figuras 26A e 26B), a produção de etanol foi similar demonstrando que a redução da carga enzimática de 15 para 7,5 FPU/g de biomassa (MS) resultou em uma redução de 2,4% no rendimento em etanol (Tabela 7). A concentração máxima de etanol obtida por *S. cerevisiae* GSE16-T18 foi de $3,73 \pm 0,2\%$ (v/v) (Tabela 7). Diferentes hidrolisados de coco já foram fermentados com sucesso por cepas de *S. cerevisiae*, *S. stipitis* e *Z. mobilis* com produção de etanol entre 0,7 e 1% (m/v) (GONÇALVES et al., 2014, 2015). Estes resultados demonstraram que o coco é uma biomassa potencial para etanol 2G, entretanto o processo proposto no presente estudo apresentou uma maior produção de etanol. Em adição, considerando a rápida fermentação (Figuras 27A e 27B), e o rápido pré-tratamento (Figura 20B) e sacarificação (Figura 24) descritas no presente trabalho, é hipoteticamente possível realizar o processo do baseado em SSF (pré-tratamento até a sacarificação) entre 24 e 48 h.

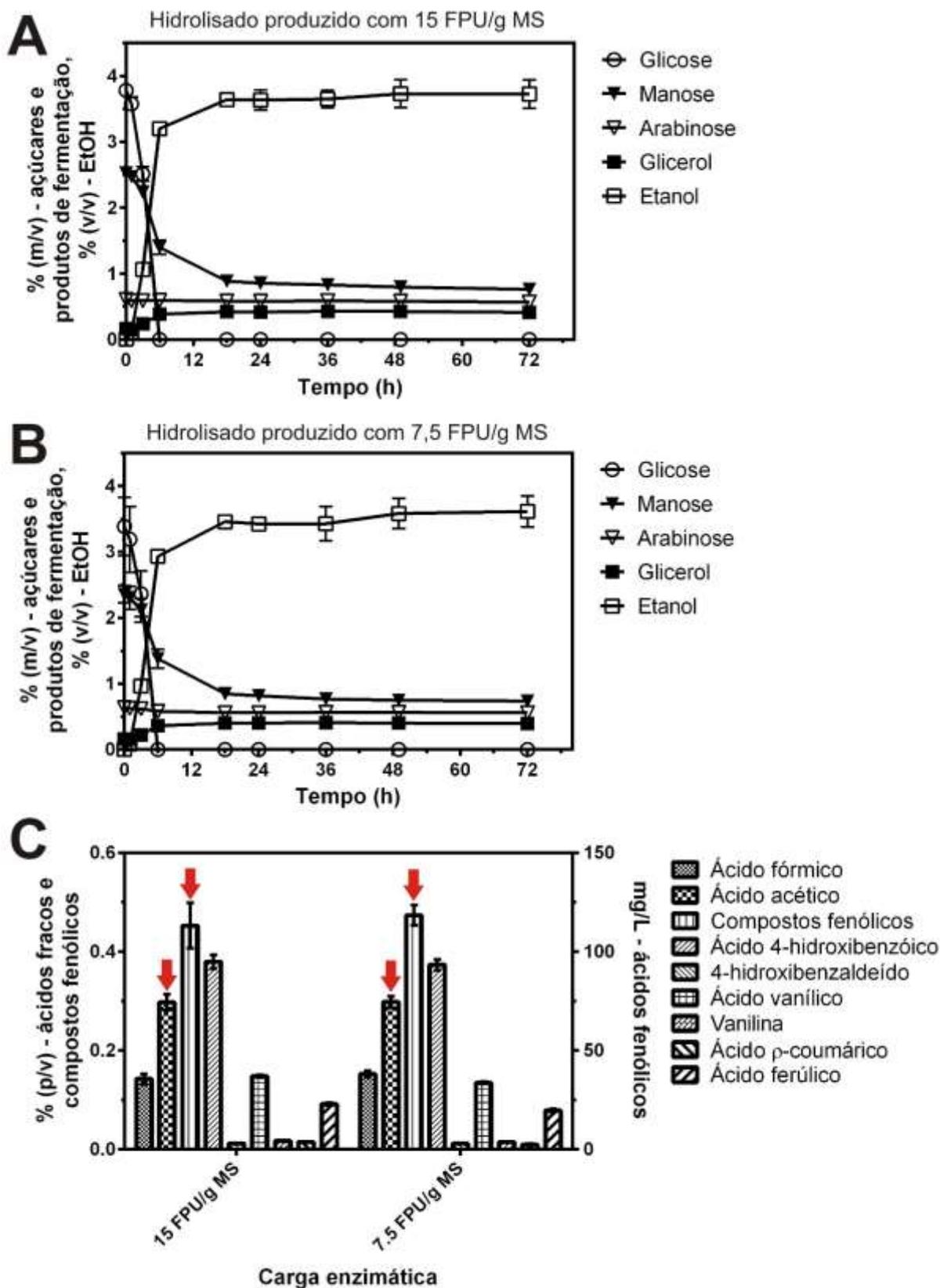


Figura 27: Perfil fermentativo da *S. cerevisiae* GSE16-T18 em HMC. O HMC foi obtido de processos de sacarificação utilizado as cargas enzimáticas de (A) 15 e (B) 7,5 FPU/g de biomassa (MS). Fermentações do HMC foram conduzidas em condição de semi-anaerobiose a 35 °C, pH 5,5. (C) Inibidores de fermentação na fração líquida após diferentes sacarificações do PMC. Setas vermelhas

indicam os principais inibidores (ácido acético e compostos fenólicos) presentes nos PMC. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

Tabela 7: Etanol e açúcares residuais da fermentação utilizando *S. cerevisiae* GSE16-T18. Os HMC foram obtidos de sacarificações que utilizaram as cargas de enzimas de 15 e 7,5 FPU/g de biomassa (MS).

Parâmetro	Carga enzimática, FPU/ g de ST			
	15	15	7,5	7,5
Máximo EtOH, % (v/v)	3,58	3,88	3,50	3,78
Rendimento em EtOH, (g EtOH/ g açúcares*)	0,40	0,45	0,40	0,49
Glicose residual, % (m/v)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Manose residual, % (m/v)	0,75	0,78	0,73	0,75
Arabinose residual, % (m/v)	0,56	0,58	0,56	0,56

n.d. – não detectado

*glicose, manose e arabinose

3.4. Conclusões

Demonstrou-se que o PMC é uma biomassa promissora para a produção de etanol. A otimização do processo com alta carga de sólidos possibilitou um alto rendimento em açúcares e uma concentração de etanol entre 3,6 e 3,7% (m/v). A carga de enzimas foi o parâmetro mais importante do pré-tratamento e sacarificação, e a sua redução de 15 para 3,75 FPU/g de biomassa (MS) afetou consideravelmente a produção de açúcares. A destoxificação não foi requerida porque o pré-tratamento solubilizou uma grande quantidade de açúcares. Em encerramento, foi proposto no presente estudo um processos simples para a produção de etanol a partir do PMC; sendo condizente com a realidade dos países produtores de coco.

4. PRODUÇÃO DE HIDROLISADO LIGNOCELULÓSICO DO COCO VERDE E SEU MESOCARPO UTILIZANDO BATELADA ALIMENTADA COM ALTA CARGA DE SÓLIDOS

4.1. Introdução

O presente estudo reporta o uso da batelada alimentada com alta carga de sólidos no pré-tratamento e sacarificação do coco. Além do uso do mesocarpo do coco verde, optou-se por utilizar todo o fruto neste estudo. O coco verde apresenta um albúmen sólido com pouco teor de óleo, sendo que apenas o coco maduro é utilizado na produção de óleo, leite de coco e coco ralado. O coco com 7 meses (verde) apresenta um albúmen sólido com aproximadamente 1,9% (m/m) de óleo, e o fruto aos 11 meses (maduro) possui cerca de 10% (m/m) (LIANG et al., 2014).

O uso do coco verde inteiro, apenas sem o albúmen líquido (água de coco), elimina a necessidade do fracionamento do fruto para a obtenção do mesocarpo. As remoções do epicarpo e do mesocarpo são tradicionalmente feitas de forma manual para a produção da copra do coco maduro (VAN DAM, 2002). Entretanto, encontram-se máquinas para as remoções do epicarpo e mesocarpo do coco maduro no Brasil. O coco verde, por sua vez, ainda não apresenta o endocarpo completamente desenvolvido e o fracionamento do fruto deve ser realizado manualmente. São encontrados equipamentos brasileiros para a trituração do coco verde inteiro, mas não para o fracionamento do fruto em suas estruturas.

O coco verde e o mesocarpo do coco verde foram utilizados neste estudo em processos baseados em bateladas alimentadas de pré-tratamento e sacarificação. O reator é alimentado gradativamente na batelada alimenta nas etapas de pré-tratamento e sacarificação; desta forma pode-se controlar a quantidade de sólidos

no reator, e evitar a formação de hidrolisados com alta viscosidade (CHANDRA et al., 2011). Em geral, a carga de sólidos máxima em uma batelada simples é de 20% (m/v) de ST (MS) (MODENBACH; NOKES, 2012), ao passo que a batelada alimentada permite 30% (m/v) de ST (MS) (MODENBACH; NOKES, 2013).

Os pré-tratamentos alcalinos foram realizados em temperatura ambiente, e a destoxificação da lama não foi realizada para preservar os açúcares solubilizados durante o pré-tratamento. A fermentação e a sacarificação ocorreram separadamente (*SHF*) para um melhor detalhamento de cada etapa do processo. As leveduras *S. cerevisiae* Ethanol Red e *S. cerevisiae* GSE16-T18 foram utilizadas para avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos do coco verde e também do seu mesocarpo.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Processamento do coco verde e extração do seu mesocarpo

Os frutos verdes utilizados neste estudo foram doados por comerciantes de Vitória (Espírito Santo). Os frutos de coco sem o albúmen líquido ($n = 10$) foram lavados em água corrente. Os frutos foram reduzidos em trituradora de coco TRC40 (Metalúrgica Trapp, Brasil). O coco foi seco a 105 °C em estufa com circulação de ar forçada até redução da umidade em menos de 5% (m/m), para que o uso do moinho de disco vibratório fosse possível. O coco seco foi triturado em moinho de disco vibratório equipado com um conjunto de moagem de aço temperado por 90 segundos com

uma velocidade de 1.100/min. O pó do coco foi padronizado com uma peneira de 212 µm e armazenado a 4 °C. A determinação dos extrativos em água ocorreu conforme item 3.2.1. Os frutos verdes ($n = 20$ frutos) utilizados na extração do mesocarpo também foram doados por comerciantes de Vitória (Espírito Santo). A extração do mesocarpo ocorreu conforme item 3.2.1.

4.2.2. Extrativos em etanol do coco inteiro

A determinação dos extrativos em etanol foi realizada conforme LEE et al. (2014). Parte do pó do coco verde (PCV) foi submetida ao processo de extração com etanol. O PCV foi colocado em frasco Erlenmeyer e adicionou-se 10 volumes de etanol 95% (v/v), os frascos foram fechados com rolha, e mantidos a 78 °C em banho ultratermostatizado por 2 h. A fração sólida foi recuperada por filtração em papel filtro Whatman nº1 (GE Healthcare, Estados Unidos) e seca a 75 °C até peso constante. O pó do coco verde sem extrativos (PCV-E) foi armazenado a 4 °C.

4.2.3. Atividade enzimática

O coquetel enzimático AlternaFuel CMAX composto de celulasas, β-glicosidases, hemicelulasas e arabinases, foi gentilmente doado pela Dyadic International, Inc.

(Estados Unidos). As atividades de papel de filtro e das celobiasas do coquetel enzimático foram determinadas conforme Ghose (1987) e são descritas no item 3.2.2. As atividades foram de 90,2 FPU/mL e 1322,9 CB/mL.

4.2.4. Experimento de pré-tratamento e sacarificação do PCV utilizando batelada simples

O PCV foi misturado com diferentes soluções de NaOH até a concentração de 18% (m/v) de ST (MS) em frascos Erlenmeyer. Utilizou-se soluções de NaOH nas concentrações de 1 e 2% (m/v). Realizou-se uma rápida homogeneização utilizando agitador magnético. Os reatores foram então incubados em agitador do tipo orbital a 200 rpm e 25 °C por 1 h para garantir a completa homogeneização da biomassa. Após esta etapa de impregnação, a agitação foi desligada e a lama foi prontamente neutralizada ou deixada em repouso por 2 h (tempo de retenção). O pré-tratamento foi encerrado com a neutralização da lama com ácido sulfúrico concentrado, e o pH foi ajustado para 6,0. A lama pré-tratada não foi lavada antes da sacarificação. Amostras foram retiradas para análise de solubilização de açúcares pelos diferentes pré-tratamentos. Adicionou-se azida sódica na concentração de 0,02% (m/v) para prevenir possíveis contaminações microbianas durante a sacarificação (GONÇALVES et al., 2014). A sacarificação ocorreu a 200 rpm e 50 °C por 96 h, e a carga de enzimas foi de 15 FPU/g de biomassa (MS). A adição da azida sódica e das enzimas celulolíticas resultaram numa diluição dos ST de 18% (m/v) para cerca de 17% (m/v). Amostras foram retiradas para análise de açúcares e inibidores após a sacarificação (96 h).

4.2.5. Experimentos de pré-tratamento e sacarificação do PCV, PCV-E e o PMC utilizando batelada alimentada

Os PMC e PCV foram misturados com soluções a 1 e 2% (m/v) de NaOH até 12,5 e 15% (m/v) de ST (MS) em frascos Erlenmeyer. Realizou-se uma rápida homogeneização utilizando agitador magnético. Os reatores foram então incubados em agitador do tipo orbital a 200 rpm e 25 °C por 1 h para garantir a completa homogeneização da biomassa. Os sólidos foram recuperados por centrifugação (3000 xg por 5 min) e mantidos a 50 °C por 24 h para a redução da umidade. O licor (fração líquida) foi utilizado para pré-tratar mais PMC ou PCV nas respectivas concentrações de 12,5 e 15% (m/v) de ST (MS), resultando em uma carga total de 25 ou 30% (m/v) TS (MS) no pré-tratamento. Soluções alcalinas frescas foram utilizadas para completar o volume do licor. O pré-tratamento ocorreu nas mesmas condições da primeira carga de sólidos. O pré-tratamento foi encerrado após a neutralização da lama com ácido sulfúrico concentrado, e o pH foi ajustado para 6,0. Adicionou-se azida sódica na concentração de 0,02% (m/v) para prevenir possíveis contaminações microbianas durante a sacarificação (GONÇALVES et al., 2014). A sacarificação ocorreu a 200 rpm e 50 °C, e a carga de 15 FPU/g de biomassa (MS) foi utilizada. Após 24 h de sacarificação, as biomassas secas da primeira carga foram adicionadas aos respectivos reatores juntamente com uma carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa (MS). A reação foi conduzida por mais 72 h, totalizando 96 h. O pH foi ajustado após a adição da segunda carga de biomassa e enzima. A adição da azida sódica e das enzimas celulolíticas resultaram numa diluição dos ST de 25 e 30% (m/v) para aproximadamente 24 e 29% (m/v), respectivamente. Após a sacarificação, amostras foram retiradas para a análise de açúcares e inibidores.

As curvas de sacarificação foram realizadas com os PMC, PCV e PCV-E conforme os procedimentos supracitados. Entretanto, utilizou-se apenas a solução a 1% (m/v) de NaOH, e a carga de sólidos foi de 30% (m/v) de ST (MS), sendo dividida em duas cargas de 15% (m/v) de ST (MS). A segunda carga de sólidos ocorreu após 48 h da sacarificação, pois utilizou-se um maior volume de biomassa, logo foi necessário um

maior tempo de redução da umidade em estufa. A sacarificação ocorreu por 96 h considerando a primeira carga de enzimas. Obteve-se os hidrolisados do mesocarpo de coco (HMC-2), hidrolisado do coco verde (HCV-1 e 2), e o hidrolisado do coco verde sem extrativos em etanol (HMC-E). A adição da azida sódica, das enzimas celulolíticas e a biomassa com umidade (pré-tratada) resultaram numa diluição dos ST para 25,9; 24,1; 25,5 e 26,9% (m/v) dos hidrolisados HMC-2, HCV-1, HCV-2 e HCV-E, respectivamente. Amostras foram retiradas em diferentes tempos entre 0 e 96 h para a confecção das curvas de sacarificação. Realizou-se curvas de sacarificação para PMC e PCV, e depois para PCV e PCV-E. Os hidrolisados produzidos para as curvas de sacarificação foram utilizados nos experimentos de fermentação.

4.2.6. Cepas e produção de inóculo

As cepas *S. cerevisiae* Ethanol Red *MATa/α* e *S. cerevisiae* GSE16-T18 *MATa/α* foram utilizadas nos experimentos de fermentação. O meio de cultura YEPD foi utilizado na produção de inóculos. A composição do YEPD foi de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de D-glicose. As fontes de carbono e nitrogênio foram autoclavadas (121 °C por 20 min) em separado para evitar a reação de Maillard, sendo misturadas quando as soluções atingiram temperatura ambiente. As condições de crescimento aeróbico foram de 30 °C e 200 rpm.

4.2.7. Fermentação dos HMC-2, HCV-1, HCV-2 e HCV-E utilizando cepas de etanol 1G e 2G

O pH dos hidrolisados HMC-2 e HCV-1 foram ajustados para 5,5 utilizando 4 M de NaOH ou ácido sulfúrico concentrado. Adicionou-se ureia na concentração de 2 g/L como fonte de nitrogênio nos hidrolisados. As culturas de *S. cerevisiae* Ethanol Red e *S. cerevisiae* GSE16-T18 foram obtidas por centrifugação (3000 xg, 5 min e 4 °C), e as células foram lavadas com água ultrapura estéril, o processo foi realizado em duplicata. Duas fermentações independentes foram realizadas em duplicata, uma com inóculo na DO600 de 1 e outra na DO600 de 4.

As fermentações foram realizadas em condições semi-anaeróbicas em vials de vidros de 20 mL conforme item 3.2.5. A perda de peso foi monitorada entre 0 e 96 h. A fermentação foi encerrada após 96 h e amostras foram retiradas para a quantificação de etanol.

Realizaram-se duas curvas de fermentação independentes, sendo a primeira com os HMC-2 e HCV-1, e a segunda com HCV-2 e HCV-E. As curvas de fermentação com *S. cerevisiae* GSE16-T18 foram iniciadas na DO600 de 4 e foram realizadas em condições semi-anaeróbicas em frascos reagente de 250 mL conforme item 3.2.5. Amostras foram retiradas ao longo das fermentações para análise de açúcares e produtos de fermentação.

4.2.8. Análise de açúcares, inibidores e produtos de fermentação

As amostras obtidas durante os experimentos de sacarificação e fermentação foram processadas e analisadas conforme item 3.2.6.

4.2.9. Extração e determinação de ácidos graxos

Triacilgliceróis e ácidos graxos foram extraídos do HCV-2 e HCV-E utilizando metanol, clorofórmio e água (BLIGH; DYER, 1959). Adicionou-se 3,75 mL de solução de clorofórmio e metanol (1/2, v/v) para cada mL de amostra em um funil de separação, e homogeneizou-se por 3 min. Adicionou-se 1,25 mL de clorofórmio e homogeneizou-se por 1 min. Adicionou-se 1 mL de água destilada e homogeneizou-se por 1 min. Aguardou-se a separação de fases e a fase inferior foi adicionada em um balão de fundo chato. O clorofórmio foi parcialmente evaporado, e amostra foi vertida em vial de 9 mL de massa conhecida. A amostra foi seca em temperatura ambiente com fluxo de N₂, e o vial foi novamente pesado para determinação da quantidade de extrato.

As amostras e os padrões de ácidos graxos foram então metilados. Adicionou-se 2 mL de solução de trifluoreto de boro a 14% em metanol ao extrato seco, e o vial foi fechado e mantido a 60 °C por 2 h. Adicionou-se 2 mL de octano e a amostra foi homogeneizada, a fase de octano foi transferida para um tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de água destilada, a amostra foi homogeneizada novamente. A fase de octano foi transferida para um novo tubo de ensaio e lavou-se a amostra com água novamente. A fase de octano foi então vertida em um vial de peso conhecido e seca na presença de N₂, o vial foi novamente pesado. Adicionou-se 2 gotas de padrão externo de tetradecano e 1 mL de octano.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo Hewlett Packard HP 6890 (Estados Unidos) com injetor *split* (taxa de *split* de 60:1), e detector por ionização em chama mantido a 280 °C. O gás de arraste utilizado foi o N₂. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Agilent CP-SIL88 de 100 m, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,2 µm (Agilent Technologies, Estados Unidos). A temperatura de injeção foi de 250 °C e a temperatura inicial do forno foi de 60 °C por 1 min, seguido de um aumento de 4 °C/min até 120 °C sendo mantido por 2 min, então houve outro aumento de 2 °C/min

até 180 °C sendo mantido por 2 min, aumentou-se 3°C/min até 220 °C sendo mantido por 15 min; e houve um aumento final de 10 °C/min até 225 °C sendo mantido por 32 min.

4.2.10. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras do PMC e PCV, antes e após o pré-tratamento e sacarificação foram secas a 50 °C. As amostras foram obtidas do experimento da curva de sacarificação (Item 4.2.5). As amostras foram colocadas em *stubs* de microscopia eletrônica de varredura de alumínio (Ø 12mm) cobertos por meio de adesivos de carbono (Electron Microscopy Sciences, Estados Unidos). As amostras foram metalizadas com uma camada de aproximadamente 5 nm de platina (Quorum Q150T ES, Quorum Technologies, Reino Unido). As imagens foram obtidas utilizando sistema Zeiss Auriga Crossbeam (Carl Zeiss AG, Alemanha) sob alto vácuo e operado entre 1,5 e 3 kV.

4.2.11. Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente ao acaso em duplicata.

4.3. Resultados e discussão

A fração sólida do coco (sem a água de coco) e seu mesocarpo foram utilizados neste estudo. O mesocarpo é a principal estrutura do coco verde e corresponde a 50-55% (m/m) do fruto em base de MS. O uso de todo o fruto do coco reduz o processo e elimina a etapa de extração do mesocarpo. Entretanto, os hidrolisados do mesocarpo apresentaram resultados promissores em termos de produção de açúcares e fermentabilidade como reportado no capítulo anterior (Item 3), portanto o mesocarpo do coco verde também foi utilizado neste estudo. Inicialmente, investigaram-se os efeitos da concentração da solução alcalina e do tempo de retenção no pré-tratamento e sacarificação em batelada simples do PCV. Após a determinação dos parâmetros em batelada simples, foram avaliadas duas cargas de sólidos e duas concentrações de solução alcalina nos pré-tratamentos em batelada alimentada dos PMC e PCV.

Os cocos utilizados para a produção de água foram coletados verdes (5-7 meses). O uso de frutos verdes para a produção de hidrolisados não destoxificados possui algumas vantagens em comparação com os frutos desenvolvidos (11-12 meses), porque o mesocarpo do coco verde possui menos fenólicos ácidos (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005), e lignina (VAN DAM et al., 2004). O coco verde apresentou uma grande quantidade de extrativos em água que corresponderam $30,1 \pm 0,2\%$ (m/m). Os extrativos em água do coco verde apresentaram uma grande quantidade de açúcares ($54,5 \pm 1,7\%$, m/v): $24,8 \pm 0,8\%$ (m/m) de glicose, $16,7 \pm 0,4\%$ (m/m) de manose, $5,1 \pm 0,05\%$ (m/m) de celobiose, $4,2 \pm 0,4\%$ (m/m) de arabinose, e $3,7 \pm 0,1\%$ (m/m) de galactose. A quantidade de extrativos em água foi menor do que o observado no mesocarpo do coco verde ($49 \pm 2,1\%$, m/m) (Item 3), mas o perfil de açúcares e a quantidade de açúcares foi similar entre o coco verde e seu mesocarpo. O pó do mesocarpo é a estrutura rica em extrativos desta estrutura do coco, sendo os extrativos compostos principalmente de carboidratos e fenólicos de baixo peso molecular (e.g. ácido 4-hidroxibenzóico e ácido ferúlico) (VAN DAM et al., 2004).

A remoção dos extrativos em etanol do coco verde também foi avaliada na sacarificação e fermentação dos hidrolisados do coco verde. Extrativos, por definição, são compostos presentes na biomassa que podem ser solubilizados por diferentes tipos de solventes (SLUITER et al., 2004). Os extrativos comuns em biomassa lignocelulósica são a sacarose, nitrato, nitrito, proteínas, cinzas, clorofila, ceras *etc.* (SLUITER et al., 2004). O etanol foi escolhido como solvente para remoção dos extrativos da biomassa por apresentar baixo custo e toxicidade em comparação com outros solventes (*e.g.* hexano), e também porque solubiliza diferentes compostos do coco. O etanol é capaz de remover clorofila e ceras (SLUITER et al., 2004). O ácido láurico (C12:0), o principal ácido graxo no albúmen sólido do coco (LIANG et al., 2014), também é solúvel em etanol. O efeito dos lipídeos da biomassas lignocelulósicas na sacarificação e fermentação em geral é pouco estudado; e pesquisas para produção de etanol 2G com plantas oleaginosas como resíduos da produção do óleo de oliva (BALLESTEROS et al., 2001) ou do leite de coco (BUJANG et al., 2013), utilizam a biomassa após a extração do óleo.

Além dos possíveis efeitos dos extrativos na sacarificação e fermentação do PMC e PCV, uma maior quantidade de inibidores em um processo por batelada alimentada foi esperada em função da maior carga de sólidos. Portanto, 19 potenciais inibidores foram quantificados durante a otimização do processo.

4.3.1. Efeito da solução de NaOH e tempo de retenção na produção de hidrolisados do PCV utilizando batelada simples

Primeiramente foi avaliada a produção de hidrolisado do PCV utilizando batelada simples. O pré-tratamento foi realizado com 18% (m/v) de ST (MS), soluções de

hidróxido de sódio a 1 ou 2% (m/v), e tempo de retenção de 2 h ou sem tempo de retenção. A destoxificação não foi realizada para preservar os açúcares solubilizados durante o pré-tratamento.

Os efeitos da solução alcalina e do tempo de retenção no pré-tratamento do PCV (Figuras 28A e 28B) foram similares aos resultados do PMC (Item 3) em que se utilizou apenas o mesocarpo do coco verde. O uso de soluções superiores a 2% (m/v) de NaOH foi desconsiderado devido à grande formação de inibidores, conforme foi observado nos experimentos do PMC (Figuras 19A e 19B). Um experimento preliminar utilizando uma solução a 0,5% (m/v) de NaOH no pré-tratamento de PCV resultou em menos glicose ao término da sacarificação se comparado com soluções a 1 e 2% (m/v) de NaOH (Apêndice D). Trabalhos reportaram que o uso de soluções com menos de 1% (m/v) de NaOH ou água geralmente resultam em menor conversão da lignocelulose em açúcares fermentescíveis (MCINTOSH; VANCOV, 2011; REZENDE et al., 2011; YAMASHITA et al., 2010).

Os pré-tratamentos alcalinos resultaram na solubilização de açúcares, $1,6 \pm 0,05\%$ (m/v) de glicose e $1,3 \pm 0,03\%$ (m/v) de manose (Figura 28A). Entretanto, a quantidade de açúcares foi abaixo do ideal para uma fermentação industrial. Enzimas celulolíticas foram então adicionadas para aumentar o nível de açúcares. A digestão enzimática da celulose e hemicelulose resultou numa maior concentração de açúcares, destacando-se um aumento de $1,7 \pm 0,1\%$ (m/v) de glicose e $0,96 \pm 0,07\%$ (m/v) de manose (Figura 28B). Os hidrolisados apresentaram uma concentração final de açúcares (celobiose, glicose, manose e arabinose) por volta de $6,2 \pm 0,2\%$ (m/v).

O nível de açúcares foi similar entre os pré-tratamentos utilizando solução 1 ou 2% (m/v) de NaOH. Entretanto, a solução de NaOH foi um parâmetro importante no controle da produção de inibidores. O tempo de residência, por sua vez, apresentou efeitos mínimos na produção de açúcares (Figura 28B). Glicose e manose compreenderam 89% (m/m) dos açúcares presentes nos hidrolisados (Figura 28B). Mesmo com o uso de alta carga de sólidos 18% (m/v) TS (MS) não foi possível obter 8% (m/v) de açúcares fermentescíveis, que teoricamente poderiam resultar, após a

fermentação, numa concentração de etanol (4%) mínima para uma destilação viável (MODENBACH; NOKES, 2013).

Os resultados da batelada simples com o PCV foram superiores a outros processos que utilizaram o coco. O pré-tratamento alcalino assistido por micro-ondas resultou em 2,79 g/L de açúcares redutores (0,28%, m/v) (DING; HUI; ONG, 2012), e o pré-tratamento Alc-H₂O₂/NaOH em regime de SSSF resultou em aproximadamente 18 g/L de glicose (1,8%, m/v) nas primeiras 12 h de sacarificação (GONÇALVES et al., 2014). As diferentes condições de pré-tratamento resultaram em diferenças mínimas na produção de açúcares, entretanto, o uso de solução a 2% (m/v) de NaOH resultou em uma maior produção de inibidores (Figura 29).

Os ácidos fracos foram os inibidores mais abundantes nos hidrolisados do PCV, e o uso da solução a 2% (m/v) de NaOH resultou em uma produção de ácido acético de $0,99 \pm 0,02\%$ (m/v), enquanto que $0,66 \pm 0,03\%$ (m/v) de ácido acético foi observado nos pré-tratamentos utilizando solução a 1% (m/v) de NaOH (Figura 29). Os pré-tratamentos utilizando solução a 2% (m/v) de NaOH também resultaram em uma maior produção de ácido 4-hidroxibenzóico do que a solução a 1% (m/v) de NaOH, $209 \pm 12,6$ e $123,1 \pm 7,1$ mg/L, respectivamente (Figura 29). Por outro lado, as diferentes condições de pré-tratamento apresentaram pequenas diferenças na produção de compostos fenólicos e ácido acético, sendo observadas concentrações por volta de 0,21% (m/v) e 0,27% (m/v), respectivamente (Figura 29). Furfural, HMF e ácido levulínico não foram detectados nos hidrolisados do PCV (Figura 29).

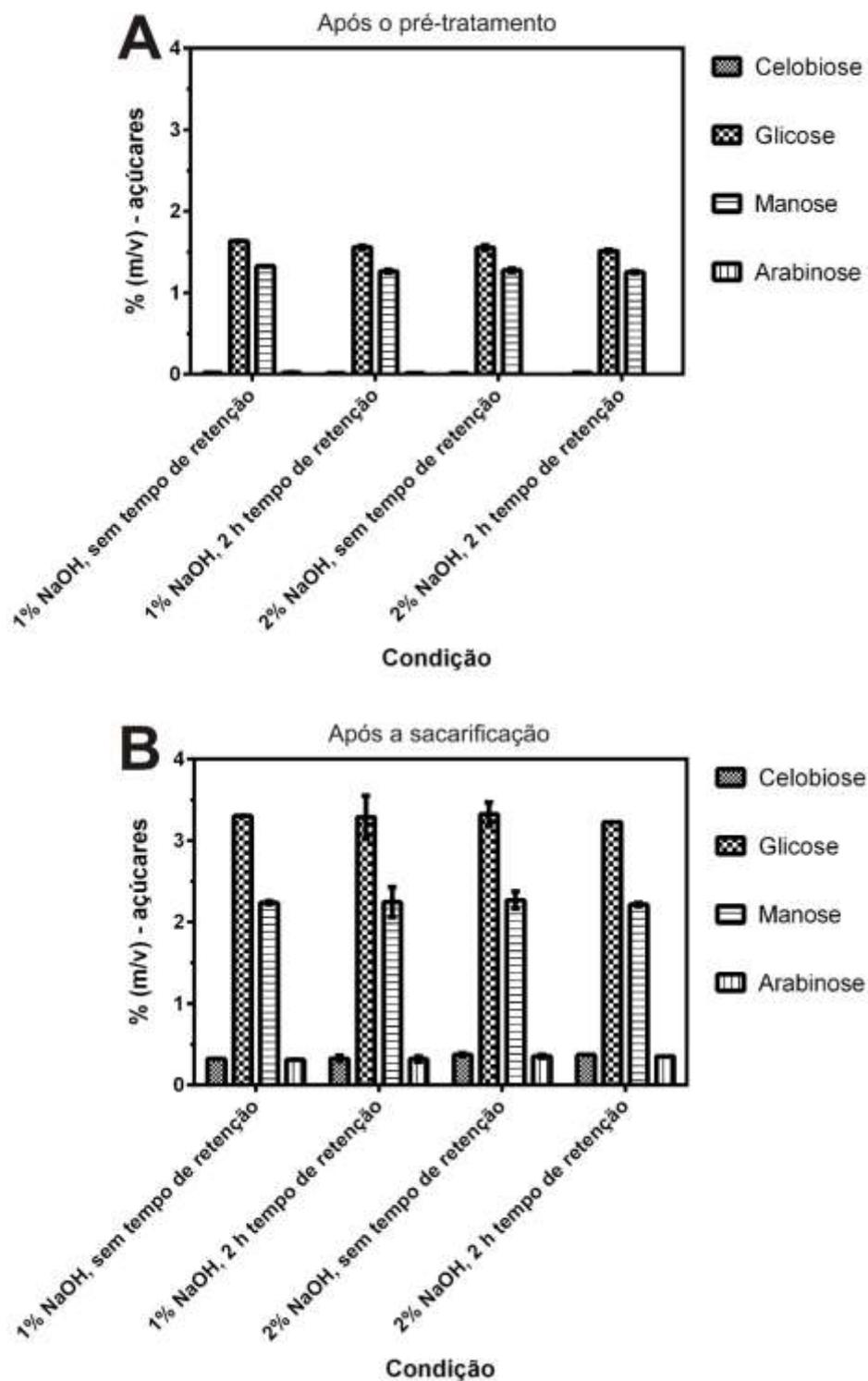


Figura 28: Efeito da solução de NaOH e o tempo de retenção na produção de hidrolisados do PCV em batelada simples. Açúcares na fração líquida (A) após diferentes pré-tratamentos e sem sacarificação, e (B) após a sacarificação.

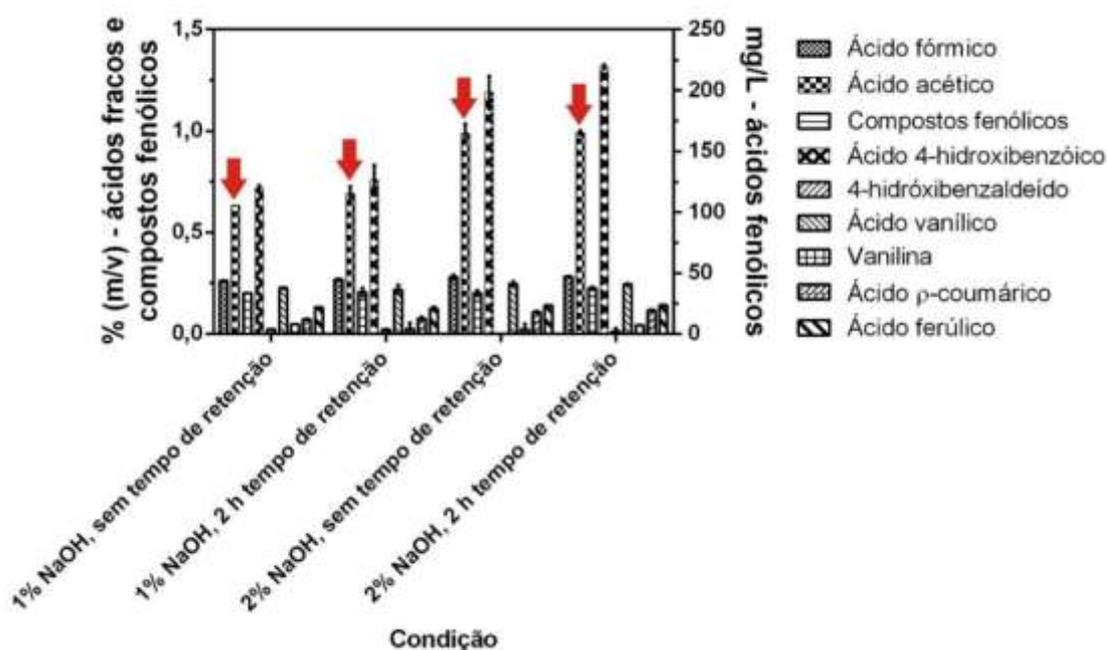


Figura 29: Efeito da solução de NaOH e o tempo de retenção na formação de inibidores de hidrolisados do PCV em batelada simples. Setas vermelhas indicam o principal inibidor (ácido acético) presente nos hidrolisados do PCV. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

4.3.2. Efeito da solução de NaOH e carga de sólidos na produção do PCV e PMC utilizando batelada alimentada

Investigou-se o uso da batelada alimentada na produção de hidrolisados do PCV e PMC visando uma maior produção de açúcares em comparação com os hidrolisados produzidos utilizando a batelada simples. Avaliaram-se as concentrações de solução a 1 ou 2% (m/v) de NaOH, e cargas de sólidos divididas em 2 fases de 12,5 ou 15% (m/v), que resultaram em uma carga total de 25 e 30% (m/v) de ST (MS), respectivamente. O pré-tratamento foi realizado em duas etapas para evitar a

formação de hidrolisados pastosos, e também para reciclar a solução alcalina e preservar os açúcares solubilizados na primeira etapa do pré-tratamento.

Os hidrolisados produzidos por batelada alimentada apresentaram uma concentração final de açúcares superior à observada nos experimentos utilizando batelada simples (Figuras 24, 28B, 30 e 31). O uso da batelada alimentada também permitiu que cargas de sólidos superiores a 18% (m/v) de ST (MS) fossem utilizadas sem culminarem em hidrolisados sólidos. O hidrolisado de PCV produzido utilizando as condições de pré-tratamento de solução a 1% (m/v) de NaOH e 30% (m/v) de ST (MS) apresentou $9,6 \pm 0,3\%$ (m/v) açúcares (celobiose, glicose, manose e arabinose), um aumento de 36% em relação ao observado em regime de batelada simples (Figuras 28b e 30). Similarmente, as condições de pré-tratamento do PMC utilizando solução a 1% (m/v) de NaOH e 30% (m/v) de ST (MS) resultaram na maior concentração de açúcares, $12,2 \pm 0,8\%$ (m/v) (Figura 31). Experimentos de pré-tratamento e sacarificação do coco foram realizados com batelada simples e foram reportados hidrolisados com menos açúcares do que o presente estudo (ALBUQUERQUE, 2013; BUJANG et al., 2013; DING; HII; ONG, 2012; GONÇALVES et al., 2014, 2015; LOSS, 2011; VAITHANOMSAT et al., 2011).

A preservação dos açúcares após o pré-tratamento foi fundamental para a produção de hidrolisados ricos em açúcares em batelada alimentada do PMC e PCV, a lavagem da biomassa após o pré-tratamento resultou em hidrolisados com menos açúcares conforme discutido no Apêndice E. Adicionalmente, a concentração da solução alcalina mostrou-se importante na solubilização de açúcares do PMC e PCV (Figuras 18A e 28A). A solubilização da biomassa no pré-tratamento e sacarificação é uma característica desejável para o uso de elevadas cargas de sólidos, de forma a se evitar a formação de hidrolisados pastosos ou completamente sólidos em função de uma elevada concentração de sólidos insolúveis no reator.

Os hidrolisados produzidos com solução a 2% (m/v) de NaOH resultaram em 4,6% menos açúcares quando comparados com os pré-tratamentos utilizando solução a 1% (m/v) de NaOH, indicando a degradação de açúcares pela condição mais severa de pré-tratamento (Figuras 30 e 31). Estes resultados sugerem uma possível degradação de açúcares pelo aumento da concentração da solução de NaOH.

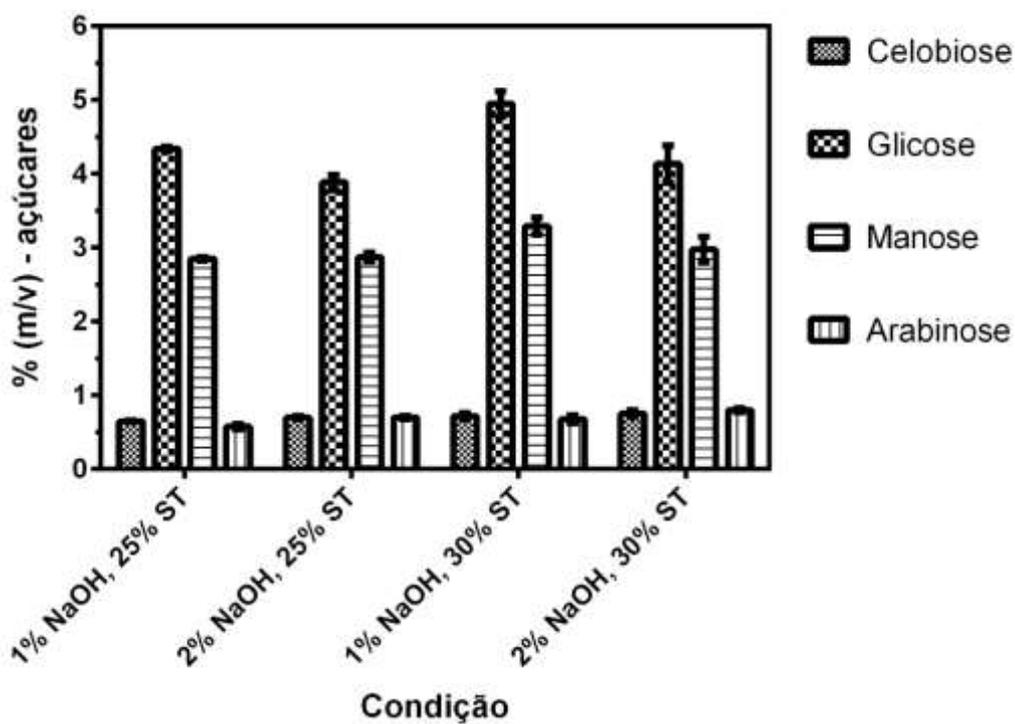


Figura 30: Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na produção de hidrolisados do PCV em batelada alimentada.

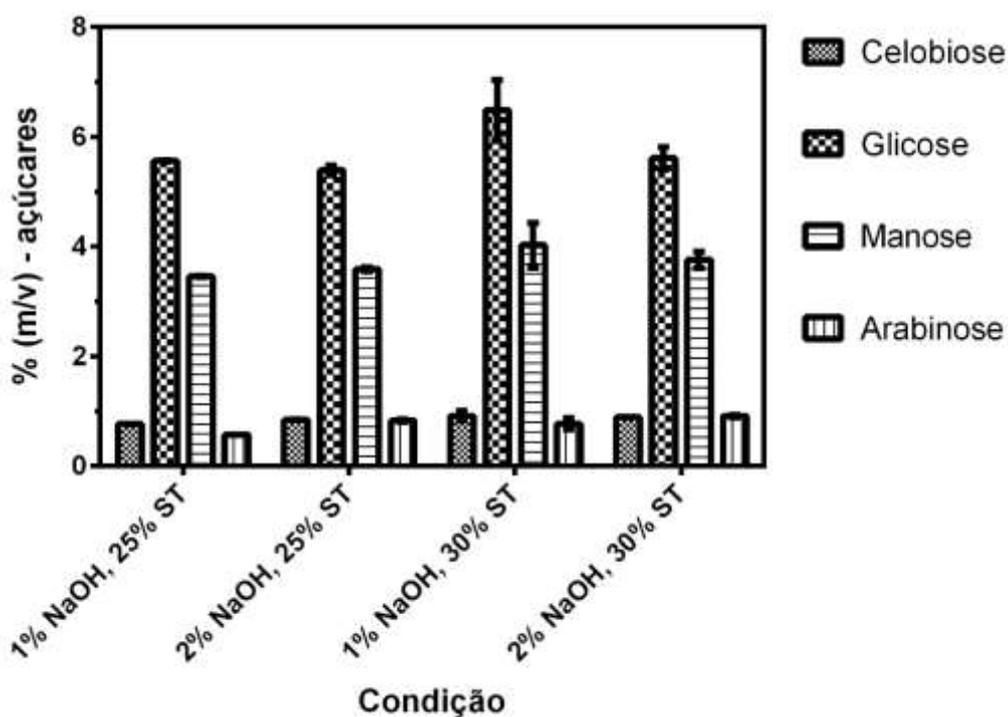


Figura 31: Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na produção de hidrolisados do PMC em batelada alimentada.

Observou-se um aumento de aproximadamente 0,2% (m/v) na concentração de ácido fórmico nos hidrolisados de PCV e PMC produzidos com a solução a 2% (m/v) de NaOH em comparação com a solução a 1% (m/v) de NaOH (Figuras 32 e 33). O ácido fórmico é relacionado com a degradação de açúcares, sendo resultado da degradação de HMF e furfural que são produtos da degradação de açúcares (ALMEIDA et al., 2007). Entretanto, a degradação de açúcares é bastante complexa e pode gerar diversos subprodutos. Por exemplo, a degradação de glicose em condições alcalinas pode resultar em mais de 50 compostos (e.g. ácido láctico, ácido fórmico, ácido 2,4-dihidroxibutanóico, ácido acético e ácido glicólico) (YANG; MONTGOMERY, 1996).

A degradação de açúcares também foi observada em pré-tratamento alcalino em temperatura ambiente da folha e caule do milho, a degradação de açúcares foi observada quando altas concentrações de NaOH foram utilizadas (e.g. 7,5% NaOH, m/m de biomassa) (ZHU; WAN; LI, 2010). O uso de altas dosagens de NaOH no pré-tratamento da folha e caule do milho resultou em degradação de 30-40% da lignina, entretanto a degradação de celulose e hemicelulose chegou a 20% (ZHU; WAN; LI, 2010). Altas dosagens de NaOH, como as utilizadas no pré-tratamento da folha e caule do milho, não aparentam ser uma possibilidade viável para a produção de hidrolisados do coco, porque o uso de solução a 2% (m/v) de NaOH resultou em altos níveis de inibidores e não aumentou o rendimento em açúcares (Figuras 30, 31, 32 e 33).

O aumento do nível de inibidores em função do aumento da severidade do pré-tratamento também foi observado na autohidrólise do coco (GONÇALVES et al., 2015). O aumento da carga de sólidos no pré-tratamento alcalino em temperatura ambiente mostrou-se uma melhor alternativa para se obter maiores níveis de açúcares em relação ao aumento da concentração da solução de NaOH durante o pré-tratamento (Figuras 30 e 31).

O aumento da concentração de NaOH de 1% para 2% (m/v) também resultou em uma maior produção de ácido acético (Figuras 32 e 33). O hidrolisado de PCV apresentou uma concentração de ácido acético de $1,3 \pm 0,07\%$ (m/v) no pré-tratamento utilizando solução a 2% (m/v) de NaOH, enquanto que o uso da solução a 1% (m/v) de NaOH resultou em $0,9 \pm 0,03\%$ (m/v) de ácido acético (Figura 32). A

solução de NaOH também afetou a produção de ácido acético do hidrolisado de PMC; o uso das soluções a 1 e 2% (m/v) de NaOH resultaram em $0,7 \pm 0,05$ e $0,9 \pm 0,06\%$ (m/v) de ácido acético, respectivamente (Figura 33). A solução a 2% (m/v) de NaOH também resultou em mais ácido 4-hidróxibenzoico, $380,2 \pm 10,5$ mg/L (PCV) e $322,2 \pm 28,6$ mg/L (PMC), comparado com a solução a 1% (m/v) de NaOH que resultou em $213,5 \pm 15,7$ mg/L (PCV) e $197,9 \pm 5,9$ mg/L (PMC) (Figuras 32 e 33). A produção de compostos fenólicos foi menos afetada pelas condições de pré-tratamentos. Entretanto, os compostos fenólicos totais foram 54,8% superior nos hidrolisados de PMC em comparação com os hidrolisados de PCV (Figuras 32 e 33). O mesocarpo do coco possui grande quantidade de compostos fenólicos na fração de extrativos (DEY; CHAKRABORTY; MITRA, 2005; VAN DAM et al., 2004). Em geral, a produção de inibidores foi pouco afetada pela carga de sólidos em comparação com a concentração da solução de NaOH (Figuras 32 e 33). O principal efeito da carga de sólidos foi o aumento de compostos fenólicos de $0,72 \pm 0,06$ para $0,9 \pm 0,07\%$ (m/v) no hidrolisado de PMC produzido com 25 e 30% (m/v) de ST (MS), respectivamente (Figura 33).

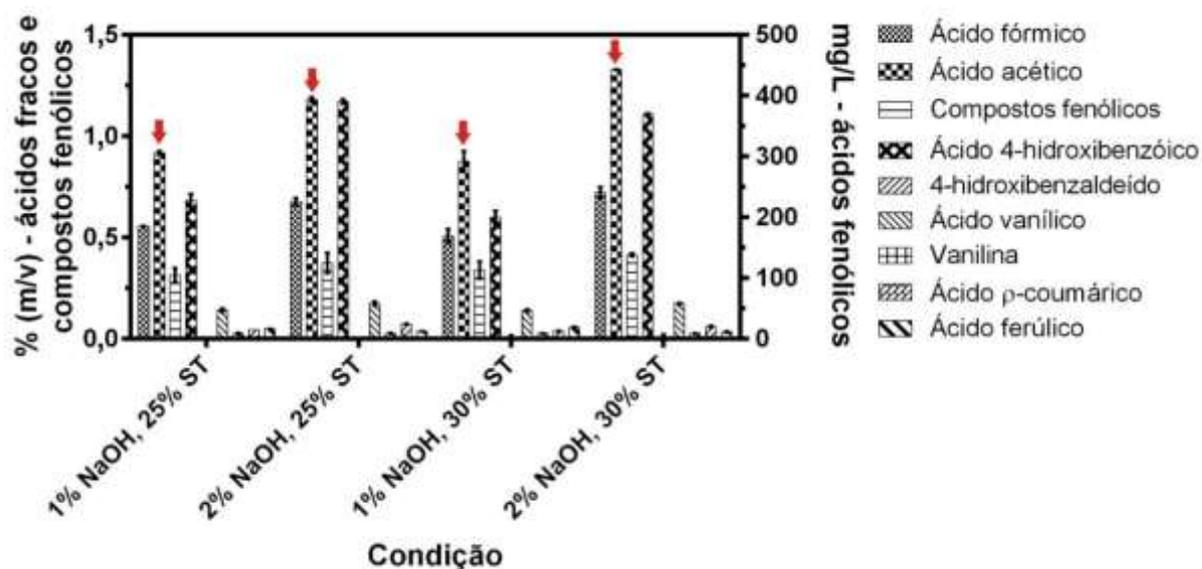


Figura 32: Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na formação de inibidores de hidrolisados do PCV em batelada alimentada. Setas vermelhas indicam o principal inibidor (ácido acético) presente nos hidrolisados do PCV. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

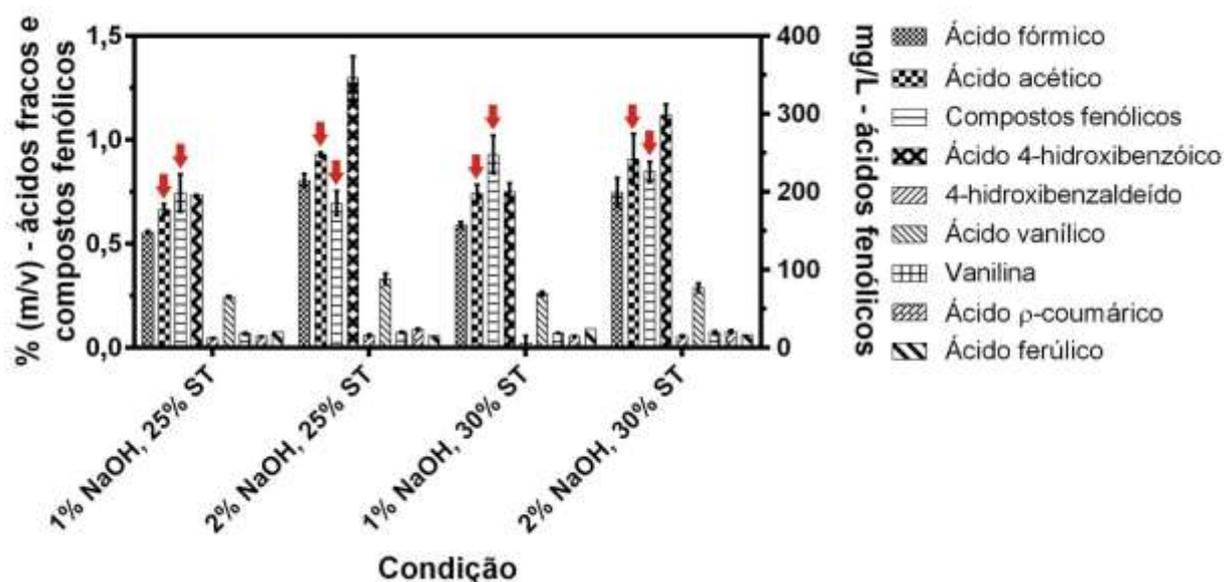


Figura 33: Efeito da solução de NaOH e a carga de sólidos na formação de inibidores de hidrolisados do PMC em batelada alimentada. Setas vermelhas indicam os principais inibidores (ácido acético e compostos fenólicos) presentes nos hidrolisados do PMC. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

4.3.3. Eficiência dos processos por bateladas simples e alimentada

O aumento da carga de sólidos de 25% para 30% (m/v) de ST (MS) resultou em 9,4 e 10,1% mais açúcares para os hidrolisados de PCV e PMC, respectivamente (Figuras 30 e 31). Por outro lado, as eficiências dos processos por batelada alimentada dos processos do item 4.3.2 foram menores para o PCV e o PMC quando comparadas com os resultados de batelada simples (Figuras 34A e 34B). O resultado da batelada simples do PMC foi obtido do item 3.3.3. (Figura 23). O hidrolisado de PMC produzido com 30% (m/v) de ST (MS) apresentou uma redução de 16,4% em comparação com o hidrolisado produzido com 18% (m/v) de ST (MS) (Figura 34B). Em contraste, a eficiência do processo do hidrolisado de PCV foi menos afetada pelo aumento da carga de sólidos, e uma redução de 5,7% foi observada quando utilizou-se 30% (m/v) de ST (MS) em comparação com 18% (m/v) de ST (MS) (Figura 34A).

Estas observações estão de acordo com outros estudos que observaram uma redução na eficiência do processo devido ao aumento da carga de sólidos na produção dos hidrolisados (MODENBACH; NOKES, 2013). Alguns fatores que podem ter afetado a eficiência do processo são o acúmulo açúcares (PAULOVA et al., 2015), a adsorção irreversível das enzimas celulolíticas na lignina (CUI et al., 2014), assim como a inibição ou inativação da enzimas por compostos fenólicos (XIMENES et al., 2011).

O aumento na carga de sólidos resulta em maiores concentrações de inibidores das celulasas (MODENBACH; NOKES, 2013). Os hidrolisados de PMC apresentaram mais compostos fenólicos (Figuras 32 e 33) e açúcares (Figuras 30 e 31) em comparação com os hidrolisados de PCV. Tais compostos estão entre os principais inibidores de celulasas (KIM et al., 2011), e provavelmente afetaram o rendimento de açúcares dos hidrolisados de PMC (Figura 34B).

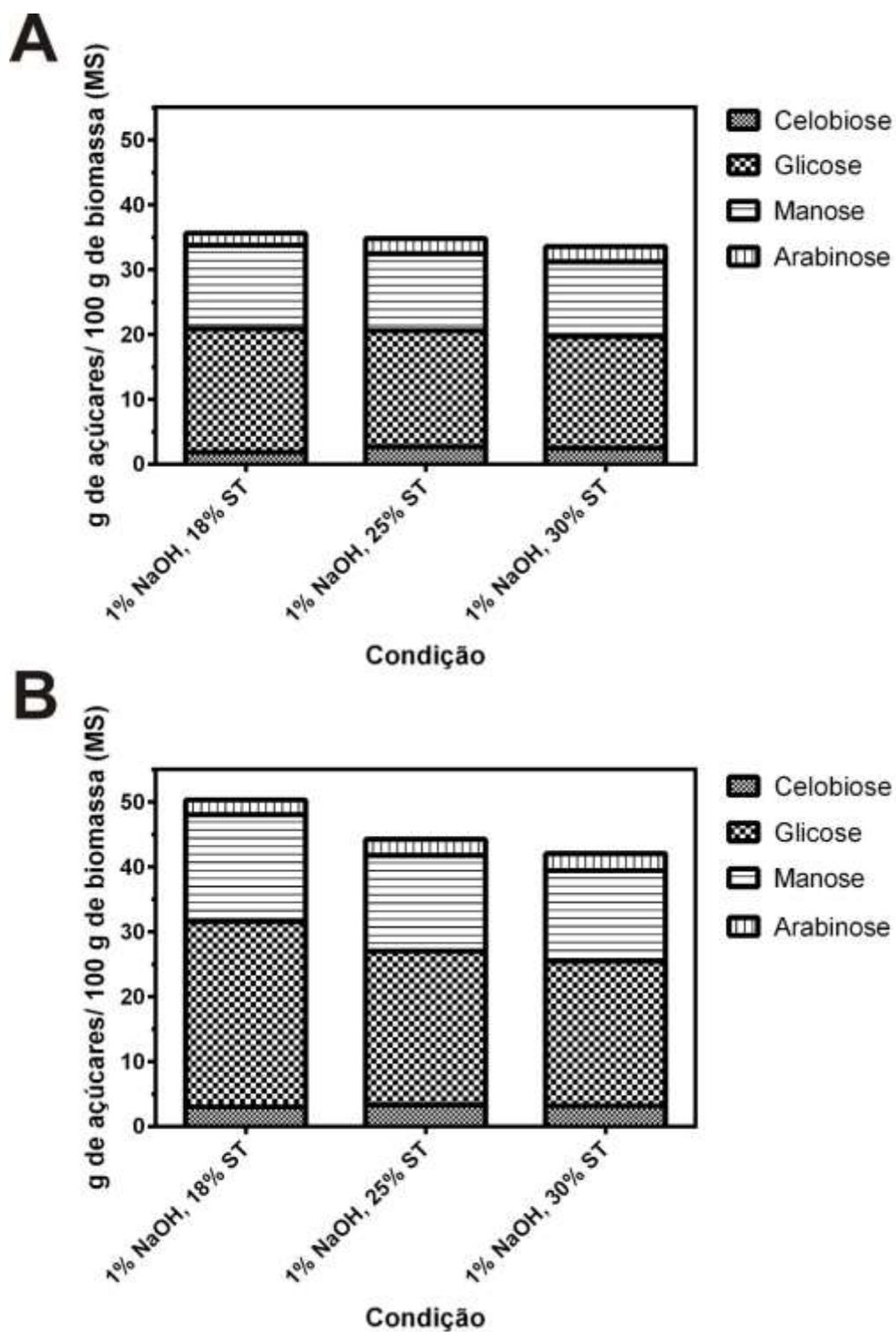


Figura 34: Eficiência de diferentes cargas de sólidos após a sacarificação do coco verde e seu mesocarpo. (A) PCV e (B) PMC.

4.3.4. Curvas de sacarificação do PMC, PCV e PCV-E

As curvas de sacarificação foram realizadas com o PMC, PCV e PC-E utilizando solução a 1% (m/v) de NaOH e carga de sólidos total de 30% (m/v) de ST (MS), dividida em 2 cargas de 15% (m/v) de ST (MS). As curvas de sacarificação demonstraram que os pré-tratamentos solubilizaram uma considerável quantidade de açúcares (glicose e manose), sendo $3,7 \pm 0,03\%$ (m/v) e $5,7 \pm 0,04\%$ (m/v) para HCV-1 e HMC-2, respectivamente (Figura 35).

As lamas pré-tratadas foram então hidrolisadas pela ação de enzimas celulolíticas. A rápida conversão da celulose e hemicelulose foi observada nas primeiras horas de sacarificação e após a adição da segunda carga de enzimas e biomassa pré-tratada (Figura 35). As quantidades de celobiose e arabinose mantiveram-se praticamente constantes durante a sacarificação (dados não reportados), e apresentaram concentrações entre 0,8-1% (m/v). A hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose resultou em uma produção adicional de $2,6 \pm 0,2$ e $2,8 \pm 0,04\%$ (m/v) de açúcares (glicose e manose) para os hidrolisados de HCV-1 e HMC-2, respectivamente (Figura 35). As concentrações finais de açúcar foram $9,7 \pm 0,07\%$ (m/v) e $7,2 \pm 0,1\%$ (m/v) para os HMC-2 e HCV-1, respectivamente.

A redução da umidade da biomassa pré-tratada foi importante na produção de hidrolisados utilizando a carga de sólidos de 30% (m/v) de ST (MS). Isso se deve ao rápido intumescimento que as fibras do coco cominuídas apresentam quando imersas em água (VAN DAM et al., 2006). Portanto, a biomassa recuperada após a primeira etapa de pré-tratamento teve que ser submetida à uma etapa de redução de umidade. O grande volume de material utilizado no perfil de sacarificação para produzir os hidrolisados em regime de batelada alimentada demandou de uma longa (48 h) e não completa redução de umidade a 75 °C em estufa com circulação de ar forçada (Item 4.2.5). Portanto, os hidrolisados produzidos em reatores de 1 L apresentaram uma menor carga de sólidos final (26% ST, m/v) e nível de açúcares (Figura 35), quando comparados à carga de sólidos final (29% ST, m/v) e nível de

açúcares (Figuras 30 e 31) dos hidrolisados produzidos na etapa de otimização de processo produzidos em reatores de 50 mL. A recuperação da biomassa por filtração ou centrifugação, e a redução de umidade podem ser consideradas umas das desvantagens da batelada alimentada em comparação com a batelada simples, devido à maior complexidade e consumo de energia.

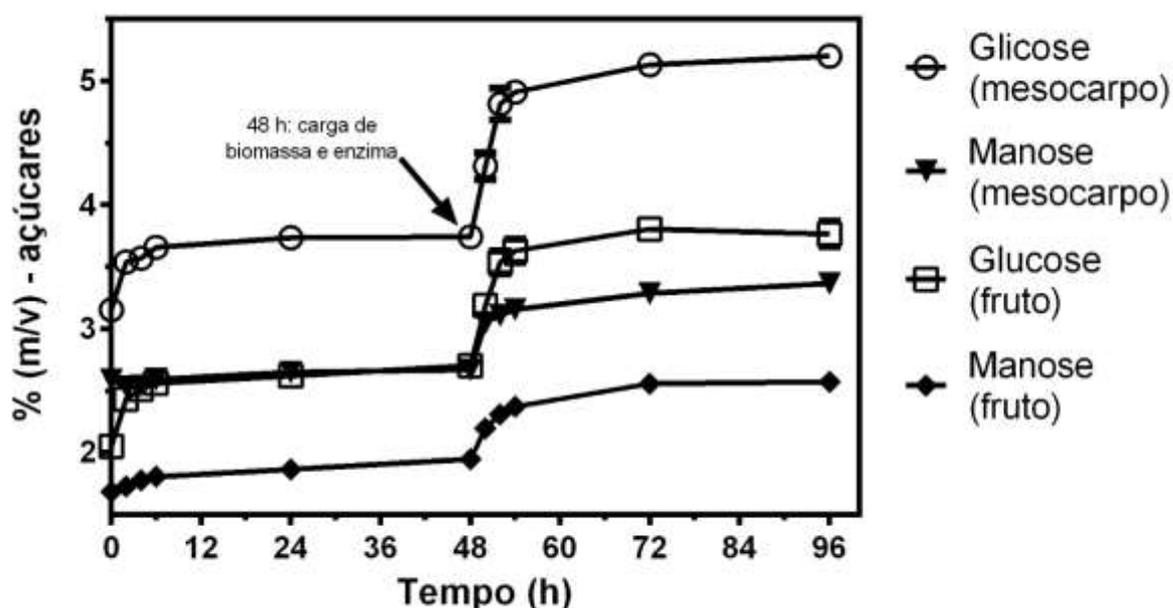


Figura 35: Curvas de sacarificação do coco e seu mesocarpo. Seta indica a segunda carga de enzimas e biomassa.

O efeito de extrativos em etanol também foi investigado na produção de açúcares do PCV. Os perfis de sacarificação dos HCV-2 e HCV-E foram similares (Figura 36). Entretanto, a remoção dos extrativos com etanol resultou em uma considerável remoção de glicose e manose do PCV. A perda de açúcares nesta etapa resultou em uma menor solubilização de açúcares no pré-tratamento alcalino. Logo, a sacarificação do PCV-E iniciou com menos açúcares em relação ao PCV (Figura 36). Os extrativos em etanol representaram $18,8 \pm 0,5\%$ (m/m) do PCV, e a sua remoção não melhorou a sacarificação, o hidrolisado de PCV-E apresentou $29,8\%$ (m/m) menos açúcares em comparação com o PCV (Figura 36). As concentrações de açúcares (celobiose, glicose, manose e arabinose) foram de $8,4 \pm 0,1\%$ (m/v) e $5,9 \pm 0,1\%$ (m/v) para HCV-2 e HCV-E, respectivamente. Os resultados de sacarificação sugerem que os extrativos do coco não afetaram as enzimas celulolíticas na concentração de 15 FPU/g de biomassa (MS).

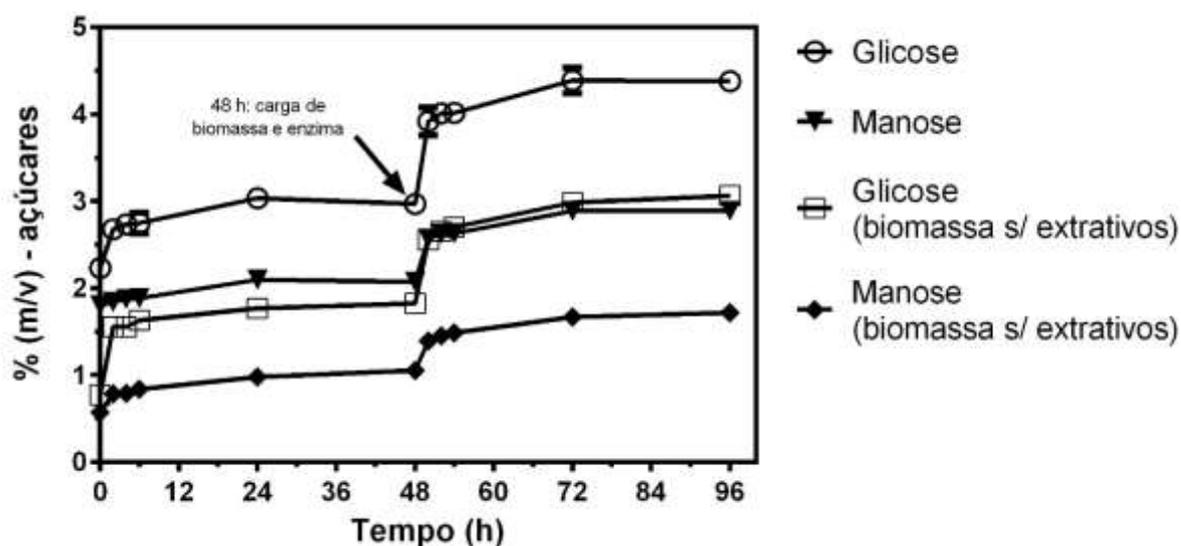


Figura 36: Curva de sacarificação de PMC com e sem extrativos. Seta indica a segunda carga de enzimas e biomassa.

4.3.5. Efeitos de pré-tratamento e sacarificação na morfologia do PCV e PMC

As imagens de microscopia eletrônica de varredura do PCV e PMC cominuídos demonstram biomassa particulada em excesso e fibras (Figuras 37A e 37B). As fibras do mesocarpo do coco podem chegar a 35 cm de comprimento e 0,15 mm de espessura, ao passo que o pó do mesocarpo do coco é um considerado um fino agregado com 0,075-1,2 mm (BRASILEIRO; VIEIRA; BARRETO, 2013; CONRAD, 2008). O pó do mesocarpo do coco é compreendido por tecido parenquimatoso composto de células de parede delgada, e corresponde à 70-80% (m/m) do mesocarpo, enquanto que a fibra representa os 20-30% (m/m) restantes do mesocarpo (VAN DAM et al., 2004). As fibras possuem uma estrutura simples com o feixe vascular rodeado por uma bainha de células espessas (NANAYAKKARA; ISMAIL; WIJESUNDARA, 2005). Na superfície da fibra é possível observar as

células do pó do mesocarpo do coco e cavidades (estruturas circulares) com cristais (Figura 37A). Estes cristais estão presentes como óxidos nas plantas e conferem rugosidade à superfície da fibra (NANAYAKKARA; ISMAIL; WIJESUNDARA, 2005).

O uso de um pré-tratamento alcalino brando afetou a superfície, entretanto a expansão da fibra não foi observada (Figura 37C). A sacarificação enzimática após o pré-tratamento resultou em modificações nas cavidades e na superfície das fibras de PCV e PMC, porém as fibras não foram completamente digeridas (Figuras 37D e 37E). As fibras do coco possuem uma grande resiliência devido à sua estrutural helicoidal (Figura 37F), que é resultante da orientação das microfibrilas da parede celular em um ângulo de aproximadamente 45° em relação ao eixo da fibra (VAN DAM et al., 2006). Adicionalmente, as células na bainha da fibra são mais lignificadas do que as células internas (xilema) (CONRAD, 2008; NANAYAKKARA; ISMAIL; WIJESUNDARA, 2005), esta organização celular talvez tenha atuado como barreira natural às enzimas celulolíticas. As cavidades das fibras e os cristais de silicato foram afetados pelo processo, expondo a cavidade da câmara após a sacarificação (Figuras 37D e 37E).

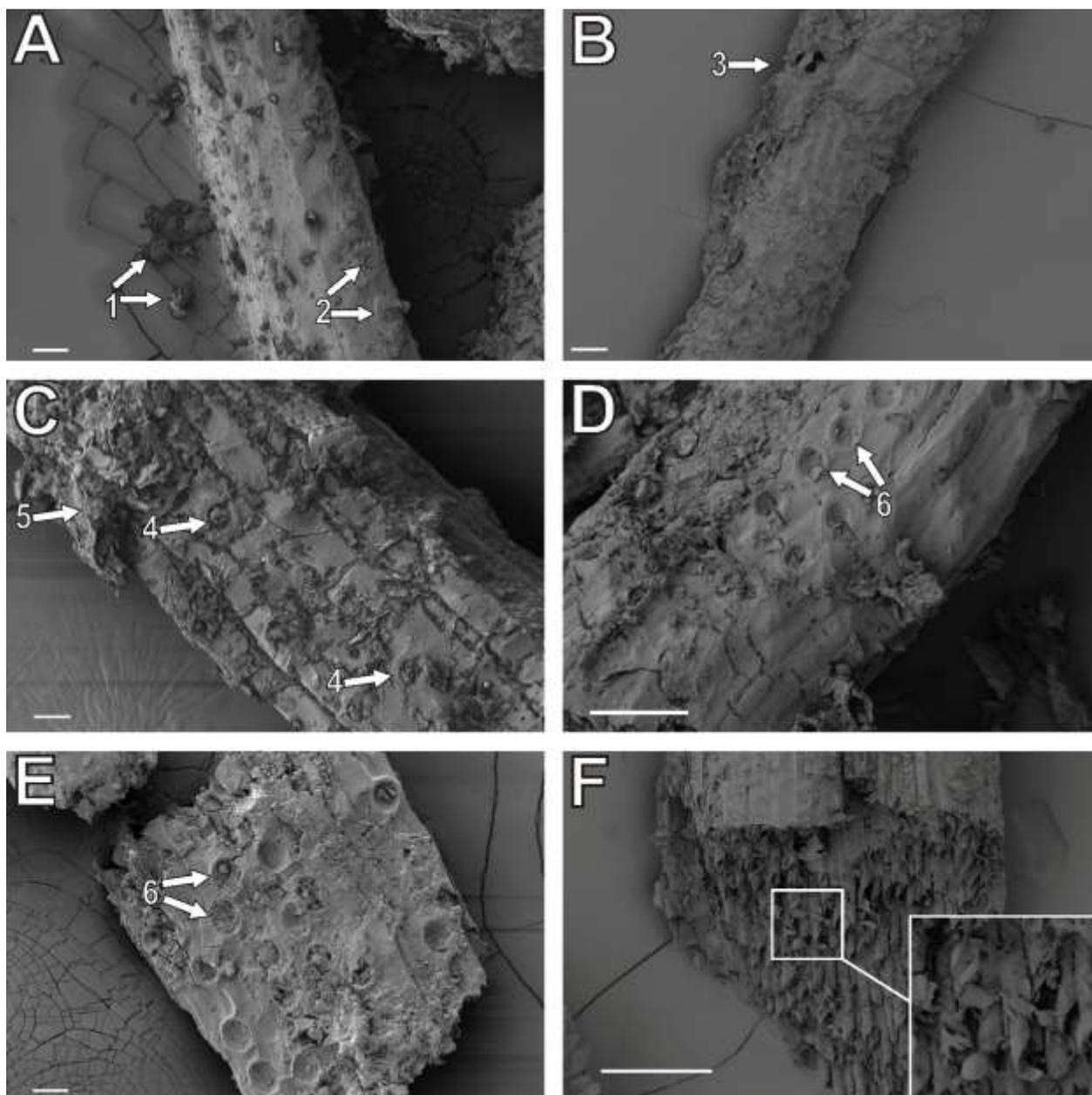


Figura 37: Modificações estruturais no coco (PCV) e seu mesocarpo (PMC) pelo pré-tratamento e sacarificação. Microscopia eletrônica de varredura das fibras e (1) biomassa particulada do (A) PCV e (B) PMC, (2) cavidades na superfície da fibra, e (3) células do pó do mesocarpo aderidas na fibra. (C) PCV pré-tratado utilizando solução a 1% (m/v) de NaOH e 30% (m/v) de ST (MS): modificações na superfície da fibra, (4) estrutura da cavidade e (5) células do pó do mesocarpo. (D) PCV e (E) PMC digerido por enzimas comerciais utilizando a carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa (MS) a 50 °C, a biomassa foi previamente pré-tratada utilizando uma solução a 1% (m/v) de NaOH e 30% (m/v) de ST (MS): (6) modificações na estrutura da cavidade, exposição da câmara da cavidade, e remoção dos cristais de silicato. (F) Estrutura helicoidal das fibras. Barra de escala e magnificação: (A) 50 μ m e 448 x, (B) 50 μ m e 149 x, (C) 50 μ m e 453 x, (D) 50 μ m e 478 x, (E) 50 μ m e 449, (F) 150 μ m e 97 x.

4.3.6. Fermentação dos HMC-2, HCV-1, HCV-2 e HCV-E utilizando cepas de etanol 1G e 2G

Os HMC-2 e HCV-1 foram fermentados com as cepas de etanol 1G e 2G, *S. cerevisiae* Ethanol Red e *S. cerevisiae* GSE16-T18, respectivamente. As cepas foram inoculadas com a DO600 de 1 e fermentaram o HMC-2, mas não o HCV-1. A fermentação do HMC-2 foi relativamente rápida, a produção de etanol chegou ao platô em 24 h (Figura 38A). O perfil fermentativo e a produção de etanol final das cepas foram similares (Figuras 38A e 38C), uma vez que o HMC-2 contém principalmente hexoses (glicose e manose) (Figura 34). Cepas de *S. cerevisiae* naturalmente fermentam glicose e manose (MADHAVAN et al., 2012). Após a fermentação, foram analisados os açúcares remanescentes no HMC-2 por *HPLC* para separar manose e xilose. O HMC-2 continha $0,54 \pm 0,05\%$ (m/v) de xilose que foi parcialmente consumida pela GSE16-T18, o que pode explicar a pequena diferença na produção de etanol em relação a Ethanol Red (Figura 38C). As cepas não fermentaram o HCV-1 (Figura 38A), sugerindo a presença de inibidores.

A carga de inóculo das cepas foi modificada da DO600 de 1 para a DO600 de 4, pois considerou-se a possibilidade da levedura converter os inibidores em compostos menos tóxicos (ALMEIDA et al., 2007). Entretanto, as cepas não fermentaram o HCV-1, ao passo que a fermentação do HMC-2 foi mais rápida (12 h) (Figura 38B). Ressalta-se que ambas as cepas são industriais, e a GSE16-T18 derivou da *S. cerevisiae* GSE16 que foi selecionada por apresentar resistência ao ácido acético (DEMEKE et al., 2013b). O HCV-1 apresentou uma maior concentração de ácido acético ($0,82 \pm 0,009\%$, m/v) se comparado com o HMC-2 ($0,61 \pm 0,01\%$, m/v) (Figura 39). Entretanto, o HMC-2 apresentou uma maior concentração de compostos fenólicos ($0,87 \pm 0,09\%$, m/v) do que o HCV-1 ($0,42 \pm 0,02\%$, m/v) (Figura 39).

Compostos fenólicos exercem efeitos específicos em *S. cerevisiae* (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014), entretanto é remota a possibilidade de que o HCV-1

possua um composto fenólico que não esteja presente no HMC-2. Hidrolisados de coco já foram fermentados com sucesso por *S. cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Zymomonas mobilis*, entretanto os hidrolisados foram produzidos utilizando baixa carga de sólidos e foram filtrados após os pré-tratamentos (GONÇALVES et al., 2014, 2015).

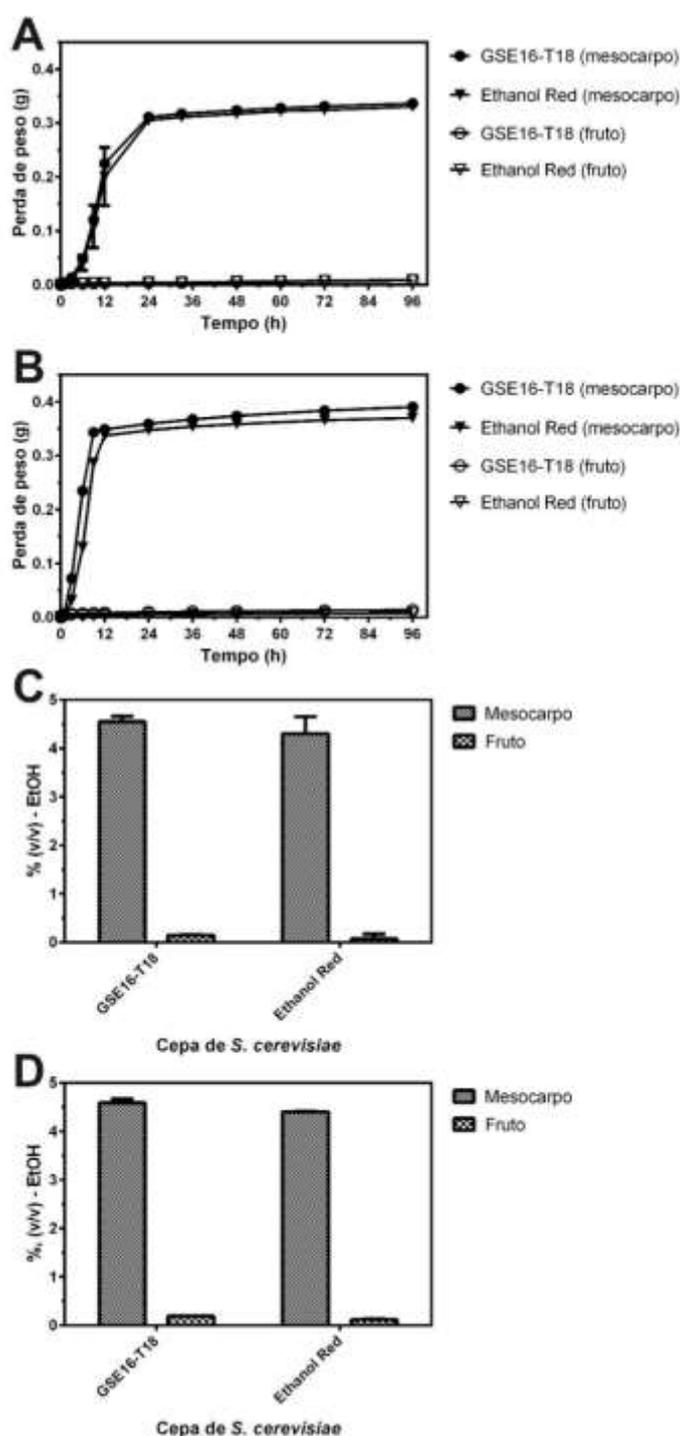


Figura 38: Fermentação do HMC-2 e HCV-1 utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Curvas de fermentação utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae* inoculadas com (A) DO600 de 1 e (B)

DO600 de 4. A perda de peso (produção de CO₂) foi medida em fermentações semi-anaeróbicas a 35 °C e pH 5,5. Etanol produzido dos HMC-2 e HCV-1 utilizando diferentes cepas de *S. cerevisiae* inoculadas com (C) DO600 de 1 e (D) DO600 de 4 após 96 h de fermentação.

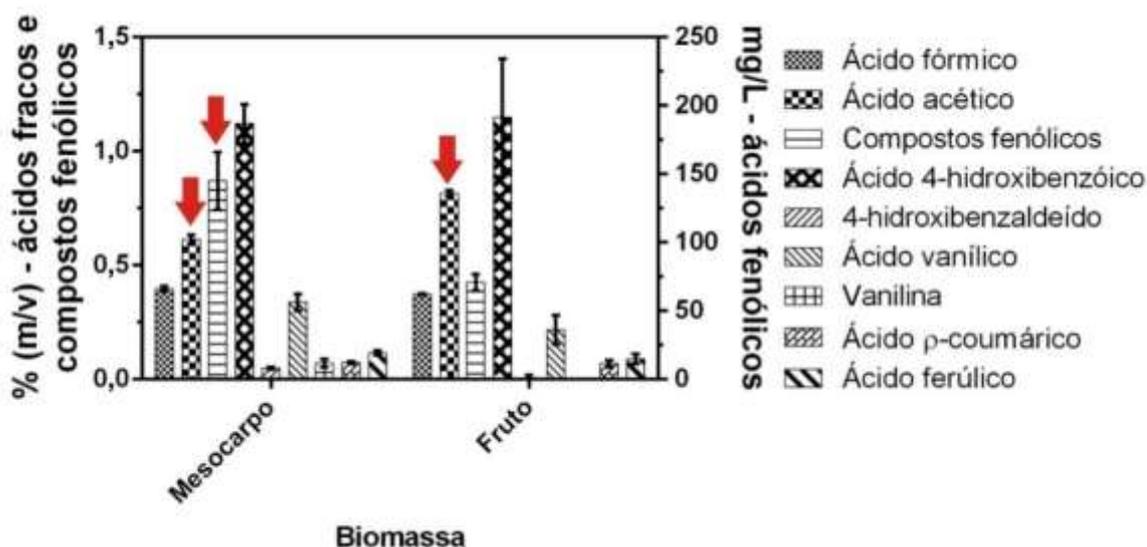


Figura 39: Inibidores na fração líquida nos hidrolisados HMC-2 e HCV-1. Setas vermelhas indicam os principais inibidores (ácido acético e compostos fenólicos) presentes nos hidrolisados do PMC e PCV. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

A curva de fermentação do HMC-2 pela GSE16-T18 demonstrou uma rápida fermentação, sendo que a exaustão de glicose ocorreu em 12 h (Figura 40A). Glicose e manose foram co-fermentadas, entretanto o consumo de manose diminuiu após 12 h (Figura 40A), o que sugere retroinibição pela produção de etanol sozinho ou junto com outros inibidores (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A concentração de arabinose manteve-se praticamente inalterada porque a GSE16-T18 possui uma via heteróloga de fermentação de arabinose não funcional (DEMEKE et al., 2013a, 2013b).

A produção máxima de etanol foi de $4,33 \pm 0,19\%$ (v/v) e o rendimento em etanol de $0,41 \pm 0,03$ g EtOH/ g açúcares fermentescíveis (Tabela 8). O uso da batelada alimentada na produção do hidrolisado de mesocarpo de coco verde (Tabela 8) resultou em uma concentração máxima de etanol 13,8% maior em comparação com a fermentação do hidrolisado obtido na batelada simples (Tabela 7). Entretanto, a alta carga de sólidos afetou o rendimento em etanol (Tabela 8), e o rendimento foi 4,1% menor se comparado com o rendimento da fermentação do hidrolisado produzido pela batelada simples (Tabela 7). A maior presença de inibidores, como o ácido acético e compostos fenólicos (Figura 38) em função da alta carga de sólidos,

pode ter afetado o rendimento em etanol (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014; ALMEIDA et al., 2007). Por outro lado, o rendimento em etanol foi similar aos rendimentos de *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, e *P. stipitis* observados na fermentação de hidrolisado do coco produzido por autohidrólise utilizando uma baixa carga de sólidos que ficaram entre 0,43-0,45 g EtOH/ g açúcares fermentescíveis (GONÇALVES et al., 2015). Os açúcares residuais, manose e arabinose, na concentração final de 1,4% (m/v) (Tabela 8), se fermentados, podem resultar em concentrações próximas de 5% (v/v) de etanol.

Em outros estudos, observou-se que os compostos fenólicos de hidrolisados de palha de trigo produzidos por explosão a vapor limitou a carga de sólidos devido à forte inibição da fermentação da cepa de etanol 2G *S. cerevisiae* KE6-12 (MORENO et al., 2013). A concentração de compostos fenólicos observada neste estudo foi inferior à observada no HMC-2. Tais resultados corroboram que a inibição por compostos fenólicos é específica para cada composto (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014). Em adição, um menor rendimento em etanol também foi observado na fermentação de espiga de milho produzido com 19% (m/v) de ST (MS) em comparação com 25% (m/v) de ST (MS) (ZHANG et al., 2010).

O HCV-2 foi fermentado por GSE16-T18 no reatores de 250 mL (Figura 40B), o que não ocorreu nas fermentações anteriores que foram realizados em reatores menores (20 mL) (Figuras 37A e 37B). A levedura foi inoculada com a DO600 de 4, assim como na fermentação da Figura 37B, e a fermentação ocorreu após uma longa fase *lag* (Figura 40B). Talvez o uso de um maior número absoluto de células nos reatores maiores tenha contribuído para o surgimento de mutantes resistentes aos hidrolisados, entretanto não foi possível descrever o fenômeno que resultou no início da fermentação. O HCV-1 também apresentou uma fermentação tardia nos reatores de 250 mL (Apêndice F). A glicose do HCV-2 começou a ser consumida apenas após 72 h e esgotou-se em 120 h (Figura 40B). Outrossim, a produção de etanol e o consumo de manose começaram também por volta de 72 h (Figura 40B).

A formação de glicerol (Figura 40B) ou acetato (dados não reportados) em excesso poderia ser um indicativo de estresse por compostos fenólicos específicos (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014), porém não foram observados níveis que sugerissem a presença de tais compostos fenólicos. Além disso, uma maior

produção de glicerol pela levedura ocorreu no HMC-2 ($0,43 \pm 0,007\%$, m/v) (Figura 40A) em comparação com o HCV-1 ($0,36 \pm 0,01\%$, m/v) (Figura 40B), sendo que o HMC-2 foi prontamente fermentado.

A remoção dos extrativos do PCV foi realizada para uma melhor compreensão da fermentabilidade dos hidrolisado do coco, e a fermentação do HCV-E não apresentou fase *lag* (Figura 40C). A fermentação do HCV-E pela GSE16-T18 foi similar à fermentação do HMC-2 (Figuras 40A e 40C), com um rápido consumo de glicose e produção de etanol, e um consumo parcial da manose. A fermentação incompleta da manose foi observada nos três hidrolisados (HMC-2, HCV-2 e HCV-E) (Figura 40). A manose é transportada para o meio intracelular por transportadores de hexoses (família HXT), e passa por uma etapa de fosforilação e isomerização antes de convergir para a via Embden-Meyerhof-Parnas (MADHAVAN et al., 2012). A levedura *S. cerevisiae* possui 5 hexocinases (Glk1p, Emi2p, Hxk1p, Hxk2p e YLR446W) e uma manose isomerase (Pmi40p) que talvez foram inibidas pelos inibidores dos hidrolisados do coco verde e de seu mesocarpo.

A perda de açúcares em função da remoção dos extrativos refletiu a menor produção de etanol na fermentação do HCV-E em comparação com o HCV-2, $2,49 \pm 0,05\%$ (v/v) e $3,75 \pm 0,07\%$ (v/v), respectivamente (Tabela 8). Os rendimentos em etanol do HCV-2 e HCV-E foram similares, mas inferiores ao HMC-2 (Tabela 8). A alta concentração de ácido acético nos hidrolisados do coco (Figura 41) provavelmente foi a principal causa dos rendimentos em etanol inferiores à 0,40 g de etanol/g açúcares fermentescíveis (Tabela 8). Os perfis similares dos inibidores dos hidrolisados HCV-2 e HCV-E (Figura 41) sugerem que, além do ácido acético, um composto diferente dos inibidores analisados foi responsável pela fermentação tardia do HCV-2, e este composto é solúvel em etanol. Apesar de uma parcial solubilização de ácido 4-hidroxibenzoico pela extração etanólica, a concentração é muito inferior a concentração inibitória reportada para *S. cerevisiae* (ADEBOYE; BETTIGA; OLSSON, 2014). Por outro lado, o coco maduro apresenta uma quantidade maior de compostos fenólicos em comparação com o coco verde, e talvez o ácido 4-hidroxibenzoico possa vir a ser um potencial inibidor de fermentação de hidrolisados do coco maduro produzidos com alta carga de sólidos. Por fim, as concentrações etanol observadas no presente capítulo foram superiores aos previamente reportados (GONÇALVES et al., 2014, 2015; VAITHANOMSAT et al.,

2011), o que reforça o potencial do uso da batelada alimentada na produção de hidrolisados lignocelulósicos.

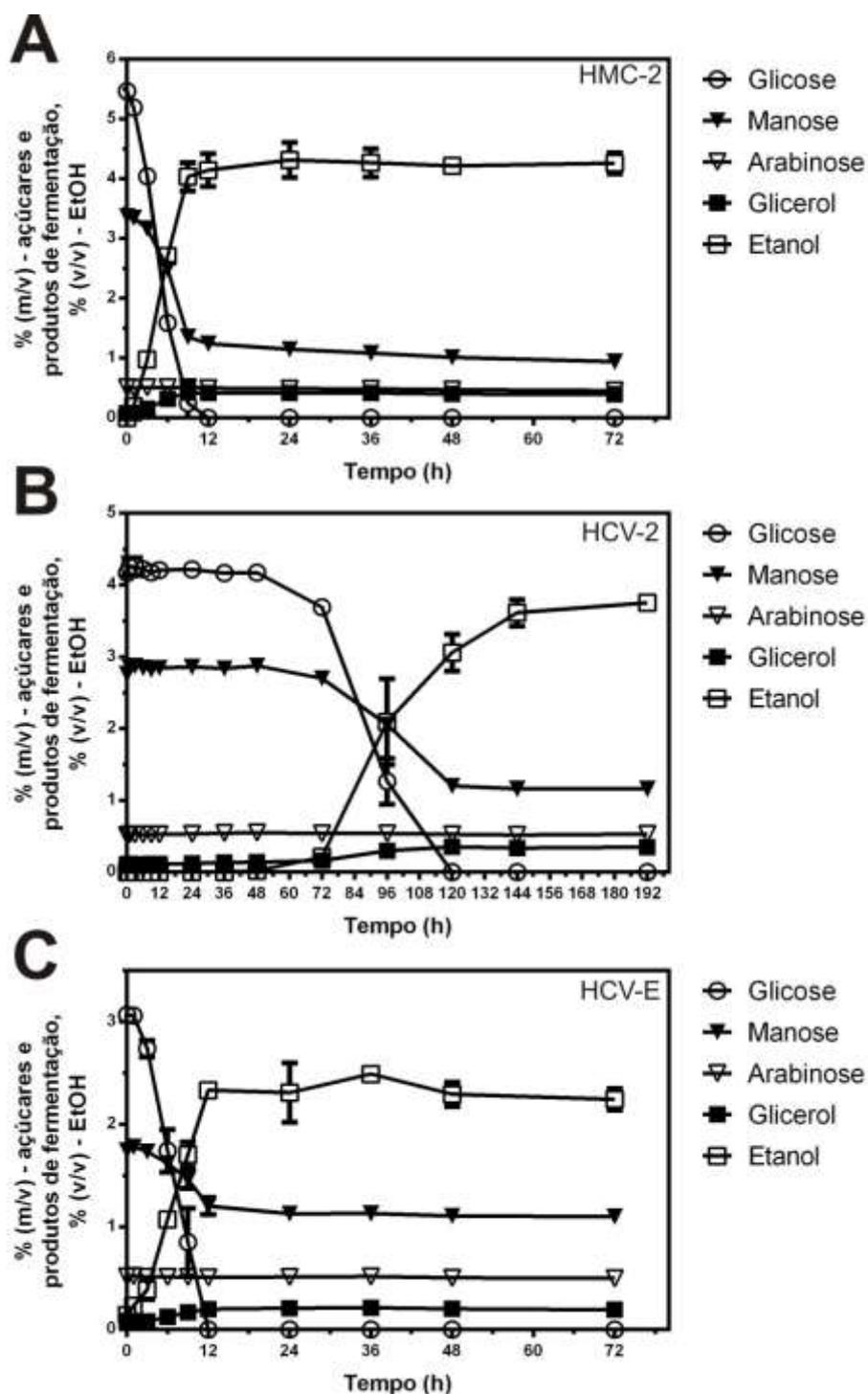


Figura 40: Curva de fermentação da *S. cerevisiae* GSE16-T18 em diferentes hidrolisados do coco. (A) HMC-2, (B) HCV-2 e (C) HCV-E. As fermentações dos hidrolisados foram conduzidas em condição de semi-anaerobiose a 35 °C, pH 5,5.

Tabela 8: Etanol e açúcares residuais da fermentação de diferentes hidrolisados utilizando *S. cerevisiae* GSE16-T18.

Parâmetro	Biomassa					
	Mesocarpo	Mesocarpo	Fruto	Fruto	Fruto s/ extrativos	Fruto s/ extrativos
Máximo EtOH, % (v/v)	4,52	4,14	3,82	3,68	2,54	2,44
Rendimento em EtOH, (g EtOH/ g açúcares*)	0,38	0,45	0,39	0,37	0,37	0,36
Glicose residual, % (m/v)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Manose residual, % (m/v)	0,95	0,94	1,18	1,14	1,13	1,07
Arabinose residual, % (m/v)	0,46	0,46	0,55	0,51	0,51	0,49

n.d. – não detectado

*glicose, manose e arabinose

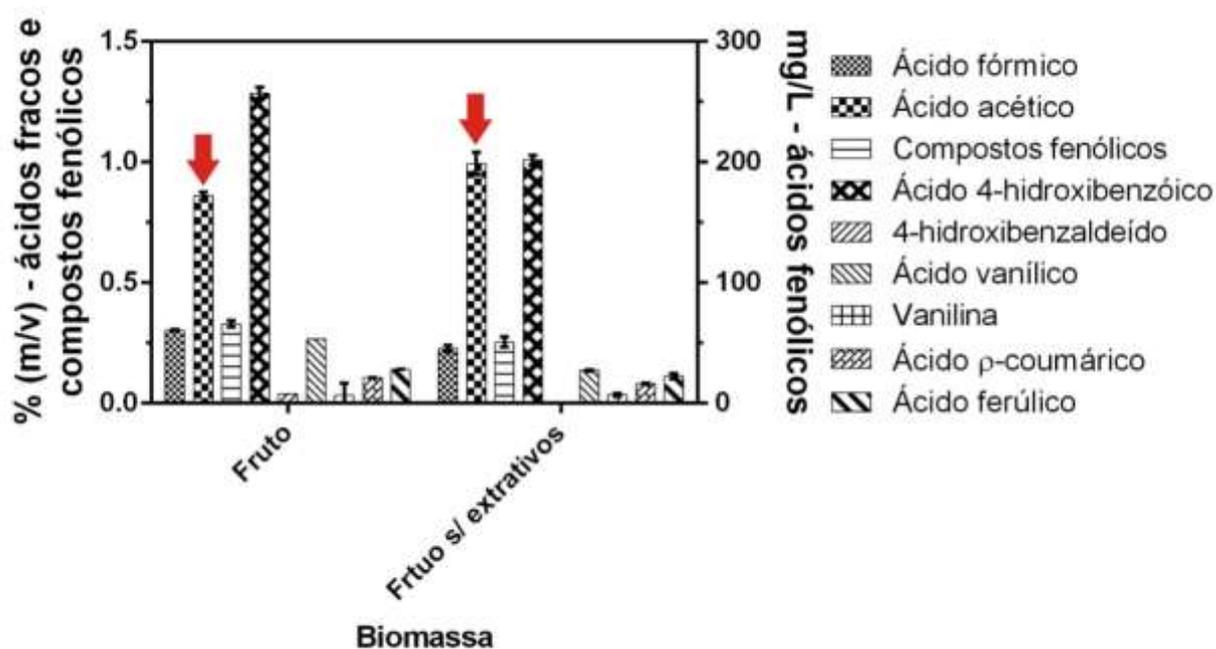


Figura 41: Inibidores na fração líquida nos hidrolisados HCV-2 e HCV-E. Setas vermelhas indicam o principal inibidor (ácido acético) presente nos hidrolisados do PCV. Ácido levulínico, furfural e HMF não foram detectados.

4.3.7. Perfil de ácidos graxos nos hidrolisados HCV-2 e HCV-E

A cepa industrial GSE16-T18 foi capaz de fermentar o HCV-E que continha 1% (m/v) de ácido acético (Figuras 40C e 41). Logo, optou-se por verificar o perfil de ácidos graxos dos hidrolisados. Os ácidos graxos dos hidrolisados do coco com (HCV-2) e sem extrativos em etanol (HCV-E) foram determinados por cromatografia gasosa. A extração com etanol resultou em uma redução de 78,9% dos ácidos graxos presentes no HCV-E em comparação com o HCV-2 (Tabela 9). A quantidade de ácidos graxos com cadeia C12 até C18 no HCV-2 e HCV-E foram $2,5 \pm 0,09$ e $0,53 \pm 0,4$ mg/g de hidrolisado, respectivamente (Tabela 9). O ácido láurico (C12:0) foi o principal ácido graxo observado no HCV-2, seguido do ácido oleico (C18:1) (Tabela 9). A extração com etanol de outros potenciais inibidores, como o ácido acético e compostos fenólicos não foi significativa, e os HCV-2 e HCV-E demonstraram uma composição similar para estes inibidores (Figura 41 e Tabela 9).

O aumento da fase *lag* de *S. cerevisiae* W303-1A em meio YNBt já foi observado em concentrações inferiores de ácido láurico (2 mM ou 0,4 g/L) do que a observada no HCV-2 (0,63 g/L) (MCDONOUGH; STUKEY; CAVANAGH, 2002). Ácidos graxos de cadeia média resultam em acidificação do pH intracelular, acumulação de ROS e modificações na membrana celular (BORRULL et al., 2015). A acidificação intracelular também é um dos efeitos negativos do ácido acético em altas concentrações (ALMEIDA et al., 2007), e talvez a combinação dos dois inibidores foi tóxica para a GSE16-T18. Não foi observada fase *lag* durante a fermentação em outros estudos utilizando o coco (GONÇALVES et al., 2014, 2015). Porém, nestes estudos não foram utilizadas altas cargas de sólidos e os hidrolisados foram destoxificados. Apesar da extração de óleo ser uma alternativa para a remoção dos ácidos graxos, esta não é uma opção comercial viável devido ao baixo teor de óleo presente no coco verde.

Tabela 9: Perfil de ácidos graxos do HCV-2 e HCV-E. A carga de sólidos utilizada na produção dos hidrolisados foi de 30% (m/v) de ST (MS) e a biomassa foi pré-tratada com solução a 1% (m/v) de NaOH sem tempo de residência, a sacarificação foi realizada utilizando 15 FPU/g de biomassa (MS).

Hidrolisado	Ácido graxo (mg/g de hidrolisado)						
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:n	C18:0	C18:1	C18:2
HCV-2	0,63 ± 0,1	0,47 ± 0,1	0,47 ± 0,1	0,01 ± 0,003	0,08 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,27 ± 0,04
HCV-E	0,094 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,0023 ± 0,0005	0,02 ± 0,003	0,13 ± 0,02	0,065 ± 0,01

4.4. Conclusões

O uso da batelada alimentada permitiu que fossem utilizadas cargas de sólidos superiores às utilizadas na batelada simples sem resultar em hidrolisados completamente sólidos. Os ajustes dos parâmetros do pré-tratamento foram importantes para manter os inibidores em concentrações baixas, uma vez que realizou-se o pré-tratamento e a sacarificação sem destoxificação. Evidenciou-se que os açúcares solubilizados pelo pré-tratamento devem ser mantidos para uma maior produção de etanol, como foi observado na perda de açúcares pela remoção dos extrativos. O uso de elevada carga de sólidos mostrou-se uma alternativa simples para se obter hidrolisados com elevadas concentrações de açúcares. Além disso, o uso de elevadas cargas de sólidos não resultou em um aumento expressivo de inibidores, sendo que a intensidade do pré-tratamento (e.g. concentração da solução alcalina e tempo de residência) mostrou-se mais influente na produção de tais compostos.

O mesocarpo, como matéria-prima, apresentou resultados bastante promissores em termos de sacarificação, pré-tratamento e fermentação. O uso do coco inteiro retornou resultados interessantes, mas a fermentação do hidrolisado foi longa. O uso

de solventes apolares (e.g.hexano) talvez evite a solubilização dos açúcares e remova os inibidores do coco. A obtenção de uma cepa resistente aos inibidores também é outra alternativa potencial para a fermentação do hidrolisado do coco. O desenvolvimento de cepas capazes de consumirem todos os açúcares também permitirá que concentrações de etanol ainda maiores sejam alcançadas. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que é possível produzir e fermentar hidrolisados do coco sem destoxificação e com elevada carga de sólidos de forma simples, indo em direção à viabilidade industrial. Os resultados obtidos no presente trabalho estão sumarizados na tabela 10. O uso do coco para produção de etanol 2G poderá mitigar os resíduos da cococultura, assim como agregar valor à sua cadeia produtiva.

Tabela 10: Resultados da produção de açúcares em hidrolisados produzidos utilizando diferentes tipos de biomassa do coco, regimes de batelada, e cargas de sólido, e máximo etanol obtido da fermentação dos hidrolisados utilizando *S. cerevisiae* GSE16-T18.

Biomassa	Tipo de batelada	Carga de sólidos, % (m/v)	Açúcares totais ^a , % (m/v)	Máximo EtOH, % (v/v)
Mesocarpo ^b	Simples	18	7,5	3,73
Mesocarpo ^c	Alimentada	30	9,7	4,33
Coco ^d	Simples	18	6,2	n.f.
Coco ^e	Alimentada	30	8,4	3,75
Coco s/ extrativos ^f	Alimentada	30	5,9	2,49

n.f. – não fermentado

^acelobiose, glicose, manose e arabinose

^bhidrolisado produzido com a carga de enzimática de 15 FPU/g de biomassa (MS)

^cHMC-2

^dhidrolisado produzido com solução a 1% (m/v) de NaOH e sem tempo de retenção

^eHCV-2

^fHCV-E

4.5. Fluxograma do processo final

A figura 42 demonstra o fluxograma do processo final de pré-tratamento e sacarificação por batelada alimentada do PMC, PCV e PCV-E.

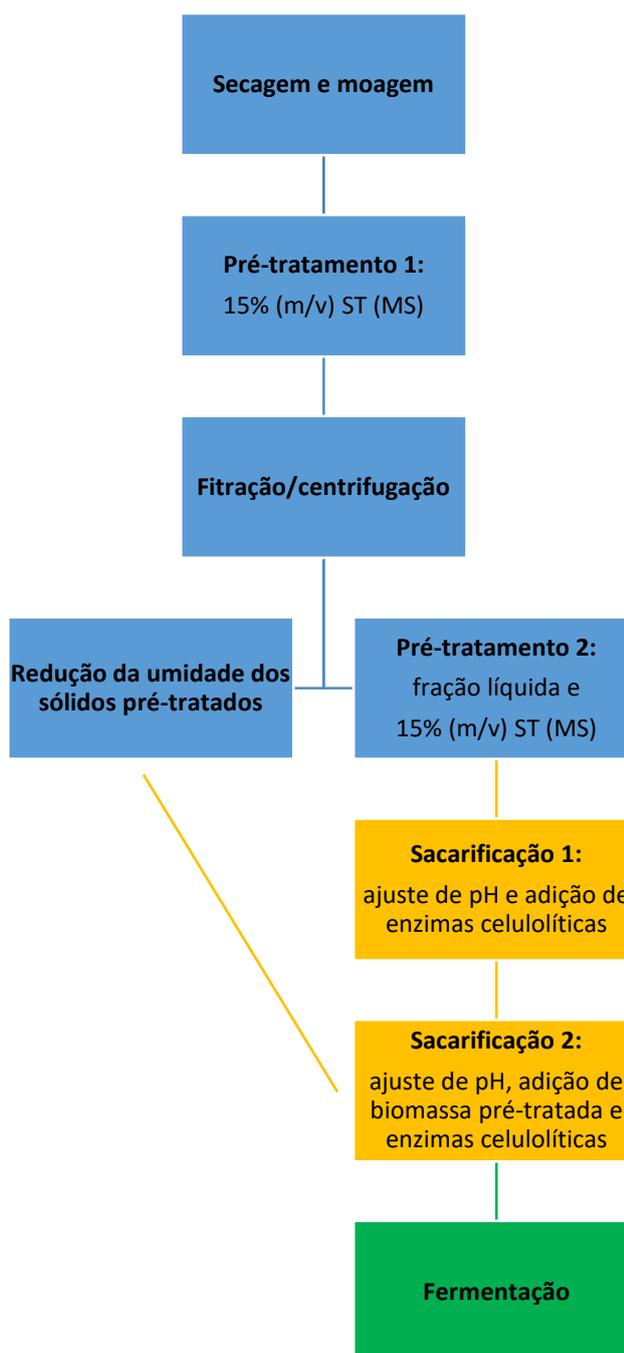


Figura 42: Fluxograma do processo de pré-tratamento e sacarificação por batelada alimentada do PMC, PCV e PCV-E, e fermentação. O pré-tratamento foi dividido em 2 etapas para se evitar a formação de hidrolisados sólidos e reciclar a fração líquida rica em açúcares após o pré-tratamento 1.

A sacarificação também foi realizada em duas etapas para se evitar a formação de hidrolisados sólidos, por isso a adição de sólidos pré-tratados foi feita em duas etapas. Legenda: etapas de pré-tratamento (retângulos azuis), etapas de sacarificação (retângulos amarelos), e etapa de fermentação (retângulo verde).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, v. 4, p. 46, 2014.

AGBOR, V. B., CICEK, N., SPARLING, R., BERLIN, A., LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

ALBUQUERQUE, E. D., TORRES, F. A. G., FERNANDES, A. A. R., FERNANDES, P. M. B. Combined effects of high hydrostatic pressure and specific fungal cellulase improve coconut husk hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 11, p. 1767–1775, 2016.

ALBUQUERQUE, E. D. **Aumento da atividade celulásica para hidrólise da casca de coco verde para aplicação da alta pressão hidrostática**. Rede Nordeste de Biotecnologia, 2013.

ALMEIDA, J. R., MODIG, T., PETERSSON, A., HÄHN-HÄGERDAL, B., LIDÉN, G., GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. D. O. **Água-de-coco**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001.

BALLESTEROS, I., OLIVA, J. M., SAEZ, F., BALLESTEROS, M. Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91–93, n. 1–9, p. 237–252, 2001.

BENASSI, A. C.; FANTON, C. J.; SANTANA, E. N. DE. **O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção**. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, 2003.

BONAWITZ, N. D.; CHAPPLE, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 337–363, 2010.

BORRULL, A., LÓPEZ-MARTÍNEZ, G., POBLET, M., CORDERO-OTERO, R., ROZÈS, N. New insights into the toxicity mechanism of octanoic and decanoic acids on *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 32, p. 451–460, 2015.

BRASILEIRO, G. A. M.; VIEIRA, J. A. R.; BARRETO, L. S. Use of coir pith particles in composites with Portland cement. **Journal of Environmental Management**, v.

131, p. 228–238, 2013.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals – a review. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 572–581, 2015.

BUJANG, N., NAJWA, M., RODHI, M., MUSA, M., SUBARI, F., HALIM, K., HAMID, K. **Coconut dregs for glucose recovery**. IEEE Business Engineering and Industrial Applications Colloquium, 2013.

CABRERA, E., MUÑOZ, M.J., MARTÍN, R., CARO, I., CURBELO, C., DÍAZ, A. B. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 1–7, 2014.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T., ANTUNES, F. A. F., LUIZ DA COSTA FREITAS, W., DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M., DA SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

CAVKA, A.; JÖNSSON, L. J. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 368–376, 2013.

CHANDRA, R. P., AU-YEUNG, K., CHANIS, C., ROOS, A. A., MABEE, W., CHUNG, P. A., GHATORA, S., SADDLER, J. N. The influence of pretreatment and enzyme loading on the effectiveness of batch and fed-batch hydrolysis of corn stover. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 77–85, 2011.

CHUNDAWAT, S. P. S., BECKHAM, G. T., HIMMEL, M. E., DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 121–145, 2011.

CLARK, J. H.; LUQUE, R.; MATHARU, A. S. Green chemistry, biofuels, and biorefinery. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, n. 1, p. 183–207, 2012.

CONRAD, K. Correlation between the distribution of lignin and pectin and distribution of sorbed metal ions (lead and zinc) on coir (*Cocos nucifera* L.). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8476–8484, 2008.

COSGROVE, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, n. 1, p. 171–201, 1997.

CUI, M., ZHANG, Y., HUANG, R., SU, R., QI, W., HE, Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by integrated decrystallization and fed-batch operation. **RSC Advances**, v. 4, n. 84, p. 44659–44665, 2014.

DEMEKE, M. M., DIETZ, H., LI, Y., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., MUTTURI, S., DEPREZ, S., DEN ABT, T., BONINI, B. M., LIDEN, G., DUMORTIER, F., VERPLAETSE, A., BOLES, E., THEVELEIN, J. M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 89, 2013a.

DEMEKE, M. M., DUMORTIER, F., LI, Y., BROECKX, T., FOULQUIÉ-MORENO, M. R., THEVELEIN, J. M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol

production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 120, 2013b.

DEY, G.; CHAKRABORTY, M.; MITRA, A. Profiling C6–C3 and C6–C1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 375–381, 2005.

DING, T. Y.; HUI, S. L.; ONG, L. G. A. Comparison of pretreatment strategies for conversion of coconut husk fiber to fermentable sugars. **BioResources**, v. 7, n. 2, p. 1540–1547, 2012.

DIVYA, L.; PRASANTH, G.; SADASIVAN, C. Potential of the salt-tolerant laccase-producing strain *Trichoderma viride* Pers. NFCCI-2745 from an estuary in the bioremediation of phenol-polluted environments. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2745, 2014.

EIA, U. S. E. I. A. **Sources & Use, Renewable & Alternative Fuels - 2012**. Disponível em: <<https://www.eia.gov/renewable/>>. Acesso em: 29 set. 2015.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, n. 1, p. 119–127, 2001.

ESMERALDO, M. A., GOMES, A. C., FREITAS, J. E. B., FECHINE, P. B. A., SOMBRA, A. S. B., CORRADINI, E., MELE, G., MAFFEZZOLI, A., MAZZETTO, S. E. Dwarf-green coconut fibers: a versatile natural renewable raw bioresource. treatment, morphology, and physicochemical properties. **BioResources**, v. 5, n. 4, p. 2478–2501, 2010.

FAOSTAT. **Coconut production in 2013.** Disponível em:

<http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em: 26 nov. 2015.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S. **A cultura do coco.** Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006.

FONTES, H. R.; FERREIRA, J. M. S.; SIQUEIRA, L. A. **Sistema de produção para a cultura do coqueiro.** Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GLASS, N. L., SCHMOLL, M., CATE, J. H. D., CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 477–498, 2013.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 2007.

GONÇALVES, F. A., RUIZ, H. A., DOS SANTOS, E. S., TEIXEIRA, J. A., DE MACEDO, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, v. 131, p. 66–76, 2014.

GONÇALVES, F. A., RUIZ, H. A., NOGUEIRA, C. DA C., SANTOS, E. S. DOS, TEIXEIRA, J. A., MACEDO, G. R. Bioethanol production from coconuts and cactus

pretreated by autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1–12, 2015.

GUTIÉRREZ-CUENCA, M. A.; COSTA, W. V. **Estatísticas da cocoicultura no Brasil - 1942/2001**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001.

HAHN-HÄGERDAL, B., GALBE, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F., LIDÉN, G., ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., FONSECA, C., SPENCER-MARTINS, I., GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937–953, 2007a.

HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., JEPPSSON, M., GORWA-GRAUSLUND, M. F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 147–77, 2007b.

HARRIES, H. C. The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. **The Botanical Review**, v. 44, n. 3, p. 265–319, jul. 1978.

HOSSAIN, Z. MOHAMMAD; ABE, J.; HIZUKURI, S. Multiple forms of P-mannanase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. January 1994, p. 95–98, 1996.

HU, F.; RAGAUSKAS, A. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 4, p. 1043–1066, 2012.

JOHNSON, D. V. **Non-wood forest products - tropical palms**. Food and Agriculture Organization of The United Nations, 1998.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

JORDAN, D. B., BOWMAN, M. J., BRAKER, J. D., DIEN, B. S., HECTOR, R. E., LEE, C. C., MERTENS, J. A., WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 2, p. 241–252, 2012.

KIM, Y., XIMENES, E., MOSIER, N. S., LADISCH, M. R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 4–5, p. 408–415, 2011.

KUMAR, P., KUMAR, P., BARRETT, D. M., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., DELWICHE, M. J., STROEVE, P., STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry**, p. 3713–3729, 2009.

LEE, S. M., LIN, J. J., LIAO, C. Y., CHENG, H. L., PAN, B.S. Phenolic acids identified in sorghum distillery residue demonstrated antioxidative and anti-cold-stress properties in cultured tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 20, p. 4618–4624, 2014.

LEE, H. V; HAMID, S. B. A.; ZAIN, S. K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–22, 2014.

LIANG, Y., YUAN, Y., LIU, T., MAO, W., ZHENG, Y., LI, D. Identification and computational annotation of genes differentially expressed in pulp development of *Cocos nucifera* L. by suppression subtractive hybridization. **BMC Plant Biology**, v.

14, n. 1, p. 205, 2014.

LIMA, E. B. C., SOUSA, C. N. S., MENESES, L. N., XIMENES, N. C., SANTOS JÚNIOR, M. A., VASCONCELOS, G. S., LIMA, N. B. C., PATROCÍNIO, M. C. A., MACEDO, D., VASCONCELOS, S. M. M. *Cocos nucifera* (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 0, p. 1–12, 2015.

LOSS, R. **Aproveitamento dos resíduos da produção de água de coco verde para produção do bioetanol**. Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

MADHAVAN, A., SRIVASTAVA, A., KONDO, A., BISARIA, V. S. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 22–48, 2012.

MÄKI-ARVELA, P., SALMI, T., HOLMBOM, B., WILLFÖR, S., MURZIN, D. Y. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses - a review. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5638–5666, 2011.

MARTINEZ, A., RODRIGUEZ, M. E., WELLS, M. L., YORK, S. W., PRESTON, J. F., INGRAM, L. O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 2, p. 287–293, 2001.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. D. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

MCDONOUGH, V.; STUKEY, J.; CAVANAGH, T. Mutations in *erg4* affect the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to medium-chain fatty acids. **Biochimica et**

Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1581, n. 3, p. 109–118, 2002.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3094–3103, 2011.

MCNAMARA, J. T.; MORGAN, J. L. W.; ZIMMER, J. A molecular description of cellulose biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 895–921, 2015.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment - a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1430–1442, 2012.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, 2013.

MORENO, A. D., TOMÁS-PEJÓ, E., IBARRA, D., BALLESTEROS, M., OLSSON, L. Fed-batch SSCF using steam-exploded wheat straw at high dry matter consistencies and a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain: effect of laccase supplementation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 160, 2013.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M. R., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid

lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.

NANAYAKKARA, N. H. A. S. Y.; ISMAIL, M. G. M. U.; WIJESUNDARA, R. L. C. Characterization and determination of properties of Sri Lankan coconut fibres. **Journal of Natural Fibers**, v. 2, n. 1, p. 69–81, 30 ago. 2005.

OICA, O. I. DES C. D'AUTOMOBILES. **Production statistics and vehicles in use**. Disponível em: <<http://www.oica.net/>>. Acesso em: 25 set. 2015.

OLIVEIRA, M. E. D. DE; VAUGHAN, B. E.; RYKIEL JÚNIOR, E. J. Ethanol as fuel: energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. **BioScience**, v. 55, n. 7, p. 593–602, 2005.

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

PASSOS, E. E. M.; CARDOSO, B. T.; ARAGÃO, W. M. **Qualidade do fruto de três cultivares de coqueiro**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009.

PAULOVA, L., PATAKOVA, P., BRANSKA, B., RYCHTERA, M., MELZOCH, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015.

PAULY, M., GILLE, S., LIU, L., MANSOORI, N., SOUZA, A. D., SCHULTINK, A., XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 627–642, 2013.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 305–312, 2010.

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 743–762, 2009.

RAULINO, G. S. C., VIDAL, C. B., LIMA, A. C. A., MELO, D. Q., OLIVEIRA, J. T., NASCIMENTO, R. F. Treatment influence on green coconut shells for removal of metal ions: pilot-scale fixed-bed column. **Environmental technology**, v. 35, n. 13–16, p. 1711–20, 2014.

REITER, W. D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 6, p. 536–542, 2002.

RENCORET, J., RALPH, J., MARQUES, G., GUTIÉRREZ, A., MARTÍNEZ, Á. T., DEL RÍO, J. C. Structural characterization of lignin isolated from coconut (*Cocos nucifera*) coir fibers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 2434–2445, 2013.

REZENDE, C., DE LIMA, M., MAZIERO, P., DE AZEVEDO, E., GARCIA, W., POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, 2011.

RFA, R. F. A. **World fuel ethanol production 2014**. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SERRANO-RUIZ, J. C.; WEST, R. M.; DUMESIC, J. A. Catalytic conversion of renewable biomass resources to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, n. 1, p. 79–100, 2010.

SILVA, R. R., OLIVEIRA E SILVA, D., FONTES, H. R., ALVIANO, C. S., FERNANDES, P. D., ALVIANO, D. S. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 107, 2013.

SIQUEIRA, L. A.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. **Introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.

Sluiter, A., Ruiz, R. O., Scarlata, C., Sluiter, J., **Templeton. Determination of extractives in biomass**. National Renewable Energy Laboratory, 2004.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: history, economics, and energy policy. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 6, p. 416–425, 2007.

SOMERVILLE, C. Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, n. 1, p. 53–78, 2006.

SPC, S. P. C. **Coconut, South Pacific foods leaflet 8**. South Pacific Commission, 1983.

STEGMILLER, L., REIS, J. A. A. E S., DE JESUS, R. W., COSTA, L. D. DE M.,

FERNANDES, A. A. R., ALBUQUERQUE, E. D., CORREA, J. D. S., CUNHA, M. K., BASTOS, M. C. M., FERNANDES, P. M. B., ZORZAL, P. B. **Process for obtaining carboxymethyl cellulose from agro-industrial residues and carboxymethyl cellulose and use thereof.** WO2013166575 A1; US2013324711-A1; TW201412776-A; WO2013166575-A9; AU2013258896-A1; EP2847232-A1; AR91814-A1; KR2015058099-A; JP2015523418-W; VN42487-A; CN105143273-A, 2013.

SUN, S., SUN, S., CAO, X., SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.

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

TAKAHASHI, R., KUSAKABE, I., MAEKAWA, A., SUZUKI, T., MURAKAMI, K. Studies on mannanase of Actinomycetes. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v. 27, n. 3, p. 140–148, 1983.

TIAN, S., LUO, X. L., YANG, X. S., ZHU, J. Y. Robust cellulosic ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine using an adapted strain *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8678–85, 2010.

TIMILSENA, Y. P., ABEYWICKRAMA, C. J., RAKSHIT, S. K., BROSSE, N. Effect of different pretreatments on delignification pattern and enzymatic hydrolysability of miscanthus, oil palm biomass and typha grass. **Bioresource Technology**, v. 135, p.

82–88, 2013.

VAITHANOMSAT, P., APIWATANAPIWAT, W., CHUMCHUENT, N., KONGTUD, W., SUNDHRARAJUN, S. The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 45, n. 1, p. 159–164, 2011.

VAN DAM, J. E. G. **Coir processing technologies: improvement of drying, softneing, bleaching and dyeing coir fibre/yarn and printing coir floor coverings**. Common Fund For Commodities, 2002.

VAN DAM, J. E. G., VAN DEN OEVER, M. J. A., KEIJSERS, E. R. P., VAN DER PUTTEN, J. C., ANAYRON, C., JOSOL, F., PERALTA, A. Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk. Part 1: lignin as intrinsic thermosetting binder resin. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 3, p. 207–216, 2004.

VAN DAM, J. E. G., VAN DEN OEVER, M. J. A, TEUNISSEN, W., KEIJSERS, E. R. P., PERALTA, A. G. Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 2, p. 96–104, set. 2006.

VAN DER POL, E., BAKKER, R., VAN ZEELAND, A., SANCHEZ GARCIA, D., PUNT, A., EGGINK, G. Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment. **Bioresource technology**, v. 181, p. 114–23, 2015.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes — factors

affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

VAN MARIS, A. J. A., ABBOTT, D. A., BELLISSIMI, E., VAN DEN BRINK, J., KUYPER, M., LUTTIK, M. A. H., WISSELINK, H. W., SCHEFFERS, W. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391–418, 2006.

VANBENEDEN, N.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, n. 2, p. 237–242, dez. 2006.

VIDAL, B. C., DIEN, B. S., TING, K. C., SINGH, V. Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 8, p. 1405–1421, 2011.

VIKARI, L.; VEHEMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13–24, 2012.

WANG, M., LI, Z., FANG, X., WANG, L., QU, Y. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 123, n. July 2015, p. 1–24, 2012.

WHETTEN, R. W., MACKAY, J. J., SEDEROFF, R. R., STREET, N. W. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 585–609, 1998.

XIE, R., TU, M., WU, Y., ADHIKARI, S. Improvement in HPLC separation of acetic acid and levulinic acid in the profiling of biomass hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4938–4942, abr. 2011.

XIMENES, E., KIM, Y., MOSIER, N., DIEN, B., LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011.

YAMADA, R.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 754–63, 2013.

YAMASHITA, Y., SHONO, M., SASAKI, C., NAKAMURA, Y. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 914–920, 2010.

YANG, B. Y.; MONTGOMERY, R. Alkaline degradation of glucose: effect of initial concentration of reactants. **Carbohydrate Research**, v. 280, p. 27–45, 1996.

YOON, J. M.; ZHAO, L.; SHANKS, J. V. Metabolic engineering with plants for a sustainable biobased economy. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 4, n. March, p. 211–237, 2013.

ZENG, Y., ZHAO, S., YANG, S., DING, S.Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 38–45, 2014.

ZHANG, M., WANG, F., SU, R., QI, W., HE, Z. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after

combined pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4959–4964, 2010.

ZHAO, X.-Q., ZI, L.-H., BAI, F.-W., LIN, H.-L., HAO, X.-M., YUE, G.-J., HO, N.W.Y. Bioethanol from lignocellulosic biomass. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 123, n. July 2015, p. 25–51, 2011.

ZHU, J.; WAN, C.; LI, Y. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7523–7528, 2010.

6. APÊNDICE

6.1. Apêndice A: produção de hidrolisado do PMC utilizando 18% (m/v) de ST destoxificados por lavagem

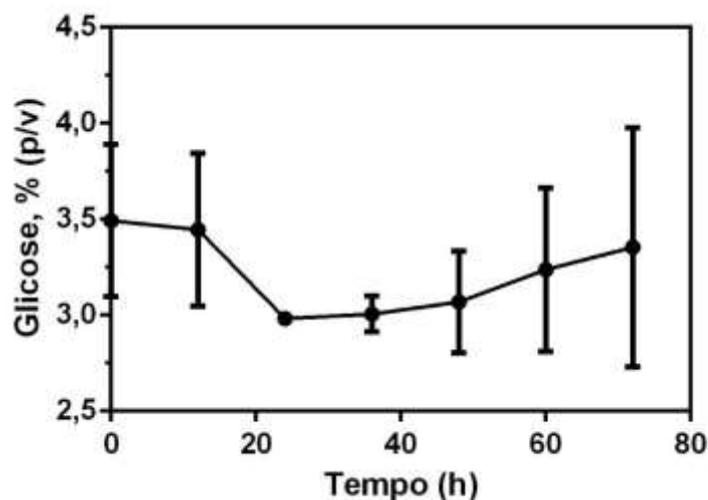
Produziu-se hidrolisado do mesocarpo do coco verde conforme o item 3.2.3 (Processo A). Entretanto, após o pré-tratamento a biomassa foi lavada 3x com água ultrapura, e a lama foi então filtrada e seca a 70 °C até peso constante. Os sólidos foram suspensos com água ultrapura até 18% m/v de ST (MS) e a sacarificação foi realizada conforme item 3.2.3 (Processo A). A lama, mesmo após a adição da azida sódica e do coquetel enzimático, apresentou um aspecto bastante pastoso e a biomassa não foi hidrolisada. Os resultados sugerem que a produção do HMC com uma elevada carga de sólidos, 18% (m/v) de ST (MS), foi possível em função da solubilização de parte da biomassa durante o pré-tratamento e o uso da lama na sacarificação sem a etapa de destoxificação, conforme foi observado na produção de hidrolisados do item 3.3.1. A biomassa pré-tratada provavelmente é rica em materiais insolúveis em água (e.g. celulose e lignina) em comparação com o PMC não tratado, o que resultou na lama pastosa e de difícil homogeneização.

6.2. Apêndice B: produção de hidrolisado do PMC utilizando 10% (m/v) de ST destoxificados por lavagem

O PMC foi suspenso em solução a 10% (m/v) de NaOH até a concentração 10% (m/v) de ST (MS). O material foi homogeneizado em agitador do tipo orbital a 150 rpm por 30 min em temperatura ambiente. O material foi então autoclavado a 121 °C por 30 min. A fração líquida foi removida por filtração, e a biomassa foi lavada 10x com água destilada, sendo então filtrada e seca a 70 °C até peso constante. Os sólidos pré-tratados foram suspensos em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) até a concentração de 10% (m/v) de ST (MS), e a sacarificação ocorreu com a adição de 30 FPU/g de biomassa (MS) de celulases de *T. reesei* ATCC26921 (Celluclast 1.5L) e 30 CB/g de biomassa (MS) de *Aspergillus niger* C6105 (Novozyme 188), as enzimas foram produzidas pela Novozymes S.A. (Dinamarca). A sacarificação ocorreu a 50 °C a 160 rpm por 96 h. O hidrolisado apresentou $2,2 \pm 0,2\%$ (m/v) de glicose.

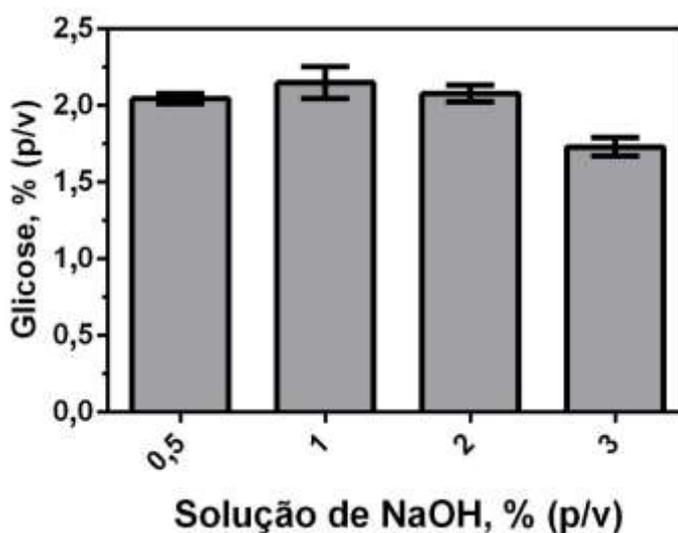
6.3. Apêndice C: produção de hidrolisado do PMC utilizando 20% (m/v) de ST

Produziu-se hidrolisado do mesocarpo do coco verde conforme o item 3.2.3 (Processo A). Entretanto, utilizou-se 20% (m/v) de ST (MS) ao invés de 18% (m/v) de ST (MS). O pré-tratamento foi realizado com solução a 2% (m/v) de NaOH e tempo de retenção de 24 h. A sacarificação foi realizada por 72 h e amostras foram colhidas em diferentes intervalos de tempo. O uso de 20% (m/v) de ST (MS) resultou em hidrolisado sólido, que não foi liquefeito durante a sacarificação. O problema da homogeneização resultou em grande erro experimental em função da amostragem heterogênea, além de não resultar numa conversão da celulose em açúcares de forma gradual.



6.4. Apêndice D: produção de hidrolisado do PCV utilizando diferentes soluções de NaOH

Produziu-se hidrolisado do coco verde conforme item 3.2.3 (Processo A). Entretanto, utilizou-se 15% (m/v) de ST (MS) e o tempo de retenção de 24 h durante o pré-tratamento. Avaliou-se o efeito de diferentes soluções de NaOH no pré-tratamento, sendo 0,5, 1, 2 e 3% (m/v) de NaOH. A sacarificação foi realizada por 62 h. O uso de soluções de 1 e 2% (m/v) de NaOH resultaram em maiores rendimentos em açúcares após a sacarificação. Optou-se por utilizar soluções de NaOH com concentrações acima de 1% (m/v) na avaliação de outros parâmetros ao longo do presente trabalho como a maior produção de açúcares, redução de inibidores, tempo de pré-tratamento e carga enzimática.



6.5. Apêndice E: produção de PCV verde utilizando batelada alimentada com etapa de destoxificação

Os frutos verdes utilizados neste estudo foram doados por comerciantes de Vitória (Espírito Santo). Os frutos de coco sem o albúmen líquido ($n = 90$) foram lavados em água corrente e reduzidos em trituradora de coco TRC40 (Metalúrgica Trapp, Brasil). O coco foi seco a 105 °C em estufa com circulação de ar forçada até redução da umidade em menos de 5% (m/m). A biomassa foi moída em moinho do tipo martelo.

A biomassa foi misturada com uma solução de 0,4 M (1,6%, m/v) de NaOH até a concentração de 5% (m/v), e mantida em repouso por 20 h. A lama foi removida e a biomassa foi lavada 2 vezes com água e uma vez com solução de 0,1% (m/v) de Na₂SO₃, os volumes utilizados foram os mesmos da solução de NaOH. A biomassa foi então centrifugada para redução da umidade. A sacarificação foi iniciada com 5% (m/v) de sólidos pré-tratados, e as cargas de enzimas foram 13 FPU/g de biomassa e 1,3 CB/g de biomassa, sendo utilizadas as Cellic CTec2 e Cellic HTec2 da Novozymes S.A. (Dinamarca), respectivamente. A sacarificação ocorreu a 100 rpm e 50 °C. Foram realizadas 3 cargas de biomassa e enzimas nas concentrações supracitadas a cada 6 h, totalizando 20% de sólidos pré-tratados. Em função da alta viscosidade, foi necessária a remoção de sólidos não digeridos durante a sacarificação. A concentração de açúcares foi 0,4% (m/v) de celobiose, 1,36% (m/v) de glicose, 1,18% (m/v) de manose e 1,5% (m/v) de arabinose. A destoxificação resultou em um hidrolisado com apenas 0,14% (m/v) de ácido acético. HMF e furfural não foram detectados.

6.6. Apêndice F: fermentação do HCV-1 utilizando cepa de etanol 2G

A curva de fermentação semi-anaeróbica do HCV-1 pela *S. cerevisiae* GSE16-T18 foi realizada conforme item 4.2.7 utilizando frascos reagente de 250 mL. As amostras foram retiradas ao longo das fermentações para análise de açúcares e produtos de fermentação entre 0 e 144 h. A curva fermentação do HCV-1 pela *S. cerevisiae* GSE16-T18 foi similar à curva de fermentação do HCV-2 (Item 4.3.6), em que se observou o consumo de glicose a partir de 72 h de fermentação e esgotou-se em 144 h. A concentração final de etanol foi de $3.2 \pm 0.04\%$ (v/v).

