

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**

**CENTRO DE TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PPGEQ)**



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**VALORIZAÇÃO DA FIBRA DE COCO VERDE PARA PRODUÇÃO DE  
LIGNOSULFONATO APLICADO À PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA  
GERAÇÃO**

**Beatriz Meneghetti Costa de Araújo**

Orientador(a): Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Co-orientador(a): Prof. Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha

**NATAL**

**2023**

BEATRIZ MENEGHETTI COSTA DE ARAÚJO

**VALORIZAÇÃO DA FIBRA DE COCO VERDE PARA PRODUÇÃO DE  
LIGNOSULFONATO APLICADO À PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA  
GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Co-orientador: Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha

NATAL

2023

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Horácio Nicolas Solimo - - Engenharia Química -  
EQ - CT

Araújo, Beatriz Meneghetti Costa de.

Valorização da fibra de coco verde para produção de  
lignosulfonato aplicado à produção de etanol de segunda geração  
/ Beatriz Meneghetti Costa de Araújo. - Natal: UFRN, 2023.  
98f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande  
do Norte, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos.

Coorientador: Carlos Eduardo de Araújo Padilha.

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Lignosulfonato. 3. Lignina.  
4. Hidrólise enzimática. 5. Etanol. I. Santos, Everaldo Silvino  
dos. II. Padilha, Carlos Eduardo de Araújo. III. Título.

RN/UF/BSEQ

CDU 661.722

BEATRIZ MENEGHETTI COSTA DE ARAÚJO

VALORIZAÇÃO DA FIBRA DE COCO VERDE PARA PRODUÇÃO DE  
LIGNOSULFONATO APLICADO À PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA  
GERAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte,  
como requisito à obtenção do título de Mestre em  
Engenharia Química.

Dissertação aprovada em: 07/08/2023

COMISSÃO EXAMINADORA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos (Orientador)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha (Co-orientador)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Nathália Saraiva Rios

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Ferreira De Souza Filho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa conquista ao meu avô, Leonardo, por ser luz em minha vida; e aos meus pais, Fábio e Michele, por serem meus maiores incentivadores e apoiadores.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me protege e guia meus passos.

Aos meus amados pais, Fábio e Michele, que são meus exemplos e sempre me incentivam, me ajudam e estão ao meu lado me apoiando quando necessário. Sempre fizeram o possível e impossível para me prover as melhores oportunidades.

Ao meu querido avô, Leonardo, que, mesmo de longe, sempre está participando de alguma forma e comemorando minhas conquistas.

Aos meus queridos avós, Marlene, Diana, Valdevino, Azarias e Rita, por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu namorado, Pedro Henrique, por me mostrar uma nova forma de enxergar o amor e o companheirismo. Agradeço por sempre me ouvir, me apoiar e me incentivar.

Ao meu professor orientador, Professor Dr. Everaldo Silvino, que sempre se mostrou muito atencioso às minhas dúvidas, sempre tentando me orientar da melhor forma. Obrigada por ter contribuído com minha formação, como professor e orientador.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Padilha, que me passou seus ensinamentos com tanta paciência, a quem tanto admiro e em quem me inspiro. À Professora Dra. Nathália Rios, por todo o apoio e disponibilidade em me auxiliar, sempre com muita delicadeza. Ao professor Dr. Domingos Fabiano, por sempre ter se mostrado muito solícito, sempre torcendo e acreditando no meu potencial.

À farmacêutica Waleska, por toda a paciência e disponibilidade para me auxiliar e ensinar sempre que necessário. O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) não é o mesmo sem você! Ao Dr. Vitor Troccoli e ao Me. Daladiê Barreto, por sempre me auxiliarem, tirarem minhas dúvidas e ouvirem meus desabafos, com muito carinho, também tornando muitos dos meus dias mais alegres.

Aos meus amigos do LEB Jaqueline, Francisco Bruno e Isabela, pelo companheirismo e apoio durante todo esse período e por tornarem a rotina mais leve. Aos meus amigos da vida, Isadora Braz, Maria Luiza Paes e Lucas Pedro pelas alegrias que compartilhamos, mas também por não saírem do meu lado nos momentos difíceis.

## RESUMO

A fim de reduzir os impactos ambientais gerados pelo descarte inadequado de resíduos agroindustriais, a busca por reaproveitá-los promove um olhar mais atencioso para o etanol de segunda geração, além do aproveitamento da lignina para produção de produtos de valor agregado. O presente estudo avaliou tanto a produção de etanol como do surfactante lignosulfonato (LS), um produto de valor agregado obtido a partir do reaproveitamento da lignina extraída, utilizando como matéria prima a fibra de coco verde. Assim, foi estudada a produção de açúcares a partir da hidrólise enzimática variando-se a concentração de biomassa (5,0, 10,0 e 15,0 %) e a carga de enzimas (10,0, 15,0 e 20,0 FPU/g), após os pré-tratamentos com hidróxido de sódio (ensaio HS) e combinado (explosão a vapor seguido do tratamento com hidróxido de sódio) (ensaio EVHS). Em seguida, foi avaliada a produção etanólica para ambos os ensaios, variando-se a carga de sólidos e de enzimas, além das estratégias de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e semi-simultâneas (SSSF). No presente estudo, o lignosulfonato produzido a partir de uma sulfometilação da lignina foi adicionado na hidrólise enzimática da biomassa, a fim de se avaliar o seu efeito no rendimento de açúcares. Na hidrólise enzimática, o aumento da carga de sólidos demonstrou um aumento significativo na concentração de glicose obtida para ambos os ensaios, porém, a variação da carga enzimática não foi estatisticamente significativa, exceto para o ensaio EVHS, a 15% de sólidos, com 15 FPU/g (>34 g/L) e 20 FPU/g (>31 g/L). Ademais, o lignosulfonato é eficiente na redução da adsorção não-produtiva da lignina na enzima, quando adicionado ao processo de hidrólise. Na fermentação, a mudança na estratégia fermentativa e a variação da carga enzimática não indicou variação significativa na produção de etanol para o ensaio HS. Por sua vez, para o ensaio EVHS, o aumento da carga enzimática aumentou de maneira significativa a concentração de etanol produzida. Além disso, a mudança de estratégia de SSF (a 20,0 FPU/g) para SSSF (a 15,0 FPU/g) demonstrou um aumento em torno de 40% na concentração de etanol obtida, enquanto reduziu cerca de 25% de enzima utilizada. Em relação aos lignosulfonatos, as análises de FTIR corroboraram a eficiência do processo de sulfometilação para sulfonação dos grupos aromáticos da lignina. Sua adição na hidrólise enzimática, para uma concentração de 0,5 g/L (1% m/m de biomassa), resultou em um aumento de 30% na conversão celulósica. Portanto, os resultados indicam que o aumento da quantidade de sólidos na hidrólise enzimática aumenta a conversão celulósica, mas nem sempre o aumento da carga enzimática se faz necessário. Além disso, verificou-se que a mudança de estratégia fermentativa, em alguns casos, permite a redução da quantidade de enzima comercial usada, ainda aumentando a produção de etanol no processo.

**Palavras-chave:** biomassa lignocelulósica, lignosulfonato, lignina, hidrólise enzimática, etanol.

## ABSTRACT

In order to reduce the environmental impacts generated by the inappropriate disposal of agro-industrial waste, their reuse promotes a more attentive look at second-generation ethanol, in addition to the use of lignin for the production of value-added products. The present study evaluated ethanol and liginosulfonate (LS) productions, from green coconut fiber. The sugar production in enzymatic hydrolysis was studied by varying the biomass concentration (5, 10 and 15%) and the enzymatic load (10, 15 and 20 FPU/g), after pre-treatments with sodium hydroxide (test HS) and combined (steam explosion followed by treatment with sodium hydroxide) (test EVHS). Then, the ethanolic production was evaluated for both tests, varying the solids load and in simultaneous (SSF) and semi-simultaneous (SSSF) saccharification and fermentation strategies. The liginosulfonate produced from a liginin sulfomethylation was added in the biomass enzymatic hydrolysis, in order to evaluate its effect on the sugars yield. In the enzymatic hydrolysis, the increase in the solid load showed a significant increase in the glucose concentration obtained for both tests. However, the variation in the enzymatic load was not statistically significant. Only for test EVHS, at 15% solids, with 15 FPU/g (>34 g/L) and 20 FPU/g (>31 g/L). Furthermore, liginosulfonate is efficient in reducing the non-productive adsorption of liginin on the enzyme when added in the hydrolysis process. In fermentation, the change in fermentation strategy and the variation in enzymatic load did not indicate a significant variation in ethanol production for test HS. In turn, for test EVHS, the significant increase in enzymatic load increased the ethanol produced concentration. In addition, changing the strategy from SSF (at 20 FPU/g) to SSSF (at 15 FPU/g) showed an increase equivalent to 40% in the ethanol obtained concentration, while reducing about 25% of used enzyme. Regarding liginosulfonates, FTIR analyzes corroborate the efficiency of sulfomethylation process for sulfonation of the aromatic groups of liginin. As for its addition in enzymatic hydrolysis, for a concentration of 0.5 g/L (1% m/m of biomass), it showed a 30% increase in cellulosic conversion. Therefore, the results indicate that increasing the amount of solids in enzymatic hydrolysis increases cellulosic conversion, but increasing the enzymatic load is not always necessary. In addition, it was verified that the change in the fermentation strategy, in some cases, allows the reduction of the amount of cormaceous enzyme used, even increasing the production of ethanol in the process.

**Keywords:** liginocellulosic biomass, liginosulfonate, liginin, enzymatic hydrolysis, ethanol.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	10
1. Introdução.....	10
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS</b> .....	13
2. Objetivos .....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3. Revisão Bibliográfica .....	16
3.1 Biomassas Lignocelulósicas.....	16
3.1.1 Celulose .....	17
3.1.2 Hemicelulose .....	18
3.1.3 Lignina .....	19
3.2 Coco Verde.....	21
3.3 Produção de Etanol Celulósico .....	23
3.3.1 Pré-tratamento .....	24
3.3.2 Hidrólise Enzimática.....	27
3.3.3 Fermentação .....	29
3.4 Valorização da Lignina.....	31
3.4.1 Lignosulfonato .....	32
3.4.1.1 Adição de Lignosulfonato na Hidrólise Enzimática.....	36
<b>CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4. Materiais e Métodos.....	38
4.1 Materiais .....	38
4.2 Obtenção e Preparo do Coco.....	39
4.3 Pré-tratamento .....	39
4.3.1 Pré-tratamento Alcalino .....	39
4.3.2 Pré-tratamento Combinado (Explosão a vapor – alcalino).....	40
4.4 Extração de Lignina.....	41

4.5	Produção de Lignosulfonato .....	41
4.6	Caracterização química e física .....	41
4.6.1	Umidade .....	41
4.6.2	Extraíveis .....	42
4.6.3	Polissacarídeos e Lignina Insolúvel .....	42
4.6.4	Teor de Cinzas Totais .....	44
4.6.5	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	45
4.6.6	Análise Termogravimétrica (TG).....	45
4.6.7	Análise de Difração de Raios-X (DRX) e Índice de Cristalinidade (IC).....	45
4.7	Hidrólise Enzimática.....	46
4.7.1	Hidrólise Enzimática com adição de lignosulfonato .....	47
4.8	Fermentação .....	47
4.8.1	Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF).....	47
4.8.2	Sacarificação e Fermentação Semi-simultâneas (SSSF).....	48
4.9	Análise estatística .....	48
<b>CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>		<b>49</b>
5.	Resultados e Discussões .....	50
5.1.	Caracterizações das biomassas lignocelulósicas.....	50
5.1.1.	Caracterização físico-química das fibras .....	50
5.1.2.	Análise por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	52
5.2.	Hidrólise Enzimática.....	55
5.3	Fermentação .....	61
5.4	Caracterização da Lignina .....	63
5.4.1	Análise por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	63
5.4.2	Análise termogravimétrica (TG) .....	65
5.5	Caracterização do Lignosulfonato.....	66
5.5.1	Análise por espectrofotometria de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	67

5.5.2	Análise termogravimétrica (TG)	68
5.6	Adição de lignosulfonato na hidrólise enzimática	69
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES</b>		72
6	Conclusões	73
7	Referências Bibliográficas	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Fluxograma de processo.....	12
Figura 3.1 - Composição da parede celular vegetal. (A) celulose (B) hemicelulose (C) lignina. .....	17
Figura 3.2 - Estrutura da Celulose.....	18
Figura 3.3 - Estruturas que compõem a hemicelulose. ....	19
Figura 3.4 - Ligações presentes e unidades estruturais básicas encontradas na lignina. ....	20
Figura 3.5 - Estrutura do Coco. (1) epicarpo, a casca da fruta; (2) mesocarpo fibroso, o miolo; (3) endocarpo, a casca da semente; (4) endosperma carnoso ou albúmen sólido, a parte comestível do fruto e que é preenchido pelo endosperma (ou albúmen) líquido (água de coco); e o embrião (5).....	21
Figura 3.6 - Processo Produtivo do Bioetanol. ....	23
Figura 3.7 - Estrutura lignocelulósica com ação do pré-tratamento. ....	24
Figura 3.8 - Ação enzimática na biomassa.....	28
Figura 3.9 - Conversão de glicose em etanol. ....	29
Figura 3.10 - Ilustração de uma micela formada devido à presença do surfactante. ....	33
Figura 3.11 – Parte da estrutura do lignosulfonato. ....	33
Figura 3.12 - Reação de sulfometilação em unidade fenilpropanóide para formação do lignosulfonato.....	34
Figura 3.13 - Interação cátion- $\pi$ entre celulase e lignina. ....	36
Figura 5.1 - Análises de espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier das biomassas lignocelulósicas IN (não-tratada), HS (alcalina), EVHS (combinada).....	53
Figura 5.2 - Difratoograma das fibras de coco verde (a) in natura (IN); (b) combinada (EHVS); (c) alcalina (HS). ....	54
Figura 5.3 - Concentrações de glicose e xilose liberadas após hidrólise enzimática do coco verde para ensaio HS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. A letra a foi utilizada para comparar os valores obtidos, indicando resultados sem diferença significativa para um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ). ....	56
Figura 5.4 - Concentrações de glicose e xilose liberadas após hidrólise enzimática do coco verde EHVS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ). ....	57
Figura 5.5 - Conversão celulósica para a hidrólise enzimática da biomassa HS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15	

e 20 FPU/g) em cada. A letra a foi utilizada para comparar os valores obtidos, indicando resultados sem diferença significativa para um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).....	59
Figura 5.6 - Conversão celulósica para a hidrólise enzimática EVHS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).....	60
Figura 5.7 - Fermentação via SSF e SSSF das biomassas (a) HS e (b) EVHS variando carga de sólidos (10, 15 e 30%), carga enzimática (10, 15, 20 FPU/g) e estratégia fermentativa (SSF e SSSF). As letras a, b, c e d foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).....	61
Figura 5.8 - Análises de Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier das ligninas.....	64
Figura 5.9 - Análise termogravimétrica das Ligninas D e E.....	65
Figura 5.10 – Lignosulfonato, sendo (a) HS e (b) EVHS. ....	66
Figura 5.11 - Análise de FTIR dos lignosulfonatos HS e EVHS.....	67
Figura 5.12 - Análise de perda de massa por termogravimetria dos lignosulfonatos. ....	68
Figura 5.13 - Concentração de açúcares após hidrólise enzimática com diferentes concentrações de lignosulfonato. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).....	69
Figura 5.14 - Conversão celulósica da hidrólise com adição de lignosulfonato em diferentes concentrações. (a) concentrações de 0, 0,1 e 0,5% de LS, para 10 FPU/g; (b) concentrações de 0, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0% de LS para 20 FPU/g. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais inibidores de microrganismos.....	30
Tabela 4.1 – Pré-tratamentos usados na fibra de coco verde.....	39
Tabela 4.2 - Fatores de conversão dos açúcares .....	43
Tabela 5.1 - Caracterização físico-química da biomassa não-tratada e após os pré-tratamentos. As letras a, b e c foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p >$ 0.05).....	50
Tabela 5.2 - Retenção de celulose e remoção de lignina e hemicelulose nas biomassas HS e EVHS após os pré-tratamentos.....	52

## LISTA DE SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

AA – Ácido Acético

ACN - Acetonitrila

1G – Primeira geração

2G – Segunda geração

3G – Terceira geração

E2G – Etanol de segunda geração

EUA – Estados Unidos da América

Finep – Financiadora de Estudos e Projetos do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações

Paiss – Plano de Apoio Conjunto à Inovação Tecnológica Agrícola no Setor Sucroenergético

XOS – Xilooligossacarídeos

% – Porcentagem

LS – Lignosulfonato

TG – Análise Termogravimétrica

FTIR – Análise por espectrofotometria de infravermelho por Transformada de Fourier

DRX – Análise de Difração de Raios-X

HMF - Hidroximetilfurfural

FF – Furfural

Ro – Fator de Severidade

CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> - grupo metileno sulfonato

---

# CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

---

# 1. Introdução

*Neste capítulo faz-se uma introdução ao tema da pesquisa realizada, em que são abordados a importância do trabalho e seus aspectos gerais.*

A biomassa lignocelulósica é uma fonte energética renovável e abundante, que pode ser utilizada na produção de combustíveis líquidos e gasosos. Sendo responsável por 50% da biomassa total disponível no mundo (SUKUMARAN et al., 2009), pode ser utilizada na fabricação de produtos termoquímicos e álcoois de segunda geração e, portanto, tem ganhado cada vez mais importância na matriz energética mundial (WU et al., 2022). Além de garantir o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, visa a redução de danos ambientais causados por fontes de energia primária não-renováveis (como petróleo, gás natural e carvão mineral), que são os combustíveis emissores de CO<sub>2</sub>, fortemente relacionado ao efeito estufa e causador da elevação da temperatura do planeta e de mudanças climáticas (NAIK et al., 2010; BOZIO, 2018).

O coco verde é um dos principais cultivos presentes no Brasil desde o século XVI, sendo muito utilizado na produção de leite de coco, coco ralado, açúcar, água de coco, óleo de coco e outros (EMBRAPA, 2014). Apesar da variedade de produtos oriundos do coco, aproximadamente 80-85% deste tende a ser descartado como resíduo, mas que pode se tornar uma matéria-prima potencial para a produção de butanol e etanol, uma vez que é rica em polímeros estruturais que podem ser convertidos em glicose e, posteriormente, fermentados em etanol e butanol (ARAÚJO, 2021).

Em se tratando da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, os novos processos são desafiadores, porém promissores. A conversão desse tipo de material em açúcares fermentescíveis por via enzimática, e posterior produção de etanol por fermentação, tem sido uma alternativa na busca para atender a alta demanda mundial energética associada ao aproveitamento dos resíduos agroindustriais do processamento do coco, milho, cana de açúcar, entre outros (NOGUEIRA, 2017).

Tendo em vista a alta complexidade da matriz lignocelulósica, os pré-tratamentos são uma alternativa para desestruturá-la e, assim, aumentar a disponibilidade de celulose e hemicelulose na biomassa, a partir de reações que permitam reduzir a quantidade de lignina na biomassa e ou modificá-la (SILVERSTEIN et al., 2007). Esses polissacarídeos serão, então, hidrolisados em açúcares monoméricos fermentescíveis, e, posteriormente, fermentados em etanol. Diferentes pré-tratamentos, como químicos, físicos, físico-químicos e

biológicos, ou combinações destes, devem ser utilizados de acordo com necessidades específicas e com a biomassa a ser usada, uma vez que não há um consenso na comunidade científica acerca de um único tipo de tratamento que seja eficiente para todos os materiais celulósicos (SADDLER & KUMAR, 2013). A escolha do pré-tratamento deve levar em consideração fatores tecnológicos, econômicos e ambientais e, desta forma, deve-se avaliar o rendimento de açúcares, quantidade de energia, temperatura e pressão, bem como a utilização de reagentes químicos e água que são primordiais para a viabilidade do processo (SOUZA et al., 2009).

Além da biomassa pré-tratada rica em celulose utilizada para produção de etanol, é possível que a fração líquida produzida seja rica em lignina e utilizada na produção de energia e de outros compostos de interesse, como álcool, proteínas, vanilina e surfactantes (LUO et al., 2010 *apud* NOGUEIRA et al., 2018). Nesse caso destaca-se o Lignosulfonato, amplamente obtido a partir de reações de sulfonação e hidrólise no processo sulfito em indústrias de polpação da madeira (ARO & FATEHI, 2017), que é um polímero aniônico e solúvel em água, devido à substituição de partes hidrofóbicas por grupos sulfatos na lignina, sendo então um surfactante renovável, degradável, de baixa toxicidade e de baixo custo (PADILHA et al., 2021). Sua molécula é similar à lignina precursora, sendo composta por álcoois coniferílico (grupo guaiacila), sinapílico (grupo siringila), e p-cumarílico (grupo p-hidroxifenila) ligados entre si por ligações éter ou carbono-carbono, e pode ter diferentes massas moleculares. Destacando-se que esta característica afeta diretamente o comportamento adsorvente desse biopolímero (RUWOLDT et al., 2020; PADILHA et al., 2021)

Salienta-se que, nas pesquisas sobre produção de etanol 2G, há uma busca por alternativas que aumentem o rendimento da hidrólise, melhorando a acessibilidade da enzima à celulose, e evitando o mecanismo de adsorção irreversível de parte das celulasas sobre a lignina (ARAÚJO, 2016). Dessa forma, destaca-se o uso de polímeros com propriedades tensoativas para facilitar a transferência de lignina e derivados da fase aquosa para a superfície polimérica, tornando a superfície celulósica mais disponível para ação enzimática (NOGUEIRA, 2021).

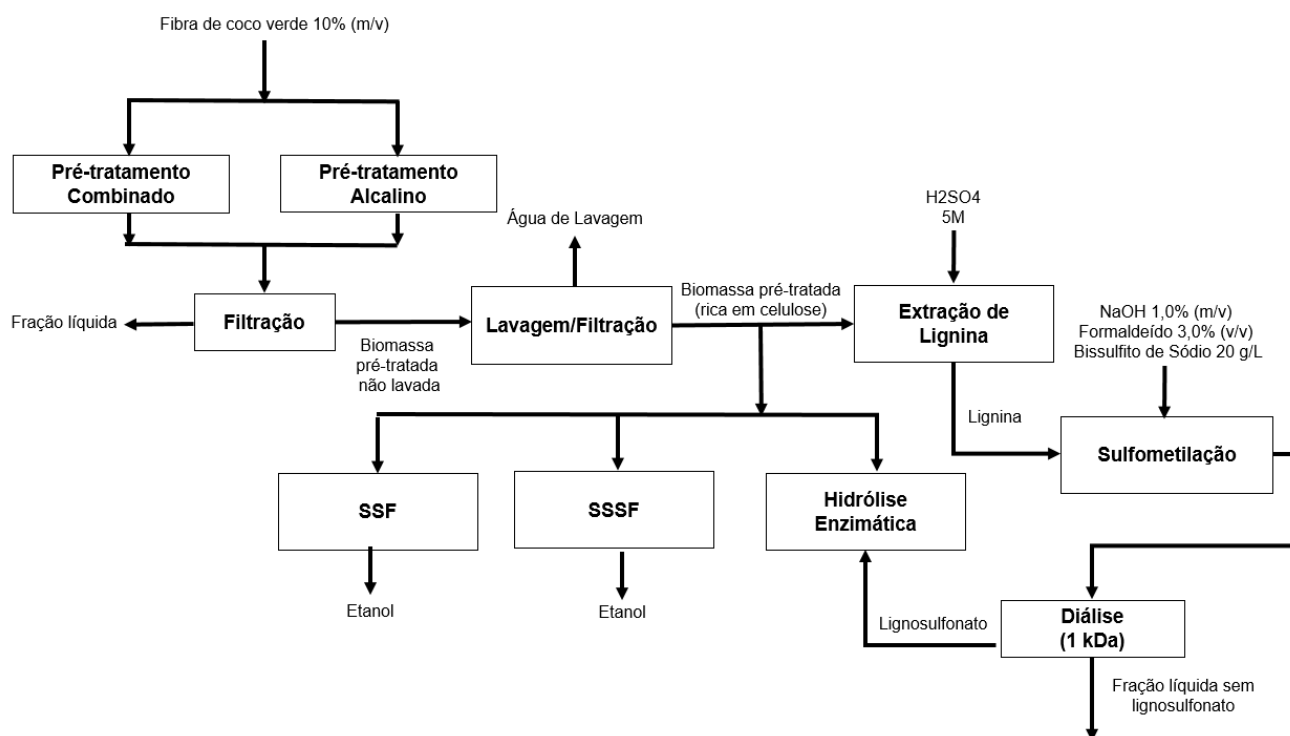
O Grupo de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte vem trabalhando no tema de valorização da fibra de coco para produção de etanol 2G, como Ribeiro et al. (2022), Nogueira (2021), Padilha et al. (2019). Entretanto, a presente dissertação é a primeira a produzir lignosulfonato, além de avaliar seu uso no processo de hidrólise, como descrito na Figura 1.1. Na literatura, verificam-se poucas produções

científicas em que se menciona a produção de lignosulfonato a partir de fibra de coco, como DAUD et al. (2021).

Nesse contexto, o presente estudo aborda a produção e posterior utilização do lignosulfonato, obtido do pré-tratamento da fibra de coco, na etapa de hidrólise enzimática visando a produção de etanol de segunda geração. Além disso, foi avaliada sua eficiência em interagir como adsorvente de lignina residual presente na biomassa pré-tratada, visando a redução a adsorção não-produtiva na superfície da enzima, favorecendo, assim, a interação celulose-celulase no processo de hidrólise e, portanto, aumentando o rendimento de açúcares fermentescíveis.

Figura 1.1 - Fluxograma de processo.

Fonte: Autora (2023).



---

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

---

## 2. Objetivos

*Neste capítulo são apresentados os objetivos, geral e específicos, que serão abordados no presente estudo.*

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir etanol de segunda geração e lignosulfonato, a partir dos produtos gerados do fracionamento do coco verde, e avaliar a influência do lignosulfonato produzido no rendimento da hidrólise enzimática.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o impacto dos pré-tratamentos alcalino e combinado (explosão a vapor + alcalino) sobre a composição da fibra do coco verde pré-tratada, prioritariamente sobre a remoção de lignina;
- Mensurar a influência da variação da carga de sólidos das biomassas pré-tratadas na hidrólise enzimática em termos de açúcares fermentescíveis sem adição de surfactante;
- Mensurar a influência da variação da carga enzimática na hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas em termos de açúcares fermentescíveis sem adição de surfactante;
- Avaliar a eficiência da produção de surfactante (lignosulfonato) a partir da lignina residual removida após os pré-tratamentos;
- Avaliar a eficácia do lignosulfonato na potencialização da liberação de açúcares fermentescíveis na hidrólise enzimática;
- Mensurar a produção de etanol via sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e semi-simultâneas (SSSF) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a partir do resíduo agroindustrial da fibra de coco verde.

---

# **CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### **3. Revisão Bibliográfica**

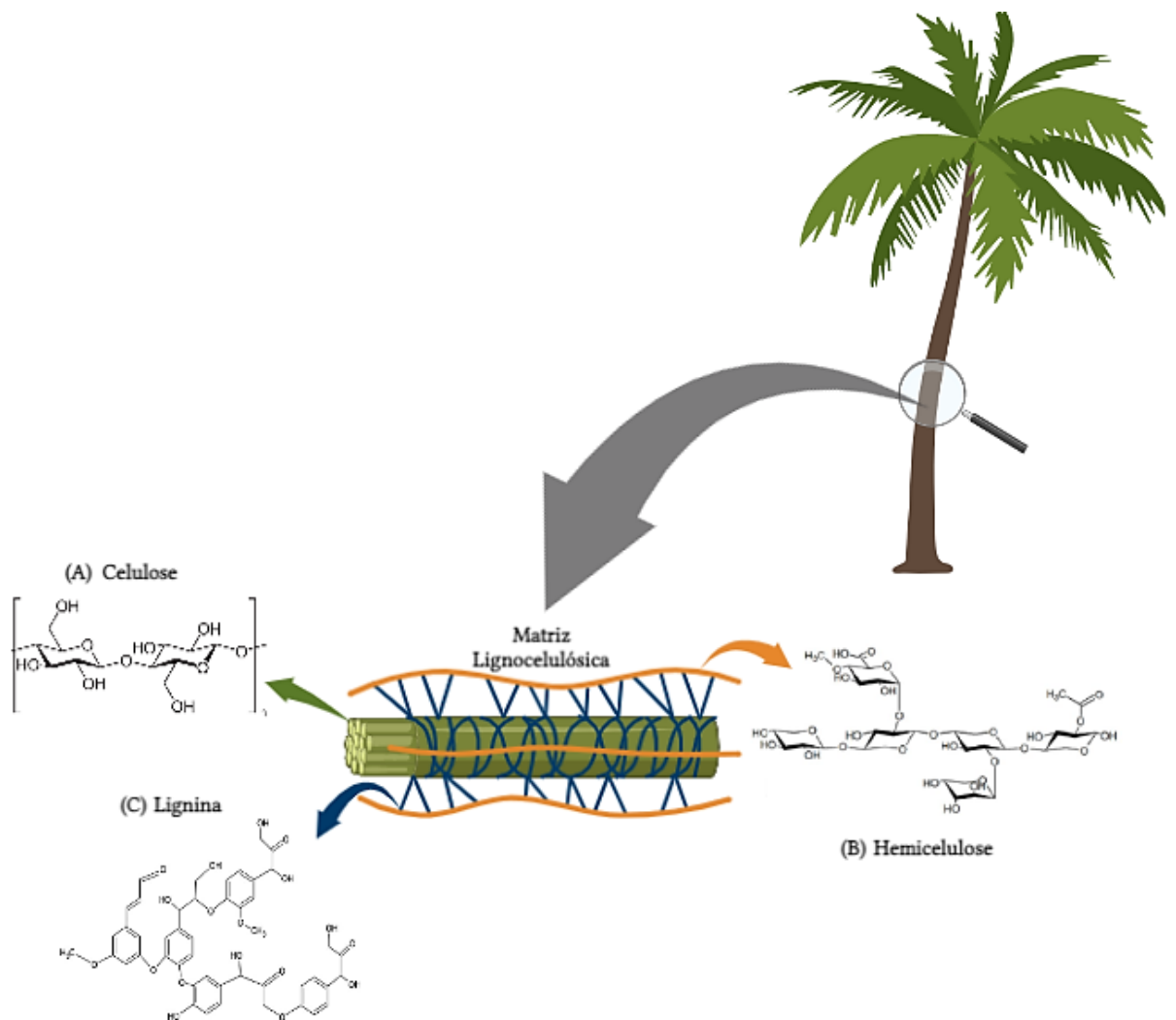
*A seguir são apresentados os principais conceitos usados para o desenvolvimento desta dissertação. São abordados tópicos importantes que fundamentam a teoria envolvida nas diversas etapas do processo de produção de lignosulfonato, e de sua aplicação na produção de etanol celulósico.*

#### **3.1 Biomassas Lignocelulósicas**

Os materiais lignocelulósicos são compostos naturais presentes na natureza e representam cerca de 90% da biomassa renovável disponível na atmosfera (SAINI et al., 2015). Apesar de ser constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, os teores de cada oligossacarídeo na sua composição é variável de acordo com a origem, espécie e condição climática da região (DA COSTA FILHO, 2021). A interação entre lignina, hemicelulose e celulose forma a estrutura da parede celular que é estável, funcional e segura para o vegetal (SUN & CHENG, 2002), como demonstrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Composição da parede celular vegetal. (A) celulose (B) hemicelulose (C) lignina.

Fonte: Autora (2023).



Cerca de 20 bilhões de toneladas de materiais lignocelulósicos são gerados por ano no mundo como resíduos sólidos, e que poderiam ser convertidos em produtos renováveis e biodegradáveis de alto valor agregado. Entretanto, a utilização de biomassa para produção energética tem ganhado visibilidade no mercado energético mundial, como bioetanol, biohidrogênio e biometano (WU et al., 2022).

### 3.1.1 Celulose

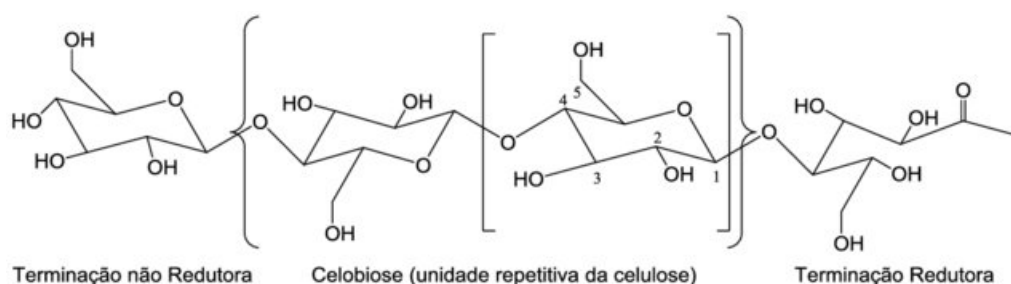
A celulose (Figura 3.1A) é um polímero renovável de cadeia longa e linear encontrado principalmente nas paredes celulares de plantas, sendo considerado o maior reservatório de carbono do mundo (FESTUCCI-BUSSELI et al., 2007). Esse polissacarídeo apresenta um grande potencial industrial, sendo matéria-prima de diversos produtos, por exemplo, o papel,

tecidos, açúcares e álcoois de segunda geração, como butanol e etanol (GUSAKOV et al., 2007).

A celulose é formada por unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. A união de duas unidades de glicose formam a estrutura chamada de celobiose (NOGUEIRA, 2017), como indica a Figura 3.2. Dessa forma, a celulose é encontrada na forma de microfibrilas (DA COSTA FILHO, 2021).

Figura 3.2 - Estrutura da Celulose.

Fonte: CORDEIRO (2016)



Reponsáveis pela rigidez estrutural, as moléculas de celulose estão associadas umas às outras por forças intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio e de Van der Waals (PADILHA et al., 2021), apresentando regiões cristalinas intercaladas com regiões amorfas, auxiliando no ordenamento da cadeia polimérica. Com isso, a celulose é considerada um biopolímero cristalino e compacto, sendo assim, insolúvel em água e resistente à despolimerização (SINGH et al., 2014).

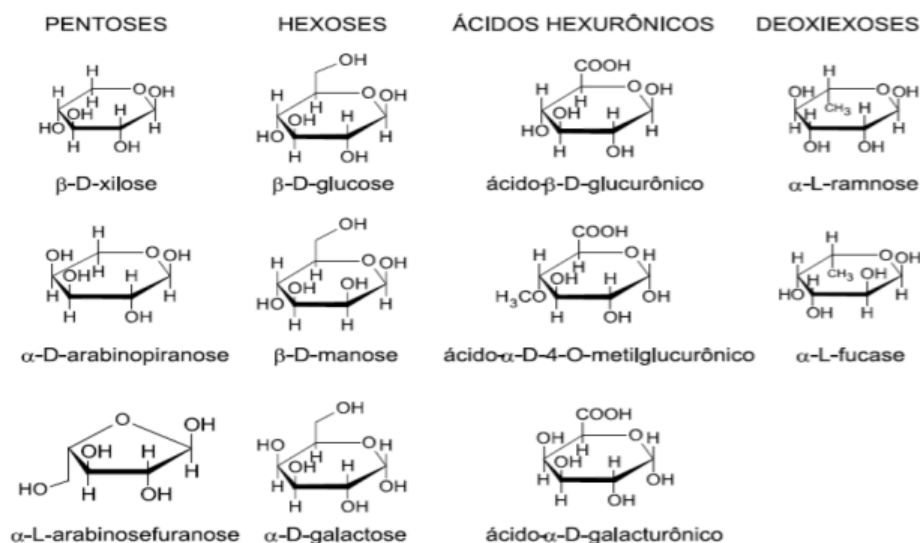
### 3.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose (Figura 3.1B), também chamada de poliose, é um polímero heterogêneo composto por unidades de açúcares de baixa massa molecular como pentoses (arabinoses, xiloses) e hexoses (glicoses, manoses, galactoses), além de ácidos urônicos (ácido glucurônicos, metilglucurônicos, galactourônicos) e deoxiexoses (ramnoses e fucases), como visto na Figura 3.3. Um dos principais carboidratos formados da hemicelulose é a xilana, formado por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas (CARVALHO et al., 2013).

Dessa forma, a depender do tipo de tecido vegetal, estágio de desenvolvimento da planta e sua espécie, diferentes estruturas de hemicelulose podem ser identificadas (FENGEL & WEGENER, 1989; GÍRIO et al., 2010; WU et al., 2022).

Figura 3.3 - Estruturas que compõem a hemicelulose.

Fonte: FENGEL & WEGENER (1989).



Diferentemente da celulose, as cadeias de hemicelulose são estruturas amorfas, de baixa massa molecular e de baixo grau de polimerização, o que as tornam mais suscetíveis à hidrólise por ácidos diluídos ou enzimas (PADILHA et al., 2021). Além disso, algumas moléculas desse carboidrato podem ser hidrolisadas em soluções alcalinas e até mesmo em água a temperaturas acima de 150°C, uma vez que esta se torna fonte de prótons em altas temperaturas (BALAT, 2011; NAIDU et al., 2018).

Uma vez que constitui de 15-35% da parede celular vegetal, tal estrutura está intimamente ligada à celulose por ligações de hidrogênio, sendo responsável pela estabilidade das fibras. Ainda conectada por ligações covalentes com a lignina, se torna a estrutura intermediária da parede celular vegetal (NOGUEIRA, 2017).

O uso comercial desse polissacarídeo é visto na fabricação de biofilmes para encapsulamento de remédios, hidrólise para produção de xilooligossacarídeos, xilitol, furfural, butanol, etanol, ácido lático, entre outros produtos de interesse industrial (MARTINS, 2020).

### 3.1.3 Lignina

A lignina (Figura 3.1C) é um biopolímero aromático e renovável presente na parede celular vegetal, sendo responsável por 30% do carbono orgânico presente na biosfera, atrás apenas da celulose (DA COSTA FILHO, 2021). É formada por unidades de fenilpropanóides (unidades C<sub>9</sub>) e monolignóis, como álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que diferem entre si pelo grau de metoxilação e formam as unidades guaiacil (unidade G), p-



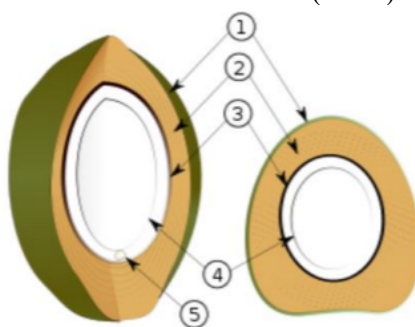
### 3.2 Coco Verde

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma planta frutífera da classe das monocotiledôneas, originária do Sudeste Asiático, e que foi trazido para o Brasil na segunda metade do século XVI, tornando-se um dos principais cultivos do país. O cultivo do coco é responsável pela geração de empregos e renda em pequenas e grandes empresas do agronegócio durante o ano inteiro, principalmente na região Nordeste do país (MOURA NETO et al., 2018; PENHA et al., 2018). Essa palmeira, membro da família *Aracaceae*, tem múltiplas funcionalidades e encontra-se difundida em diversos países de zona intertropical, que detém condições ideais de cultivo, como radiação solar abundante (300-900 W.m<sup>-2</sup>) e com duração anual de 2000 horas, solos arenosos, umidade regular (60-90%), temperatura média em torno de 22-34°C e precipitação bem distribuída anualmente (GOMES & PRADO, 2007).

O coco é um fruto seco simples, classificado como drupa fibrosa, sendo 65% da estrutura correspondendo à noz e seu conteúdo (água e albúmen sólido) e 35% a parte fibrosa (casca). (PENHA et al, 2018; MIOLA et al., 2020). A Figura 3.5 ilustra o coco e suas estruturas acima citadas.

Figura 3.5 - Estrutura do Coco. (1) epicarpo, a casca da fruta; (2) mesocarpo fibroso, o miolo; (3) endocarpo, a casca da semente; (4) endosperma carnoso ou albúmen sólido, a parte comestível do fruto e que é preenchido pelo endosperma (ou albúmen) líquido (água de coco); e o embrião (5).

Fonte: PENHA et al. (2018)



O cultivo dessa planta tem como uma das principais finalidades a utilização do fruto para agroindústria, tendo o albúmen sólido como fonte de produção de leite de coco, coco ralado, óleo, coco seco desidratado, açúcar, entre outros; e o albúmen líquido é processado como água de coco, vinagre e outros. Além disso, outras estruturas do fruto, como a fibra, podem ser usadas para a confecção de móveis e artesanato (EMBRAPA, 2014; NOGUEIRA, 2021).

Apesar da variedade de produtos oriundos do coco, aproximadamente 80-85% deste torna-se resíduo, representado por suas cascas (NOGUEIRA, 2017). Portanto, aliado ao crescente mercado internacional do coco e de suas variedades, a quantidade de resíduo agroindustrial gerado é um grande problema ambiental. Com o descarte de maneira inapropriada em lixões, aterros sanitários e locais públicos, como toda matéria orgânica, o resíduo de coco apresenta um alto potencial de emissão de gases, além da proliferação de vetores transmissores de doenças, mau cheiro, contaminação de águas e solo, e destruição da paisagem urbana (ROSA et al., 2001; ARAGÃO, 2002). Tendo em vista o alto custo associado à produção de carvão ativado a partir da pirólise das partes fibrosas do coco (NOGUEIRA, 2021), faz-se necessário buscar destinos alternativos para esse resíduo.

As fibras do coco são materiais lignocelulósicos obtidos principalmente do mesocarpo, com alto teor de lignina e, portanto, maior dureza e durabilidade quando comparadas com fibras de outros resíduos agroindustriais, além de ter baixa taxa de degradação (CORRADINI et al., 2009; ARAÚJO, 2021; ARAÚJO DE ALMEIDA & COLOMBO, 2021).

A lignina presente na fibra é responsável por fornecer outras características importantes, como resistência a microrganismos e a impactos, exercendo função de proteção à célula (PENHA et al., 2018). Além da lignina, a casca do coco verde é composta por celulose, hemicelulose e outros componentes como terpenos, gorduras e compostos fenólicos, representando 5-20% de todo o material (FENGEL & WEGNER, 1989).

A utilização do resíduo do coco verde e de outros produtos agroindustriais, como biomassa lignocelulósica fonte de bioetanol, tem sido objeto de estudo a partir do fato de que a produção de biocombustíveis de primeira geração (1G), como álcool e biodiesel, traz à tona uma preocupação com a crise mundial dos alimentos (SUAREZ et al., 2009; FOOD-SECURITY-INFORMATION-NETWORK, 2020). Com isso, para a substituição de matéria-prima que também abastece o mercado de consumo interno do país, tem-se estudado o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, que normalmente são direcionados a lixões e aterros sanitários, entre eles, casca de coco verde, sendo denominados biocombustíveis de segunda geração (2G). Ainda nessa vertente, há o conceito de energia de terceira geração (3G), que combina avanços tecnológicos e genômicos para aprimorar certas características das biomassas para torná-las mais apropriadas para conversão em bioprodutos e que são facilmente cultiváveis, como microalgas (DELMIRO, 2020).

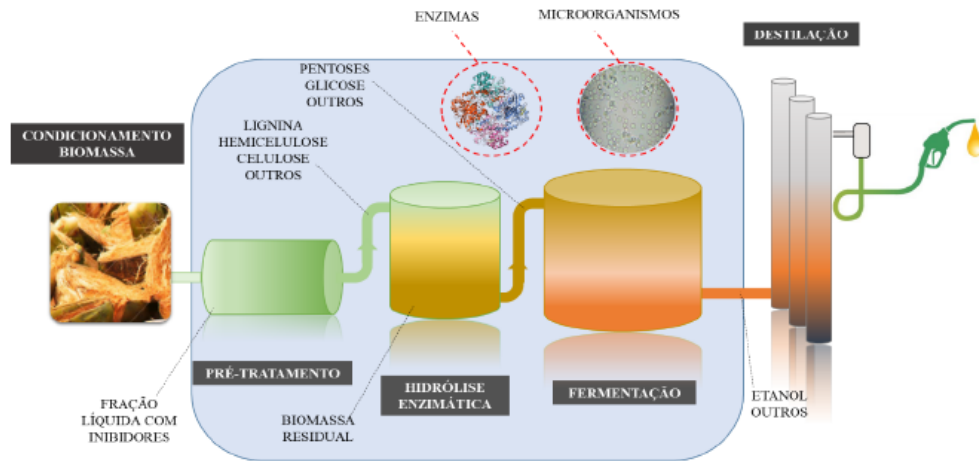
### 3.3 Produção de Etanol Celulósico

O etanol de segunda geração (E2G) tem recebido atenção especial em países como Brasil, China e Estados Unidos, em prol da sustentabilidade envolvida no processo. No Brasil, estão se desenvolvendo pesquisas que envolvem essa nova tecnologia, com investimentos na construção de plantas de processo, incentivados pelo plano conjunto BNDES-FINEP de Apoio à Inovação Tecnológica Industrial dos Setores Sucroenergético e Sucroquímico (Paiss) (MILANEZ et al., 2015). Em decorrência do sucesso do Paiss, foi lançado o Paiss 2, focado no incentivo à produtividade agrícola do setor, desenvolvimento de máquinas e sistemas integrados, investindo um total de R\$ 1,48 bilhão até 2018. Sancionada ao fim de 2017, a Lei n. 13576 propôs a criação do programa Renovabio a fim de promover o crescimento da produção de biocombustíveis, garantir mercado a longo prazo e previsibilidade energética, além de diminuir a emissão de gases de efeito estufa (LORENZI & DE ANDRADE, 2019). Além disso, no mercado nacional há a Raízen, uma empresa integrada que é referência global em geração de bioenergia e produz diversos produtos renováveis, como bioetanol e biogás.

Para a produção do bioetanol, algumas etapas, após obtenção e preparo da matéria-prima são necessárias, como o pré-tratamento, a hidrólise enzimática, a fermentação e a destilação (Figura 3.6). O pré-tratamento se faz necessário para tornar os polissacarídeos da estrutura acessíveis ao ataque enzimático na etapa de hidrólise, permitindo então a despolimerização destes em açúcares fermentescíveis, tais como glicose, xilose, arabinose e celobiose. Na etapa de fermentação, microrganismos são usados para converter os monômeros em etanol e outros compostos de interesse industrial (NOGUEIRA, 2017). Após isso, o caldo fermentado (vinho) passa por um processo de destilação para separação de componentes, purificando o etanol e determinando o teor alcoólico, de acordo com o do interesse comercial. Sendo importante destacar que, com o elevado custo da enzima na hidrólise e, a depender do pré-tratamento, a alta quantidade de solvente usada, faz-se necessário o aprimoramento da técnica para produção do bioetanol (OGATA, 2013; DA COSTA FILHO, 2021).

Figura 3.6 - Processo Produtivo do Bioetanol.

Fonte: NOGUEIRA (2021).



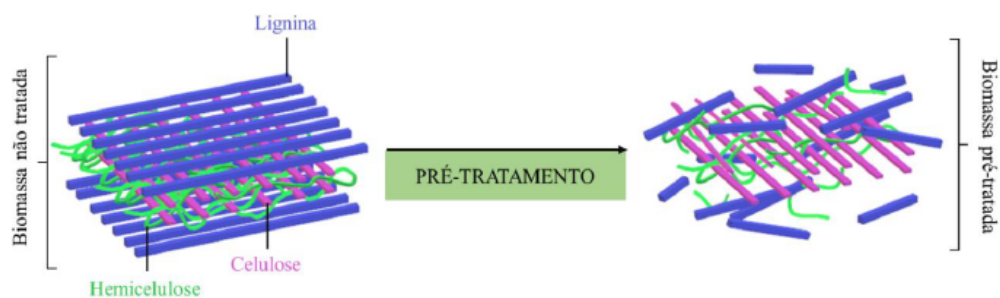
### 3.3.1 Pré-tratamento

Sendo a primeira fase na obtenção do etanol de segunda geração, a etapa de pré-tratamento representa grande parte do obstáculo no processo: cerca de 20% dos custos de produção total do biocombustível (YANG & WYMAN, 2008). A sua finalidade é solubilizar e/ou modificar os principais polissacarídeos presentes na biomassa, aumentando a suscetibilidade do material ao ataque enzimático na etapa de hidrólise ao reduzir a recalcitrância da biomassa. Ainda possibilita a recuperação da fração líquida que foi solubilizada, seja de forma parcial ou total. (GONÇALVES et al., 2016). Essa etapa é eficiente na remoção de cinzas minerais existentes na composição que podem obstruir os poros da fibra e, assim, aumentar o custo e o tempo em etapas posteriores (LEE et al., 2021).

A depender do tipo de processo empregado, pode haver a solubilização da lignina e hemicelulose pela quebra das ligações entre esses compostos, ocorrendo assim uma hidrólise das ligações éteres da estrutura da lignina e, por fim, adicionando grupos hidrofílicos aos anéis benzênicos, aumentando então a solubilidade desse composto em água. Ainda é possível que haja uma despolimerização da lignina e da hemicelulose, além do aumento da área superficial dos compostos em questão, o que ocasiona um aumento considerável na conversão, reduzindo a recalcitrância da estrutura vegetal e, conseqüentemente, facilitando a transferência de massa (MOOD et al., 2013; RABELO et al., 2019). Uma representação ilustrativa do que ocorre com a estrutura lignocelulósica com o emprego do pré-tratamento está demonstrada na Figura 3.7.

Figura 3.7 - Estrutura lignocelulósica com ação do pré-tratamento.

Fonte: DA COSTA FILHO (2021).



É consenso na comunidade científica que não há um pré-tratamento universal, o melhor pré-tratamento depende do tipo de biomassa e produto de interesse. Uma vez que diferentes processos estão sendo estudados, estes podem ser classificados como pré-tratamentos físicos (moagem, microondas, extrusão), químicos (ácido, básico, organossolv, líquidos iônicos, sais inorgânicos), físico-químicos (explosão a vapor) e biológicos, além da possibilidade da combinação entre eles, a fim de se obter uma ação sinérgica de seus efeitos (MOSIER et al., 2005; GU et al., 2021). É reportado que os tratamentos combinados além de melhorar a disponibilidade da celulose, aumentam a solubilização (com posterior recuperação) da hemicelulose e lignina, já que são tratamentos sequenciais e que permitem a remoção de cada fração de forma separada e específica. Com isso, também há minimização de perdas e de subprodutos inibidores das próximas etapas (CHERUBINI, 2010).

### 3.3.1.1 Pré-tratamento químico

Sendo o tratamento que se demonstra mais promissor, técnica e economicamente, o pré-tratamento químico permite a solubilização da hemicelulose e/ou lignina, aumentando a área superficial livre da celulose para o ataque enzimático. Entre eles, podem ser utilizados os ácidos, os agentes alcalinos, os oxidativos, os solventes eutéticos profundos e os solventes orgânicos (organossolv). Nos pré-tratamentos alcalinos usando, por exemplo, hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, entre outros, as ligações ésteres intermoleculares entre lignina e hemicelulose são afetadas permitindo a solubilização parcial desses componentes e, ainda, o inchamento da celulose e redução do grau de polimerização para que se torne acessível à enzima na etapa seguinte (RABELO et al., 2019; NOGUEIRA, 2021). No entanto, ao promover a degradação da lignina e a formação de subprodutos indesejados, como compostos fenólicos e produtos de condensação, podem inibir a fermentação subsequente (KUMAR et al., 2009).

Por sua vez, o pré-tratamento com ácidos diluídos (ácido sulfúrico, fosfórico, acético, etc.), além de ser de fácil obtenção, demonstra alta eficiência em romper as ligações

glicosídicas da hemicelulose em condições não tão drásticas de tratamento. Dessa forma, uma vez separada da celulose, a hemicelulose é facilmente separada e hidrolisada, portanto, produzindo um licor rico em monômeros de açúcares do tipo xilose, além de algumas moléculas de glicose, galactose, manose e arabinose. O grau de degradação e de remoção desse polissacarídeo pode variar, dependendo das condições de pré-tratamento, como temperatura, concentração de ácido usada e tempo de processo. A lignina é repolimerizada no processo ácido, se tornando altamente recalcitrante (GUNDUPALLI & BHATTACHARYYA, 2019; GU et al., 2021)

### **3.3.1.2 Pré-tratamento físico e biológico**

Os pré-tratamentos físicos são usados para aumentar a área superficial de contato ao reduzir o tamanho dos sólidos e gerar uma irregularidade estrutural por processos de moagem, trituração, radiação (raios  $\gamma$  e microondas) e extrusão (RABELO et al., 2019). Além de demandar alta energia e alto custo, a depender do tamanho da partícula desejado, essa técnica não remove lignina e há um alto valor envolvido na instalação e manutenção dos equipamentos que, recorrentemente, sofrem desgaste físico pelo processo (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; ALVES, 2018).

O pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica envolve o uso de microrganismos, como fungos ou bactérias (*Ceriporia lacerata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, entre outros), consórcios microbianos ou enzimas (puras ou misturas) para quebrar a estrutura complexa da lignocelulose e facilitar a produção de açúcares mais simples na etapa de hidrólise (DEIVAYANAI et al., 2022). Devido ao menor consumo de energia e menor quantidade de aditivos necessários, esse processo se torna mais atraente (BEIG et al., 2021). Com a utilização de enzimas no pré-tratamento, estudos foram desenvolvidos utilizando diferentes tipos de enzimas, como xilanases (HASSAN et al., 2018; BIAN et al., 2020), monooxigenases líticas de polissacarídeos (LMPO) (KOSKELA et al., 2019), lacases e a mistura delas (BIAN et al., 2020).

### **3.3.1.3 Pré-tratamento físico-químico**

Os pré-tratamentos físico-químicos são processos que agem tanto decompondo a lignina e hemicelulose, como também na porosidade e área superficial das partículas. Os tratamentos hidrotérmicos e por explosão a vapor são os mais estudados nesse tipo de pré-tratamento (TAYLOR et al., 2019). São processos ambientalmente viáveis uma vez que utilizam-se basicamente da biomassa e da água.

O pré-tratamento hidrotérmico atua com elevadas pressões e temperaturas, utilizando a água como agente de fracionamento da biomassa para romper o complexo lignina-carboidrato, além das ligações glicosídicas dos compostos celulósicos e hemicelulósicos. O  $H^+$  presente na água atua como um catalisador ácido causando a liberação de acetato proveniente da xilana e da hidrólise das suas ligações glicosídicas. Essas reações encadeiam a despolimerização da hemicelulose em açúcares monoméricos (DE OLIVEIRA, 2010b; MARIANO et al., 2020).

O tratamento por explosão a vapor se baseia na descompressão rápida, por abertura de válvula de descarga do reator direcionando para um tanque à pressão atmosférica, do sistema pressurizado por vapor de água saturado em altas pressões sobre a biomassa. O vapor penetra o material lignocelulósico, condensa formando água (líquida) dentro das fibras e, após descomprimir, a água evapora, “explodindo” no interior das fibras. Nesse processo ocorre uma autohidrólise dos polissacarídeos (principalmente a hemicelulose) e degradação parcial de lignina. De modo geral, as temperaturas desse pré-tratamento ocorrem entre 160 e 260°C, com pressões correspondentes de 0,62 a 4,7 MPa e baixos tempos de reação antes da descompressão (de segundos a poucos minutos) (WYLEN & SONNTAG, 1985; CHEN et al., 2008). Assim, se refere a um tratamento a vapor de alta pressão que rompe a estrutura lignocelulósica, recondensa a lignina, reduz a cristalinidade da celulose e remove a hemicelulose (BHATIA et al., 2020).

No pré-tratamento usando água subcrítica, a molécula de água ( $H_2O$ ) é dissociada para produzir íons hidrogênio ( $H^+$ ) e íons hidroxila ( $OH^-$ ). A natureza ácida do meio realiza reações hidrolíticas, como a degradação da hemicelulose (dissolvendo o grupo acetila presente na molécula e produzindo ácido acético), proteínas, lignina, gorduras, lipídios e compostos polifenólicos (SARKER et al., 2021).

### **3.3.2 Hidrólise Enzimática**

Atualmente, a etapa do processo que desperta maior atenção na indústria de biocombustíveis é a hidrólise enzimática, responsável pela conversão dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) em monômeros fermentescíveis, visto que é responsável por boa parte dos gastos envolvidos na produção de E2G. Dessa forma, vem sendo estudada associada a uma etapa anterior de pré-tratamento, que é realizada para diminuir a rigidez da estrutura lignocelulósica e aumentar a acessibilidade enzimática à celulose, principal carboidrato responsável pela obtenção de glicose (RABELO et al., 2019).

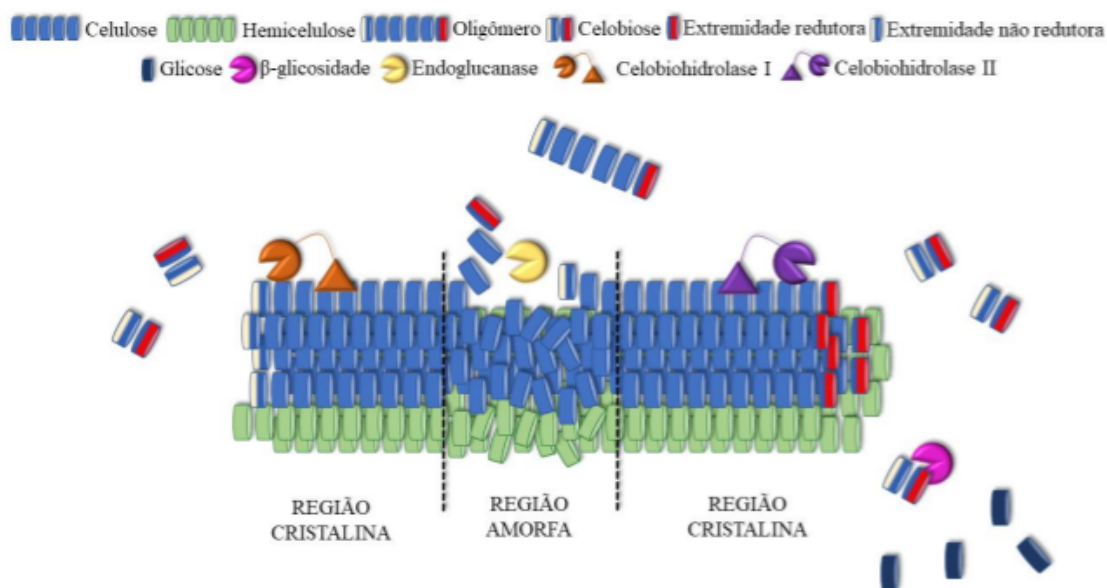
A recalcitrância gerada pela combinação dos oligossacarídeos presentes na estrutura celular dos vegetais, os inibidores gerados na etapa de pré-tratamento, a restrição de água, as interações não produtivas entre a lignina e enzima, as limitações de transferência de massa, a falta de sinergia entre os tipos de enzimas presentes no coquetel enzimático, entre outros, estão entre os desafios encontrados na etapa de hidrólise (SAINI et al., 2022).

O coquetel de enzimas celulolíticas, ou seja, o complexo enzimático responsável pela conversão de hemicelulose e celulose em pentoses e hexoses, contém enzimas altamente específicas que trabalham em condições amenas de temperatura e podem ser divididas em celulases e hemicelulases. As celulases são responsáveis pela hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4, transformando a celulose em glicose, e se dividem em três tipos que possuem efeito sinérgico (Figura 3.8): as endoglicanases (ED), que atuam nas ligações glicosídicas das regiões amorfas da estrutura, formando terminais redutores; celobiohidrolases (CBH), que atuam na região cristalina da molécula, formando unidades de celobiose, capazes de atuar em extremidades redutoras (CBH I) e não redutoras (CBH II); e  $\beta$ -glucanases (BG), que transformam a celobiose formada pela ação das CBH em glicose (THONGEKKAEW et al., 2008; HORN et al., 2012).

Por sua vez, as hemicelulases são enzimas com atividades de exoxilanase, endoxilanase e esterase, reduzindo esse polissacarídeo em glicose, xilose, galactose e manose. Nos coquetéis também podem ser inseridas enzimas auxiliares, como expansinas e lactases (WYMAN, 1996). A fim de facilitar os processos, têm sido desenvolvidos coquetéis enzimáticos comerciais, que podem ser otimizados a partir da adição de enzimas acessórias (SUN et al., 2015).

Figura 3.8 - Ação enzimática na biomassa.

Fonte: NOGUEIRA (2021).



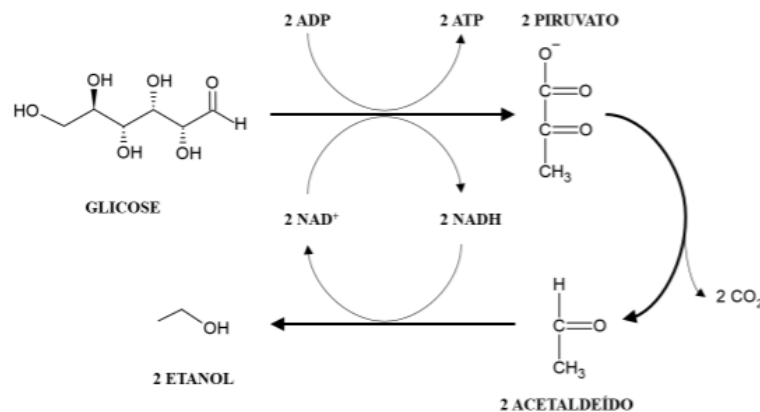
Apesar dos recentes avanços no processo, ainda há muito a se melhorar nessa etapa para produção de bioetanol, tanto na questão de custos envolvidos, como na eficiência de processo. Uma estratégia que tem sido avaliada é a utilização de polímeros, como PEG, que têm afinidade com a lignina insolúvel (em água) e que podem melhorar a acessibilidade da celulose ao complexo enzimático, incrementando a obtenção de glicose e, assim, favorecendo ao processo fermentativo (NOGUEIRA, 2021).

### 3.3.3 Fermentação

Alguns microrganismos têm a capacidade de converter açúcares monoméricos obtidos na etapa de hidrólise, como glicose e xilose (que representam cerca de 90% dos açúcares totais), em energia celular, formando  $\text{CO}_2$  e etanol (HAHN-HAGERDAL et al., 2007), como ilustrado resumidamente na Figura 3.9. Dessa forma, a glicose é convertida em piruvato pelos microrganismos, seguida de uma oxidação parcial através do  $\text{CO}_2$  formando o acetaldeído que será transformado em etanol, em reações responsáveis por restaurar os carreadores de elétrons ( $\text{NAD}^+$ ) (DA COSTA FILHO, 2021).

Figura 3.9 - Conversão de glicose em etanol.

Fonte: NOGUEIRA (2021).



A existência de subprodutos e compostos de degradação formados nas etapas anteriores, que atuam como inibidores de processo fermentativo, é um dos principais desafios enfrentado nessa etapa. O 5-hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural (FF), por exemplo, são componentes tóxicos formados pela degradação da glicose e xilose e, em determinadas concentrações, podem atuar como inibidores do processo fermentativo (TAHERZADEH & KARIMI, 2011), conforme destacado na Tabela 3.1, de acordo com Andrade (2012).

Tabela 3.1 - Principais inibidores de microrganismos.

Origem do Grupo	Inibidor	Concentração (g/L)	Microrganismo	% de Inibição
Compostos liberados no pré-tratamento e hidrólise enzimática	Ácido acético	1,4	<i>S. cerevisiae</i>	50% (pH 4,5)
	Ácido acético	4,3	<i>S. cerevisiae</i>	50% (pH 5,5)
	Ácido acético	8	<i>S. striptis</i>	98% (pH 5,1)
	Ácido acético	8	<i>S. striptis</i>	25% (pH 6,5)
Produtos de degradação de açúcares	Furfural	1	<i>S. striptis</i>	71%
	5-hidroximetilfurfural	3	<i>S. striptis</i>	90%
	Ácido fórmico	2,7	<i>S. cerevisiae</i>	80% (crescimento)
Produtos de degradação da lignina	Cinamaldeído	1	<i>S. cerevisiae</i>	100%
	p-hidroxibenzaldeído	1	<i>S. cerevisiae</i>	48%
	Siringaldeído	0,22	<i>S. striptis</i>	72% (fermentação)

Fonte: ANDRADE (2012).

Dentre as diversas estratégias para se conduzir a fermentação destaca-se a sacarificação e fermentação separadas (SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), e sacarificação e fermentação semi-simultâneas (SSSF). Na primeira, são realizadas duas etapas, em que no primeiro estágio ocorre a hidrólise enzimática da biomassa e, em seguida, há conversão dos açúcares para formação do etanol. Na SSF, as duas etapas ocorrem ao mesmo tempo, uma vez que as enzimas e os microrganismos são adicionados no meio

reacional ao mesmo tempo e, assim, os açúcares liberados pela hidrólise são imediatamente convertidos em álcool. A principal desvantagem ao se utilizar essa estratégia refere-se às condições de pH e temperatura ideais para o funcionamento pleno da enzima e das leveduras, uma vez que estas são diferentes. As celulasas atuam, de forma otimizada, entre 45 e 50°C, enquanto a fermentação apresenta um bom desempenho em torno de 35°C (DA COSTA FILHO, 2021). Uma forma de reduzir esse inconveniente é a realização da SSSF, em que ocorre uma etapa de pré-hidrólise, na qual a biomassa é hidrolisada de forma inicial e separada até atingir a temperatura ideal de funcionamento do coquetel enzimático, liberando uma quantidade significativa de açúcares. Em seguida, o hidrolisado é resfriado até a temperatura do processo fermentativo (DEVI et al., 2021).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na indústria para a produção de etanol a partir da conversão de sacarose, glicose e frutose. Além disso, é considerada um microrganismo não patogênico, em comparação a outras leveduras (NOGUEIRA, 2021). No entanto, essa levedura não é capaz de fermentar xilose e arabinose (C5), que são monossacarídeos gerados durante a hidrólise das hemiceluloses, dos materiais lignocelulósicos (RABELO et al., 2019). Como resultado, outros microrganismos, como *Zymomonas mobilis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, entre outros, estão sendo estudados para a conversão de açúcares de biomassas lignocelulósicas em etanol de segunda geração (E2G) (ANDRADE, 2012; GONÇALVES et al., 2016).

Uma estratégia utilizada consiste na modificação genética de microrganismos, incluindo a *Saccharomyces*, a fim de permitir o consumo de xilose. Isso se deve ao fato de que a *S. cerevisiae* possui alta eficiência na produção de etanol, e tolerância a altas concentrações alcoólicas (superiores a 4% (v/v)) e glicosídicas (superiores a 15% (v/v)), o que significa que, mesmo com a alta produção de etanol no meio, a fermentação não é interrompida pela inativação do microrganismo (VANZYL et al., 2007).

### **3.4 Valorização da Lignina**

No Brasil, devido à vasta biodiversidade encontrada, há uma gama de variedades dos resíduos agrícolas que podem gerar interesse social e econômico, como o sabugo de milho e a casca do coco verde (TAN et al., 2008). Nesse contexto, o conceito de biorrefinaria surge como um complexo industrial no qual são obtidos, a partir da biomassa, produtos de alto valor agregado e energia (OGATA, 2013).

As biorrefinarias buscam a valorização completa de resíduos de biomassas utilizando cadeias carbônicas similares as dos derivados de petróleo, reduzindo a dependência industrial

dos combustíveis fósseis e, assim, diminuindo impactos ambientais na obtenção de materiais, medicamentos e energias alternativas (KUMAR & VERMA, 2021). Idealmente, essas instalações integram rotas de conversão bioquímica, química, microbiana e termoquímica a fim de melhorar o aproveitamento da biomassa e da energia nela contida. A busca por matérias-primas, processos, tecnologias, produtos e resíduos pouco agressivos, levam em conta balanços de massa e energia, análise de ciclo de vida, desenvolvimento sócio-econômico regional e emissão de gases do efeito estufa (EMBRAPA, 2011).

Em contrapartida ao crescimento das atividades de biorrefinarias que utilizam biomassas lignocelulósicas, surge a produção acentuada de lignina. De acordo com Da Costa Filho (2021), cerca de 28% da massa inicial da biomassa processada é lignina gerada no processo. Assim, se torna necessário desenvolver estratégias que utilizem esse material a fim de viabilizar economicamente todo o processo produtivo do etanol celulósico.

A lignina é uma macromolécula polimérica aromática que pode ser utilizada como fonte para produção sustentável de diversos materiais químicos e combustíveis. A sua estrutura heterogênea complexa dificulta a sua bioconversão e biodisponibilidade, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias de despolimerização e conversão eficientes (LIU et al., 2022). Atualmente, mais de 50 milhões de toneladas de lignina são utilizadas para geração energética a partir da sua combustão, e apenas uma pequena parcela é usada para outras aplicações. A motivação por trás desse fato se dá pela sua coloração escura, odor forte e a dificuldade associada às rotas de conversão (DA COSTA FILHO, 2021). Porém, nos últimos anos, aplicações não convencionais da lignina vêm sendo estudadas de forma mais significativa. Processos de pré-tratamento de biomassas facilitam a sua deslignificação para produção de açúcares fermentescíveis, auxiliando a extração e isolamento da lignina para diferentes usos. Entre eles, está a utilização para síntese de nanopartículas, nanocompósitos híbridos, lignosulfonatos, aditivos alimentícios, flocculantes, oxidantes naturais, agentes antimicrobiológicos, prebióticos, termoplásticos para impressões 3D, eletrodos, entre outros (PADILHA et al., 2021; SETHUPATHY et al., 2022).

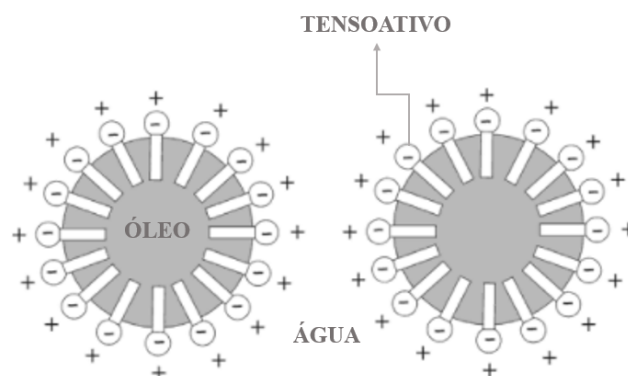
### **3.4.1 Lignosulfonato**

Surfactantes, ou tensoativos, são moléculas que contêm uma região hidrofílica e uma hidrofóbica, formadas por cadeias carbônicas longas (de 8 a 18 átomos), na maioria dos casos. Em função disso, a molécula é denominada anfifílica e permite a interação entre superfícies imiscíveis ao entrarem em contato com a sua superfície ativa, agindo em regiões interfaciais que não se misturam bem, como óleo-água ou sólido-líquido. Dessa forma, pode atuar como

cossolvente promovendo a solubilização de compostos hidrofóbicos em água (Figura 3.10). Além disso, reduz a constante dielétrica de solventes, reduz a tensão superficial, melhora a molhabilidade, e também afeta a solubilidade de alguns compostos (FENDLER, 1992; HOLMBERG et al., 2002; MEDEIROS & KANIS, 2010; ARAÚJO, 2021).

Figura 3.10 - Ilustração de uma micela formada devido à presença do surfactante.

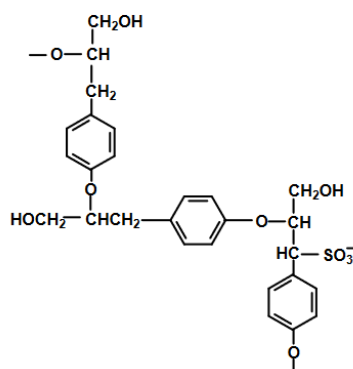
Fonte: ARAÚJO (2021).



Um derivado da lignina, o lignosulfonato (LS), é produzido pela sulfitação (em meio ácido, utilizando bissulfito) dos resíduos da polpa da madeira, sendo um processo muito encontrado na indústria de papel e celulose. Pode também ser obtido pelo processo Kraft (em meio básico), em que também ocorre a sulfonação da lignina. A depender do processo empregado para polpação da madeira, diferentes tipos de lignosulfonatos podem ser obtidos, como os de sódio, cálcio, magnésio, entre outros (DE OLIVEIRA, 2010a), além de poder conter teores de açúcares residuais provenientes dos polissacarídeos da madeira (SANTOS & CURVELO, 1999). Nesse processo, a lignina é despolimerizada e grupos sulfonatos são adicionados aos fragmentos aromáticos, acrescentando partes hidrofílicas e tornando a molécula resultante anfifílica, melhorando a sua solubilidade em água (RUWOLDT et al., 2020). Assim como a lignina, a estrutura geral dos LS não é bem estabelecida na literatura (Figura 3.11).

Figura 3.11 – Parte da estrutura do lignosulfonato.

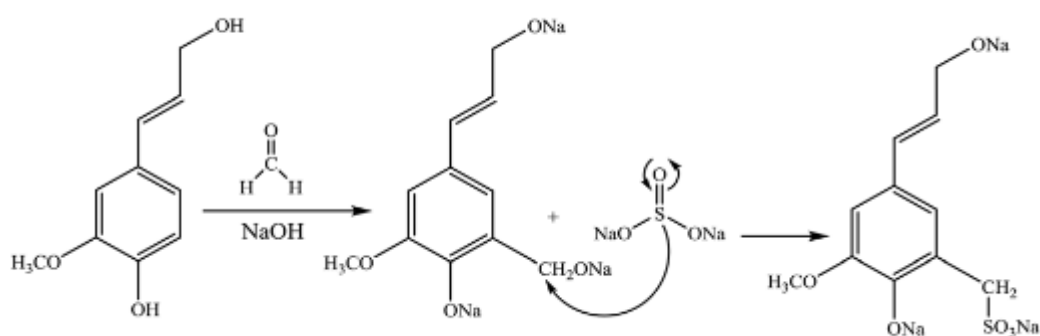
Fonte: Fredheim et al. (2003)



Os LS são solúveis em água e em soluções ácidas, devido ao baixo  $pK_a$  ( $\leq 2,0$ ) dos grupos sulfônicos, além de terem solubilidade em solventes orgânicos polares. Nas soluções aquosas, formam micelas com os grupos sulfônicos na superfície (HEINZ, 2022). De forma simplificada, a reação de formação do lignosulfonato por sulfometilação da lignina ocorre por adição de um grupo metileno sulfonato ( $-\text{CH}_2\text{SO}_3$ ) no anel aromático da lignina. Em condições alcalinas, a reação se inicia por uma substituição eletrofílica, cujo o anel aromático reage com o formaldeído. A sulfonação do produto intermediário formado ocorre por eliminação de água, até que se forme o lignosulfonato (Figura 3.12). Um processo de diálise pode ser aplicado a fim de separar e purificar o produto obtido (KAZZAZ et al., 2019).

Figura 3.12 - Reação de sulfometilação em unidade fenilpropanóide para formação do lignosulfonato.

Fonte: Kazzaz et al. (2019)



Apesar disso, Perkins (1998) afirma que a baixa eficiência em reduzir a tensão interfacial entre água-óleo ou a tensão superficial da água limita suas aplicações. Além disso, o processo tradicional de produção de lignosulfonato, por sulfitação de polpas celulósicas, pode acarretar em contaminantes químicos e polissacarídeos no produto em questão. Assim, a utilização de outros surfactantes (sintéticos ou naturais) associados com n-hexanol, n-heptanol

ou n-octanol são avaliados como alternativas para aumentar a eficiência de adsorção do lignosulfonato na interface água-óleo (ALWADANI & FATEHI, 2018).

O lignosulfonato tem uma ampla aplicação, devido às suas características dispersante, quelante, antioxidante, floculante, não tóxicas, entre outras. Pode ser usado na melhoria da qualidade do concreto, reduzindo o teor de água, melhorando a dispersão dos flocos de cimento em finas partículas, além de poder ser utilizada em perfurações de poços de petróleo e dispersantes em tintas devido à sua capacidade dispersante (HEINZ, 2022). O LS também pode ser usado como aglutinante na produção de madeira, briquetes de carvão, materiais cerâmicos ou peletização de ração animal, por aumentar a taxa de peletização em até 20%, reduzir a energia requerida para produção dos briquetes, uniformização e estabilização dos *pellets*, entre outros (SCHMIDT et al., 2004).

Os lignosulfonatos são surfactantes que podem ser usados para estabilizar dispersões e emulsões e que possui diversas aplicações, entre elas destacam-se: na redução de contaminantes em água, no tratamento de águas residuais, na produção de petróleo, no uso de aditivos alimentícios para animais, em pesticidas, como inibidores de corrosão, em resinas de troca iônica, entre outros (XU & FERDOSIAN, 2017; ALWADANI & FATEHI, 2018). A afinidade para adsorção, capacidade de dispersão e sua molhabilidade o tornam um produto de grande interesse industrial. Além disso, são produtos de baixo custo, renováveis, biodegradáveis e geram menos impactos ambientais quando comparados com surfactantes não-iônicos sintéticos (PADILHA et al., 2021).

Uma outra aplicação viável do LS é como uma alternativa ao uso do carvão ativado, sendo usado como complexante de metais pesados, em decorrência da sua capacidade quelante para íons metálicos atribuída aos grupos hidroxilas, carboxilas, carbonila e sulfônico (LIU et al., 2019). Além disso, devido à sua capacidade antioxidante, pode ser usado em produtos cosméticos, como demonstrado por Lorquin et al. (2021), sem alterar as características da emulsão e garantindo estabilidade e propriedades antioxidantes. Também é demonstrado na literatura o uso de lignosulfonatos para o desenvolvimento de drogas para estimular o sistema imunológico, demonstrando propriedades antivirais, anticoagulantes e antitumorais (ARO & FATEHI, 2017).

Uma vez que o LS tem demonstrado um bom potencial de adsorção em interfaces, tem se avaliado sua utilização na etapa de hidrólise enzimática para produção de E2G, sendo uma alternativa para deslignificação da biomassa pré-tratada. Por serem moléculas anfifílicas, como os polímeros sintéticos, com uma grande cadeia carbônica apolar na estrutura, têm alta afinidade com a lignina e outros inibidores do processo, reduzindo a adsorção inespecífica das

enzimas nessa estrutura e evitando, em muitos casos, a inacessibilidade da celulose por impedimento estérico (MOONEY et al., 1998).

#### **3.4.1.1 Adição de Lignosulfonato na Hidrólise Enzimática**

A fim de aumentar a produção dos açúcares fermentescíveis na etapa de hidrólise, se faz necessário estudar formas de melhorar, ainda mais, a acessibilidade enzimática à celulose, visto que essa etapa é crucial para a produção de etanol celulósico.

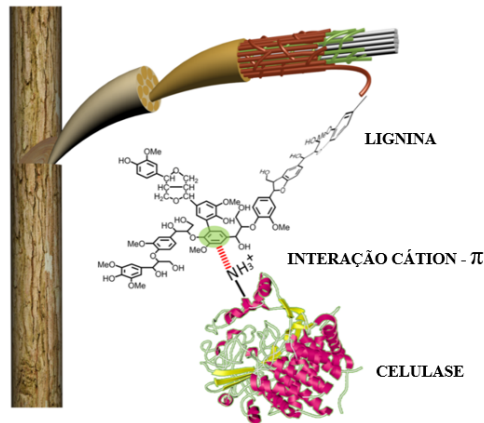
Apesar de ser eficiente na remoção e/ou modificação de alguns compostos, a etapa de pré-tratamento ainda é um dos grandes entraves na produção de E2G. A depender do tipo de tratamento, a lignina residual é responsável por sua adsorção às celulases (deixando-as não-produtivas), por formação de gotas de pseudo-lignina, reduzindo a eficiência da digestibilidade enzimática (MARIANO et al., 2020; NOGUEIRA, 2021). Assim, se faz necessário aumentar a quantidade de enzima no meio para se atingir a mesma conversão celulósica e, com o alto custo comercial das celulases, pode-se inviabilizar o processo.

Durante muitos anos, se especulou que a ligação promotora da adsorção não específica da lignina à celulose se dava por uma soma de efeitos de forças, como a eletrostática, ligações hidrofóbicas e de hidrogênio (LOU et al., 2013). Porém, além destas, a adsorção improdutiva deve-se principalmente à interação cátion- $\pi$ , entre os átomos eletronicamente carregados e os cátions adjacentes, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{NH}_3^+$ , demonstrado na Figura 3.13. Ainda, segundo Zheng et al. (2021), essa interação se faz muito presente entre a lignina e as celulases, demonstrando ter uma maior força de adesão do que a encontrada entre a celulose e as celulases.

Dessa forma, a adição de LS na hidrólise enzimática tem demonstrado alguns mecanismos que favorecem o processo. Ao interagir com as porções hidrofóbicas da lignina, reduz-se a adsorção não-produtiva das enzimas. Adicionalmente, promove-se uma estabilidade conformacional, aumentando a atividade enzimática; reduz-se a desnaturação proteica ocasionada pelo aumento da temperatura; estabiliza-se as forças eletrostáticas de repulsão entre a enzima e a lignina ao ocupar os sítios de interação da lignina da biomassa; reduz a desativação das celulases causada pela força de cisalhamento e a interface gás-líquido causada pela agitação; além de minimizar efeitos adversos dos inibidores advindos da hemicelulose e lignina (ERIKSSON et al., 2002; LOU et al., 2018; ZHENG et al., 2020; PADILHA et al., 2021). Como demonstrado por Zhou et al. (2013), a presença de LS na hidrólise aumentou a digestibilidade enzimática em torno de 2,5 vezes ao fim do processo.

Figura 3.13 - Interação cátion- $\pi$  entre celulase e lignina.

Fonte: ARAÚJO (2021).



De acordo com Lou et al. (2013), a utilização de LS como aditivo no processo aumentou a digestibilidade enzimática da celulose, porém, liginosulfonatos mais hidrofóbicos (com baixa massa molecular e baixa concentração de grupos sulfonatos) inibiram o processo

---

## CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS

---

de hidrólise enzimática por existir uma adsorção competitiva entre a enzima e as frações de LS na superfície hidrofóbica da celulose (LOU et al.,2013).

Assim, devido ao baixo custo desse polímero, por se tratar de um produto gerado a partir da lignina extraída do próprio processo de produção do E2G, torna-se uma alternativa viável para aplicação na hidrólise enzimática.

## 4. Materiais e Métodos

*A seguir são apresentadas as principais metodologias, materiais, reagentes e equipamentos utilizados no desenvolvimento experimental deste estudo.*

### 4.1 Materiais

- Resíduo de coco verde;
- Água destilada (H<sub>2</sub>O);
- Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);
- Hidróxido de Sódio (NaOH);
- Azida de Sódio (1,0%);
- Citrato de Sódio (50,0 mM);
- Coquetel enzimático Cellic CTec2;
- *Saccharomyces cerevisiae* PE-2;
- Moinho Willye, TE – 670, Tecnal;
- Microscópio (Olympus BX51, Japão);
- Autoclave;
- Unidade de Explosão a vapor;
- Banho termostático;
- CLAE;
- Mufla;
- Estufa;
- Agitador do tipo *Shaker*;
- Geladeira;
- Agitador magnético;
- Fluxo Laminar;
- Centrífuga (5415 D, Eppendorf);
- Potenciômetro (pHmetro);
- Vidrarias de uso geral (béqueres, Erlenmeyers, balões volumétricos, cadinho, placa de Petri, provetas, tubos de ensaio);
- Tubos Falcon (15 mL e 50 mL);
- Eppendorfs;
- Pipetas e suas ponteiras.

## 4.2 Obtenção e Preparo do Coco

O coco verde foi obtido na Rua Adolfo Gordo, Cidade da Esperança, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil RN, 59070-100, em um ponto de venda e distribuição de água de coco. Como matéria-prima do processo, a fibra da casca de coco usada consistiu no epicarpo e mesocarpo.

Após coletada e armazenada em sacos, com um facão, a fibra foi cortada em pequenos pedaços e lavada com água destilada para remover impurezas. Em seguida, foi seca a 50°C, por 72 h, em estufa de câmara com bandejas, moída (moinho Willye, TE – 670, Tecnal) e, por fim, foi peneirada com granulometria de 48 *mesh* para ser usada, posteriormente, como reportado por Nogueira (2017).

## 4.3 Pré-tratamento

Os diferentes pré-tratamentos realizados no presente estudo são descritos a seguir e demonstrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Pré-tratamentos usados na fibra de coco verde.

Nomeclatura utilizada	Tipo	Condições
HS	Alcalino (Hidróxido de sódio)	Hidróxido de sódio 2,0% (m/v), 1 hora, 121°C em autoclave.
EVHS	Combinado (Explosão a vapor + Hidróxido de Sódio)	Explosão a vapor: 210°C, 20 bar, 10 minutos; Alcalino: Hidróxido de Sódio 2,0% (m/v), 1 hora, 121°C em autoclave

Fonte: Autora adaptado de RIBEIRO et al. (2022).

### 4.3.1 Pré-tratamento Alcalino

Esse tratamento foi realizado com uma solução de hidróxido de sódio (2,0% m/v) e fibra de coco verde seca em razão de 10% (m/v). Assim, 20,0 g de sólido (base seca) foram misturados com 200 mL de solução e tratado em autoclave (Autoclave, AV137, Phoenix) por 1 h, a 121°C, conforme Nogueira (2021) e Sindhu et al. (2011). Após o pré-tratamento, o licor residual foi armazenado para análise e o material pré-tratado lavado seis vezes com água corrente. Por fim, a biomassa foi seca a 60°C, por 72 h, em estufa de câmara com bandejas.

### 4.3.2 Pré-tratamento Combinado (Explosão a vapor – alcalino)

Para o pré-tratamento por explosão a vapor, 210,0 g de fibra de coco verde, em base seca, foram introduzidas em um reator de 14L (219 x 280 x 8 mm, UpControl, Brasil), com vapor gerado por água destilada, em temperatura de 210°C e pressão de 20 bar, por 10 minutos. O fator de severidade ( $R_o$ ) foi calculado a partir da Equação (1). Em seguida, a fibra pré-tratada foi lavada com água corrente, filtrada e seca por 24 horas a 60°C (RIBEIRO et al., 2022).

$$R_o = \log \left[ \int_0^t \exp \left( \frac{T - 100}{14,75} \right) dt \right] \quad (1)$$

Os valores de  $R_o$  são calculados com base no tempo e na temperatura do pré-tratamento, conforme a Eq. (1), sendo  $t$  o tempo de duração do processo no equipamento, em minutos,  $T$  a temperatura em (°C), 100 sendo a temperatura de referência em (°C) e 14,75 um parâmetro empírico relacionado com a energia. O valor de  $R_o = 4,25$  foi utilizado no presente estudo.

Após a realização do pré-tratamento por explosão a vapor, a biomassa pré-tratada foi encaminhada para um tratamento alcalino, seguindo a mesma metodologia do item anterior (4.3.11).

O rendimento de cada pré-tratamento (HS e EVHS) foi calculado pela razão das massas antes e depois da operação de pré-tratamento e lavagem, como mostrado na Equação (2).

$$\text{Rendimento (\%)} = \left( \frac{M_{fc}}{M_{ic}} \right) \times 100 \quad (2)$$

sendo:

Rendimento (%) → percentual de rendimento mássico do pré-tratamento;

$M_{ic}$  → massa inicial de sólido em base seca, antes do pré-tratamento;

$M_{fc}$  → massa final de sólido em base seca, após pré-tratamento e lavagens.

#### 4.4 Extração de Lignina

A extração da lignina do primeiro resíduo da lavagem pós pré-tratamentos HS e EVHS, seguiu a metodologia de extração citada por Mancera et al. (2010). A lignina do licor extraído após os pré-tratamentos foi precipitada da fase líquida por redução do pH, adicionando ácido sulfúrico (5,0M) até atingir pH = 2,0. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de água ácida (pH 2,0). Então, o material foi filtrado para isolar a lignina, que foi seca a 60°C, por 24 horas.

#### 4.5 Produção de Lignosulfonato

Similarmente ao proposto por Ghavidel et al. (2021) e Ying et al. (2022), para a produção de lignosulfonato foi efetuada uma reação de sulfometilação, cuja lignina sólida utilizada apresenta uma proporção de 1:100 (sólido/líquido), com NaOH (1,0% m/m) e formaldeído (3,0% v/v), por 1 h, a 70°C. Em seguida, 100 mL de bissulfito de sódio (20,0 g/L) foi adicionado à solução e a reação ocorreu a 97°C, por 3h, em agitador magnético.

Após o término da reação, a solução, ao alcançar a temperatura ambiente, foi mantida em sacos de diálise (Sigma Aldrich) de 1,0 kDa, por 2 dias, trocando-se a água após as primeiras 6 horas e, depois disso, a cada 12 horas, até completar o tempo necessário de purificação. Por fim, a amostra foi seca em estufa do tipo bandeja a 60°C.

#### 4.6 Caracterização química e física

No presente estudo foram caracterizados os materiais *in natura* (ensaio IN); com hidróxido de sódio (ensaio HS) e combinado (ensaio EVHS). As composições de celulose, hemicelulose, lignina, extraíveis e cinzas, nos demais ensaios realizados, além da quantificação de sólidos totais, foram obtidas seguindo os protocolos da NREL (SLUITER et al., 2005a; SLUITER et al., 2005b; SLUITER et al., 2008).

##### 4.6.1 Umidade

Na avaliação da umidade, 0,1 g de fibra de coco, em base seca, foi pesada em cápsulas de porcelana previamente tarada. O material foi submetido a uma temperatura de 105°C, por 24 h, em estufa (estufa com circulação de ar, TE394/I, Tecnal). Após isso, o material foi colocado em dessecador, por 30 minutos, e pesado novamente. A determinação de umidade foi obtida pela diferença de massa, como demonstra a Equação (3). O experimento foi realizado em triplicata.

$$Umidade (\%) = \left(1 - \frac{M_{ss}}{M_{su}}\right) \times 100 \quad (3)$$

sendo:

*Umidade (%)* → percentual de umidade da amostra;

$M_{ss}$  → massa de sólido seco, obtida pela diferença entre a massa do conjunto cápsula + fibra, após o período de 24h em estufa, e a massa da cápsula;

$M_{su}$  → massa de sólido úmido, obtida pela diferença entre a massa do conjunto cápsula + fibra, antes o período de 24h em estufa, e a massa da cápsula.

#### 4.6.2 Extraíveis

Para determinação de compostos extraíveis, 0,2 g de material, em base seca, foi pesado e adicionado a filtros de papel, e então submetido a uma extração sólido-líquido em duas etapas. Inicialmente, o solvente utilizado foi água deionizada (70 mL) a 100°C, por 2 h. Em uma segunda etapa, 70 mL de álcool etílico 95% foram usados como solvente, a 80°C, por 2 h. O experimento foi realizado em triplicata para cada ensaio.

Finalizado esse processo de extração, o tubo contendo o material foi mantido em estufa (estufa com circulação de ar, TE394/I, Tecnal), a 60°C, durante 24 h, e pesado em seguida. A percentagem de extraíveis, em cada amostra, foi calculado conforme indicado na Equação (4):

$$\text{Extraíveis (\%)} = \left( \frac{M_{t+e} - M_t}{M_{ss}} \right) \times 100 \quad (4)$$

sendo:

*Extraíveis (%)* → percentual de extraíveis da amostra;

$M_{t+e}$  → massa do tubo com extraíveis após extração;

$M_t$  → massa do tubo vazio;

$M_{ss}$  → massa do sólido seco inicial, em base seca.

#### 4.6.3 Polissacarídeos e Lignina Insolúvel

Para a determinação de polissacarídeos, foi usado o método de hidrólise com ácido sulfúrico (72,0%). Dessa forma, foi pesado em torno 0,3 g de material em Erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se 3,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72,0%) que permaneceu durante 1 h reagindo a aproximadamente 30°C. A cada 10 minutos, a mistura foi agitada usando-se um bastão de vidro. Ao fim do período estipulado, foi adicionado 84,0 g de água destilada e, agitando-se

lentamente, a reação foi interrompida. Em seguida, a mistura foi autoclavada (Autoclave, AV137, Phoenix) (121°C e 1,0 atm) por 1 h. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Finalizado o tratamento, o material foi filtrado com papel filtro seco e tarado, para então ser armazenado em microtubos a 4°C, para análise por CLAE. A fração sólida retida no filtro foi lavada com 250 mL de água deionizada e seca a 60 °C, por 24 h. A determinação da fração de lignina insolúvel presente na amostra, se deu conforme Equação (5):

$$\begin{aligned} & \text{Lignina (\%)} \\ & = \left[ \frac{(M_{\text{sólidos+filtro}} - M_{\text{filtro}}) - (M_{\text{cad+cin}} - M_{\text{cad}})}{M_{\text{si}}} \right] \times 100 \end{aligned} \quad (5)$$

sendo:

*Lignina (%)* → percentual de lignina que não se solubilizou;

$M_{\text{sólidos+filtro}}$  → massa de sólidos com papel de filtro seca após a lavagem;

$M_{\text{filtro}}$  → massa do papel de filtro tarado antes da filtração;

$M_{\text{cad+cin}}$  → massa do cadinho de porcelana com as cinzas após a calcinação;

$M_{\text{cad}}$  → massa do cadinho tarado antes da calcinação;

$M_{\text{si}}$  → massa de sólido seco utilizada para hidrólise ácida.

A quantificação dos açúcares foi realizada por CLAE, utilizando a coluna Shim-Pack SCR-101H (Shimadzu Co. Japan) para determinar principalmente glicose e xilose, usando ácido sulfúrico (5,0 mM) como fase móvel, a 50°C, de forma isotérmica e isocrática, sob fluxo de 0,6 mL/min. Na determinação de HMF e furfural, se utilizou a coluna Shim-Pack CLC-ODS (Shimadzu Co. Japan), tendo como fase móvel ácido acético (AA) (1,0%) e acetonitrila (ACN) a 25°C, e fluxo de 0,6 mL/min em gradiente: AA 100% - ACN 30% (0-5 min); ACN 30% - 70% (5-10 min); ACN 70% - 100% (10-15 min); ACN 100% - AA 100% (15-25 min).

A fim de se determinar a concentração de celulose e hemicelulose (Eq. 6), soma-se à quantidade de açúcares corrigida, com seus respectivos fatores de conversão, apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Fatores de conversão dos açúcares

Celulose		Hemicelulose	
Componente	Fator de conversão	Componente	Fator de conversão
Celobiose	0,95	Xilose	0,88
Glicose	0,90	Arabinose	0,90
HMF	1,20	Ácido Acético	0,72
		Furfural	1,37

Fonte: Adaptado de PITARELO (2007).

$$C_f = \sum_i f_i \times C_i \quad (6)$$

sendo:

$C_f$  (g/mL) → concentração final de celulose ou hemicelulose;

$C_i$  (g/mL) → concentração do componente  $i$ ;

$f_i$  → fator de conversão do componente  $i$ .

Assim, sabendo-se que o volume total, ao fim da hidrólise ácida com  $H_2SO_4$ , é de 87 mL, e que a massa inicial a ser usada é de 0,3 g, o percentual de celulose e hemicelulose foi calculado usando-se a Equação (7):

$$P_i (\%) = \frac{(C_f \times V)}{M_i} \times 100 \quad (7)$$

sendo:

$P_i$  (%) → percentual de celulose ou hemicelulose;

$C_f$  (g/mL) → concentração final de celulose ou hemicelulose;

$V$  (mL) → volume final do hidrolisado após a hidrólise com  $H_2SO_4$ ;

$M_i$  (g) → massa inicial de sólido usada na hidrólise ácida.

#### 4.6.4 Teor de Cinzas Totais

Para determinação de cinzas totais, foi pesada 0,5 g de sólido *in natura* seco e de sólido pré-tratado seco, que foram adicionados a cadinhos de porcelana previamente tarados. O material foi inserido em uma mufla e calcinado a 800°C, por 2h. A diferença de massa determina o teor de cinzas presente, como ilustra a Equação (8). O experimento foi realizado em duplicata para cada ensaio.

$$Cinzas (\%) = \left( \frac{M_{cad+cin} - M_{cad}}{M_{ss}} \right) \times 100 \quad (8)$$

sendo:

$Cinzas (\%)$  → percentual em massa de cinzas da amostra;

$M_{cad}$  → massa do cadinho antes da calcinação;

$M_{cad+cin}$  → massa do cadinho com as cinzas após calcinar;

$M_{ss}$  → massa do sólido seco inicial, em base seca.

#### **4.6.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de FTIR da fibra de coco *in natura*, pré-tratada com hidróxido de sódio e o combinado, além das ligninas e dos lignosulfonatos produzidos, foram avaliados usando-se espectrômetro FTIR (Frontier, PerkinElmer Inc., EUA), da Central Analítica do Instituto de Química da UFRN, na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução.

#### **4.6.6 Análise Termogravimétrica (TG)**

As análises termogravimétricas da lignina extraída e dos lignosulfonatos produzidos foram realizadas no equipamento Shimadzu TGA-50 (Shimadzu Corporation, Japão), do Núcleo de Pesquisa em Alimentos e Medicamentos da UFRN, em atmosfera inerte de hélio (He), com rampa de aquecimento de 5°C/min, por até 600°C.

#### **4.6.7 Análise de Difração de Raios-X (DRX) e Índice de Cristalinidade (IC)**

A análise foi feita na biomassa *in natura* e nos materiais pré-tratados (D e E), utilizando um difratômetro de raios-X (Shimadzu 6000, Shimadzu, Japão), do Laboratório de Nanoestruturas Magnéticas e Semicondutores do Departamento de Física Teórica e Experimental da UFRN, com voltagem de 30 kV, corrente elétrica de 30 mA, radiação  $K\alpha$  de cromo e velocidade de 2 graus por minuto. Foi utilizada uma varredura contínua de ângulo  $2\theta$  de 10 a 40.

O índice de cristalinidade (IC) foi determinado pela equação 9.

$$IC (\%) = \left( \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (9)$$

sendo:

$IC$  (%) → percentual de índice de cristalinidade;

$I_{002}$  → intensidade do pico no plano cristalográfico 002 ( $2\theta \sim 22,6^\circ$ );

$I_{am}$  → intensidade do vale entre os picos dos planos cristalográficos 002 e 001 ( $2\theta \sim 17,5^\circ$ ).

#### 4.7 Hidrólise Enzimática

As hidrólises enzimáticas da fibra de coco verde pré-tratada com hidróxido de sódio (HS); e combinado, explosão a vapor + alcalino (EVHS), seguiram a metodologia descrita por Yang et al. (2014). A carga de sólidos utilizada foi de 5,0%, 10,0% e 15,0% (m/v), em base seca, para um volume útil de 5,0 mL por Erlenmeyer, em duplicata. O coquetel comercial que foi usado nos ensaios de hidrólise foi a Cellic CTec2 (Novozymes) variando-se a carga enzimática em 10,0, 15,0 e 20,0 FPU/g. Foi adicionado ainda 1,0 mL de azida de sódio (1,0% m/v) e completando-se o volume para 5,0 mL com tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8) (NOGUEIRA, 2017).

Os ensaios foram realizados em incubador rotativo (Incubadora Refrigerada com Agitação, TE-421, Tecnal) a  $50^\circ\text{C}$ , sob agitação de 150 rpm, durante 48h, a fim de se avaliar a melhor condição de carga de sólidos e carga enzimática na geração de açúcares fermentescíveis.

No tempo zero e após 48 horas as amostras foram coletadas e colocadas em banho-maria com água fervendo, por 5 minutos, a fim de inativar as enzimas e interromper a reação de hidrólise. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado (Centrífuga, SL 706, SOLAB) a 3600 rpm, por 10 minutos, sendo que a fração líquida foi filtrada em membranas de 20,0  $\mu\text{m}$ , e uma parte foi armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior análise de açúcares (glicose, arabinose, xilose e celobiose) que foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Conforme Nogueira et al. (2019), para determinação da conversão celulósica da hidrólise, usou-se a Equação (9):

$$\text{Conversão Celulósica (\%)} = \left( \frac{\text{glicose produzida (g/L)} \times 0,9}{\text{celulose inicial (g)}} \right) \times 100 \quad (9)$$

sendo:

Celulose inicial → massa de celulose na biomassa considerando a carga de sólidos na hidrólise e a concentração de celulose na caracterização da fibra pré-tratada;

Glicose produzida → concentração de glicose obtida por CLAE para cada ensaio.

#### **4.7.1 Hidrólise Enzimática com adição de lignosulfonato**

O processo de hidrólise citado na seção 4.7 foi repetido, agora com adição do lignosulfonato EVHS, na biomassa EVHS, como agente surfactante. Dessa forma, o conteúdo em cada Erlenmeyer de 25 mL consistiu de 5,0% (m/v) de biomassa, 0,25 mL do coquetel enzimático (98 FPU/g), 0,25 mL de azida de sódio (1,0% m/v), variou-se o lignosulfonato em 0,1%, 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0%, 10% (m/m de biomassa) e completou-se o volume para 5 mL com tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8), para o ensaio EVHS.

### **4.8 Fermentação**

Para a produção do inóculo fermentativo, a levedura *S. cerevisiae* PE-2, previamente mantida em placa de Petri, com meio de cultivo BDA (ágar-batata-dextrose) a 4°C, foi cultivada em Erlenmeyer de 250 mL, com 50 mL de meio (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona), esterelizado em autoclave, e então colocado em incubador rotativo, a 30°C e 150 rpm, por 24 horas.

Ao fim desse tempo, o conteúdo foi transferido para tubos de 50 mL e centrifugados (Centrífuga, SL 706, SOLAB) a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e as leveduras precipitadas foram ressuspensas por adição de tampão citrato de sódio (pH 4,8 e 5,0 mM), e a agitação promovida por vórtex.

Para determinar a concentração inicial de *S. cerevisiae*, na etapa de fermentação, foi realizada contagem de células em câmara de Neubauer, através de microscópio (Olympus BX51, Japão), a fim de se obter uma concentração de  $1,0 \times 10^8$  células/mL (RIBEIRO et al., 2022).

#### **4.8.1 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)**

A fim de produzir E2G, foi realizado o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas. Em Erlenmeyers de 25 mL, foi adicionada a biomassa com carga de sólidos variando em 10,0, 15,0 e 30,0%, utilizando a enzima Cellic CTec 2 com carga enzimática de 20,0 FPU/g. O inóculo de *S. cerevisiae* PE-2 para uma concentração de  $1,0 \times 10^8$  células/mL para um volume reacional de 5 mL (RIBEIRO et al., 2022). Os experimentos foram realizados a 40°C, em incubador rotativo (Incubadora Refrigerada com Agitação, TE-421, Tecnal), com agitação de 150 rpm, durante 72 horas. Amostras foram coletadas no tempo final de fermentação, centrifugadas (Centrífuga, SL 706, SOLAB) (3500 rpm) e filtradas, com filtro de membrana 20,0 µm, a fim de estimar a concentração de etanol por CLAE.

#### **4.8.2 Sacarificação e Fermentação Semi-simultâneas (SSSF)**

Para os ensaios de SSSF, a biomassa adicionada de enzima à 20,0 FPU/g e tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) foram postos em pré-hidrólise por 12 horas, a 50°C e 150 rpm em incubador rotativo. Após esse tempo, no volume reacional foi adicionado o inóculo, na concentração de células  $1,0 \times 10^8$  células/mL de *S. cerevisiae* PE-2, por mais 72 horas. Ao fim do processo, as amostras foram coletadas, centrifugadas (Centrífuga, SL 706, SOLAB) (3500 rpm) e filtradas com filtros de membrana (Millex, Irlanda) de 45,0 µm para se estimar a concentração de etanol produzida, por CLAE.

É válido mencionar que para 30,0% de sólidos, tanto na SSSF como na SSF, inicialmente foram adicionados 15,0% de sólidos. O restante só foi adicionado após 24h de processo.

#### **4.9 Análise estatística**

A fim de avaliar a significância dos efeitos nos resultados obtidos, foi realizado o teste de Tukey com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft, EUA).

---

# **CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

## 5. Resultados e Discussões

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos e as discussões pertinentes aos temas apresentados.

### 5.1. Caracterizações das biomassas lignocelulósicas

No presente estudo, foram realizadas caracterizações físico-químicas das biomassas não-tratada (IN), tratada com hidróxido de sódio 2,0% (m/v) (HS) e tratada de forma combinada (explosão a vapor, 210°C, 10 minutos + hidróxido de sódio 2,0%) (EHVS), bem como análise de difração de raios-X (DRX) e análise por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

#### 5.1.1. Caracterização físico-química das fibras

As fibras de coco verde não tratada (*in natura*) e com tratamentos alcalino (HS) e combinado (EHVS) foram caracterizadas em termos de polissacarídeos (celulose, hemicelulose), lignina insolúvel, extraíveis e cinzas, seguindo os protocolos da NREL. Os valores obtidos estão explicitados na Tabela 5.1. IN é referente à biomassa não tratada, HS é a biomassa após o tratamento alcalino e EVHS é a biomassa com tratamento combinado.

Tabela 5.1 - Caracterização físico-química da biomassa não-tratada e após os pré-tratamentos. As letras a, b e c foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).

Amostra	Índice de Cristalinidade (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extraíveis (%)	Cinzas (%)
IN	27,58%	33,07 ± 0,02 <sup>c</sup>	14,63 ± 0,50 <sup>a</sup>	36,05 ± 1,54 <sup>a</sup>	14,17 ± 3,41 <sup>a</sup>	2,11 ± 0,04 <sup>a</sup>
HS	44,08%	38,11 ± 0,53 <sup>b</sup>	13,61 ± 0,54 <sup>a</sup>	22,32 ± 0,54 <sup>b</sup>	6,62 ± 0,68 <sup>b</sup>	1,88 ± 0,04 <sup>a</sup>
EVHS	45,67%	39,87 ± 0,39 <sup>a</sup>	12,84 ± 0,29 <sup>a</sup>	22,57 ± 1,19 <sup>b</sup>	7,00 ± 0,86 <sup>b</sup>	1,64 ± 0,99 <sup>a</sup>

Com os referidos pré-tratamentos, o conteúdo celulósico na fibra pré-tratada fica mais exposto do que no material *in natura*, havendo um aumento no conteúdo de celulose verificado na caracterização (Tabela 5.1). Para EVHS, o percentual celulósico na biomassa é de 39,87%, um aumento de 20% em relação ao material sem tratamento (IN). Já para a fibra alcalina (HS), o percentual obtido foi de 38,11%, equivalente a um aumento de 15% no conteúdo de celulose.

Quanto ao teor de hemicelulose em cada fibra, apesar da redução expressa após ambos tratamentos, não há diferença significativa quando comparado à biomassa *in natura* (IN). Ademais, para a lignina, verifica-se uma redução de 35%, em média, após os tratamentos alcalino e combinado, como visto na Tabela 5.1.

O tratamento com hidróxido de sódio, seja isolado ou de forma combinada, em sequência de algum outro, de acordo com Rabelo et al. (2019), quebra as ligações ésteres intermoleculares entre a hemicelulose e lignina, solubilizando parcialmente esses compostos no licor. Além disso, proporciona um inchamento da celulose e reduz o seu grau de polimerização, aumentando a acessibilidade enzimática posteriormente. Por sua vez, o tratamento hidrotérmico por explosão a vapor, segundo Bhatia et al. (2020), rompe a estrutura lignocelulósica, recondensa parte da lignina, reduz a cristalinidade da celulose e remove parcialmente a hemicelulose, solubilizando-a no licor separado.

Além disso, os tratamentos são responsáveis por removerem outros componentes presentes na fibra *in natura* e que são facilmente extraídos, reduzindo em torno de 50% o teor de extraíveis com relação à fibra *in natura*, que demonstrou um teor de 14,17%, em média, enquanto a biomassa HS apresentou 6,62%, e a EVHS, 7%. A diferença entre os valores, após os tratamentos, não demonstra diferença estatística. Quanto ao teor de cinzas totais, a redução de seu conteúdo, após os tratamentos realizados, não demonstrou variações significativas, como visto na Tabela 5.1.

O comportamento verificado após ambos os pré-tratamentos, para todos os componentes caracterizados, difere do estudo realizado por Ribeiro et al. (2022) quanto à magnitude dos efeitos. Isso pode ser explicado, entre outras justificativas, pela diferente matéria-prima utilizada, que apesar de ser coco verde, foi obtido em locais diferentes, e, conseqüentemente, cultivos diferentes. De acordo com Rosa et al (2001), é possível que diferentes substratos da mesma matéria-prima obtenham diferentes composições.

Conseqüentemente, para um pré-tratamento alcalino com rendimento de aproximadamente 69,31%, e para um tratamento combinado com rendimento de 44,10%, a Tabela 5.2 a seguir, ratifica a alta remoção de lignina na biomassa HS, pelo tratamento alcalino, e a remoção da hemicelulose da biomassa, devido à explosão a vapor, e da lignina pelo tratamento sequencial com hidróxido de sódio.

Tabela 5.2 - Retenção de celulose e remoção de lignina e hemicelulose nas biomassas HS e EVHS após os pré-tratamentos.

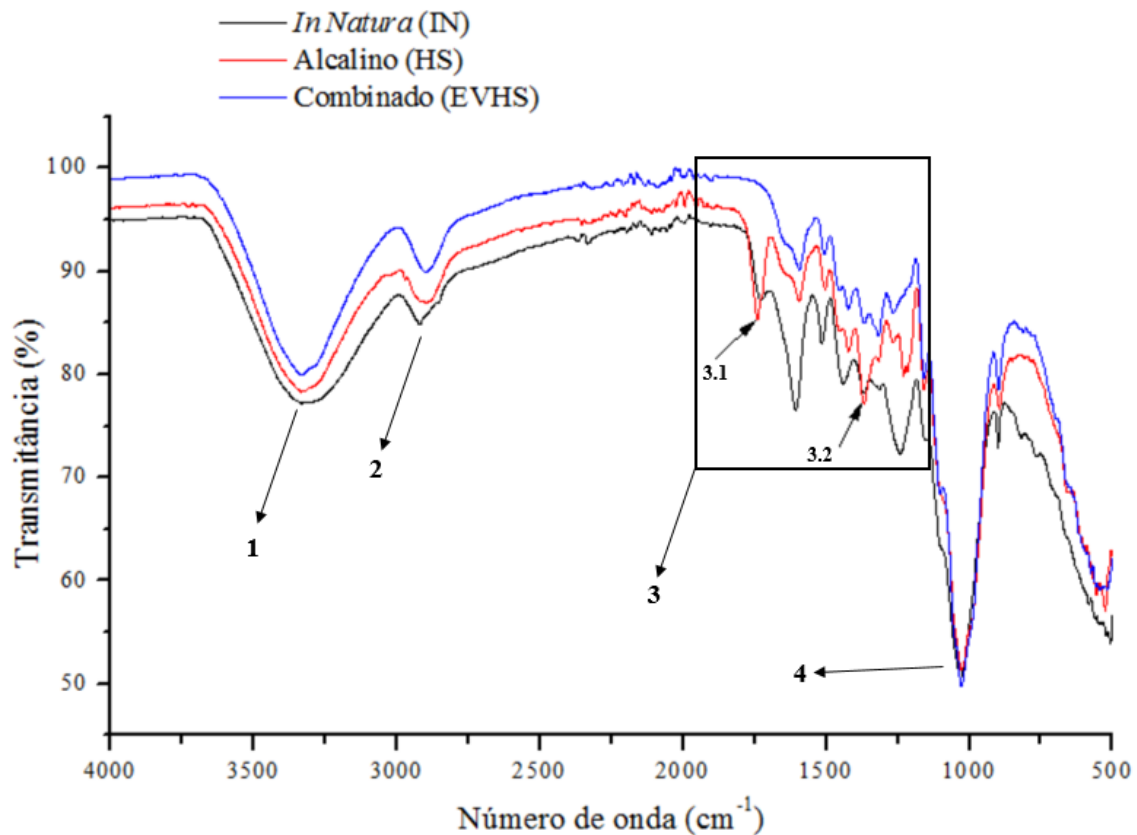
Amostra	Retenção		Remoção
	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
HS	79,87%	35,52%	57,09%
EVHS	52,73%	61,61%	72,62%

### 5.1.2. Análise por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada a fim de determinar as mudanças nas ligações químicas das estruturas (biomassas, ligninas e lignosulfonatos) em decorrência dos processos envolvidos nos pré-tratamentos das biomassas.

As análises foram realizadas para a fibra pré-tratada com 2,0% (m/v) hidróxido de sódio (ensaio HS) e tratada com explosão a vapor (210°C, 10 minutos, 20 bar) combinado com 2,0% (m/v) hidróxido de sódio (EVHS). A fibra *in natura* foi analisada com o intuito de comparar e avaliar as mudanças ocasionadas (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Análises de espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier das biomassas lignocelulósicas IN (não-tratada), HS (alcalina), EVHS (combinada).



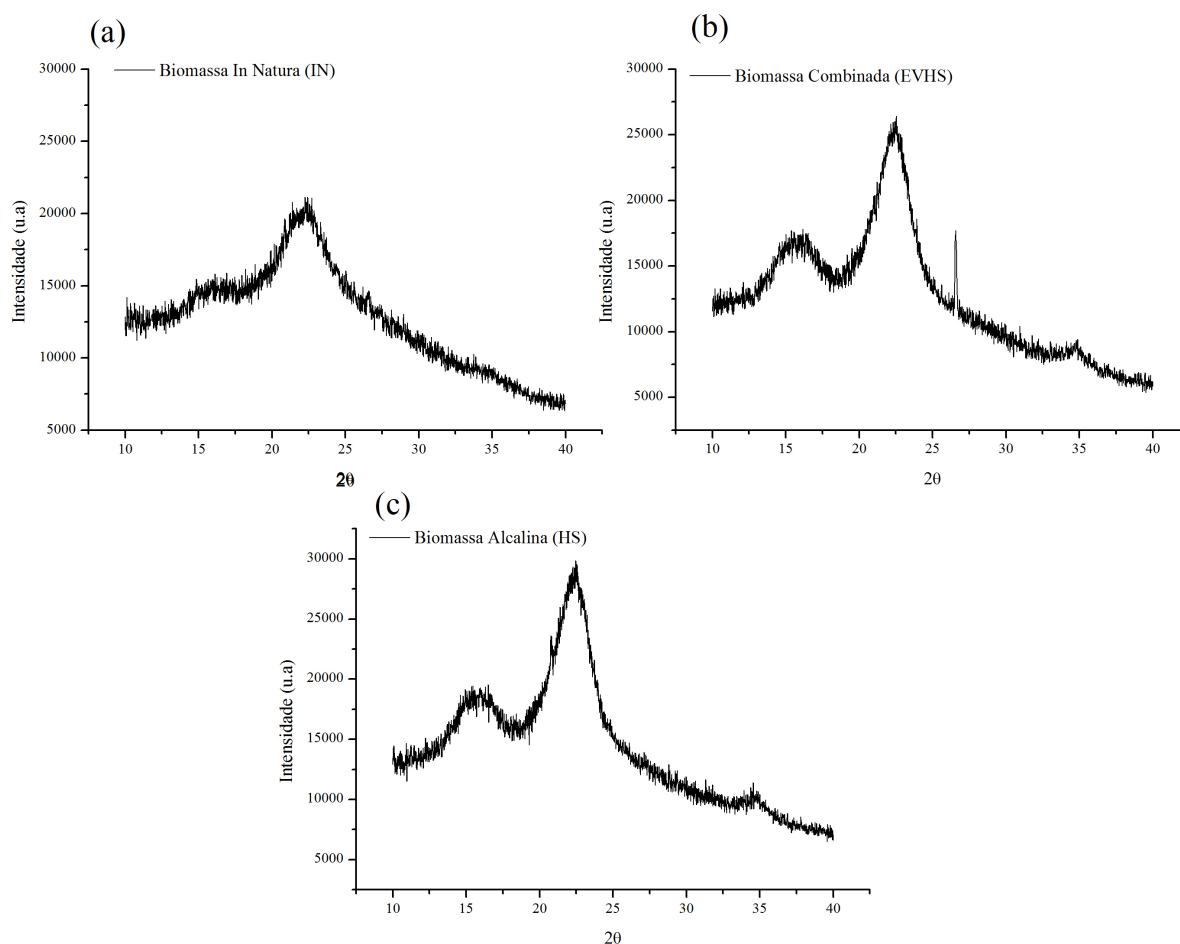
A região indicada pelo número 1, é o pico referente à transmitância em  $3348\text{ cm}^{-1}$  indicando um alongamento dos grupos hidroxila na celulose, hemicelulose e lignina (RIBEIRO et al., 2022). A redução da banda nas biomassas após os tratamentos (HS e EVHS), quando comparado com a fibra *in natura* (IN), sugere uma remoção dos demais componentes (celulose, hemicelulose e lignina). A região indicada por (2), em torno de  $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$  é referente às ligações C-H (DA COSTA FILHO, 2021). Na região 3, verifica-se, principalmente, variações significativas na hemicelulose após o pré-tratamento alcalino. O pico indicado por 3.2 demonstra uma maior deformação na ligação C-H da celulose e hemicelulose ( $1375\text{ cm}^{-1}$ ) após o pré-tratamento alcalino, e o 3.1 um alongamento da ligação C=O da hemicelulose decorrente do tratamento ( $1737\text{ cm}^{-1}$ ) (KURIAN et al., 2015). A região entre o 3.1 e o 3.2, em torno de  $1610\text{ cm}^{-1}$ , pode indicar que os alongamentos C=O conjugados a anéis aromáticos foram diminuídos, podendo ser explicado pela degradação de estruturas aromáticas e consequente formação de grupos carbonila. Por fim, a quarta (4) área numerada, em torno de  $1030\text{ cm}^{-1}$ , demonstra a existência de um alongamento no carbono 6 dos resíduos de glicose que compõem a celulose, além de um alongamento C-O em álcoois do

polissacarídeo (KURIAN et al., *ibid.*). RIBEIRO et al. (2022) e Nogueira (2017) reportaram perfis de transmitâncias semelhantes ao obtido e demonstrado na Figura 5.1.

### 5.1.3. Análise por Difração de Raios-X (DRX)

A fim de se analisar a estrutura cristalina das fibras de coco verde *in natura* (IN) e pré-tratadas (EVHS e HS), realizou-se a análise de difração de raios-X (Figura 5.2) e a determinação do índice de cristalinidade (Tabela 5.1). Os picos observados na Figura abaixo são referentes à celulose cristalina, enquanto os vales, referentes à celulose amorfa (NOGUEIRA, 2017).

Figura 5.2 - Difratoograma das fibras de coco verde (a) *in natura* (IN); (b) combinada (EVHS); (c) alcalina (HS).



A mudança na cristalinidade das fibras indica diminuição da rigidez da matriz lignocelulósica pela quebra da cadeia de celulose ou por remoção da lignina (DA COSTA FILHO, 2021). Na Tabela 5.1 estão indicados os valores de cristalinidade obtidos, sendo de 27,58% para a fibra *in natura*, 44,08% para a biomassa HS e 45,67% para a biomassa EVHS. O aumento do índice de cristalinidade em torno de 65% das biomassas tratadas, comparadas

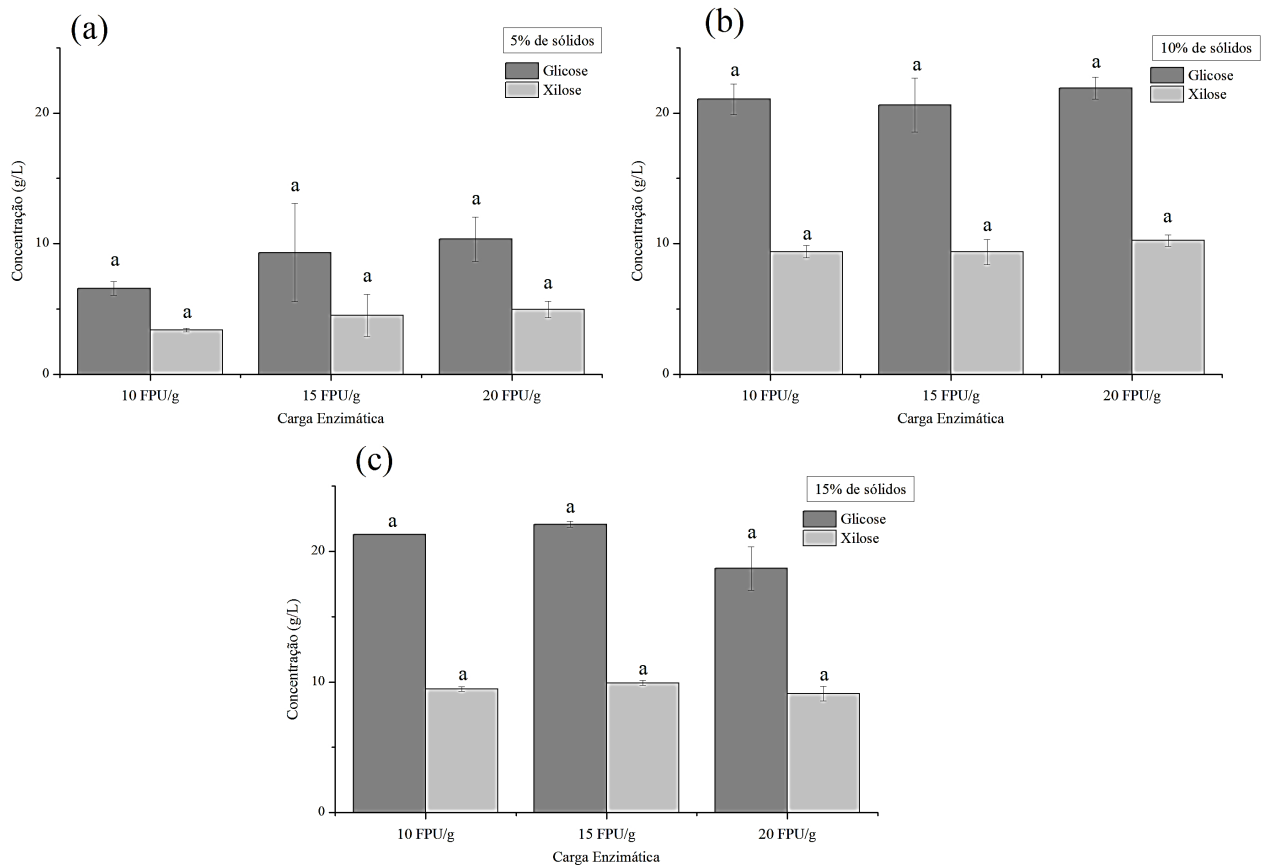
com a *in natura*, é decorrente, principalmente, pelo uso do hidróxido de sódio, responsável por aumentar a cristalinidade da celulose, além de remover a lignina e diminuir o grau de polimerização. O resultado obtido por Nogueira (2017) para a fibra de coco tratada com NaOH foi de 46,56%, similar ao obtido para a fibra HS.

De acordo com Abraham et al. (2013), a explosão a vapor do pré-tratamento combinado com o alcalino facilita o acesso do hidróxido de sódio nas partes mais internas da fibra de coco, uma vez que ocasiona um inchaço da estrutura e aumento da área de superfície, aumentando o índice de cristalinidade da fibra. Corroborando isso, o estudo realizado por Tanpichai, Witayakran & Boonmahitthisud (2019), demonstrou que tratamentos por explosão a vapor na folha de abacaxi aumentam o índice de cristalinidade de 82,2% para 86,7%, para uma pressão de processo em torno de 15,7 bar, 5 minutos e 204°C, devido à remoção das partes amorfas da fibra. Com isso, era esperado que o valor de índice de cristalinidade verificado para o ensaio EVHS fosse ainda maior que o do ensaio HS, já que o aumento foi de apenas 3,5%.

## **5.2. Hidrólise Enzimática**

A hidrólise enzimática é uma etapa essencial para produção de etanol a partir da fibra de coco verde e outros materiais lignocelulósicos. Tanto o pré-tratamento alcalino como o combinado atuaram na remoção parcial da lignina, mesmo que parte dela ainda se mantenha no material de forma indesejada, dificultando a digestibilidade enzimática da celulose presente na biomassa pela existência da interação cátion- $\pi$  do complexo lignina-celulose. Assim, buscou-se avaliar a melhor condição de carga de sólidos e, principalmente, de carga enzimática para ambas as biomassas tratadas, a fim de se obter melhores condições para o processo. Foi avaliada uma carga de sólidos variando em 5,0, 10,0 e 15,0% de sólidos e uma carga enzimática de 10,0, 15,0 e 20,0 FPU/g, em 48 horas de processo. A Figura 5.3 mostra as concentrações de glicose e xilose obtidas a partir da hidrólise enzimática usando a fração sólida dos ensaios realizados com a biomassa tratada com hidróxido de sódio 2,0% (m/v), sendo a Fig. 5.3a para 5,0% de carga de sólidos, Fig. 5.3b para 10,0% de carga de sólidos e a Fig. 5.3c para 15,0% de carga de sólidos.

Figura 5.3 - Concentrações de glicose e xilose liberadas após hidrólise enzimática do coco verde para ensaio HS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. A letra a foi utilizada para comparar os valores obtidos, indicando resultados sem diferença significativa para um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).



De modo geral, como esperado, com o aumento da carga de sólidos, é verificado uma maior a concentração de açúcares fermentescíveis obtida, principalmente para cargas de sólido acima de 5% (m/v). Para uma carga de sólido de 5% (m/v), o maior valor obtido foi para 20 FPU/g, sendo 10,34 g/L, e o menor, para 10 FPU/g, sendo 6,58 g/L. Tais valores demonstram uma certa eficiência no processo, nestas condições, visto que Bezerra et al. (2021) obtiveram apenas 2,0 g/L de glicose para 10 FPU/g e 5% de sólidos, e Nogueira (2017) atingiu em torno de 8 g/L para 20 FPU/g e 5% de sólidos, utilizando a fibra de coco tratada com hidróxido de sódio 2,0% (m/v).

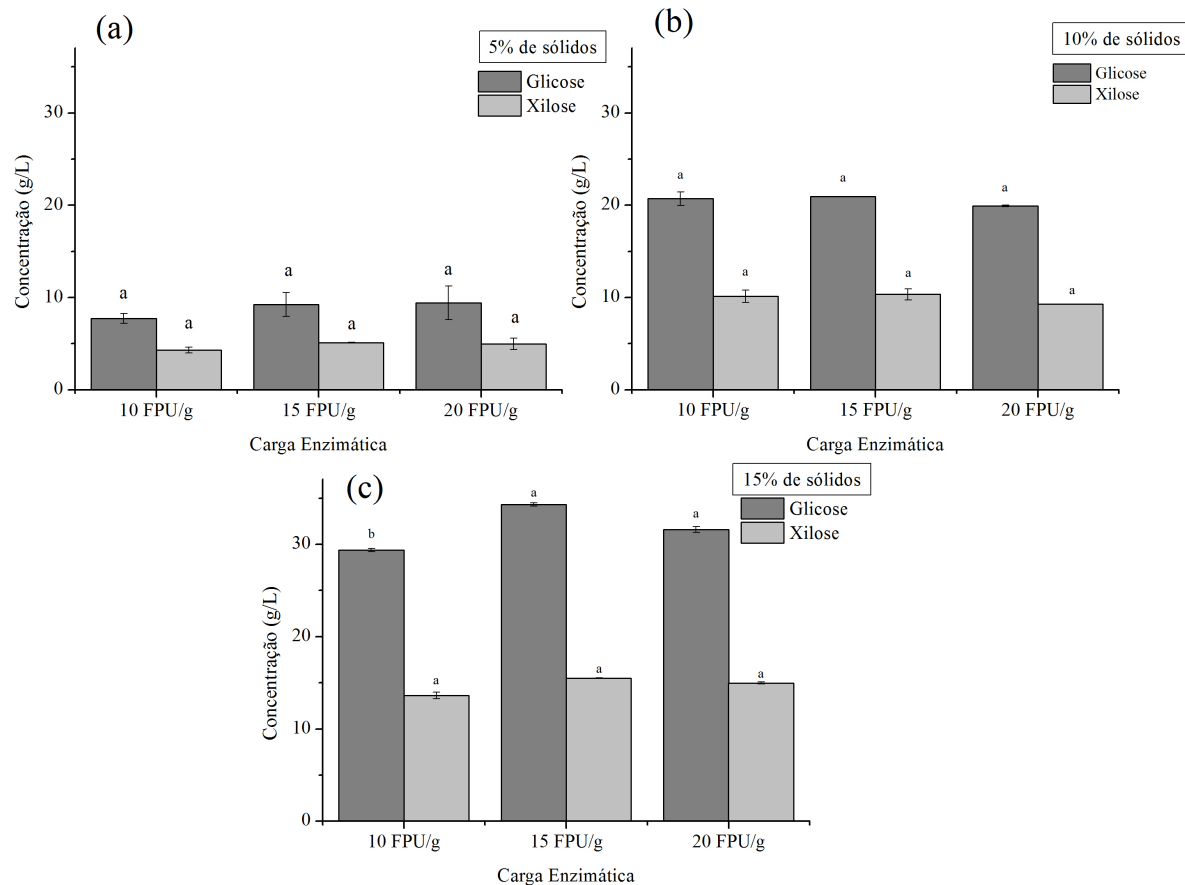
Para os testes em 10 e 15% de sólidos, não há diferença significativa entre as concentrações de glicose alcançadas (~21 g/L). O maior valor obtido entre os ensaios foi de 22,07 g/L para 15% de sólidos e 15 FPU/g, e o menor de 18,69 g/L para 15% e 20 FPU/g.

Ainda avaliando a carga enzimática usada para todos os testes com carga de sólidos, não houve diferença estatística significativa para nenhum dos ensaios realizados. Pode-se inferir que devido a uma remoção de lignina menor do que o esperado, em torno de 57%

(Tabela 5.2), há uma maior taxa de adsorção improdutivo da enzima, reduzindo, então, a produção de açúcares (ARAÚJO, 2021). O aumento da carga de sólidos pode reduzir a eficiência do processo por promover não só um excesso de lignina disponível no meio, mas também um aumento da viscosidade do meio, que dificulta a transferência de massa (CHEN & LIU, 2017). Dessa forma, para a biomassa HS, a fim de reduzir custos e quantidade de matéria-prima usada, é possível realizar os estudos posteriores com cargas enzimáticas baixas (10 FPU/g) e carga de sólido em torno de 10%. Para concentrações de sólidos mais altas, sugere-se uma estratégia de batelada alimentada, adicionando, aos poucos, a biomassa no processo até atingir a concentração desejada.

A Fig. 5.4 a seguir refere-se aos ensaios após o pré-tratamento combinado da explosão a vapor (210°C, 20 bar, 10 minutos) e hidróxido de sódio 2,0% (m/v), sendo Fig. 5.4a para 5,0% de carga de sólidos, Fig. 5.4b para 10,0% de carga de sólidos e Fig. 5.4c para 15,0%.

Figura 5.4 - Concentrações de glicose e xilose liberadas após hidrólise enzimática do coco verde EHVS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).



Para a biomassa EVHS, os valores demonstram que bons resultados foram obtidos variando a carga de sólidos. Para 20 FPU/g, em uma carga de sólidos de 5%, obteve-se 9,42 g/L; para 10% de sólidos, 19,91 g/L de glicose e para 15%, 31,59 g/L. Isso pode ser explicado pelo aumento de celulose disponível, que pode ser convertida em glicose, em decorrência de uma maior concentração de sólidos no meio, para uma mesma quantidade de enzima.

Avaliando a carga enzimática usada, para o ensaio com 15% de sólidos, quantidades de enzimas mais altas apresentam resultados mais promissores, com um aumento aproximado de 15% de produção de glicose, principal açúcar fermentado para produção de etanol a partir de *S. cerevisiae* PE-2, sendo de 34,32 g/L para 15 FPU/g e 29,39 g/L para 10 FPU/g. Para cargas de sólidos mais baixas, não há diferença estatisticamente significativa ao variar a quantidade de enzima no meio. Dessa maneira, confirma-se que é possível proceder os seguintes estudos utilizando cargas de enzima mais baixas, a fim de reduzir custos de processo.

Nas Figuras a seguir estão explicitadas as conversões celulósicas obtidas para cada ensaio, sendo a Figura 5.5 para a biomassa HS (5.5a para 5% de sólidos, 5.5b para 10% de sólidos e 5.5c para 15% de sólidos) e a Figura 5.6 para biomassa EVHS (5.6a para 5% de sólidos, 5.6b para 10% e 5.6c para 15%).

Figura 5.5 - Conversão celulósica para a hidrólise enzimática da biomassa HS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. A letra a foi utilizada para comparar os valores obtidos, indicando resultados sem diferença significativa para um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).

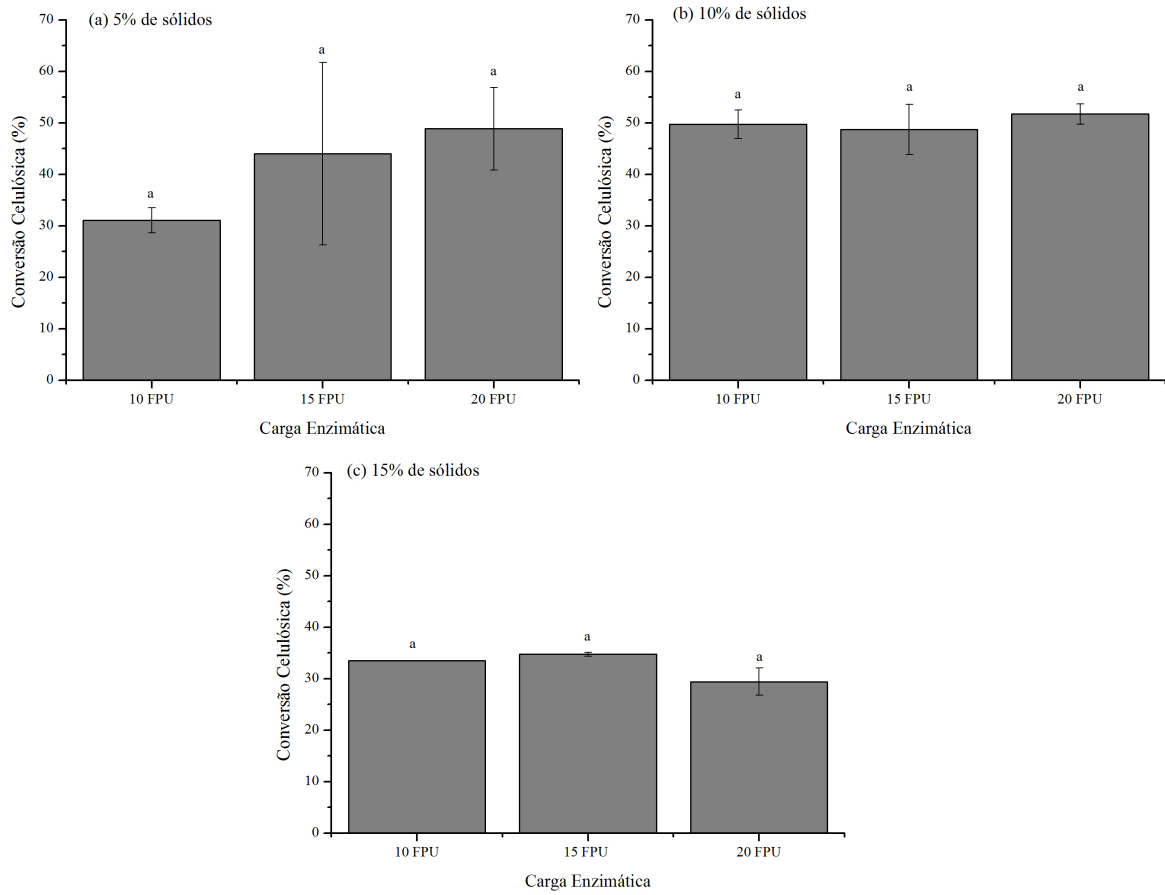
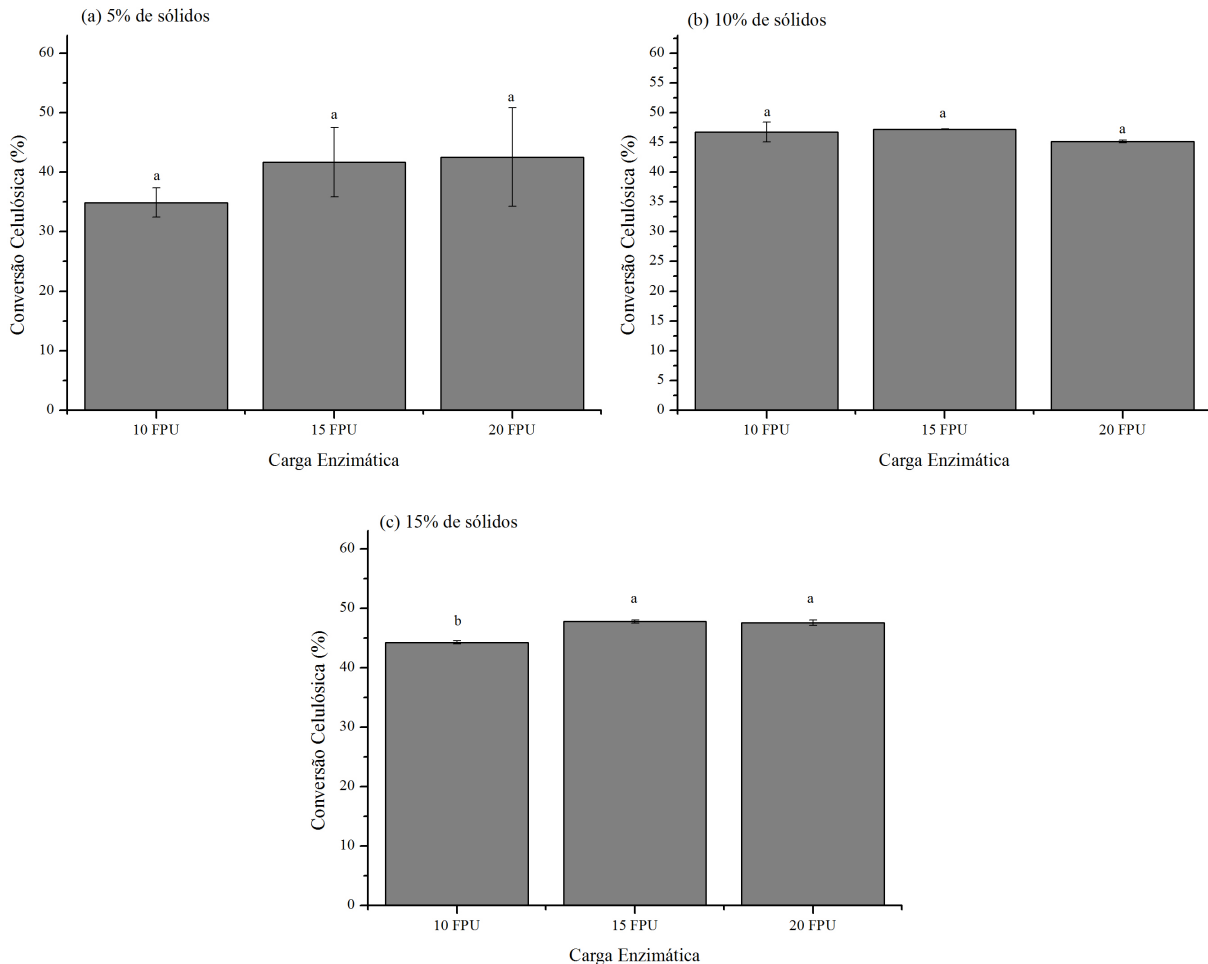


Figura 5.6 - Conversão celulósica para a hidrólise enzimática EVHS, sendo (a) para 5% de sólidos, (b) para 10% de sólidos e (c) para 15% de sólidos, variando a carga enzimática (10, 15 e 20 FPU/g) em cada. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).



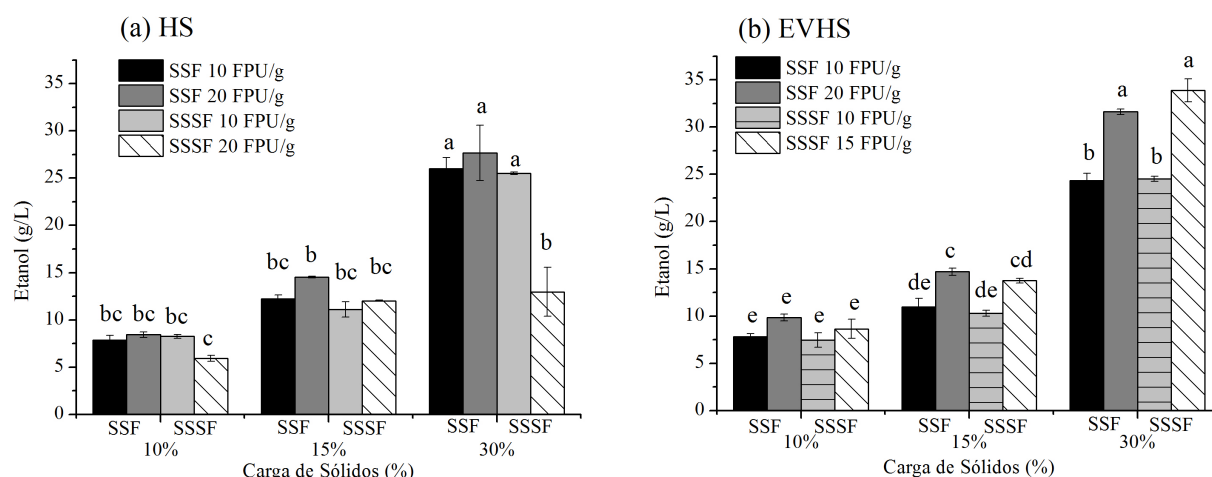
Nas figuras mostradas acima, observa-se uma conversão celulósica similar em ambas as biomassas. Um pouco diferente do obtido por Ribeiro et al. (2022), para 5% de sólidos e 20 FPU/g, a conversão celulósica do processo foi em torno de 54%, enquanto o valor obtido neste trabalho foi de 42,53% para a biomassa EVHS.

Corroborando a análise anterior, observa-se que os melhores resultados na hidrólise enzimática são para cargas de sólidos mais altas. Quanto à carga enzimática, só demonstrou ser significativa na etapa de hidrólise enzimática em uma carga de sólidos de 15% (m/v) na biomassa EVHS, para valores acima de 10,0 FPU/g, aumentando cerca de 8,0% (para 15,0 FPU/g) e 7,4% (para 20,0 FPU/g), sendo 47,75% e 47,54%, respectivamente.

### 5.3 Fermentação

Os resultados da produção de etanol em hidrólise e fermentação simultâneas (SSF) (Figura 5.7a) e semi-simultâneas (SSSF) (Figura 5.7b), utilizando *S. cerevisiae* PE-2 para as biomassas HS e EVHS, durante 72 horas, são mostrados na Figura 5.7. Além da biomassa, variou-se a carga de sólidos (10,0, 15,0 e 30,0%) e a carga enzimática (10,0, 15,0 e 20,0 FPU/g). É importante considerar que as condições não foram otimizadas a fim de obter a maior concentração de etanol para o processo, avaliando-se apenas o impacto do pré-tratamento e da estratégia de condição do processo que obtiveram o melhor desempenho.

Figura 5.7 - Fermentação via SSF e SSSF das biomassas (a) HS e (b) EVHS variando carga de sólidos (10, 15 e 30%), carga enzimática (10, 15, 20 FPU/g) e estratégia fermentativa (SSF e SSSF). As letras a, b, c e d foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).



Conforme esperado, quanto maior a carga de sólidos, maior a concentração de etanol obtida, em decorrência de uma maior quantidade de polissacarídeos disponíveis para serem convertidos em glicose (IOELOVICH & MORAG, 2012), e, em seguida, em etanol. Uma vez que 30,0% de carga de sólidos no meio promove uma alta viscosidade e, conseqüentemente, dificuldade na transferência de massa, a utilização da estratégia de batelada alimentada (adicionando 15,0% inicialmente e o restante da biomassa apenas 24 h após o início do experimento) melhorou, consideravelmente, o rendimento do processo, visto que com 15,0% de sólidos já não se demonstrava diferenças tão significativas quando comparado com os ensaios realizados a 10,0%. De acordo com Mondenbach & Nokes (2013), a adição tardia de uma parcela de substrato mantém um certo nível de água livre para que ocorra processos de difusão dos inibidores produzidos na hidrólise para longe das enzimas.

Com isso, para a carga de sólidos de 30,0%, verificou-se que a produção de etanol foi a maior alcançada neste estudo, atingindo um máximo de 27,68 g/L para biomassa HS, usando a estratégia de SSF para 20,0 FPU/g; e 33,89 g/L para a biomassa EVHS, quando se utilizou a SSSF em 15,0 FPU/g de carga enzimática. Ma et al. (2011) utilizaram a mesma estratégia de batelada alimentada para 25,0% de carga de sólidos, aumentando a conversão celulósica em 50%.

Para uma carga de sólidos de 15,0%, para a biomassa EVHS, a estratégia SSF, com 20,0 FPU/g, demonstrou uma concentração de álcool produzido em torno de 15,0 g/L, um pouco abaixo do valor obtido por Ribeiro et al. (2022), que obtiveram, em média, 21,0 g/L.

Verifica-se que, para a biomassa HS (alcalina), o aumento da carga enzimática não demonstra um aumento estatisticamente significativo, quando se compara 20,0 FPU/g e 10,0 FPU/g na sacarificação e fermentação simultâneas, algo que já era esperado a partir dos resultados obtidos no tópico 5.2. Além disso, verificou-se que a estratégia fermentativa utilizada, nesse caso, não interferiu de forma positiva nos resultados. Para uma SSSF com carga enzimática de 10,0 FPU/g, não há variação significativa na concentração de etanol. Já para uma SSSF com 20,0 FPU/g, há uma diminuição considerável da quantidade de álcool produzida, em qualquer carga de sólidos utilizada. De acordo com Mussatto et al. (2008), pode ser verificado uma redução da taxa da conversão celulósica ao aumentar-se a carga enzimática em decorrência da inibição das enzimas pela alta concentração de glicose no meio. Assim, corrobora-se que o aumento da carga enzimática nem sempre está relacionado ao aumento da liberação de açúcares no meio e, conseqüentemente, ao aumento da produção de etanol.

Além disso, como visto na Tabela 5.2 e já citado anteriormente no tópico 5.2, em decorrência da retenção de lignina em torno de 43%, pode indicar um aumento da adsorção não-produtiva da celulase. Logo, à medida em que o conteúdo de enzima aumenta, não é verificado um aumento concomitante na conversão de polissacarídeos em açúcares, e, conseqüentemente, em etanol, devido ao alto teor de lignina disponível para formar complexos não-produtivos com a celulase.

Dessa forma, com o intuito de melhorar a viabilidade econômica do processo, é demonstrada a possibilidade de redução em até 50% a quantidade de coquetel enzimático usado para essa biomassa (HS), assim como, a utilização de 10 FPU/g, para obter-se resultados similares a 20 FPU/g. Por sua vez, na biomassa combinada (EVHS), o mesmo não ocorreu. Uma vez que o percentual de remoção de lignina após o pré-tratamento combinado foi em torno de 72%, a quantidade de lignina disponível não demonstra ter afetado, de forma

significativa, o processo de liberação de açúcares e fermentação. Verificou-se que com o aumento de carga enzimática, a concentração de etanol produzida aumentou em todas as cargas enzimáticas. Com o interesse voltado a reduzir os custos do processo, é primordial uma redução na quantidade de enzima utilizada. Neste caso, com a mudança de estratégia de SSF para SSSF, vemos um aumento de quase 40% na concentração etanólica, enquanto reduz-se 25% da carga enzimática usada. No ensaio da SSSF a 15 FPU/g, obteve-se 33,90 g/L de etanol, enquanto para a SSF a 20 FPU/g a concentração de etanol observada foi de 24,53 g/L.

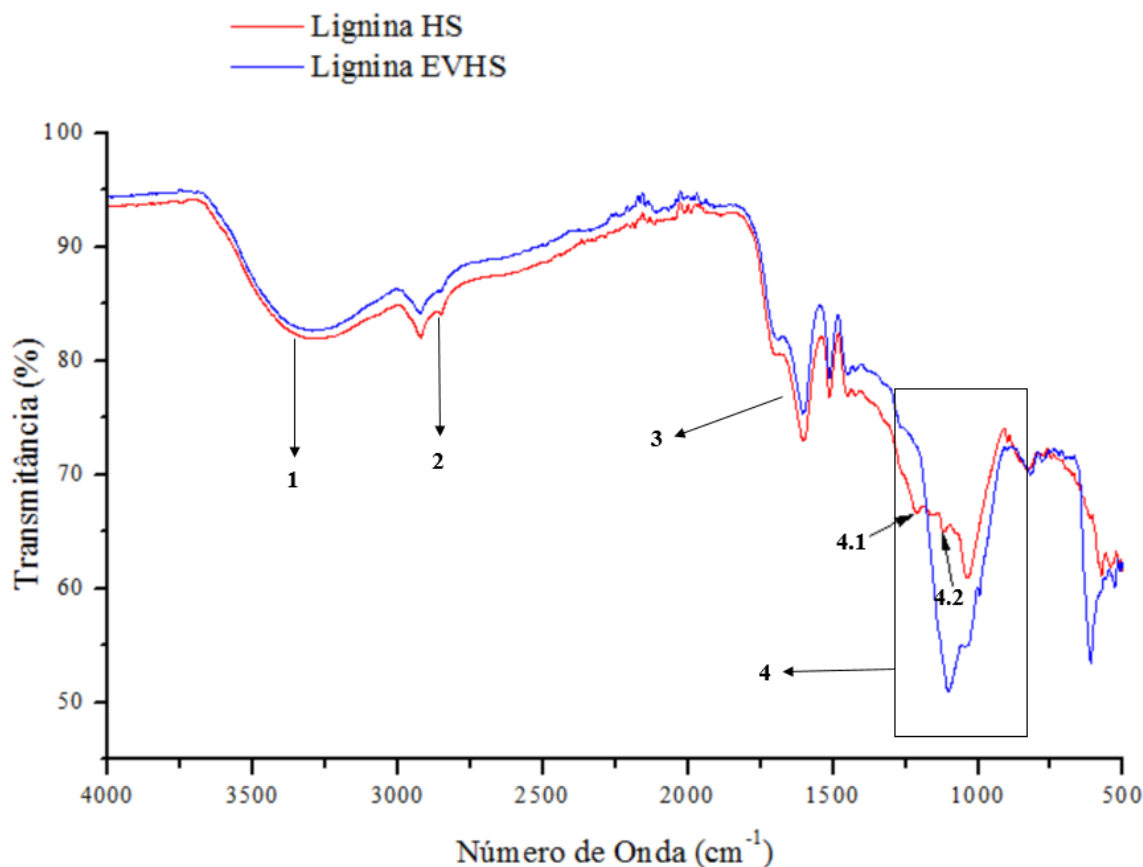
## **5.4 Caracterização da Lignina**

As ligninas extraídas após os pré-tratamentos HS (alcalino) e EVHS (combinado) foram analisadas por FTIR e TG, para melhor compreender as modificações estruturais e diferenças entre elas.

### **5.4.1 Análise por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise por FTIR das ligninas é um indicativo qualitativo da pureza e similaridade nas estruturas de ligninas advindas de diferentes processos. As similaridades presentes nos demais picos da Figura 5.8 são referentes a grupos funcionais que não se alteraram com os tratamentos.

Figura 5.8 - Análises de Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier das ligninas.



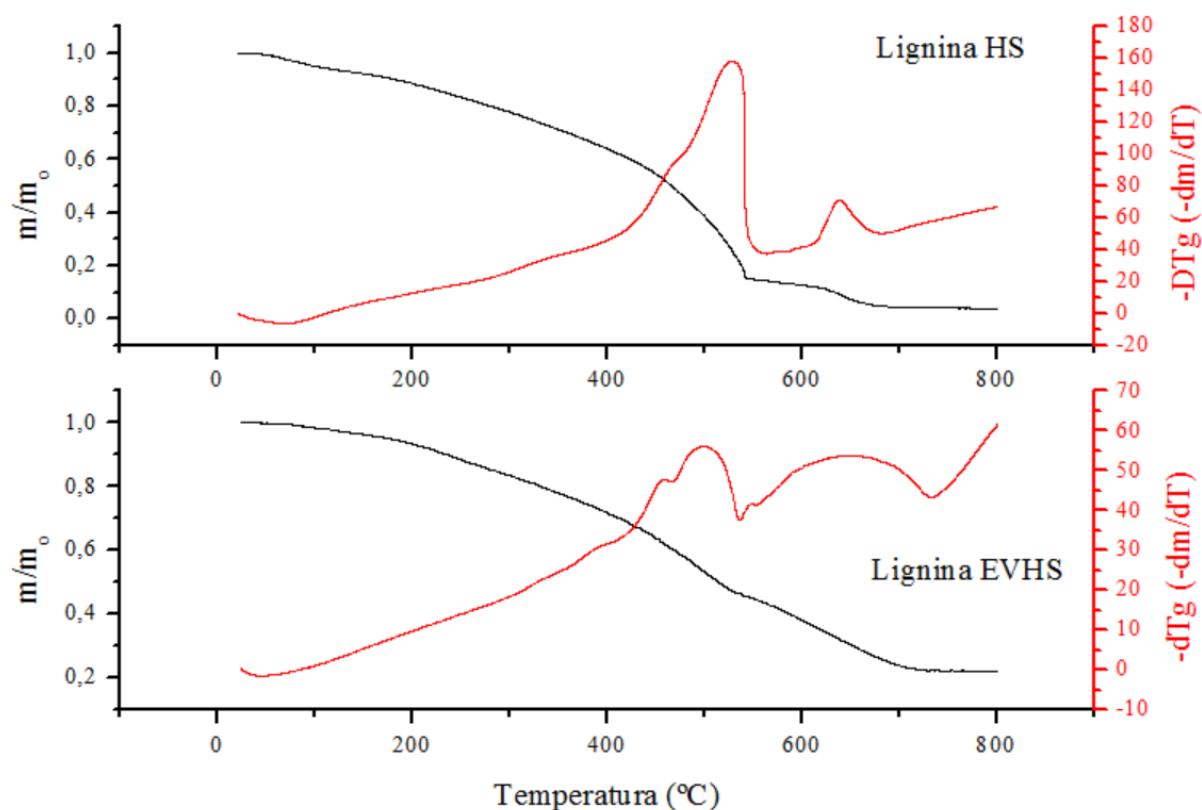
Como demonstrado por Panangama & Peramune (2018), as regiões entre 1400-1600  $\text{cm}^{-1}$  (3) são referentes às vibrações dos anéis aromáticos C=C nas estruturas de fenilproprano; já os picos em torno de 3445-3312  $\text{cm}^{-1}$  (1) podem ser associados ao das hidroxilas presentes, tanto nas partes aromáticas como alifáticas da lignina. Por sua vez, os picos em 2917  $\text{cm}^{-1}$  (2) são atribuídos aos alongamentos das ligações C-H alifáticas, nos grupos  $-\text{CH}_3$  e  $-\text{CH}_2$ -nas cadeias de fenil propano. Na região (4), que comporta picos de 1300 a 830  $\text{cm}^{-1}$ , surgem áreas referentes às vibrações dos grupos funcionais distintos, como o alongamento C-O nas partes fenólicas, éteres e unidades de guaiacil (unidade G) e siringil (unidade S) (DZIURZYNSKI, SUPINSKI & SURMINSKI, 1988). A área (4.1), em 1213  $\text{cm}^{-1}$ , se refere a um alongamento de C-O das unidades de guaiacil verificado na lignina alcalina, que não surge na lignina combinada. Já os picos em torno de 112-1035  $\text{cm}^{-1}$  (4.2) podem indicar deformação nos C-H aromáticos, alongamento de ligações C=O, além de uma maior quantidade de grupos guaiacil, quando comparados com os grupos siringil (DZIURZYNSKI, SUPINSKI & SURMINSKI,

ibid.). Uma vez que esse pico demonstra-se mais expressivo na lignina combinada, verifica-se que a atuação da explosão a vapor intensifica esse efeito, quando combinado ao tratamento alcalino.

#### 5.4.2 Análise termogravimétrica (TG)

A fim de analisar a perda de massa durante o processo de pirólise da lignina, em atmosfera inerte, foram realizados ensaios termogravimétricos, cujos resultados estão demonstrados na Figura 5.9.

Figura 5.9 - Análise termogravimétrica das Ligninas D e E.



Conforme reportado por Carvalho (2022), as ligninas apresentam uma menor variação de perda de massa, porém, maiores amplitudes de faixa de degradação e uma massa residual considerável, indicando uma resistência à degradação térmica. De acordo com Postawa et al. (2022) e Díez et al. (2020), na análise termogravimétrica existem 4 fases: desidratação (até 120°C, na qual ocorre perda da umidade da amostra); pirólise ativa (120-340°C, fase na qual ocorre a mudança de massa por decomposição dos compostos orgânicos pouco resistentes); pirólise passiva (340-380°C, fase em que a amostra perde massa de compostos mais resistentes); pirólise residual (momento em que produtos secundários formados em etapas de queima anteriores e a quantidade final de carvão é formada). Os extrativos são degradados na

faixa de temperatura entre 200-400°C, sendo impossível distingui-los das demais frações da biomassa.

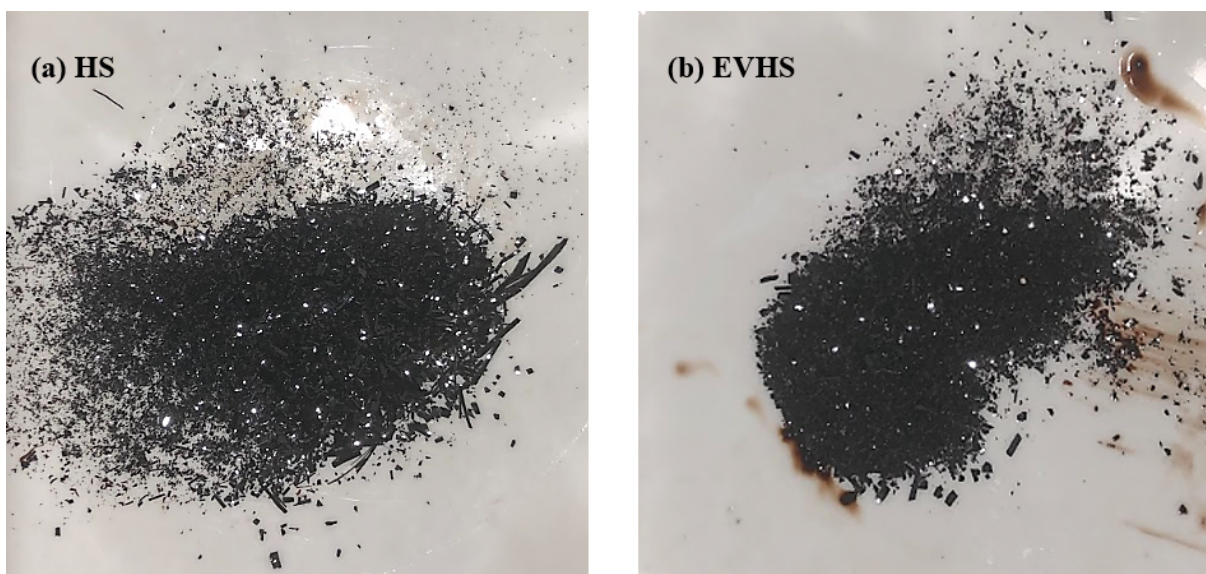
Como verificado na Figura 5.8, as ligninas possuem maior resistência à degradação térmica, abrangendo faixas de até 700°C até a sua estabilidade. Isso ocorre pela presença de grupos funcionais à base de oxigênio com estabilidades térmicas que diferem entre si. A decomposição inicia em torno de 150 e 275°C, degradando hidroxilas localizadas no grupo benzila. Até 250°C, a lignina sofre uma degradação exotérmica. Depois dessa temperatura, a lignina apresenta flutuações que indicam diferentes fases de pirólise, com diferentes entalpias (CARVALHO, 2022). A lignina EVHS demonstrou o ponto de degradação máxima em torno de 505°C, enquanto a HS aproximadamente em 535°C. As diferenças verificadas entre as duas ligninas se dá pela diferença no método de extração, como reportado por Rodrigues et al. (2020), visto que a forma de extraí-la altera a sua estrutura e composição. Quanto mais parecida com a lignina original, menor resistência a degradação térmica.

## 5.5 Caracterização do Lignosulfonato

Os lignosulfonatos produzidos (HS e EVHS) a partir das ligninas extraídas do coco verde foram caracterizados por FTIR, DRX e TG, para um melhor entendimento sobre o seu comportamento e suas características. A Figura 5.10 mostra o lignosulfonato HS. Ambos os LS apresentam a mesma aparência e a mesma tendência à solubilidade em água.

Figura 5.10 – Lignosulfonato, sendo (a) HS e (b) EVHS.

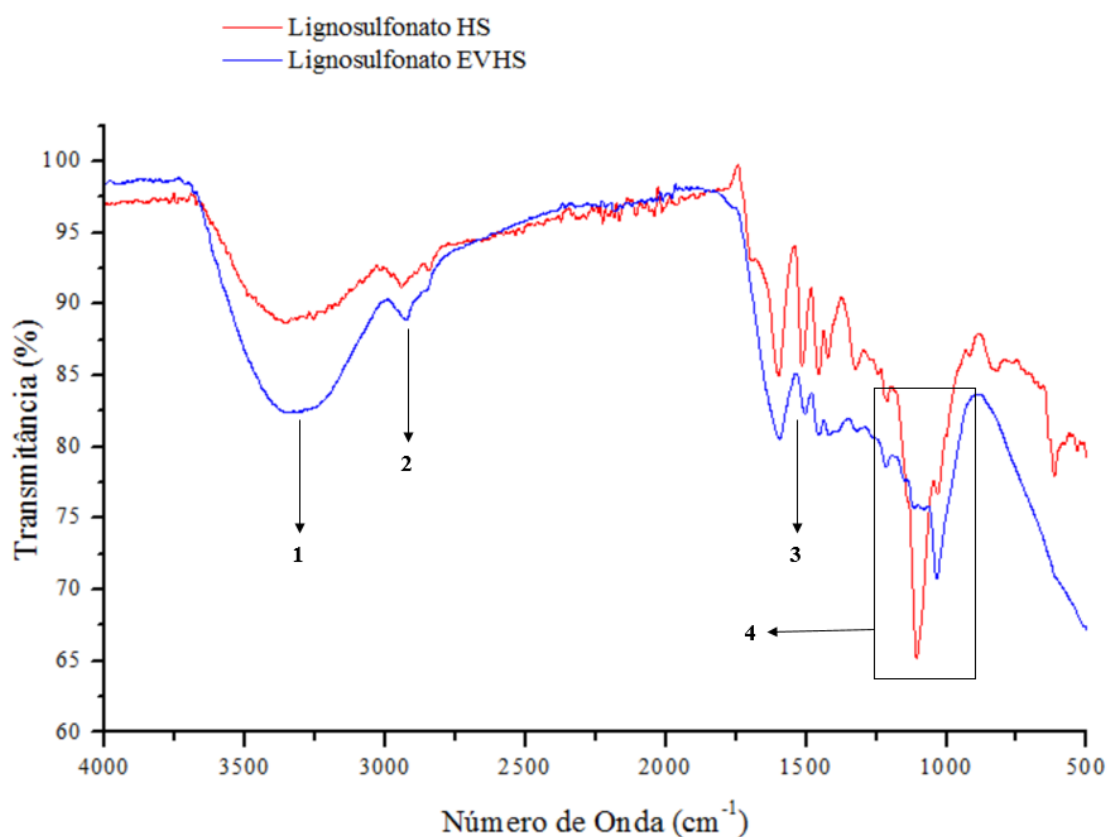
Fonte: Autora (2023).



### 5.5.1 Análise por espectrofotometria de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A fim de analisar a similaridade entre os lignosulfonatos, foi realizada a análise por FTIR das duas estruturas (Figura 5.11). As similaridades presentes nos demais picos da Figura 5.11 são referentes a grupos funcionais que não se alteraram com os tratamentos, e que ainda são oriundos das ligninas usadas como precursoras para cada LS.

Figura 5.11 - Análise de FTIR dos lignosulfonatos HS e EVHS.



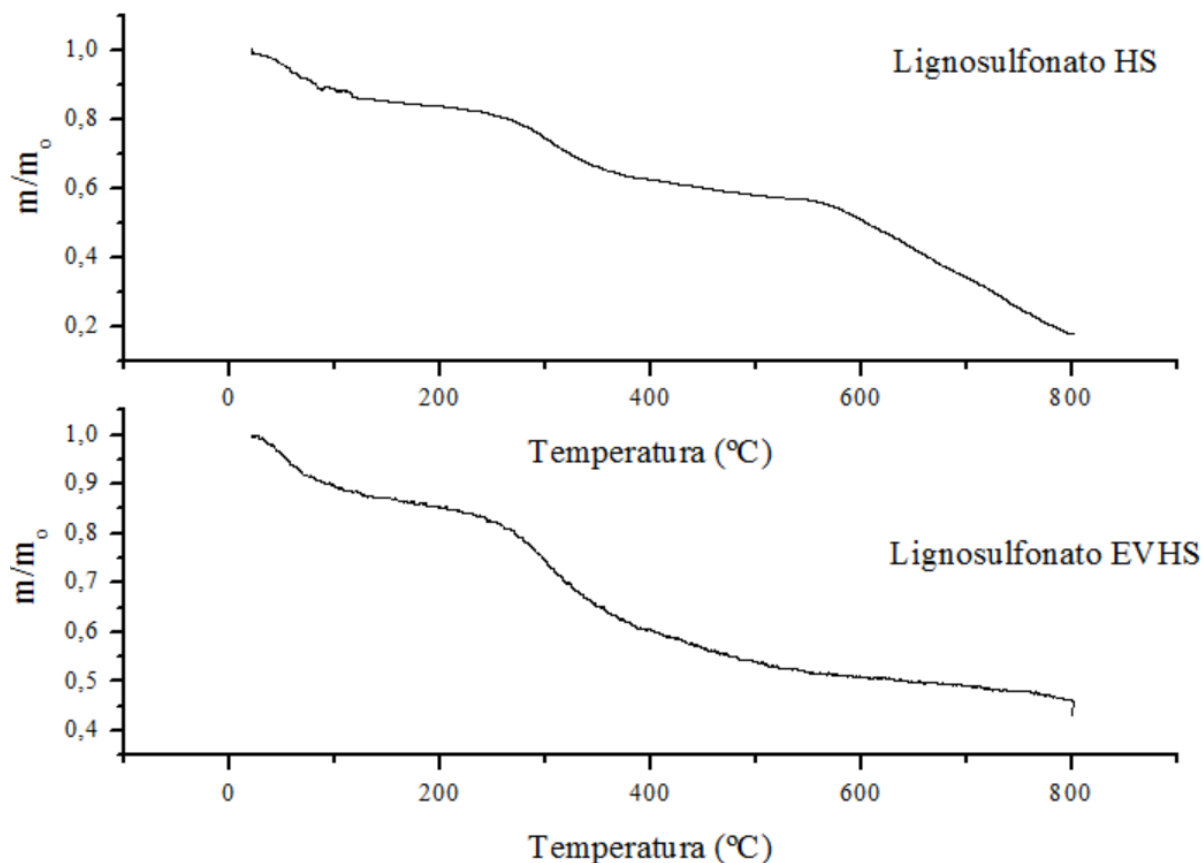
Visto que o lignosulfonato tem como precursor a lignina, o comportamento observado é semelhante: os picos em torno de  $3445-3312\text{ cm}^{-1}$  (1) podem ser associados ao alongamento das hidroxilas presentes tanto nas partes aromáticas como alifáticas da lignina, as regiões entre  $1400-1600\text{ cm}^{-1}$  (3) são referentes às vibrações dos anéis aromáticos C=C nas estruturas de fenilproprano (SHEN, ZHANG & ZHU, 2008). Como reportado por Li & Ge (2011), em torno de  $1040\text{ cm}^{-1}$  (4) visualiza-se a presença de um pico referente a inserção do grupo  $-\text{SO}_3$  advindo da sulfonação, e a adição de grupos metoxila durante a reação podem ser observados pela banda característica em torno de  $2940\text{ cm}^{-1}$  (2). As diferenças verificadas neste pico entre

os dois LS, sugerem que o pré-tratamento combinado (EHVS), por modificar estruturalmente a lignina precursora do liginosulfonato e pela alta temperatura de processo, provoca uma menor quantidade de grupos livres para serem sulfonados na sulfometilação.

### 5.5.2 Análise termogravimétrica (TG)

As perdas de massa dos liginosulfonatos HS (alcalino) e EVHS (combinado) foram analisadas por meio da termogravimetria e demonstradas na Figura 5.12. Comumente, não se têm toda a sua massa inicial carbonizada, restando cerca de 40 a 20%, como indicado por Santos & Curvelo (1999). De acordo com De Oliveira (2010), os cátions presentes nos LS, como o sódio, decorrente do tipo de processo de obtenção usado, podem catalisar a decomposição térmica do material, por facilitarem a clivagem de grupos funcionais e promoverem reações entre eles, demonstradas pela distribuição diversificada de produtos de baixa massa molar. Além disso, ainda promovem a formação de produto carbonizado. Ainda é verificado que os LS começam a se decompor em temperaturas relativamente baixas em decorrência da cisão dos grupos sulfonatos (JAKAB et al., 1993).

Figura 5.12 - Análise de perda de massa por termogravimetria dos liginosulfonatos.

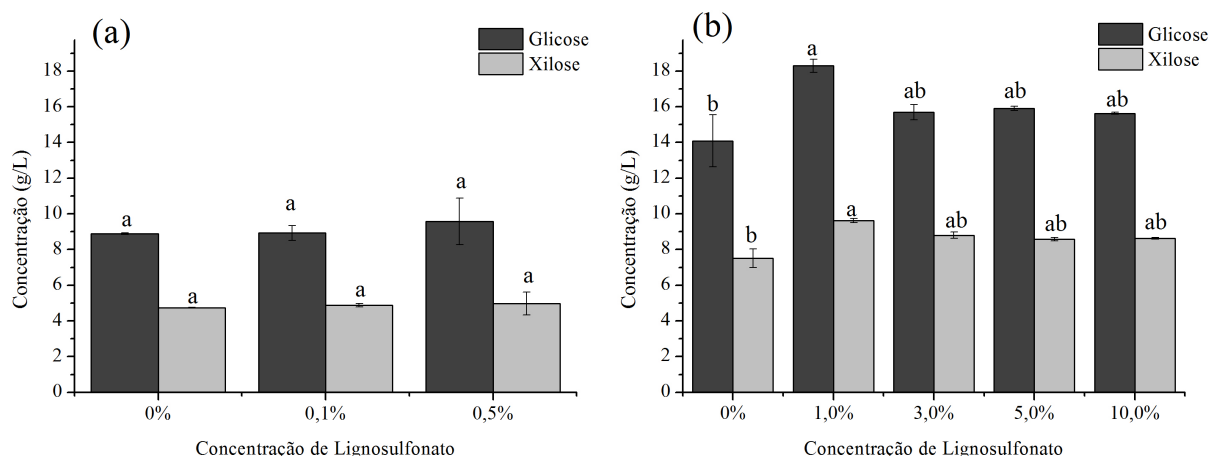


A diferença na estabilidade e no comportamento dos dois lignosulfonatos estudados pode ser atribuída a diferentes quantidades de açúcares residuais nos materiais (SANTOS & CURVELO, 1999), além de diferentes quantidades de sais, visto que as ligninas precursoras de cada um são diferentes, podendo ocasionar em sutis diferenças no processo de sulfometilação. Assim, diferentes pré-tratamentos provocam diferenças físicas e químicas nos lignosulfonatos produzidos, sendo o LS EVHS o que apresenta maior estabilidade em torno de 800°C.

## 5.6 Adição de lignosulfonato na hidrólise enzimática

Como indicado anteriormente, a busca incessante pelo aumento da produtividade em açúcares, na etapa de hidrólise, ocasiona o estudo de aditivos que possam auxiliar no processo. Assim como os tensoativos comerciais, como PEG, Tween, entre outros (NOGUEIRA, 2017), o lignosulfonato atua na redução da adsorção não produtiva da lignina residual na enzima celulase, ao longo do processo (LOU et al., 2013). A Figura 5.13 indica a concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática, com a utilização de diferentes concentrações de lignosulfonato, em relação a massa de sólidos usada (5,0% (m/m)). A Figura 5.13a indica uma concentração de lignosulfonato variando de 0,0% (m/m de biomassa) até 0,5% (m/m de biomassa), com uma carga enzimática de 10,0 FPU/g. Já a Figura 5.13b demonstra os ensaios utilizando 20,0 FPU/g e uma concentração de LS variando de 1,0% (m/m de biomassa) até 10,0% (m/m de biomassa).

Figura 5.13 - Concentração de açúcares após hidrólise enzimática com diferentes concentrações de lignosulfonato (a) Para 10 FPU/g, com 0, 0,1 e 0,5% de lignosulfonato (m/m biomassa); (b) Para 20 FPU/g, com 0, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0% de lignosulfonato (m/m biomassa). As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).

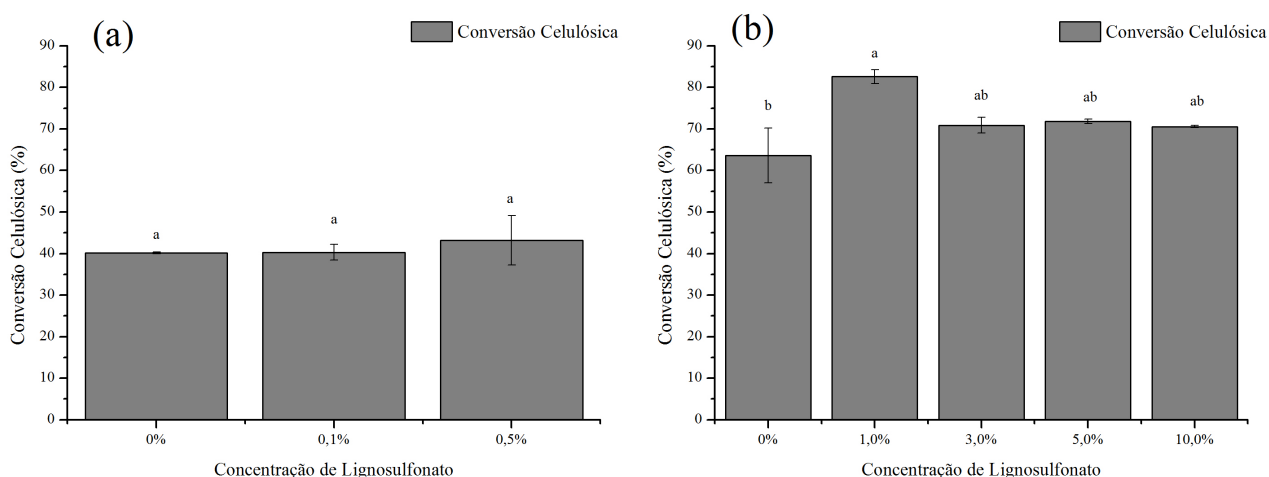


Corroborando o estudo de Lou et al. (2014), para as concentrações de lignosulfonato acima de 0,5 g/L (acima de 1,0%), os efeitos do surfactante começam a não ser tão positivos sobre a hidrólise, quando comparados com a concentração de açúcar obtida em 0,5 g/L. Isso pode ser explicado pelo início da formação de complexos LS-celulase, que formam interações não produtivas e podem vir a precipitar, reduzindo a atividade da enzima. Porém, nessas concentrações, os efeitos na hidrólise demonstram uma estabilidade, independente do aumento da quantidade de lignosulfonato adicionado.

Todavia, no presente estudo, diferindo um pouco do proposto por Lou et al. (2014), para concentrações abaixo de 0,5 g/L (1,0% m/m biomassa), não houveram resultados significativos de aumento da produção de glicose e xilose, em decorrência da baixa concentração de tensoativo adicionado ao meio, sendo indiferente quando comparado aos ensaios sem a adição de lignosulfonato.

Na Figura 5.14 é indicada a conversão celulósica para cada ensaio, sendo a Fig. 5.14a para uma concentração de até 0,5% (m/m de biomassa), e a Fig. 5.14b de 1,0% até 10,0% m/m de biomassa de LS.

Figura 5.14 - Conversão celulósica da hidrólise com adição de lignosulfonato em diferentes concentrações. (a) concentrações de 0, 0,1 e 0,5% de LS, para 10 FPU/g; (b) concentrações de 0, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0% de LS para 20 FPU/g. As letras a e b foram utilizadas para comparar os valores obtidos, utilizando-se letras iguais para indicar resultados sem diferença significativa, considerando-se um intervalo de confiança de 95% ( $p > 0.05$ ).



Ainda assim, é verificado que ao utilizar 1,0% (m/m de biomassa) de lignosulfonato, há um aumento de 30,0% na conversão celulósica da hidrólise enzimática, corroborando o

efeito tensoativo esperado do lignosulfonato no processo. Pode-se inferir que o lignosulfonato foi responsável por promover estabilidade conformacional, por estabilizar as forças eletrostáticas de repulsão entre a enzima e a lignina, ao ocupar os sítios de interação da lignina da biomassa, além de minimizar efeitos adversos dos inibidores advindos da hemicelulose e lignina (ZHOU et al., 2013).

Acima de 1,0 g/L, a contribuição é inferior, aumentando apenas cerca de 11,0% a conversão. Entretanto, estatisticamente, não há diferença significativa entre os ensaios (3,0, 5,0 e 10,0% de lignosulfonato), apresentando uma certa estabilidade de efeito sobre a redução da adsorção não-produtiva da lignina na celulase, como encontrado no estudo realizado por Lou et al. (2014), além de não apresentar diferença quando comparado aos testes realizados sem a presença do LS no meio. Como estudado por Lou et al. (2018), sugere-se um estudo acerca da influência do lignosulfonato variando as condições de processo, como pH e agitação.

---

# **CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES**

---

## 6 Conclusões

*Neste capítulo, são descritas as principais considerações após os resultados obtidos e discussões desenvolvidas ao longo deste estudo.*

No presente trabalho, foi estudada a influência da carga de sólidos e da carga enzimática na hidrólise de biomassas advindas de dois pré-tratamentos diferentes: com hidróxido de sódio 2,0% (m/v) (ensaio HS) e combinado (explosão a vapor a 210°C, 10 minutos e 20 bar, seguido do tratamento com hidróxido de sódio 2,0%) (ensaio EVHS). O primeiro, demonstrou uma remoção de lignina de 57,09%, enquanto o segundo, de 72,62%. Tal feito interferiu diretamente nos resultados da conversão de açúcares. Uma vez que uma alta quantidade de lignina retida na biomassa causa uma adsorção improdutiva da enzima, ao variar a carga enzimática dos ensaios não houve variação estatisticamente significativa no resultado do processo.

Também foi avaliada a produção de etanol, quando variada a carga de sólidos, carga enzimática e mudança de estratégia fermentativa (SSF e SSSF). Para a biomassa HS (alcalina), corroborando o estudo a cerca da liberação de açúcares na hidrólise, na fermentação, a produção de etanol também não é significativamente diferente ao variar as demais condições de ensaio, durante a SSF. Além disso, verificou-se que a estratégia fermentativa utilizada, neste caso, não interferiu de forma positiva nos resultados. Com o aumento da carga enzimática de 10 para 20 FPU/g, há uma diminuição considerável da quantidade de álcool produzida, em qualquer carga de sólidos utilizada. Com isso, pode-se inferir que a alta quantidade de lignina residual na biomassa reduz a atividade de enzima à medida em que sua quantidade é aumentada.

Por sua vez, para a biomassa combinada (EVHS) verificou-se que com o aumento de carga enzimática, a concentração de etanol produzida aumentou em todas as cargas enzimáticas, visto que houve uma maior remoção de lignina após o pré-tratamento combinado. Também foi demonstrado que ao mudar a estratégia fermentativa (de SSF para SSSF), é possível reduzir em torno de 25,0% da carga enzimática usada e, ainda assim, obter um aumento de quase 40,0% na concentração etanólica. Dessa forma, em ambos os casos, a fim de melhorar a viabilidade econômica do processo, é demonstrado que se pode trabalhar com uma menor quantidade de coquetel enzimático usado e, ainda assim, obter-se bons resultados.

Quanto à carga de sólidos, para ambas as biomassas, os efeitos negativos do aumento de concentração de sólidos se sobressaem aos positivos (maior quantidade de celulose à

disposição para ser convertida em glicose). A estratégia de batelada alimentada, adicionando uma parte da biomassa após 24 horas do início do processo, demonstrou ser uma boa alternativa frente a isso.

Por fim, referente à produção de lignosulfonato, tanto a partir da lignina extraída após o pré-tratamento HS como o EVHS, os ensaios de caracterização por FTIR demonstraram a eficiência da sulfometilação da lignina. Dessa forma, ao adicionar o lignosulfonato combinado (EVHS) na hidrólise enzimática da biomassa, advinda do mesmo processo (EVHS), foi confirmada a sua ação surfactante, responsável por promover uma estabilidade conformacional e estabilização das forças eletrostáticas de repulsão entre a enzima e a lignina, otimizando os resultados de obtenção de açúcares fermentescíveis em 30%, para uma concentração de lignosulfonato de 0,5 g/L (ou 1,0% m/m de biomassa).

Sugere-se para estudos posteriores, avaliar a influência da agitação e do pH na ação do lignosulfonato na hidrólise enzimática, bem como sua atuação na fermentação. Além disso, é possível estudar o uso do LS em outras aplicações, como na ativação de lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas.

## 7 Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E.; DEEPA, B.; POTHEN, L. A.; CINTIL, J.; THOMAS, S.; JOHN, M. J.; ANANDJIWALA, R.; NARINE, S. S. Environmental friendly method for the extraction of coir fibre and isolation of nanofibre. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 1477-1483, 2013.

ALVES, R. C. Influência da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar na solubilização da hemicelulose em meio ácido e alcalino e produção de açúcares fermentecíveis. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 56p, 2018.

ALWADANI, N.; FATEHI, P. Synthetic and lignin-based surfactants: Challenges and opportunities. *Carbon Resources Conversion*, v. 1, p. 126-138, 2018.

ANDRADE, R. R. Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

ARAGÃO, W. M. Coco: pós colheita. Série frutas do Brasil. Brasília: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002.

ARAÚJO, B. M. C. Avaliação da influência de polietilenoglicol (PEG) na hidrólise enzimática de fibra de coco verde pré-tratada com ácido fosfórico. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 61p., 2021.

ARAÚJO, C. K. Avaliação da influência de surfactantes químico e biológico na hidrólise enzimática de casca de coco verde após pré-tratamento ácido/alcalino e com peróxido de hidrogênio alcalino. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 81p., 2016.

ARAÚJO DE ALMEIDA, M.; COLOMBO, R. Construction of green roofs via using the substrates made from humus and green coconut fiber or sugarcane bagasse. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 22, 100477, 2021.

ARO, T.; FATEHI, P. Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. *ChemSusChem*, v. 10, n. 9, p. 1861–1877, 2017.

ASINA, F. N. U.; BRZONOVA, I.; KOZLIAK, E.; KUBÁTOVÁ, A.; JI, Y. Microbial treatment of industrial lignin: Successes, problems and challenges. *Renewable and Sustainable Reviews*, v. 77, p. 1179-1206, 2017.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BHATIA, P.; FUJIWARA, M.; BAN, S.; TODA, T. Effect of steam explosion pre-treatment on methane generation from *Ludwigia grandiflora*. *Biomass and Bioenergy*, v. 142, 105771, 2020.

BEIG, B.; RIAZ, M.; NAQVI, S. R.; HASSAN, M.; ZHENG, Z.; KARIMI, K.; PUGAZHENDHI, A.; ATABANI, A. E.; CHI, N. T. L. Current challenges and innovative developments in pretreatment of lignocellulosic residues for biofuel production: A review. *Fuel*, v. 287, 119670, 2021.

BEZERRA, P. K. S. B.; ARAÚJO, B. M. C.; SILVA, O. L.; DE AZEVEDO, B.; MATIAS, S. C. B.; DOS SANTOS, E. S. 381INFLUENCE OF NICKEL ON BUTANOL PRODUCTION BY *Clostridium beijerinckii* USING HYDROLYZATE FROM GREEN COCONUT SHELL. *Revista Engenharia na Agricultura*, v. 29, p. 381-388, 2021.

BIAN, H.; CHEN, L.; DONG, M.; FU, Y.; WANG, R.; ZHOU, X.; WANG, X.; XU, J.; DAI, H.; Cleaner production of lignocellulosic nanofibrils: Potencial of mixed enzymatic treatment. *Journal of Cleaner Production*, v. 270, 122506, 2020.

BOZIO, D. M. Perspectivas das energias renováveis e não renováveis nas matrizes energéticas e elétricas. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão Ambiental em Municípios) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O.; DA SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, v. 51, p. 75-85, 2013.

CARVALHO, N. R. Análise termogravimétrica da biomassa e seus compostos (celulose, hemicelulose e lignina). Dissertação (Mestrado em em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba, pp. 63, 2022.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*. v. 43, n. 12, p. 1462-1466, 2008.

CHEN, H.; LIU, Z. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading. *Engineering in Life Sciences*, v. 17, n. 5, p. 489,499, 2017.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for production energy and chemicals. *Energy Conversion and Manegement*, v. 51, p. 1412-1421, 2010.

CORDEIRO, M. A. Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (*Euterpe oleraceae Mart*) para produção de etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 102p., 2016.

CORRADINI, E.; ROSA, M. DE F.; MACEDO, B. P.; PALADIN, P. D.; MATTOSO, L. H. C. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. *Revista Brasileira Fruticultura*, v. 21, n. 3, 2009.

DA COSTA FILHO, J. D. B. Valorização de sabugo de milho: potencial para produção de etanol de segunda geração e uso de lignina residual da hidrólise enzimática como adsorvente de corante catiônico. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 110p., 2021.

DAUD, N. M. A. N.; JAAFAR, W. M. K. W.; ISMAIL, N.; JUNIN, R.; MANAN, M. A.; IDRIS, A. K. Utilizing lignosulfonate from coconut husk as sacrificial agent to reduce

surfactant adsorption. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 765, 169103, 2021.

DEIVAYANAI, V. C.; YAASHIKAA, P. R.; KUMAR, P. S.; RANGASAMY, G. A comprehensive review on the biological conversion of lignocellulosic biomass into hydrogen: Pretreatment strategy, technology advances and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 265, 128166, 2022.

DELMIRO, T. M. Potencial da *Monoraphidium sp.* produzida em cultivos outdoor para obtenção de biocombustíveis de terceira geração. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 86p., 2020.

DE OLIVEIRA, F. Lignosulfonato de sódio como agente de modificação da superfície de fibras lignocelulósicas e da formulação de termorrígido fenólico. Dissertação (Mestrado em Ciências - Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 137p., 2010a.

DE OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Dissertação (Mestrado em Biologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 101p., 2010b.

DEVI, A.; SINGH, A.; BAJAR, S.; PANT, D.; DIN, Z. U. Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, 105798, 2021.

DÍEZ, D.; URUEÑA, A.; PIÑERO, R.; BARRIO, A.; TAMMINEN, T. Determination of Hemicellulose, Cellulose, and Lignin Content in Different Types of Biomasses by Thermogravimetric Analysis and Pseudocomponent Kinetic Model (TGA-PKM Method), *Processes*, v. 8, p. 1048, 2020.

DZIURZYNSKI, A.; SUPINSKI, J.; SURMINSKI, J. Studies on chemical composition of wood on the basis of infrared spectroscopy: I. Relation between Wood Chemical Composition and Absorbance of Individual Bands of the IR Spectrum within the Range 700 – 1900 cm<sup>-1</sup>. *Folia Forestalia Polonica*, v. 18, 1988.

EMBRAPA AGROENERGIA. Biorrefinarias. 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48750/1/biorrefinaria-modificado-web.pdf>>; Acesso em: 25 Out. 2022.

EMBRAPA. Produção e Comercialização de Coco no Brasil Frente ao Comércio Internacional: Panorama 2014. 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122994/1/Producao-e-comercializacao-Doc-184.pdf>>; Acesso em 22 Out. 2022.

ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant in effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 3, p. 353-364, 2002.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 79p., 2008.

FENDLER, J. H. Membrane mimetic chemistry. New York: John Wiley, 1992.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FESTUCCI-BUSSELI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structures and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, v. 19, p. 1-13, 2007.

FOOD-SECURITY-INFORMATION-NETWORK. Global Report on Food Crises 2020. United Nations World Food Programme, 2020.

FREDHEIM, G. E.; BRAATEN, S. M.; CHRISTENSEN, B. E. Comparison of molecular weight and molecular weight distributions of softwood and hardwood lignosulfonates. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 23, n. 2, p. 197-215, 2003.

GHAVIDEL, N.; KONDURI, M. K. R.; FATEHI, P. Chemical reactivity and sulfo-functionalization response of enzymatically produced lignin. *Industrial Crops and Products*, v. 172, 113950, 2021.

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.

GOMES, F. P.; PRADO, C. H. Ecophysiology of coconut palm under water stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 19, n. 4, p. 377-391, 2007.

GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; DOS SANTOS, E. S.; TEIXEIRA, J. A.; DE MACEDO, G. R. Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fiber mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*, v. 94, p. 353-365, 2016.

GU, Y.; GUO, J.; NAWAZ, A.; UL HAQ, I.; ZHOU, X.; XU, Y. Comprehensive investigation of multiple factors in sulfuric acid pretreatment on the enzymatic hydrolysis of waste straw cellulose. *Bioresource Technology*, v. 340, 125740, 2021.

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J.-F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K.S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.

GUNDUPALLI, M. P.; BHATTACHARYYA, D. Sequential acid hydrolysis and enzymatic saccharification of coconut coir for recovering reducing sugar: Process evaluation and optimization. *Bioresource Technology Reports*, v. 6, p. 70–80, 2019.

GUSAKOV, A. V.; SAHOVIKM, T. N.; ANTONOV, A. I.; USTINOV, B. B.; OKUNEV, O. N.; BURLINGAME, R. M.; BAEZ, M.; SINITSYNI, A. P. Design of highly efficient cellulase

mistures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 97. p. 1028-1038, 2007.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; JEPPSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels: advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin: Springer, 2007.

HASSAN, M. BERGLUND, L.; HASSAN, E.; ABOU-ZEID, R.; OKSMAN, K. Effect of xylanase pretreatment of rice straw unbleached soda and neutral sulfite pulps on isolation of nanofibers and their properties. *Cellulose*, v. 25, p. 2939-2953, 2018.

HEINZ, O. L. Produção integrada de monossacarídeos e lignosulfonatos a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 94p., 2022.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 10-18, 2009.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. 2 ed. England: John Wiley, 2002.

HORN, S. F.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WSTERENG, B.; EIJSINK, V. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2012.

IOELOVICH, M.; MORAG, E. High-solids hydrolysis. *BioResources*, v. 7, n. 4, p. 4672-4682, 2012.

JAKAB, E.; FAIX, O.; TILL, F.; SZEKELY, T. The effect of cations on the thermal-decomposition of lignins. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 25, p. 185-194, 1993.

KAZZAZ, A. E.; FEIZI, Z. H.; FATEHI, P. Grafting strategies for hydroxyl groups of lignin for producing materials. *Green Chemistry*, v. 21, 5714, 2019.

KOSKELA, S.; WANG, S.; XU, D.; YANG, X.; LI, K.; BERGLUND, L. A.; MCKEE, L. S.; BULONE, V.; ZHOU, Q. Lytic polysaccharide monooxygenase (LMPO) mediated production

of ultra-fine cellulose nanofibers from delignified softwood fibers. *Green Chemistry*, v. 21, 2019.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 57, p. 45-125, 1997.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, B., VERMA, P. Biomass-based biorefineries: An important archetype towards a circular economy. *Fuel*, v. 288, 119622, 2021.

KURIAN, J. K.; GARIÉPY, Y.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. G. S. Microwave-assisted lime treatment and recovery of lignin from hydrothermally treated sweet sorghum bagasse. *Biofuels*, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2015.

LEE, C. L.; CHIN, K. L.; H'NG, P. S.; RASHID, U.; MAMINSKI, M.; KHOO, P. S. Effect of pretreatment conditions on the chemical–structural characteristics of coconut and palm kernel shell: A potentially valuable precursor for eco-efficient activated carbon production. *Environmental Technology & Innovation*, v. 21, p. 101309, 2021.

LI, F.; ZHAO, Y.; XUE, L.; MA, F.; DAI, S. Y.; XIE, S. Microbial lignin valorization through depolymerization to aromatics conversion. *Trends in Biotechnology*, v. 40, n.12, p. 1469-1487, 2022.

LI, Z.; GE, Y. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and its modification into a high performance dispersant for pesticide formulations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 10, p. 1866–1871, 2011.

LIU, Q.; DENG, Y.; TANG, J.; CHEN, D.; LI, X.; LIN, Q.; YIN, G.; ZHANG, M.; HU, H. Potassium lignosulfonate as a washing agent for remediating lead and copper co-contaminated soils. *Science of The Total Environment*, v. 658, p. 836–842, 2019.

LIU, Z.; LI, B.; YUAN, J. S.; YUAN, Y. Creative biological lignin conversion routes towards lignin valorization. *Trends in Biotechnology*, v. 40, n. 12, p. 1550-1566, 2022.

- LORENZI, B. R.; DE ANDRADE, T. H. N. O etanol de segunda geração no Brasil: políticas e redes sociotécnicas. *Revista Brasileira De Ciências Sociais*, v. 34, n. 100, 2019.
- LORQUIN, F.; LORQUIN, J.; CLAEYS-BRUNO, M.; ROLLET, M.; ROBIN, M.; GIORGIO, C. D.; PICCERELLE, P. Lignosulfonate is an efficient SPF booster: application to eco-friendly sunscreen formulations. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 24, 100539, 2021.
- LOU, H.; WANG, M.; LAI, H.; LIN, X.; ZHOU, M.; YANG, D.; QIU, X. Reducing non-productive adsorption of cellulose and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. *Bioresource Technology*, v. 146, p. 478-484, 2013.
- LOU, H.; YUAN, L.; QIU, X.; QIU, K.; FU, J.; PANG, Y.; HUANG, J. Enhancing enzymatic hydrolysis of xylan by adding sodium lignosulfonate and long-chain fatty alcohols. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 48–54, 2016.
- LOU, H.; ZENG, M.; HU, Q.; CAI, C.; LIN, X.; QIU, X.; PANG, Y. Nonionic surfactants enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by reducing cellulase deactivation caused by shear force and air-liquid interface. *Bioresource Technology*, v. 249, p. 1–8, 2018.
- LOU, H.; ZHOU, H.; LI, X.; WANG, M.; ZHU, J. Y.; XUEQING, Q. Understanding the effects of lignosulfonate on enzymatic saccharification of pure cellulose. *Cellulose*, v. 21, n. 3, p. 1351-1359, 2014.
- MA, X.; YUE, G.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. Enzymatic Hydrolysis of Cassava Bagasse with High Solid Loading. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, v. 5, n. 2, p. 275-281, 2011.
- MANCERA, A.; FIERRO, V.; PIZZI, A.; DUMARÇAY, S.; GERARDIN, P.; VELÁSQUEZ, J.; QUINTANA, G.; CELZARD, A. Physicochemical characterisation of sugar cane bagasse lignin oxidized by hydrogen peroxide. *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, p. 470–476, 2010.
- MARIANO, A. P. B.; UNPAPROM, Y.; RAMARAJ, R. Hydrothermal pretreatment and acid hydrolysis of coconut pulp residue for fermentable sugar production. *Food and Bioproducts Processing*, v. 122, p. 31-40, 2020.

MARTINS, R. P. Extração de hemicelulose e açúcares fermentáveis do bagaço, colmo e folha do sorgo sacarino. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2020.

MEDEIROS, J.; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 5, p. 796-802, 2010.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; VALENTE, M. S.; SOUSA, L. C.; BONOMI, A. M. F. L. J.; JESUS, C. D. F.; WATANABE, M. D. B.; CHAGAS, M. F.; REZENDE, M. C. A. F.; CAVALETT, O.; JUNQUEIRA, T. L.; GOUVÊIA, V. L. R. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria de cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 41, p. 237-294, 2015.

MIOLA, B.; FROTA, M. M.; OLIVEIRA, A. G.; UCHÔA, K. M.; FILHO, F. A. Aproveitamento energético dos resíduos de cascas de coco verde para produção de briquetes. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.25, n.4, p. 627-634, 2020.

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.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volumen and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 113-119, 1998.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, MR., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOURA NETO, L. G., SILVA, B. A., DA COSTA, J. P., DO NASCIMENTO, A. D. P., SOARES, D. J. Avaliação da qualidade físico-química, microbiológica e aceitação sensorial

das águas de coco refrigeradas produzidas no Sertão do Pajeú – Pernambuco. *Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB*, João Pessoa, n. 40, p. 54-62, 2018.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Cellulose*, v. 15, p. 711-721, 2008.

NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 179, p. 28-41, 2018.

NAIK, S., GOUD, V. V., ROUT, P. K., JACOBSON, K., DALAI, A. K. Characterization of Canadian biomass for alternative renewable biofuel. *Renewable Energy*. v. 35, p. 1624-1631, 2010.

NISHIMURA, H.; KAMIYA, A.; NAGATA, T.; KATAHIRA, M.; WATANABE, T. Direct evidence for  $\alpha$  ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

NOGUEIRA, C. C. Avaliação do uso de tensoativos nos pré-tratamentos ácido e alcalino diluídos da casca do coco verde e quantificação de água na pós-lavagem. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 97p., 2017.

NOGUEIRA, C. C.; PADILHA, C. E. A.; DE JESUS, A. A.; SOUZA, D. F. S.; DE ASSIS, C. F.; DE SOUSA JUNIOR, F. C.; DOS SANTOS, E. S. Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. *Industrial Crops and Products*, v. 130, p. 259–266, 2019.

NOGUEIRA, C. C., PADILHA, C.E.A., LEITÃO, A.L.S., ROCHA, P.M., MACEDO, G.R., SANTOS, E.S. Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber-Pretreatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. *Industrial crops and products*, v. 112, p. 734-740, 2018.

NOGUEIRA, C. C. Produção de etanol celulósico sob elevadas concentrações de polímeros à base de óxido de etileno. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 302p., 2021.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 109p., 2013.

PADILHA, C. E. A.; NOGUEIRA, C. C.; ALENCAR, B. R. A.; DE ABREU, I. B. S.; DUTRA, E. D.; RUIZ, J. A. C.; SOUZA, D. F. S.; DOS SANTOS, E. S. Production and application of lignin-based chemicals and materials in the cellulosic ethanol production: An overview on lignin closed-loop biorefinery approaches. *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, p. 6309–6337, 2021.

PADILHA, C. E. A.; NOGUEIRA, C. C.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; DE SOUSA JÚNIOR, F. C.; DE ASSIS, C. F.; SOUZA, D. F. S.; DE OLIVEIRA, J. A. DOS SANTOS, E. S. Fractionation of green coconut fiber using sequential hydrothermal/alkaline pretreatments and Amberlite XAD-7HP resin. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, n. 6, 103474, 2019.

PADILHA, C. E. A.; NOGUEIRA, C. C.; MATIAS, S. C. B.; DA COSTA FILHO, J. D. B.; SOUZA, D. F. S.; DE OLIVEIRA, J. A.; DOS SANTOS, E. S. Fabrication of hollow polymer microcapsules and removal of emulsified oil from aqueous environment using soda lignin nanoparticles. *Colloids and Surfaces*, v. 603, 125260, 2020.

PANAMGAMA, L. A.; PERAMUNE, P. R. U. S. K. Coconut coir pith lignin: A physicochemical and thermal characterization. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, v. 113, p. 1149-1157, 2018.

PENHA, E. M.; CABRAL, L. M.; DA MATTA, V. M.; Água de Coco. In: VENTURINI FILHO, W. G. (coord.). Bebidas não-alcoólicas: ciência e tecnologia. São Paulo: Blucher. v. 2, cap. 1, p. 1-9, 2018.

PERKINS, W. S. Surfactants: a primer. An in-depth discussion of the behavior of common types of surfactants, in: *Dyeing, Printing and Finishing*, ATI-Atlanta, p. 51–54, 1998.

PITARELO, A. P. Avaliação da suscetibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, departamento de Química, Curitiba/PR, 142 p., 2007.

POSTAWA, K.; FAŁTYNOWICZ, H.; SZCZYGIEŁ J.; BERAN, E.; KUŁAŻYŃSKI, M. Analyzing the kinetics of waste plant biomass pyrolysis via thermogravimetry modeling and semi-statistical methods, *Bioresource Technology*, v. 344, Part B, 126181, 2022.

RABELO, S. C.; PRADELLA, J. G. C.; IENCZAK, J. L. Produção de etanol de segunda geração. In: ALTERTHUM, F.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; MORAES, I. Processos Fermentativos e Enzimáticos, Coleção Biotecnologia Industrial, v. 3, 2ª Edição, São Paulo: Blucher, p. 107-150, 2019.

RIBEIRO, V. T.; CAMPOLINA, A. C.; DA COSTA, W. A.; PADILHA, C. E. A.; FILHO, J. D. B. C.; LEITÃO, A. L. O. S.; ROCHA, J. C.; DOS SANTOS, E. S. Ethanol production from green coconut fiber using a sequential steam explosion and alkaline pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03100-0>

RODRIGUES, J. S.; CARMO, K. P.; FREITAS, R. R. M. ; SILVA, J. O.; LIMA, V.; BOTARO, V. R. Isolamento e caracterização de lignina acetossolve extraída do bagaço de cana-de-açúcar, avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais, *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 4, p. 867-877, 2020.

ROSA, M. de F.; ABREU, F. A. P. de; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. de V. Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, v. 61, 3f., 2001.

ROSA, M. F.; SANTOS, F. J. S.; MONTENEGRO, A. A. T.; DE ABREU, F. A. P.; CORREIA, D.; DE ARAUJO, F. B. S.; NORÕES, E. R. V. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 54, p. 1-6, 2011.

RUWOLDT, J.; PLANQUE, J.; ØYE, G. Lignosulfonate Salt Tolerance and the Effect on Emulsion Stability. *ACS Omega*, v. 25, n. 5, p. 15007–15015, 2020.

SADDLER, J.; KUMAR, L. Special Issue from the NSERC Bioconversion network workshop: pretreatment and fractionation of biomass for biorefinery/biofuels. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 17, 2013.

- SAINI, J. K.; HIMANSHU; HEMANSI; KAUR, A.; MATHUR, A. Strategies to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for biorefinery applications: A review. *Bioresource Technology*, v. 360, 127517, 2022.
- SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, v. 5, 337-353, 2015.
- SANTOS, F.; CURVELO, A. A. S. Utilização de ligninas em resinas fenólicas. 1. Preparação de novolacas a partir de lignossulfonatos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 9, n. 1, p. 49-58, 1999.
- SARKER, T. R.; PATTNAIK, F.; NANDA, S.; DALAI, A. K.; MEDA, V.; NAIK, S. Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*, v. 284, 131372, 2021.
- SCHMIDT, A.; SANGOI, S.; ALBUQUERQUE, W.; DE LIMA, G. J. M. M. Determinação do poder aglutinante do lignossulfonato sobre a peletização. EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico, 368, 3p., 2004.
- SETHUPATHY, S.; MORALES, G. M.; GAO, L.; WANG, H.; YANG, B.; JIANG, J.; SUN, J.; ZHU, D. Lignin valorization: status, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, v. 347, 126696, 2022.
- SHEN, Q.; ZHANG, T.; ZHU, M. A comparison of the surface properties of lignin and sulfonated lignins by FTIR spectroscopy and wicking technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 320, p. 57-60, 2008.
- SILVERSTEIN, R. A., CHEN, Y., SHARMA-SHIVAPPA, R. R., BOYETTE, M. D., OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 16, p. 3000-3011, 2007.
- SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; BINOD, P.; JANU, K.U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDLEY, A. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresources Technology*, v. 102, p. 10915-10921, 2011.

SINGH, R., SHUKLA, A., TIWARI, S., SRIVASTAVA, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32(C), p. 713-728, 2014.

SLUITER, A., RUIZ, A., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005 - 42619.pdf. Technical Report NREL/TP-510-42619, 2008.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of ash in bio-mass. In: Laboratory analytical procedure. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 8p., 2005a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. In: Laboratory analytical procedure. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 12 p., 2005b.

SOUZA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. Cradle-to-grave' assessment of existing lignocelluloses pretreatment Technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 339-347, 2009.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, F. F.; HONG, J.; HU, J.; SADDLER, J. N.; FANG, X.; ZHANG, Z.; SHEN, S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 79, p. 42-48, 2015.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Fermentation inhibitors in ethanol process and different strategies to reduce their effects. In: PANDEY, A. et al (eds.). *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Process*. Waltham: Academic Press, 2011, p. 287-311.

TAN, K. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: the case of second generation bioethanol. *Energy Policy*, v. 36, n. 9, p. 3360-3365, 2008.

TANPICHAI, S.; WITAYAKRAN, S.; BOONMAHITTHISUD, A. Study on structural and thermal properties of cellulose microfibrils isolated from pineapple leaves using steam explosion. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 7, 102836, 2019.

TAYLOR, M. J.; ALABDRABALAMEER, H. A.; SKOULOU, V. Choosing physical, physicochemical and chemical methods of pre-treating lignocellulosic wastes to repurpose into solid fuels. *Sustainability*, v. 11, n. 13, p. 3604, 2019.

THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. An acidic thermostable carboxymethyl cellulose from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein expression and Purification*, v. 60, p. 140-146, 2008.

TU, C.; LUO, W.; PENG, Y.; YU, P.; SHI, C.; WU, Z.; SHAO, L.; ZHAN, P. Preparation of lignin-based carbon nanotubes using micelles as soft template. *Industrial Crops and Products*, v. 191 (B), 116009, 2023.

VAN ZYL, W. H.; LYND, L. R.; HAAN, R.; MCBRIDE, J. E. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. In: Olsson L. (eds) *Biofuels. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 108, p. 205-235, 2007.

WYLEN, G.J.V; SONNTAG R.E. *Fundamentals of Classical Thermodynamics*. 3 rd. ed. New York: John Wiley, 1985.

WYMAN, C. *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Washington: Taylor and Francis, 1996.

WU, Z.; PENG, K. ZHANG, Y.; WANG, M.; YONG, C.; CHEN, L.; QU, P.; HUANG, H.; SUN, E.; PAN, M. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review. *Materials Today Bio*, v. 16, 100445, 2022.

XU, C.; FERDOSIAN, F. Utilization of lignosulfonate as dispersants or surfactants, in: XU, C.; FERDOSIAN, F. (Eds.), *Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 81–90, 2017.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 2, p. 26-40, 2008.

YANG, J.; JIANG, J.; ZHANG, N.; MIAO, C.; WEI, M.; ZHAO, J. Enhanced enzyme saccharification of Sawtooth Oak shell using dilute alkali pretreatment. *Fuel*, v. 139, p. 102-106, 2014.

YING, W., YANG, J.; ZHANG, J. In-situ modification of lignin in alkaline-pretreated sugarcane bagasse by sulfomethylation and carboxymethylation to improve the enzymatic hydrolysis efficiency. *Industrial Crops and Products*, v. 182, 114863, 2022.

ZHENG, W., LAN, T., LI, H., YUE, G., ZHOU, H. Exploring why sodium lignosulfonate influenced enzymatic hydrolysis efficiency of cellulose from the perspective of substrate–enzyme adsorption. *Biotechnology for Biofuels*, v. 13, 19, 2020.

ZHENG, P.; XIANG, L.; CHANG, J.; LIN, Q.; XIE, L.; LAN, T.; LIU, J.; GONG, Z.; TANG, T.; SHUAI, L.; LUO, X.; CHEN, N.; ZENG, H. Nanomechanics of Lignin–Cellulase Interactions in Aqueous Solutions. *Biomacromolecules*, v. 22, p. 2033-2042, 2021.

ZHOU, H., LOU, H., YANG, D., ZHU, J.Y., QIU, X. Lignosulfonate to enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses: role of molecular weight and substrate lignin. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52, v. 25, p. 8464–8470, 2013.