



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ANA CLAUDIA MATOS DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DA CASCA DO COCO
VISANDO O AUMENTO DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

***ORGANOSOLV PRE-TREATMENT OF COCNUT SHELL AIMING
TO INCREASE ENZYMATIC SACARIFICATION***



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

ANA CLAUDIA MATOS DA SILVA

**PRÉ-TRATAMENTO ORGANOSOLV DA CASCA DO COCO
VISANDO O AUMENTO DA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC II) apresentado ao Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciane Pimenta Cruz Romão

Coorientador: Dr^a. Joselaine Carvalho Santana

SÃO CRISTOVAO – SE

Junho, 2022

RESUMO

As biomassas lignocelulósicas, como a casca do coco verde, são formadas por uma estrutura complexa de polímeros lignina, hemicelulose e celulose que atribui resistência e baixa reatividade, impossibilitando a produção de etanol celulósico (combustível de segunda geração). Diante desse cenário, esse trabalho teve como objetivo contribuir para pesquisas que visam à produção de bioetanol acessível e sustentável, através do aperfeiçoamento do processo de pré-tratamento organosolv, com glicerol e FeCl_3 a 220 °C, para desagregar a estrutura da casca de coco, reduzindo a recalcitrância. A hidrólise enzimática promoveu a quebra da celulose em seus monômeros (açúcares redutores), utilizando a enzima Cellic Ctec3, que foram quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A lignina foi recuperada do licor da reação de pré-tratamento utilizando uma centrífuga e levada para secagem a 55 °C por 24h. O pré-tratamento mostrou-se eficiente, pois as concentrações de açúcares nos hidrolisados para os tamanhos de partícula estudados foram: $4,71 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$ (<0,85mm); $6,88 \pm 0,64 \text{ g.L}^{-1}$ (0,85 - 2,0mm); $5,35 \pm 0,23 \text{ g.L}^{-1}$ (>2,0mm), destacando-se o tamanho de partícula médio. O hidrolisado da biomassa *in natura* apresentou apenas $1,73 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares redutores totais. Através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) determinou-se que a maior concentração de hidroximetilfurfural (HMF) nos hidrolisados foi de $0,0023 \pm 0,0000 \text{ g.L}^{-1}$ e furfural $0,0004 \pm 0,0001 \text{ g.L}^{-1}$, não tendo capacidade inibitória no processo fermentativo, devido à baixa concentração, pois estão abaixo dos limites determinados pela literatura, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ para o HMF e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ para o furfural. Assim, a metodologia aplicada ao tratamento desse resíduo atribui valores tecnológicos, sociais e ambientais, contribuindo para geração de políticas públicas sustentáveis.

Palavras-chave: Sustentabilidade. Resíduos lignocelulósicos. Hidrólise enzimática. Tecnologia. Energia renovável.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	5
1.1	Pré-tratamento.....	9
1.1.1	Pré-tratamento organosolv	9
1.2	Hidrólise	10
1.2.1	Hidrólise enzimática.....	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	Coleta e preparo da biomassa e determinação do teor de umidade e cinzas	13
3.2	Reações de pré-tratamento	14
3.3	Determinação da atividade da enzima e teste de verificação da atividade enzimática.....	17
3.4	Preparo da solução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	18
3.5	Hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas e biomassa <i>in natura</i>	19
3.6	Determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS	20
3.7	Recuperação da lignina dos licores	21
3.8	Preparo de soluções padrão para determinação dos subprodutos HMF e furfural.....	21
3.9	Quantificação dos subprodutos HMF e furfural por HPLC.....	22
3.10	Reutilização do licor como solvente nas reações de pré-tratamento.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Preparo da biomassa e teor de umidade e cinzas	23
4.2	Reações de pré-tratamento	24
4.3	Recuperação da lignina dos licores	25
4.4	Determinação da atividade da enzima e teste de verificação da atividade enzimática.....	27
4.5	Hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas e biomassa <i>in natura</i> , e determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).....	28
4.6	Determinação de HMF e furfural por HPLC	31
4.7	Reutilização do licor como solvente nas reações de pré-tratamento.....	34
5	CONCLUSÕES.....	36
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO.....	37
7	REFERÊNCIAS	38

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus o criador do mundo, por me amar, cuidar e ser tão bom para mim. Por me dar força e sabedoria para trilhar a caminhada.

A minha mãe por toda educação, carinho, amor, cuidado e por sonhar os meus sonhos e ao meu pai João pelo carinho, amor e incentivo fundamentais no meu crescimento.

A minha família, em especial meus irmãos e cunhadas: Rafael e Katharina, por me ouvir, interceder e incentivar em todos os passos que tenho dado. A Jamisson e Naiara (*in memoriam*) por me ensinar a não desistir de lutar nas adversidades, isso me fez mais forte! As minhas irmãs Jéssica e Carol por torcer pelo meu sucesso. Aos meus sobrinhos: Rebeca, Miguel, Jonas, Mateus e Pedro por me ensinar que a vida é uma caixa de surpresa e devemos estar preparados para abri-la. Não posso esquecer o meu Pedro Henrique que me fez entender que todo propósito tem um processo, mesmo que sejam doloridos sempre trazem aprendizado e te farão alcançar sonhos!

Ao meu esposo Adriano pelo amor, carinho, companheirismo e incentivo. Ao meu filho Adryan, que é minha vida, a forma mais sincera de amor incondicional. Obrigado por estarem sempre comigo me mantendo de pé, pois é por vocês que eu não desisto.

Aos amigos do curso, em especial Gabrielle e Rafaella que caminharam lado a lado comigo me dando força e suporte nos momentos mais turbulentos. Aos amigos do Laboratório de Estudo da Matéria Orgânica Natural (LEMON) dentre eles, Daiane Requião e Rhayza por me ajudarem na jornada acadêmica.

A Universidade Federal de Sergipe e o LEMON por viabilizar o desenvolvimento desse projeto.

A minha orientadora Luciane por me receber, me ensinar a ser um profissional exemplar e contribuir ricamente para minha formação. Aos professores do departamento de química por me transmitir conhecimento. Por último, mas de extrema importância, agradeço a minha coorientadora Joselaine por me abrir as portas da pesquisa e compartilhar seu conhecimento e forma singular.

Só expresso gratidão por ter vocês comigo!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNS –	Ácido 3,5-dinitrosalicínico
HPLC –	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
NREL –	<i>National Renewable Energy Laboratory</i> (Laboratório Nacional de Energia Renovável)
FeCl ₃ .6H ₂ O –	Cloreto de ferro III hexahidratado
FPU –	Filter Paper Unit (Unidade de papel filtro)
AR –	Açúcares redutores
ACN –	Acetonitrila
H ₂ O –	Água
HMF –	Hidroximetilfurfural
FeCl ₃ –	Cloreto de ferro (III)
NaOH –	Hidróxido de sódio
H ₂ SO ₄ –	Ácido sulfúrico
H ₂ PO ₄ –	Ácido fosfórico
PVDF –	Fluoreto de poliviniletideno

1 INTRODUÇÃO

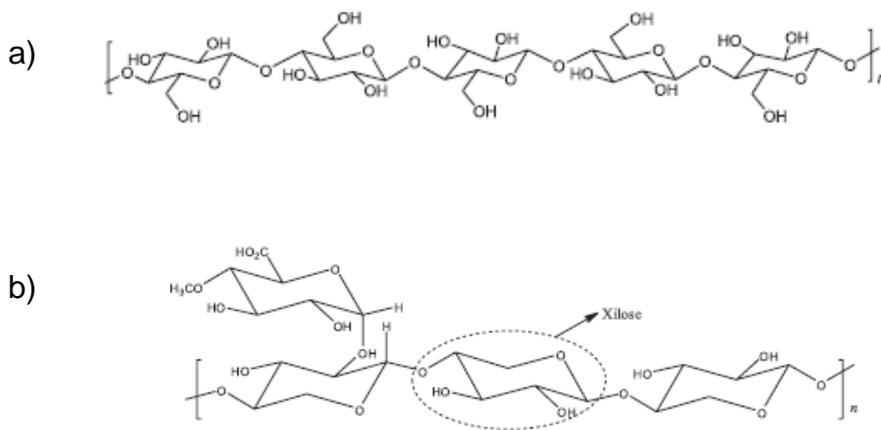
A produção de insumos alimentícios tem crescido em larga escala devido à alta demanda populacional, e gerando impactos ambientais, com enorme produção de resíduos agroindustriais que não tem uma correta disposição final. Esses resíduos, também chamados de biomassas, são provenientes de diversas fontes como, por exemplo, a cana de açúcar, a palha de milho e a casca de coco verde [1-3].

No Brasil, a água do coco verde é uma bebida bastante consumida, principalmente em regiões de clima tropical, como o estado de Sergipe, por ser uma fonte de vitaminas e minerais, além de ser refrescante e natural. Entretanto, o elevado consumo pode acarretar diversos problemas ambientais, uma vez que a decomposição da casca do coco dura cerca de 8 anos, e quando tem a disposição final de forma incorreta, ocasiona o acúmulo de água, fungos e bactérias, desencadeando contaminação do solo e a disseminação de doenças. Apesar da Política Nacional de Resíduos Sólidos, Lei Federal Nº 12.305 regulamentar a reciclagem, reaproveitamento e tratamento desses resíduos, não existe políticas públicas de conscientização e orientação do descarte que acaba ocorrendo em locais inapropriados como vias urbanas e lixões, após o consumo da água e da carne do coco, restando assim, grande parte de seu material (a casca do coco) correspondente a cerca de 80% [2, 4-9].

Assim, a casca do coco verde como um resíduo sólido abundante vem sendo mundialmente estudada, como todas as biomassas, com forte potencial para produzir materiais de alto valor e para produção de energia, como biocombustíveis, por conta de sua composição majoritária de polissacarídeos divididos em: 30-36% de lignina, 26-33% de celulose e 16-29% de hemicelulose, Figuras 1-2 [9-11]. A celulose possui estrutura cristalina e de difícil polimerização, formada por β -D-glicopirranose - moléculas repetidas de glicose unidas por ligações de hidrogênio intramoleculares; a hemicelulose é composta por carboidratos como a xilose e glicose, e ácidos como o glucurônico, que tem estrutura amorfa e curta que se une a celulose por meio de ligações de hidrogênio e a lignina por

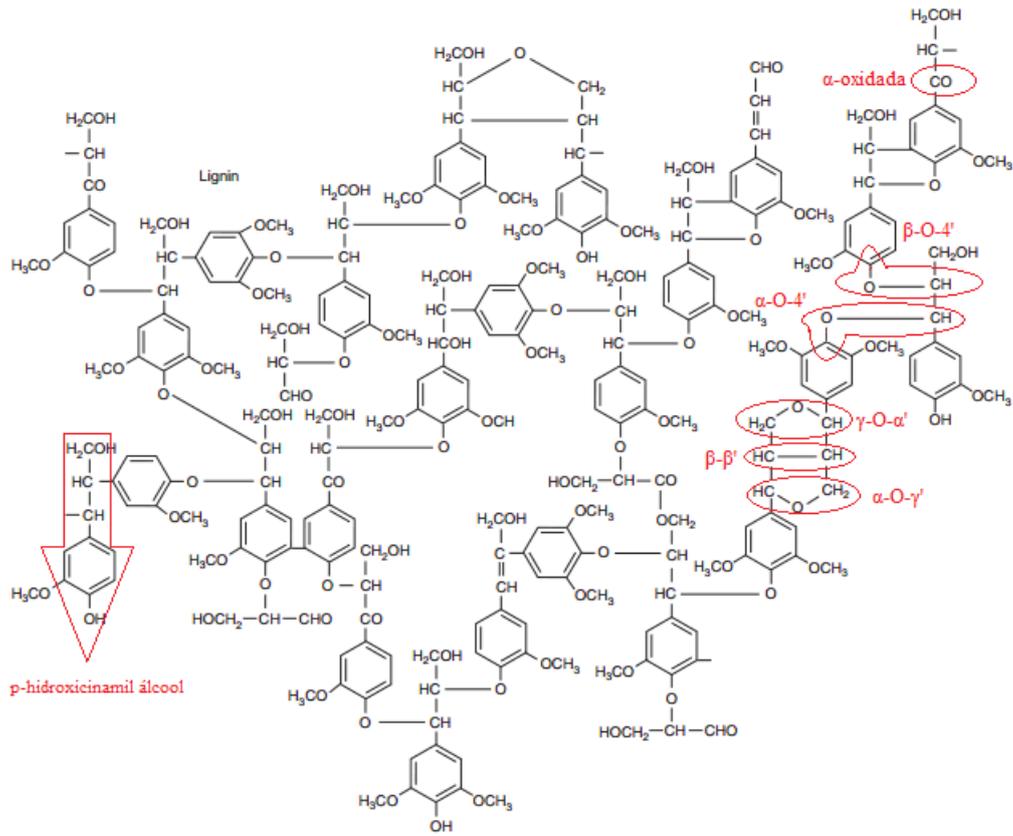
ligações covalentes, sendo mais suscetível à degradação que a celulose; e a lignina possui estrutura amorfa e rígida constituída de moléculas fenólicas responsáveis pela forte ligação entre a celulose e a hemicelulose [6, 12-17]. Nas biomassas lignocelulósicas esses polímeros formam um composto de estrutura complexa, resistente e de baixa reatividade, que inviabilizam a produção de etanol celulósico, ou etanol de segunda geração devido a sua recalcitrância, Figura 3 [10-12]. Assim, para produzir bioetanol a partir da casca de coco verde é necessário o uso de algumas etapas: o pré-tratamento, a hidrólise e a fermentação.

Figura 1: a) Estrutura da celulose; b) Estrutura da hemicelulose



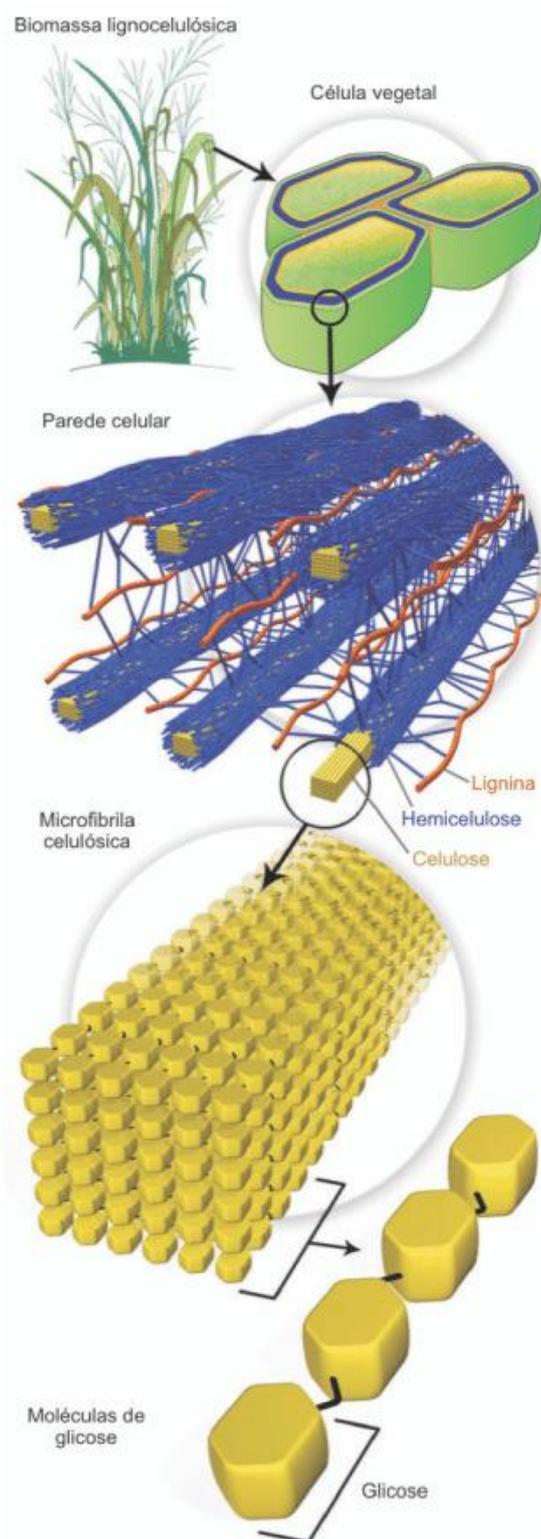
Fonte: Santos et. al. (2010) [14].

Figura 2: Estrutura da lignina.



Fonte: Silva (2017) [31].

Figura 3. Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Kondo; Polym (1997) [32].

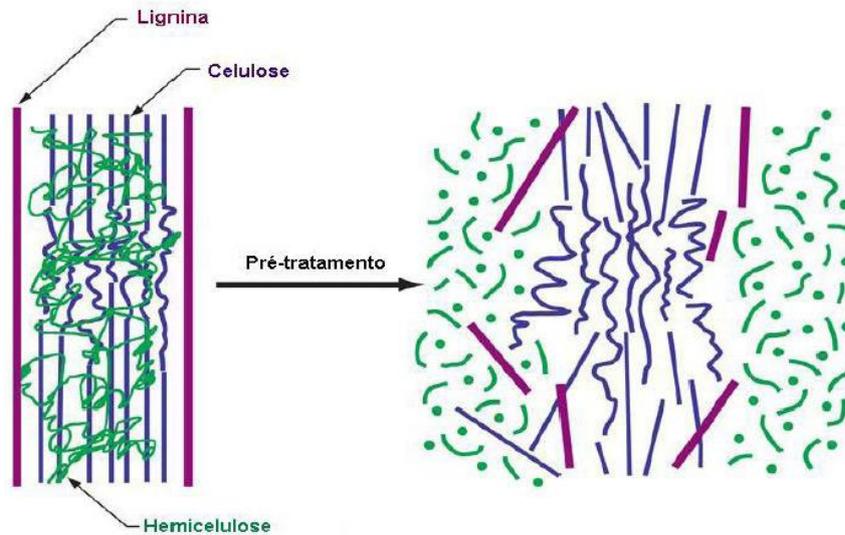
1.1 Pré-tratamento

A etapa mais importante do processo de produção do etanol celulósico é o pré-tratamento, pois está diretamente relacionado ao rendimento das etapas seguintes uma vez que, através dele busca-se que ocorra a separação da lignina e hemicelulose para a parte líquida da reação (o licor), e conservação da celulose na parte sólida, a biomassa pré-tratada, aumentando a área superficial e a digestibilidade das enzimas na etapa seguinte de hidrólise enzimática. Na literatura, existem diversos tipos de pré-tratamento: físicos; químicos; biológicos ou físicos químicos, que buscam desenvolver metodologias eficientes e ecologicamente corretas, através de processos que proporcionem redução energética e de custos com materiais e reagentes químicos, preservem a quantidade de celulose, e tenha alto rendimento de açúcares redutores liberados durante a hidrólise, entre outros [16, 18-26].

1.1.1 *Pré-tratamento organosolv*

O pré-tratamento organosolv é um processo químico comumente utilizado na indústria de papel e celulose porque gera bons rendimentos, é realizado sob alta temperatura e com uso de solvente orgânico [19, 20, 25]. Esse tratamento tem a função de quebrar a estrutura lignocelulósica, reduzindo a recalcitrância da biomassa através de solventes orgânicos, a exemplo do glicerol, um líquido viscoso, de baixo custo e baixa toxicidade. O glicerol tem capacidade de penetrar na biomassa rompendo as ligações de sua estrutura complexa, convertendo-a em moléculas pequenas com elevado grau de pureza, permite que o pré-tratamento seja realizado à pressão atmosférica devido a seu alto ponto de ebulição (290 °C), o que reduz o uso de equipamentos sofisticados e ainda gera economia de energia. Além disso, o pré-tratamento organosolv pode fazer uso de catalisadores, como o FeCl_3 que acelera o processo da reação, intensificando o efeito do glicerol sobre a biomassa na remoção da celulose e hemicelulose, Figura 4 [27-30, 43-45].

Figura 4. Representação estrutural da biomassa após pré-tratamento.



Fonte: Kondo; Polym (1997) [32].

1.2 Hidrólise

A etapa seguinte ao pré-tratamento é a hidrólise, que é responsável por converter a celulose e hemicelulose da biomassa pré-tratada a açúcares redutores utilizando ácidos, como o sulfúrico, ou enzimas, como a celulase. O uso de ácidos é uma técnica realizada através da protonação do oxigênio glicosídico, entretanto, é limitada por causa do efeito corrosivo que danifica os equipamentos, e pode ocorrer a degradação excessiva da celulose formando subprodutos inibidores de fermentação [28, 33-35].

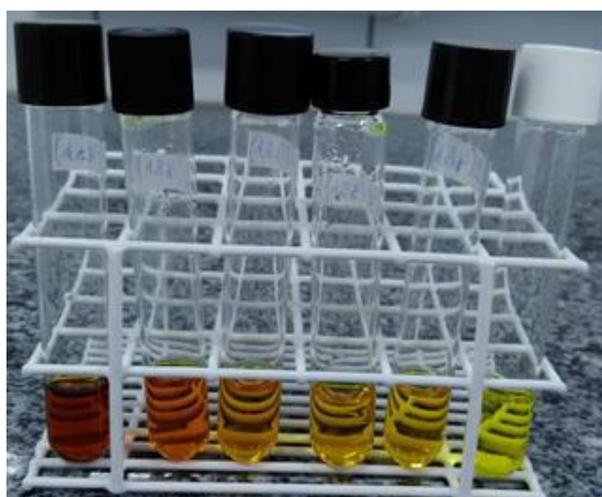
1.2.1 Hidrólise enzimática

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores em processos químicos, como a hidrólise, por conta da sua ação em pontos específicos da biomassa. Apesar do alto custo das enzimas e do tempo de reação, torna-se uma técnica vantajosa visto que, hidrolisa a celulose sem degradar, não é corrosiva, ocorre sob condições brandas de pH e em baixas temperaturas,

gerando altos rendimentos e baixas concentrações de subprodutos, como o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural [9, 28, 33, 34, 36-39].

A quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise pode ser estimada através do método do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), um reagente oxidante de coloração amarela que reage com os açúcares produzindo alteração de cor nas reações (avermelhado). A quantificação ocorre por meio da medida colorimétrica em comprimento de onda de 540 nm. A coloração da amostra varia com a quantidade de açúcar presente, ou seja, quanto maior a concentração de açúcar mais intensa a sua coloração (Figura 5) [40-42].

Figura 5. Variação da cor, na reação do método DNS, decorrente do aumento na quantidade de açúcar.



Quantidade de açúcar crescente

Fonte: Acervo do autor

Essa quantificação é indispensável, pois através dela pode-se mensurar o volume de etanol que pode ser obtido durante a última etapa do processo, a fermentação, onde os açúcares liberados são convertidos em bioetanol por meio de microorganismos e leveduras. Entretanto, se nas reações de pré-tratamento e hidrólise houver formação significativa de subprodutos (HMF formado pela desidratação de hexoses e furfural pela degradação de pentoses) ocorrerá à diminuição da taxa de consumo dos açúcares e à inibição da ação dos micro-organismos afetando o rendimento final do processo [38-42, 48].

Assim, a principal motivação do presente trabalho foi contribuir com pesquisas que buscam tornar a produção do etanol celulósico, através da avaliação do aproveitamento dos compostos presentes na casca do coco verde, visando agregar valores econômicos e socioambientais, por meio do processo de pré-tratamento organosolv com glicerol e FeCl_3 , como uma alternativa promissora para o gerenciamento sustentável desse resíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de pré-tratamento da casca de coco pelo método organosolv utilizando glicerol e FeCl_3 na obtenção de açúcares redutores.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o pré-tratamento organosolv, utilizando o solvente glicerol e o catalisador FeCl_3 , sobre a casca de coco em diferentes tamanhos de partícula, para compreender como essa variável afeta a desconstrução da lignocelulose;
- Realizar a hidrólise enzimática para verificar a digestibilidade das biomassas pré-tratadas;
- Investigar a eficiência do pré-tratamento pela determinação dos açúcares redutores totais no hidrolisado por meio do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS);
- Recuperar a lignina solubilizada nos licores do pré-tratamento;
- Verificar se há presença de inibidores de fermentação (HMF e furfural) no hidrolisado e no licor utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Avaliar a reutilização do licor como solvente do pré-tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparo da biomassa e determinação do teor de umidade e cinzas

O coco verde foi coletado no mercado municipal Milton Santos, no bairro Farolândia em Aracaju Sergipe. Toda a fibra (epicarpo e mesocarpo) foi retirada e colocada sob exposição à irradiação solar por sete dias para secagem. Depois de seca foi processada em moinho de facas, o que possibilitou à obtenção dos tamanhos de partículas < 0,85 mm e 0,85-2,0 mm, que foram primeiramente selecionados em peneira com abertura de 2,0 mm x 1,0 mm. A biomassa que passou foi selecionada novamente em uma peneira de 20 mesh (0,84 mm), a parte retida nessa última peneira correspondeu ao tamanho 0,85-2,0 mm e o que passou referiu-se a partícula < 0,85 mm. Para a obtenção de um outro tamanho de partícula, maior que 2,0 mm (2,0-4,0 mm), a biomassa foi cortada manualmente com auxílio de uma tesoura e uma régua. A casca de coco seca depois de triturada para os tamanhos de partícula citados (menor que 0,85 mm; médio entre 0,85-2,0 mm e maior que 2,0 mm (2,0-4,0 mm), Figura 6, foi armazenada a temperatura ambiente em potes com tampa. A determinação do teor de umidade e cinzas presente na biomassa foi feita adaptando os procedimentos analíticos usados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) [47, 48].

Figura 6. Casca do coco seca e triturada nos três tamanhos de partícula.



Fonte: acervo do autor.

3.2 Reações de pré-tratamento

Foram realizadas reações de pré-tratamento em duplicata para cada tamanho de partícula, executadas dentro de uma capela de exaustão e em banho de óleo aquecido em placa de aquecimento com agitação magnética [49, 50]. O procedimento consistiu em adicionar 1,5 g de biomassa sem tratamento, seca e triturada a erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se também 20,0 mL de glicerol comercial (Dinâmica, 99,5%, Brasil) e 0,1351 g cloreto de

ferro III hexahidratado P.A., $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (97-102%, Dinâmica, Brazil), o que correspondeu a $0,025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de FeCl_3 . O erlenmeyer contendo o meio reacional foi imergido no banho de óleo de soja previamente aquecido a 220°C , sob agitação de 300 rpm e para a correta transferência de calor tanto o banho de óleo quanto o meio reacional foram agitados, por meio de uma barra magnética no banho e outra no erlenmeyer, a uma distância que possibilitava a agitação de ambos, para isso o erlenmeyer permaneceu suspenso no banho de óleo com auxílio de garras, Figura 7.

Figura 7. Reação de pré-tratamento da casca de coco verde.



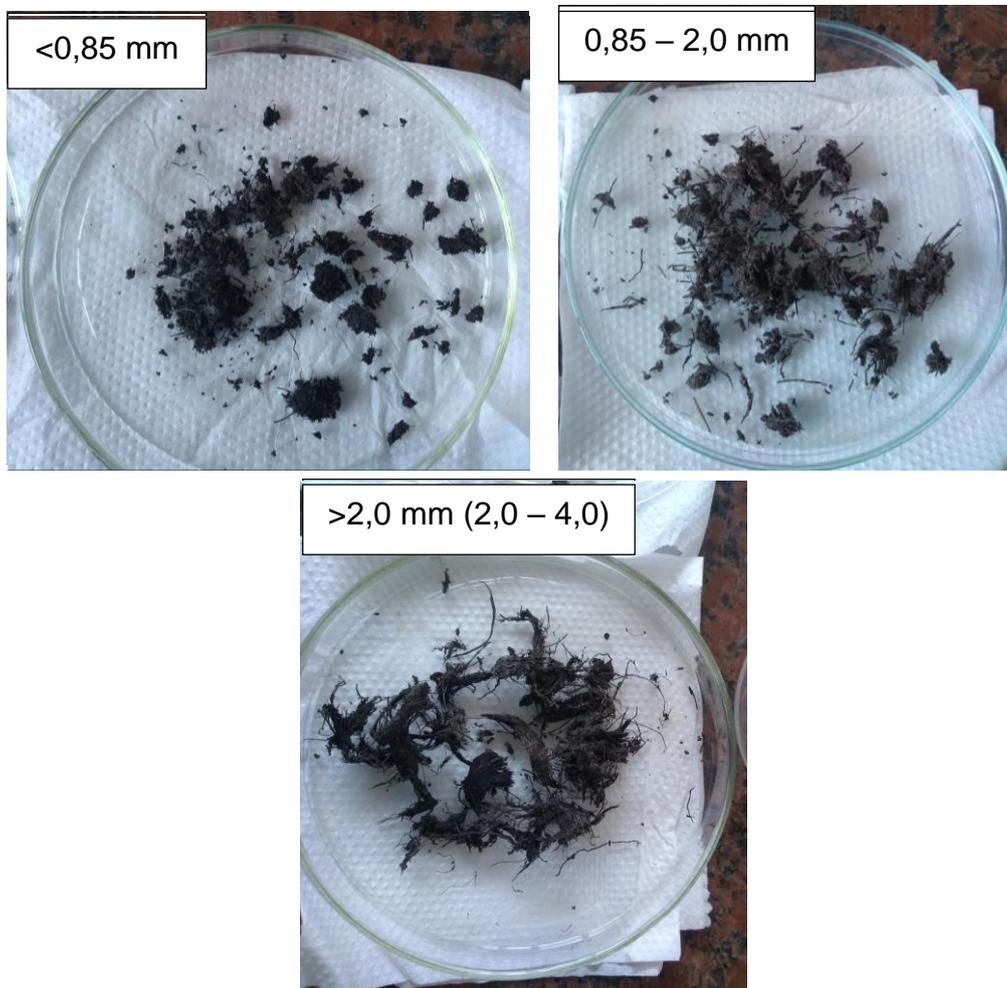
Fonte: acervo do autor.

Após o meio reacional atingir estabilidade térmica com o banho de óleo na temperatura citada, o sistema foi mantido nessas condições por 10 min. Transcorrido esse tempo, a agitação foi desligada, o erlenmeyer foi retirado do banho de óleo e colocado em um banho de água a temperatura ambiente para resfriamento. Em seguida, o meio reacional foi filtrado em tecido utilizando 25 mL de água de torneira para auxiliar a transferir todo o conteúdo reacional do erlenmeyer. A fração líquida do pré-tratamento

(filtrado/licor) teve o valor de pH aferido e foi armazenada em frasco plástico sob refrigeração. A fração sólida (biomassa pré-tratada) foi lavada com 300 mL de água de torneira, transferida para uma placa de petri e seca a 35 °C em estufa com circulação de ar. Depois de seca, Figura 8, teve sua massa medida e foi conservada em recipiente fechado a temperatura ambiente. O rendimento sólido após pré-tratamento foi calculado por meio da Equação 1.

$$\text{Rendimento sólido (\%)} = \frac{\text{massa da biomassa após tratamento(g)}}{\text{massa da biomassa antes do tratamento(g)}} \times 100 \quad (1)$$

Figura 8. Biomassa pré-tratada nos três tamanhos de partícula.



Fonte: acervo do autor.

3.3 Determinação da atividade da enzima e teste de verificação da atividade enzimática

Para medir a atividade da enzima utilizou-se o procedimento do NREL [51]. Foram preparadas soluções de extrato do complexo enzimático Cellic CTec3 nas proporções de 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2500 em balões volumétricos de 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL e 250 mL, respectivamente. Foram utilizados 27 tubos de vidro com tampa rosqueada na seguinte ordem: em dois tubos foram adicionados 1,5 mL de tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 4,8, esses correspondem ao branco; em cinco tubos foram adicionados 1 mL de tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 4,8 e 0,5 mL de glicose nas concentrações de $1,55 \text{ mg.mL}^{-1}$, $2,68 \text{ mg.mL}^{-1}$, $4,70 \text{ mg.mL}^{-1}$, $6,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $10,15 \text{ mg.mL}^{-1}$, cada tubo foi preenchido em duplicata, totalizando 10 tubos, que corresponderam aos padrões de glicose com os quais a curva de calibração foi construída para determinação da atividade enzimática, relacionada à quantidade de açúcar liberado a partir do substrato (papel filtro); em mais cinco tubos foram adicionados uma fração de papel filtro (MN 615 Macherey-Nagel) pesando 0,5 g [52], 1 mL de tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 4,8 e 0,5 mL do extrato enzimático nas proporções explicitadas acima, sendo que cada tubo foi preenchido em triplicata, totalizando 15 tubos de reação, ou seja, onde ocorre a ação do complexo enzimático sobre a celulose do papel, liberando glicose que é usada para medir a atividade da enzima.

Logo após o preparo os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C por 1 hora, após esse tempo foram retirados e submetidos à análise pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A cada tubo foi adicionado 3 mL do reagente DNS, esses foram em seguida agitados e imergidos em banho de água fervente por 5 min. Completado o tempo da reação os tubos foram arrefecidos em banho de água gelada, adicionando-se na sequência 2,0 mL de água destilada a cada tubo. Por fim, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm.

Para a determinação da atividade da enzima comumente se utiliza a diluição do extrato enzimático que libere cerca de 2 mg de glicose no tubo de reação. Após descobrir qual a melhor concentração do extrato enzimático,

calcula-se a atividade da enzima em FPU (Filter Paper Unity)/mL por meio da Equação 2.

$$FPU/mL = \frac{0,37}{[concentração\ do\ extrato\ enzimático]} \quad (2)$$

Conhecendo-se a atividade enzimática (FPU/mL) pode-se determinar o volume necessário de enzima (a ser utilizado em um processo de hidrólise) para uma determinada massa de biomassa por meio da Equação 3. Para isso, admite-se uma quantidade ideal de enzima em FPU/g. Essa concentração ótima depende do tipo de enzima, mas comumente se utiliza cerca de 10 a 20 FPU/g.

$$V (mL) = \frac{FPU/g \times biomassa (g)}{FPU/mL} \quad (3)$$

A verificação da atividade da enzima foi feita utilizando uma amostra de biomassa de casca de coco pré-tratada proveniente de uma pesquisa anterior realizada no Laboratório de Estudo da Matéria Orgânica Natural – LEMON. Ela foi realizada com o objetivo de verificar qual a melhor quantidade de enzima a ser usada no processo de hidrólise: 10; 15 ou 20 FPU/g. E, também, identificar o período de tempo mais propício para se atingir a máxima conversão enzimática: 24; 48; ou 72 h. Para isso, em três erlenmeyers de 125 mL, etiquetados de 1 a 3, foi pesado 0,125 g da biomassa e adicionados 15 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ a pH 4,8. O volume da enzima foi adicionado de modo a se obter: no erlenmeyer 1 - 10 FPU/g; no erlenmeyer 2 - 15 FPU/g e no erlenmeyer 3 - 20 FPU/g. Todos os erlenmeyers foram cobertos com filme plástico e levados à estufa com circulação de ar a 50°C e 100 rpm. Alíquotas foram retiradas em 0 h (instantes iniciais do processo), 24, 48 e 72h, as quais foram filtradas em filtros de nylon 0,22 µm e armazenadas sob refrigeração para análise.

3.4 Preparo da solução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

O procedimento foi adaptado de Bernfeld (1955) [53]: Em um béquer de 250 mL foi adicionado 1,0003 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 50 mL de

água destilada e 20,0 mL de NaOH 2,0 mol.L⁻¹, misturado e levado para aquecimento a 35 °C para facilitar a dissolução. Em seguida foi adicionado 30,0002 g de tartarato duplo de sódio e potássio C₄H₄KNaO₆.4H₂O, homogeneizado até completa dissolução, e a solução transferida para um balão volumétrico com seu volume completado para 100 mL, sendo armazenada em frasco escuro, etiquetada e mantida sob refrigeração.

3.5 Hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas e biomassa *in natura*

O processo de hidrólise enzimática foi realizado em duplicata para cada tamanho de partícula, utilizando toda a massa resultante de uma reação de pré-tratamento efetuada com 1,5 g de biomassa sem tratamento. O volume de enzima utilizado na hidrólise foi calculado de acordo com o valor médio da massa pré-tratada obtido para cada tamanho de partícula, e o volume do tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ a pH 4,8 foi fixado em 50 mL [49]. O procedimento foi realizado adicionando-se a erlenmeyer de 250 mL a massa correspondente à biomassa pré-tratada; 50 mL do tampão citrato; e o respectivo volume da enzima Cellic CTec3. Executou-se também uma hidrólise com a biomassa sem tratamento com tamanho de partícula médio (0,85 – 2,0 mm), nesse caso a massa submetida ao processo de hidrólise foi equivalente à massa média pré-tratada referente a esse tamanho de partícula. Após o preparo, os erlenmeyers foram fechados com plástico filme e levados a estufa com circulação de ar a 50 °C e agitação a 100 rpm. Foram retiradas alíquotas em tempo pré-definido de 24 e 48h, sendo filtradas em filtros de nylon 0,22 µm e armazenadas sob refrigeração até a análise. A Figura 9 mostra o aspecto dos hidrolisados após 48h de hidrólise enzimática.

Figura 9. Hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas e sem tratamento



Fonte: acervo do autor.

3.6 Determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS

A determinação foi feita utilizando tubos de vidro com tampa rosqueada, aos quais se adicionou: 250,0 μL de água destilada; 125,0 μL da amostra de hidrolisado; e 125,0 μL do reagente DNS. O meio reacional foi agitado e rapidamente levado a um banho de água fervente por 5 min, sendo agitados novamente na metade desse tempo (a adição da solução DNS foi feita em pequenos blocos, 10-15 amostras, para evitar degradação dos açúcares antes dos tubos serem levados ao aquecimento). Finalizado o tempo, os tubos foram retirados, colocados em banho de água gelada e abertos para adição de 2 mL de água destilada. Por fim, as amostras foram submetidas à análise em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda na região do visível correspondente a 540 nm onde, a coloração da amostra varia com a quantidade de açúcar presente, ou seja, quanto maior a concentração de açúcar mais intensa a sua coloração (Figura 1) [40-42]. Foi preparado também um branco substituindo a amostra por água destilada, e uma curva padrão linear de glicose foi construída a partir de soluções de glicose de concentração conhecida, preparadas em água, na faixa de 0,2 – 1,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo que a análise DNS tanto do branco quanto dos padrões seguiu o mesmo procedimento das amostras. Desse modo, a quantificação dos açúcares redutores totais foi feita em relação à glicose. Por meio da

equação da reta obtida foi possível calcular a concentração de açúcares redutores totais presente nas amostras, tendo o cuidado da absorbância lida está dentro da faixa da curva de calibração, caso contrário à amostra foi diluída e submetida novamente à reação DNS. A concentração dos açúcares redutores totais foi calculada por meio da Equação 4, e todas as determinações foram realizadas em duplicata.

$$AR (g.L^{-1}) = \text{fator da curva padrão} \times \text{diluição} \times \text{absorbância} \quad (4)$$

Onde:

fator da curva padrão = coeficiente angular da reta

3.7 Recuperação da lignina dos licores

A lignina insolúvel presente na fração líquida (licor) do pré-tratamento das biomassas foi recuperada utilizando uma centrífuga. O volume do licor (40,0 mL) foi dividido em quatro tubos Falcon com capacidade de 15,0 mL, em seguida foram submetidos à centrifugação. Após separação, a parte líquida foi devolvida ao frasco de origem e a parte sólida foi lavada com água da torneira em dois ciclos. O volume total de água utilizado correspondeu a 60% do volume do licor que foi submetido à centrifugação, sendo que em cada ciclo de lavagem adicionou-se metade da água requerida ao tubo Falcon com o sólido (lignina), agitando-se vigorosamente para homogeneização e em seguida levado à centrifugação. A lavagem retira resíduos de glicerol, facilitando a secagem que foi feita na estufa a 55 °C durante 24 h. A lignina teve sua massa medida e armazenada em um frasco plástico [49].

3.8 Preparo de soluções padrão para determinação dos subprodutos HMF e furfural

As soluções estoque e intermediária de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural foram preparadas em capela de exaustão, utilizando balões

volumétricos. No preparo dessas soluções utilizou-se como solvente uma mistura 60:40 (v:v) de água:etanol, fazendo uso de água ultrapura e etanol da Neon (99,8% P.A.). Para o HMF foi utilizada uma solução estoque a $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ já previamente preparada a partir do padrão Sigma-Aldrich (pureza 99%) e armazenada sob refrigeração no laboratório, a partir dela preparou-se 5,0 mL de uma solução intermediária a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$. Uma solução estoque de furfural a $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ foi preparada utilizando 43,53 μL do padrão Sigma-Aldrich (pureza 99%) em balão de 5 mL, em seguida preparou-se 5 mL de uma solução intermediária a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$, utilizando 1000 μL da solução estoque. Para a quantificação foram preparadas soluções conjuntas, em água, a partir das soluções estoque e intermediária. Essas soluções de trabalho foram usadas na construção de curvas de calibração linear nas faixas de: 0,1-10 mg.L^{-1} e 10-250 mg.L^{-1} tanto para o HMF quanto para o furfural.

3.9 Quantificação dos subprodutos HMF e furfural por HPLC

A determinação foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando uma coluna da Shimadzu C18 Shim-Pack VP-ODS (4,6 x 250 mm), a 35 °C, no modo de eluição isocrático, com fluxo de $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$ com a fase móvel ACN:H₂O (acetonitrila:água) - 20:80 (v:v), acidificada com ácido fosfórico (H₂PO₄) a pH 3,0. O volume de injeção foi de 10 μL e o tempo de corrida para cada amostra foi de 10 minutos. Antes de serem submetidas à análise, as amostras de licor e hidrolisado foram filtradas em filtros PVDF (fluoreto de polivinilideno) 0,22 μm . Tanto o HMF quanto o furfural foram quantificados em 280 nm [49, 50]. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

3.10 Reutilização do licor como solvente nas reações de pré-tratamento.

Para reutilização do licor das reações de pré-tratamento foi necessário realizar uma pré-concentração, para evaporar a água

adicionada durante a filtração da biomassa, evitando dentre outras coisas o transbordamento do meio reacional para o banho de óleo quente durante as reações de pré-tratamento, em função do ponto de ebulição da água (100 °C), já que as reações são realizadas em reator aberto e em temperatura de 220 °C. Esse procedimento consistiu em adicionar cada licor proveniente das reações de tamanho de partícula médio (0,85 – 2,0 mm) em um béquer e leva-los, individualmente, para a chapa de aquecimento (em banho de óleo) a 105 °C por 01h30min. Após esse tempo, o béquer foi retirado do banho de óleo e deixado à temperatura ambiente para resfriamento. Em seguida foram realizadas reações utilizando a casca do coco no tamanho de partícula médio, com e sem a adição de catalisador (FeCl_3), para avaliar a eficiência da reutilização do licor pré-concentrado. Para isso, foi adicionado ao erlenmeyer 1,5 g da biomassa da casca de coco, 20 mL do licor e 0,01351g de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, nas reações com adição de catalisador.

O procedimento reacional foi o mesmo usado nas reações utilizando o glicerol comercial, em temperatura de 220 °C a 300 rpm durante 10 min (após estabilidade térmica) sendo realizada a filtração, aferição do pH do licor, e a biomassa levada para secagem a 35 °C. O mesmo processo foi realizado para as reações sem a adição de catalisador. As biomassas pré-tratadas foram submetidas à hidrólise enzimática e a concentração dos açúcares redutores totais no hidrolisado foi realizada pelo método de análise DNS, utilizando uma curva padrão linear de glicose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo da biomassa e teor de umidade e cinzas

O preparo da biomassa após a coleta é uma etapa muito importante já que ela é a parte fundamental de todo o estudo. A redução do tamanho e a secagem são as formas mais empregadas para facilitar a desconstrução da estrutura lignocelulósica. A secagem possibilita o armazenamento, dado que

a eliminação do excesso de água inibe o crescimento microbiano. Neste trabalho, a secagem foi feita ao ar livre sob incidência de luz solar, uma prática que possibilita economia de energia e é correta para o preparo de grandes quantidades de biomassa. De acordo com o NERL/TP-510-42620 [54], a secagem da biomassa ao ar é adequada para a realização da análise de composição lignocelulósica (lignina, celulose e hemicelulose) contanto que o clima da região permita que a amostra seque a um teor de umidade inferior a 10%.

A casca de coco utilizada nesse estudo apresentou teor de cinzas de $5,0 \pm 0,0\%$ e teor de umidade após secagem de $6,4 \pm 0,1\%$, estando propícia para ser submetida à análise de composição lignocelulósica. O baixo teor de umidade é importante porque excesso de água pode interferir nos resultados diminuindo a concentração do ácido utilizado na hidrólise ácida, resultando em valores de liberação de carboidratos baixos devido à hidrólise incompleta dos açúcares poliméricos e em um alto e errôneo teor de lignina.

O tamanho da partícula também não deve ser negligenciado no preparo de biomassas porque influenciará na liberação de açúcares na hidrólise enzimática, pois um tamanho muito pequeno acarretará a degradação exagerada dos carboidratos nas reações de pré-tratamento, já um tamanho de partícula muito grande pode dificultar a separação da estrutura lignocelulósica e conseqüentemente gerar uma taxa pequena de liberação. Portanto, se faz necessário encontrar uma situação de equilíbrio com relação à redução do tamanho da partícula [49,50].

4.2 Reações de pré-tratamento

Esse processo tem como objetivo realizar a desagregação da estrutura lignocelulósica, removendo a hemicelulose e a lignina da parte sólida permanecendo, idealmente, somente a celulose. O rendimento sólido da biomassa seca, após as reações de pré-tratamento, auxilia a prever a sua composição resultante e estimar a quantidade de açúcares redutores liberados após a hidrólise. Uma vez que, um rendimento sólido alto é

indicativo de que houve pouca remoção de lignina e hemicelulose e conseqüentemente baixa redução na recalcitrância, e um rendimento muito baixo pode ser decorrente da remoção de parte da celulose, como conseqüência haverá pouca liberação de açúcares redutores em ambos os casos [49].

O rendimento sólido apresentado pela casca de coco pré-tratada, por meio do método organosolv com glicerol e FeCl_3 , em diferentes tamanhos de partícula é apresentado na Tabela 1:

Tabela 1. Rendimento sólido obtido nas reações de pré-tratamento com 1,5 g de biomassa *in natura* em diferentes tamanhos de partícula.

Tamanho de Partícula (mm)	Rendimento sólido (%)
< 0,85	34,16 ± 0,57
0,85 - 2,0	42,06 ± 6,37
> 2,0 (2,0 - 4,0)	58,90 ± 1,07

Como observado na Tabela 3, o rendimento sólido aumentou com o aumento do tamanho da partícula da biomassa, resultado coerente, uma vez que a menor área superficial dificulta a ocorrência da reação, diminuindo o grau de desconstrução da biomassa.

4.3 Recuperação da lignina dos licores

A lignina insolúvel em ácido recuperada dos licores é uma evidência de que o pré-tratamento organosolv com glicerol e FeCl_3 tem capacidade de romper as ligações da biomassa do coco (Tabela 2) [49]. A centrifugação foi efetiva na separação da lignina do licor, uma vez que, foi possível observar a concentração de massa no fundo do tubo (Figura 10). Além disso, o aspecto da lignina após a secagem mostra que a lavagem com água da torneira, correspondente a 60% do volume do licor, consegue remover praticamente todo o resíduo de glicerol presente no sólido resultante da centrifugação,

como pode ser observado na Figura 11, a presença de um pó de aspecto seco, com ausência de viscosidade relativa à presença de glicerol.

Tabela 2. Massa da lignina recuperada de licores resultante de uma reação de pré-tratamento com 1,5 g de biomassa *in natura* em diferentes tamanhos de partícula.

Tamanho de Partícula (mm)	Massa Recuperada (g)
< 0,85	0,2646 ± 0,0094
0,85 - 2,0	0,2511 ± 0,0343
> 2,0 (2,0 - 4,0)	0,2021 ± 0,0285

Conforme a Tabela 2, a partícula de tamanho < 0,85 mm apresentou maior quantidade de lignina recuperada dos licores frente aos outros dois tamanhos de partícula. Contudo, a diferença em relação a partícula 0,85-2,0 mm é bem pequena. Entretanto, para a partícula > 2,0 mm a diferença é um pouco maior, mostrando que a deslignificação da biomassa é favorecida por um menor tamanho de partícula. Esse resultado é bem coerente com o do rendimento sólido (Tabela 1, indicando que o rendimento sólido mais elevado obtido com o tamanho de partícula maior é decorrente, dentre outros fatores, da menor remoção de lignina da biomassa).

Figura 10. Lignina separada dos licores, fração líquida do pré-tratamento, após centrifugação.



Fonte: acervo do autor.

Figura 11. Aspecto da lignina, recuperada dos licores, após a secagem.

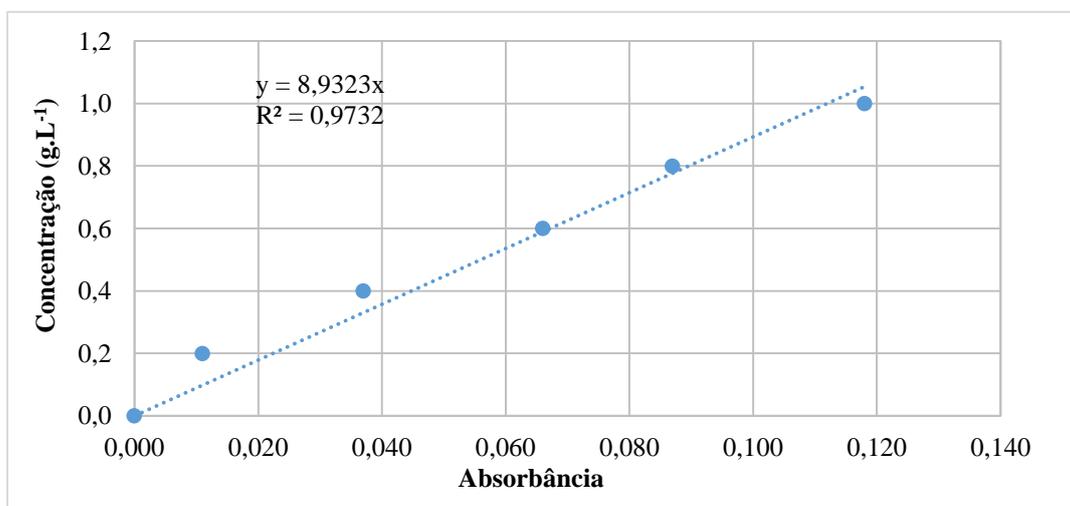


Fonte: acervo do autor.

4.4 Determinação da atividade da enzima e teste de verificação da atividade enzimática

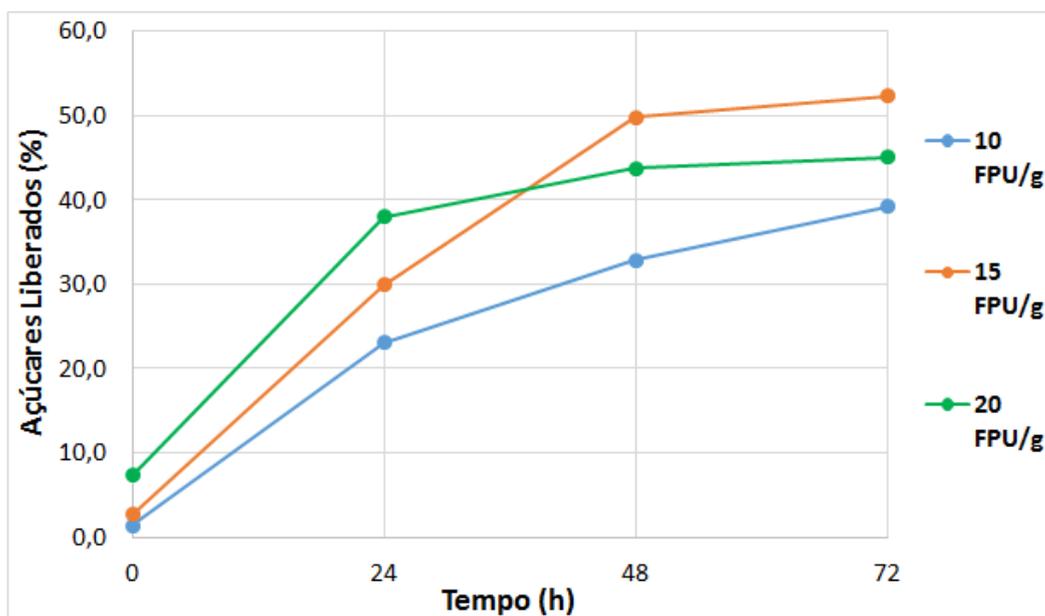
As determinações foram feitas para verificar a atividade do complexo enzimático e para encontrar o melhor tempo e melhor concentração em FPU/g da enzima para a hidrólise, tendo em vista que o período que a enzima fica armazenada e a forma de acondicionamento podem interferir em sua atividade. Uma curva de padrões de glicose foi construída para quantificar os açúcares liberados durante a hidrólise realizada, Figura 12.

Figura 12. Curva padrão linear de glicose.



A atividade determinada para o complexo enzimático Cellic CTec3 foi de 63,43 FPU/mL, e o teste de verificação da atividade enzimática (Figura 13) evidenciou que a melhor quantidade de enzima a ser utilizada no processo de hidrólise enzimática corresponde a 15 FPU/g, uma vez que foi essa concentração do complexo enzimático que proporcionou a melhor liberação de açúcares a partir de uma mesma amostra de biomassa pré-tratada.

Figura 13. Verificação da atividade do complexo enzimático Cellic CTec3 armazenado no laboratório.



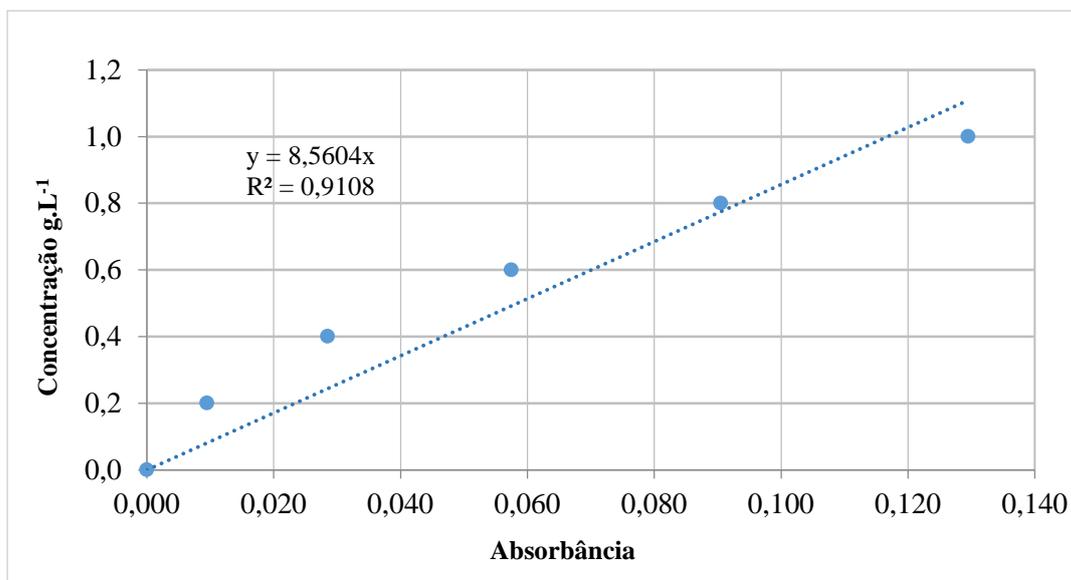
A Figura 14 também mostra que o tempo de hidrólise, com a referida enzima, pode ser fixado em 48 h, tendo em vista que com 72 h não houve aumento expressivo na quantidade de açúcares liberados.

4.5 Hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas e biomassa *in natura*, e determinação de açúcares redutores totais pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)

A hidrólise enzimática utiliza enzimas para converter a celulose, e também hemicelulose, presente nos materiais lignocelulósicos, em glicose. O método DNS, por sua vez, possibilita quantificar os açúcares liberados.

Nesse método ocorre uma reação de oxirredução entre os açúcares e o DNS, via aquecimento e em meio alcalino. O ácido formado absorve luz na região do visível a 540 nm, e usando uma curva padrão linear de glicose (Figura 14) relacionamos a sua medida colorimétrica (absorbância) com a concentração de açúcares [41, 42].

Figura 14. Curva padrão linear de glicose.



O reagente DNS possui coloração amarela e após a reação a amostra adquire coloração avermelhada, indicando a interação entre ele e os açúcares presentes na amostra. Quanto mais avermelhada a solução, maior será a concentração de açúcares redutores totais. Assim, por meio da curva de padrão linear determinou-se a concentração de açúcares liberados nos hidrolisados provenientes de processo de hidrólise enzimática realizado sobre as biomassas pré-tratadas em diferentes tamanhos de partícula e também com a biomassa *in natura* (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de açúcares liberados nos hidrolisados em 24 h e 48 h de hidrólise.

Amostra	Tempo de hidrólise	Concentração de açúcares (g.L⁻¹)
< 0,85 mm	24 h	4,71 ± 0,12
	48 h	5,08 ± 0,38
0,85 - 2,0 mm	24 h	6,88 ± 0,64
	48 h	6,91 ± 0,55
> 2,0 mm (2,0 - 4,0)	24 h	5,35 ± 0,23
	48 h	5,82 ± 0,20
0,85 - 2,0 mm <i>in natura</i>	24 h	1,73 ± 0,09
	48 h	2,00 ± 0,05

A hidrólise e análise da biomassa *in natura* foram realizadas para comparação com as biomassas pré-tratadas em relação à liberação de açúcares. O resultado para essa biomassa só confirmou o fato de que o método organosolv utilizado para pré-tratar a casca de coco é válido e eficiente, uma vez que a concentração de açúcares liberados no hidrolisado da biomassa *in natura* foi consideravelmente menor que as das biomassas pré-tratadas nos diferentes tamanhos de partícula (Tabela 3) [49, 50].

A realização do processo de hidrólise a partir de toda a massa pré-tratada teve a intenção de estimar a composição lignocelulósica após pré-tratamento [49]. As concentrações de açúcares obtidas nos hidrolisados das biomassas de tamanho de partícula menor e maior são praticamente equivalentes, considerando-se o desvio padrão. Quando se considera o rendimento sólido e a recuperação da lignina dessas mesmas biomassas, pode-se inferir: que a menor partícula levou a uma maior desagregação da biomassa, podendo ter ocorrido perdas de celulose; e que a partícula maior desagrega a biomassa em menor proporção, mas consegue reduzir a recalitrância de modo considerável, e por preservar maior quantidade de

celulose consegue atingir a mesma liberação de açúcares da partícula menor. Assim, não há diferenças no rendimento do processo quando realizado com a biomassa nos tamanhos de partícula $< 0,85$ mm e $> 2,0$ mm (2,0-4,0).

No entanto, o tamanho de partícula médio (0,85 - 2,0 mm) proporcionou o melhor equilíbrio entre redução da recalcitrância e conservação da celulose, o que pode ser percebido pela maior concentração de açúcares obtida nesse hidrolisado (Tabela 3) que, considerando o desvio padrão, é cerca de 1 g.L^{-1} superior a dos outros dois tamanhos de partícula. Desse modo, para a produção de etanol celulósico a partir da casca do coco, processar essa biomassa para o tamanho de partícula 0,85 - 2,0 mm conferirá um melhor rendimento ao processo. O trabalho realizado por Borges (2018) [27], para tratamento de biomassa da cana de açúcar pelo método organosolv utilizando como solvente orgânico acetona (14 g) e ácido sulfúrico como catalisador (20 g) para 2 g de biomassa em banho-maria a $90 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 min, obteve no filtrado concentração máxima de $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e concentrações elevadas de HMF e furfural, 0,4 e $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. Evidenciando que apesar do uso em excesso do catalisador ácido, obteve resultados inferiores ao apresentado na condição ótima deste trabalho.

Outro aspecto interessante a ser observado na Tabela 3 é que os percentuais de açúcares liberados em 24 e 48 h foram praticamente iguais, indicando não ser necessário, nesse caso, dar prosseguimento a hidrólise até 48 h, pois em 24 h já se atinge a máxima liberação de açúcares.

4.6 Determinação de HMF e furfural por HPLC

A quantificação de subprodutos, nos licores provenientes das reações de pré-tratamento e nas amostras de hidrolisado, é primordial. Uma vez que estes, em concentrações elevadas, podem inibir a ação de micro-organismos em processos fermentativos. Tanto para o HMF quanto para o furfural, foram construídas curvas de calibração (Figuras 15 - 18) em concentrações baixas ($0,1$ - 10 mg.L^{-1}) e altas (10 - 250 mg.L^{-1}).

Figura 15. Curva de calibração para a quantificação do HMF em concentrações mais baixas.

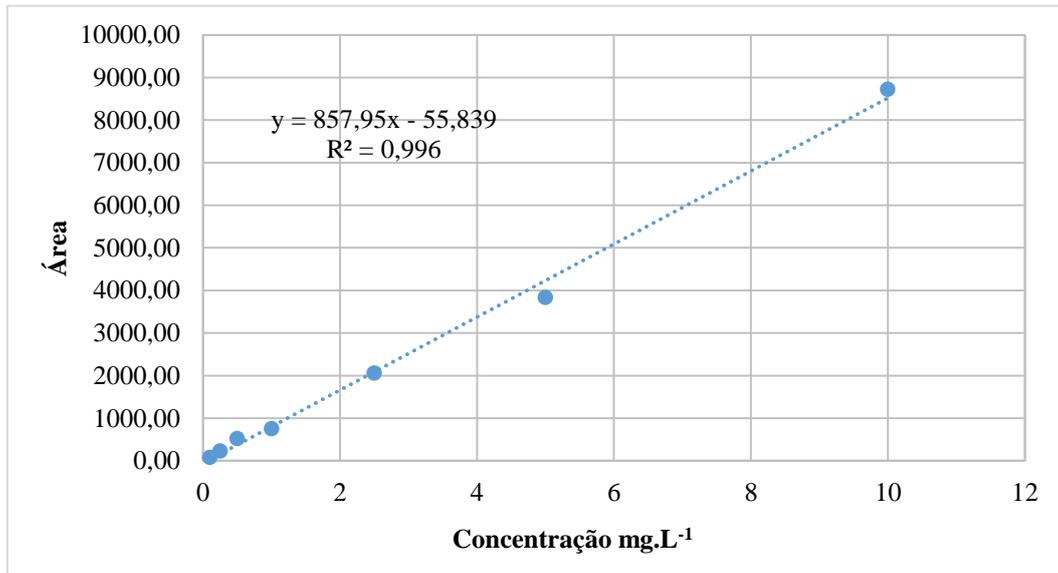
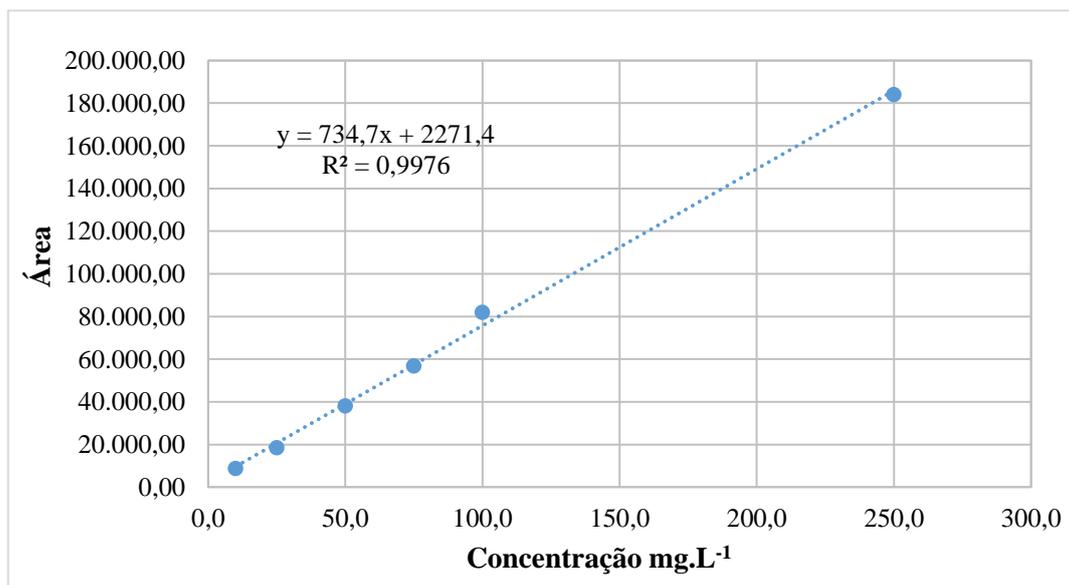


Figura 16. Curva de calibração para a quantificação de HMF em concentrações mais altas.



As curvas de calibração do HMF evidenciaram que os padrões utilizados estão aptos para quantificação do composto, pois os valores de R^2 nas duas curvas foram 0,996 e 0,9976, respectivamente. A quantificação do HMF foi feita em 280 nm (comprimento de onda de maior intensidade), o tempo de retenção foi 5,6 minutos, apresentando picos bem definidos. Sendo

que através da sua área nas amostras foi possível determinar a concentração por meio da equação da reta (Tabela 4).

Figura 17. Curva de calibração para quantificação de furfural em concentrações baixas.

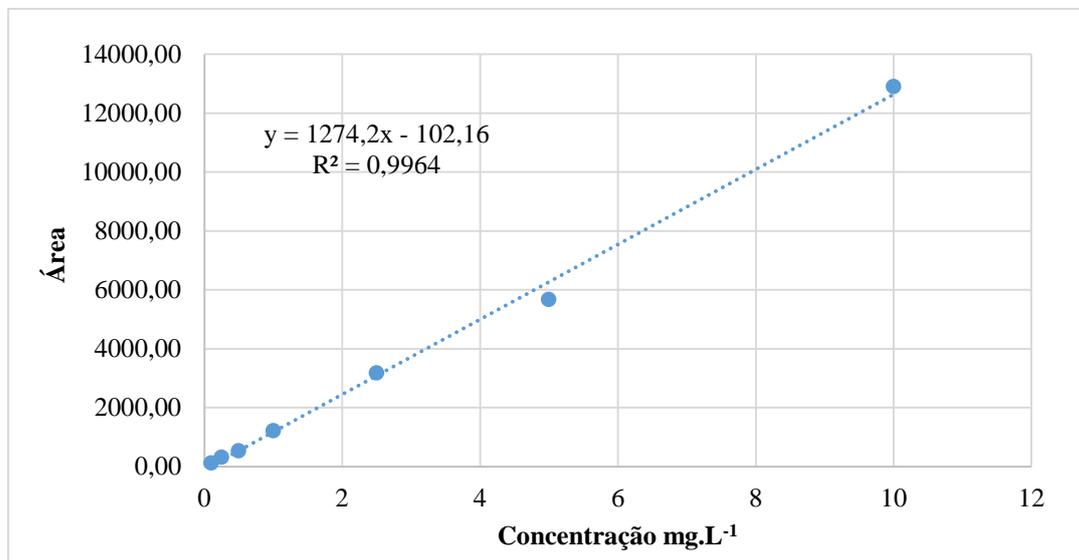
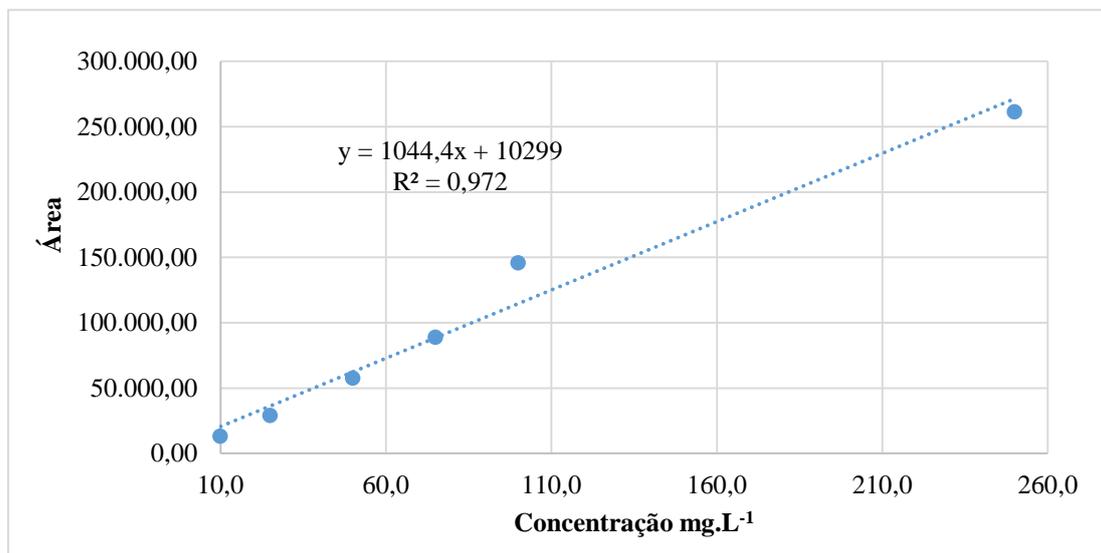


Figura 18. Curva de calibração para quantificação de furfural em concentrações altas.



O valor de R^2 das curvas de calibração do furfural mostra que estas poderão ser utilizadas para determinação da concentração dos subprodutos (Figuras 17 e 18). A quantificação desse composto foi feita no comprimento

de onda de maior intensidade (280 nm), apresentou picos bem definidos, com tempo de retenção de 8,7 minutos, sendo que por meio da área obtida determinou-se sua concentração nas amostras (Tabela 4) [49].

Tabela 4. Determinação de HMF e Furfural nos hidrolisados e licores das reações de pré-tratamento realizadas com diferentes tamanhos de partícula.

Amostra	Hidrolisado (24 h)		Hidrolisado (48 h)		Licor	
	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)
< 0,85 mm	0,0015 ± 0,0001 ± 0,0000	0,0001 ± 0,0000	0,0016 ± 0,0002 ± 0,0007	0,0002 ± 0,0000	0,0107 ± 0,0004	0,075? ± 0,0037
0,85 - 2,0 mm	0,0023 ± 0,0003 ± 0,0000	0,0003 ± 0,0000	0,0022 ± 0,0003 ± 0,0000	0,0003 ± 0,0001	0,0085 ± 0,0007	0,099? ± 0,0597
> 2,0 mm (2,0 - 4,0)	0,0020 ± 0,0002 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0001	0,0013 ± 0,0004 ± 0,0012	0,0004 ± 0,0000	0,0081 ± 0,0008	0,0189 ± 0,0020

Como visto na Tabela 4, as concentrações de HMF e furfural, tanto nos hidrolisados quanto nos licores, são baixas. De modo que a quantidade produzida desses compostos, no método proposto, não tem capacidade para inibir o processo fermentativo uma vez que, na literatura a ação inibitória da fermentação para o HMF é a partir de 0,5 g.L⁻¹ e para o furfural tem relevância a partir de 2,0 g.L⁻¹ [38, 40, 46, 53]. Desse modo, esse trabalho apresenta outra vantagem em relação ao de Borges (2018) [27], citado anteriormente, que obteve concentração, desses subprodutos, em nível capaz de gerar inibição.

4.7 Reutilização do licor como solvente nas reações de pré-tratamento.

A determinação da concentração dos açúcares redutores produzidos durante a hidrólise das biomassas pré-tratadas com o licor foi realizada através do método DNS, utilizando um espectrofotômetro na região do visível a 540 nm. A quantificação dos açúcares (Tabela 5) foi feita por meio da seguinte curva padrão linear de glicose (Figura 19).

Figura 19. Curva padrão linear de glicose.

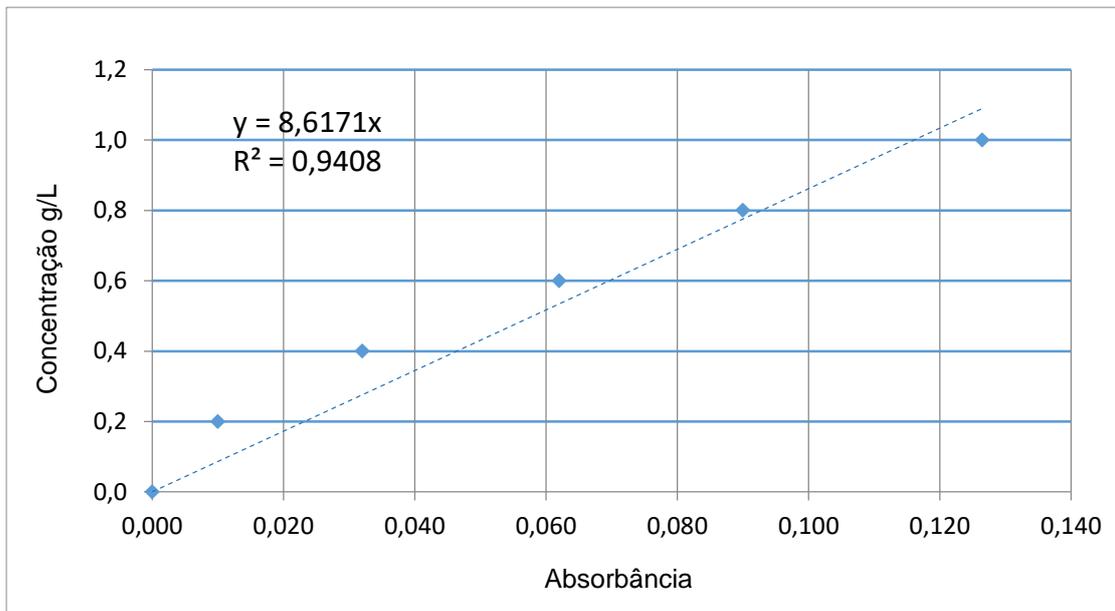


Tabela 5. Concentração de açúcares liberados nos hidrolisados das reações de reutilização do licor durante 24 e 48h de hidrólise enzimática.

Amostra	Tempo de hidrólise	Concentração de açúcares (g.L^{-1})
Com FeCl_3	24h	$7,71 \pm 0,13$
	48h	$9,40 \pm 0,09$
Sem FeCl_3	24h	$2,40 \pm 0,03$
	48h	$3,58 \pm 0,05$

Como visto na Tabela 5, a concentração de açúcares nos hidrolisados das reações com adição de cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi maior que nos hidrolisados das reações sem adição do catalisador. Observa-se também que o licor contendo FeCl_3 obteve a concentração de açúcares redutores de $7,71 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ em 24h, alcançando uma diferença significativa quando a hidrólise percorreu por 48h de $9,40 \pm 0,09$. Este resultado é superior à quantidade de açúcares liberados das biomassas pré-tratadas com glicerol comercial na condição ótima, com tamanho de partícula de 0,85 – 2,0 mm ($6,91 \pm 0,55 \text{ g.L}^{-1}$), como mostrado na Tabela 3, isto pode ser justificado pela adição de mais cloreto de ferro III na reação com o licor que já contém

uma certa quantidade desse catalisador, pois ele não foi recuperado antes de sua reutilização. Este resultado evidencia que a reutilização do licor como solvente nas reações de pré-tratamento sob as mesmas condições também proporciona a alta digestibilidade da celulose durante a hidrólise enzimática e que é uma alternativa diante da falta do glicerol comercial. Além disso, torna-se uma boa destinação final desse resíduo das reações de pré-tratamento, podendo até se estender por diversos ciclos reacionais, aproveitando ao máximo sua eficácia e evitando o consumo elevado de glicerol e o descarte de grandes quantidades de resíduos.

5 CONCLUSÕES

O pré-tratamento organosolv com glicerol e FeCl_3 aplicado à casca de coco se mostrou eficaz na redução da recalcitrância da biomassa, por meio da quebra das ligações dos compostos presentes em sua estrutura. O que fica evidente ao se observar que a concentração de açúcares liberados no hidrolisado da biomassa *in natura* foi bem menor que a concentração obtida nos hidrolisados das biomassas pré-tratadas nos diferentes tamanhos de partícula.

Todos os tamanhos de partícula estudados (< 0,85 mm; 0,85-2,0 mm; > 2,0 mm (2,0-4,0)) se mostraram adequados para aplicação na reação de pré-tratamento proposta nesse trabalho. Contudo, o tamanho médio foi o que proporcionou o melhor equilíbrio entre desagregação estrutural e conservação da celulose. O que foi inferido pela maior concentração de açúcares liberados no hidrolisado proveniente desse tamanho de partícula. Assim, um maior rendimento em etanol celulósico será obtido ao se utilizar no processo a casca de coco triturada para o tamanho de partícula 0,85-2,0 mm.

A quantidade de lignina recuperada dos licores, fração líquida do pré-tratamento, aumentou à medida que o tamanho de partícula diminuiu, indicando que a área superficial da biomassa influencia em sua remoção. Quanto maior a área superficial maior será a remoção de lignina na reação de pré-tratamento.

A concentração de HMF e furfural, tanto nos licores da reação de pré-tratamento quanto nos hidrolisados, foi muito baixa, não sendo capaz de causar inibição na atividade dos micro-organismos no processo fermentativo, o que se mostra vantajoso, possibilitando a geração de bioetanol por meio de açúcares redutores da biomassa do coco verde.

A reutilização do licor das reações de pré-tratamento em novas reações na condição ótima também foi eficiente quando acrescentado FeCl_3 , ou seja, ele possui a mesma capacidade para desagregar a biomassa lignocelulósica, removendo a hemicelulose e a lignina da sua estrutura, deixando somente a celulose na biomassa pré-tratada que o glicerol comercial,.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Elaborar um método para recuperar o catalizador FeCl_3 utilizado nas reações;
- Estudar o glicerol bruto no pré-tratamento organosolv do melhor tamanho de partícula;
- Usar a lignina recuperada para sintetizar um adsorvente híbrido magnético;
- Aplicar o adsorvente produzido na remoção poluentes para avaliar sua eficiência;
- Realizar processo fermentativo com os açúcares obtidos nos hidrolisados, e assim comprovar a eficiência do método proposto na obtenção do etanol celulósico.

7 REFERÊNCIAS

[1] Cuenca, M. A. G. Sistemas de Produção Embrapa - A Cultura do Coqueiro. https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7703&p_r_p_-996514994_topicId=7829 (acessado em 12 de agosto de 2021).

[2] Machado, L. J. Sartori, R. A.; Marques, D. D.; Nascimento, A. E. Da S.; Furtado, J. M. Utilização da biomassa do coco verde (cocos nucifera L.) Para obtenção de subprodutos. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 1, p. 3808–3826, 2020.

[3] Martins, A. P. Sanches, R. A.; Da Silva, P. L. R.; Borelli, C.; Watanabe, T.; Marcicano, J. P. P.. O Problema do Pós-consumo do Coco no Brasil: Alternativas e Sustentabilidade. *Sustentabilidade em Debate*, v. 7, n. 1, 29 abr. 2016.

[4] Brasil, 2010. Política Nacional de Resíduos Sólidos. 2 ago. 2010. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm. (acessado em 27 julho de 2021).

[5] Cabral, M. M. S.; Abud, A. K. S.; Silva, C. E. F.; Almeida, R. M. R. G. Bioethanol production from coconut husk fiber. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2016, 46, 1872-1877.

[6] Júnior, C. DE L.; Sampaio, E. V.S.B.; Lima, R. L.F.A.; Menezes, R. S.C. Potencial de aproveitamento energético de fontes de biomassa no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 7, n. 2, p. 207–221, 2014.

[7] Leão, A. DE F. F. Potencial de produção de biogás com biomassa do líquido da casca de coco verde no estado do Ceará.

<http://riut.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/20504/1/potencialbiomassacascacoco.pdf> (Acessado em 2 de agosto de 2021).

[8] Nogueira, C. C.; Padilha, C. E. A.; Jesus, A. A.; Souza, D. F. S.; Assis, C. F.; Junior, F. C. S.; Santos, E. S. Pressurized pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation with in situ detoxification to increase bioethanol production from green coconut fibers. *Industrial Crops & Products*. 2019, 130, 259–266.

[9] Vaithanomsat, P.; Apiwatanapiwat, W.; Chumchuent, N.; Kongtud, W.; Sundhrarajun, S. The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 2011, 45, 159-164.

[10] 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 & Products*. 2018, 112, 734–740.

[11] Padilha, C. E. A.; Nogueira, C. C.; Souza, D. F. S.; Oliveira, J. A.; Santos, E. S. Valorization of green coconut fibre: Use of the black liquor of organosolv pretreatment for ethanol production and the washing water for production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583. *Industrial Crops & Products*. 2019, 140, 111604.

[12] Magalhães, V. H. P. De; Neves, M. A. F. E S. Utilização do pericarpo de coco verde (*Cocos nucifera* L . - arecaceae) para remoção de íons Cromo (VI) em soluções aquosas. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, v. 3, p. 10–16, 2011.

[13] Lin, R.; Cheng, J.; Song, W.; Ding, L.; Xie, B.; Zhou, J.; Cen, K. Characterisation of water hyacinth with microwave-heated alkali pretreatment for enhanced enzymatic digestibility and hydrogen/methane fermentation. *Bioresource Technology*. 2015, 182, 1–7.

[14] Santos, F. A.; Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*. 2012, 35, 1004–1010.

[15] Shahzadi, T.; Mehmood, S.; Irshad, M.; Anwar, Z.; Afroz, A.; Zeeshan, N.; Rashid, U.; Sughra, K. Advances in lignocellulosic biotechnology : A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014, 5, 246–251.

[16] Silva, J. Dos S. Malta, V. R. dos S.; Rocha, M. S. R. Dos S.; Almeida, R. M. R. G.; Gomes, M. A.; Vicente, C. D.; Barbosa, K. L.. Hidrólise enzimática, fermentação e produção de biocombustíveis através da coroa de Ananas comosus. *Química Nova*, v. 41, n. 10, p. 1127–1131, 1 dez. 2018.

[17] Silva, S. I. D. S. Aproveitamento da biomassa de coco verde para produção de biocombustíveis sustentáveis. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 26 fev. 2019.

[18] Das, S.; Bhattacharya, A.; Haldar, S.; Ganguly, A.; Sai Gu.; Ting. Y. P.; Chatterjee, P. K. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. *Sustainable Materials and Technologies*. 2015, 3, 17–28.

[19] Elgharbawy, A. A.; Alam, M. Z.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 109, 252–267.

[20] Oh, Y. H.; Eom, I. Y.; Joo, J. C.; Yu, J. H.; Song, B. K.; Lee, S. H.; Hong, S. H.; Park, S. J. Recent advances in development of biomass pretreatment technologies used in biorefinery for the production of bio-based fuels, chemicals and polymers. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2015, 32, 1945–1959.

- [21] Guragain, Y. N.; Coninck, J. D.; Husson, F.; Durand, A.; Rakshit, S. K. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresource Technology*. **2011**, 102, 4416–4424.
- [22] Singh, A.; Bishnoi, N. R. Comparative study of various pretreatment techniques for ethanol production from water hyacinth. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 44, 283–289.
- [23] Bensah, E. C.; Mensah, M. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and innovations. *International Journal of Chemical Engineering*, **2013**, 1-21.
- [24] Santos, F. A.; Queiroz, J. H.; Colodette, J. L.; Manfredi, M.; Queiroz, M. E. L. R.; Caldas, C. S.; Soares, F. E. F. Otimização do Pré-tratamento Hidrotérmico da Palha de Cana-de-açúcar Visando à Produção de Etanol Celulósico. *Quimica Nova*. **2014**, 37, 56–62.
- [25] Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. **2011**, 52, 858–875.
- [26] Sarkar, N.; Ghosh, S. K.; Bannerjee, S.; Aikat, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. **2012**, 37, 19–27.
- [27] Borges, C. P. Estudo do Processo Organosolv Aplicado ao Bagaço de Cana-de-Açúcar para a Geração de Etanol de Segunda Geração. Uberaba - MG: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2018.
- [28] Sun, F. F.; Wang, L.; Hong, J.; Ren, J.; Du, F.; Hu, J.; Zang, Z.; Zhou, B. The impact of glycerol organosolv pretreatment on the chemistry and enzymatic hydrolyzability of wheat straw. *Bioresource Technology*. 2015. p.187, 354–361.

- [29] Constant, S.; Basset, C.; Dumas, C.; Renzo, F.D.; Robitzer, M.; Barakat, A.; Quignard, F. Reactive organosolv lignin extraction from wheat straw: Influence of Lewis acid catalysts on structural and chemical properties of lignins. *Industrial Crops and Products*. 2015, 65, 180-189.
- [30] Zhang, H.; Zhang, S.; Yuan, H.; Lyu, G.; Xie, J. FeCl₃-catalyzed ethanol pretreatment of sugarcane bagasse boosts sugar yields with low enzyme loadings and short hydrolysis time. *Bioresource Technology*. **2017**.
- [31] Silva, P. H. F. Fracionamento da biomassa lignocelulósica pelo processo organosolv. Universidade de Brasília (UNB), 2017.
- [32] Kondo, T.; *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Physics* **1997**, 35, 717.
- [33] Lopes, A. M. C.; João, K. G.; Rubik, D. F.; Bogel-lukasik, E.; Duarte, L. C.; Adreas, J.; Bogel-lukasik, R. Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation. *Bioresource Technology*. 2013, 142, 198–208.
- [34] Castillo, R. O.; Doumer, M. E.; Arízaga, G. G. C.; Hernández, A. D.; Hermosillo, C. G. Spectroscopic study of copper adsorption by chitosan and lignin composites containing layered double hydroxides. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*. **2018**, 226, 1-8.
- [35] Ranjan, A.; Singh, S.; Malani, R. S.; Moholkar, V. S. Ultrasound-assisted bioalcohol synthesis: review and analysis. *RSC Advances*. **2016**, 6, 65541–65562.
- [36] Putro, J. N.; Soetarejo, F. E.; Lin, S-Y.; JU, Y-H.; Ismadjl, S. Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances*. 2016, 6, 46834–46852.

[37] Cabral, M. M. S.; Abud, A. K. S.; Silva, C. E. F.; Almeida, R. M. R. G. Bioethanol production from coconut husk fiber. *Ciência Rural, Santa Maria*. **2016**, 46, 1872-1877.

[38] Rabelo, S. C. Avaliação E Otimização De Pré-Tratamentos E Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Para a Produção De Etanol De Segunda Geração. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2010.

[39] Soares, P. A.; Rossel, C. E. V. Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv. Nova Série ed. São Paulo, Brasil: NAIPE/USP, 2007. v. 3.

[40] Maldonade, I. R.; Carvalho, P. G. B.; Ferreira, N. A. Comunicado Técnico 85 Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. 2013.

[41] Santos, A. A., Deoti, R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U., & Alves, S. L. Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2017. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11315> (acessado em 27 de setembro de 2021).

[42] Vasconcelos, N. M. De; Pinto, G. A. S.; Aragão, F. A. De S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. 2013.

[43] Cabral, M. M. S.; Abud, A. K. De S.; Rocha, M. S. R. dos S.; Almeida, R. M. R. G.; Gomes, M. A.. Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos. *Engvista*, v. 19, n. 1, p. 99, 2017.

[44] Silva, F.V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. *Revista Liberato*. **2012**, 13, 43–58.

[45] Goldemberg, J. Atualidade e Perspectivas no Uso de Biomassa para Geração de Energia Current and Prospects in the Use of Biomass for Energy Generation. *Revista Virtual de Química - RVq*, v. 9, n. 1, p. 15–28, 2017.

[46] Bellido, C.; Bolado, S.; Coca, M.; Lucas, S.; González-Benito, G.; García-Cubero, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipites*. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 10868–10874.

[47] Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Wolfe, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. *NREL/TP-510-42621*, **2008**.

[48] Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. Determination of Ash in Biomass. *NREL/TP-510-42622*, **2008**.

[49] Santana, J. C. Abud, A. K. S.; Junior, A. W.; Navickiene, S.; Romão, L. P. C. Optimization of an organosolv method using glycerol with iron catalysts for the pretreatment of water hyacinth. *Biomass and Bioenergy*, v. 133, n. January, 2020.

[50] Santana, J. C.; Romao, L. P. C.; Abud, A. K. S.; Silva, A. C. M.; Wisniewski Junior, A. Pré-tratamento de biomassas pelo método organosolv com glicerol e FeCl_3 para obtenção de açúcares redutores e lignina, BR1020200232916, 13 de novembro de 2020.

[51] Adney, B.; Baker, J. Medição das atividades de celulase. *NREL/TP-510-42628*, 2008. <https://catalogue.nla.gov.au/Record/4391932> (acessado em 2 de agosto de 2021).

[52] Ghose, T.K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Applied Chemistry*, 1987, 59, 257-268.

[53] Bernfeld, P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, 1955, 1, 149-157.

[54] Hames, B.; Ruiz, R. Ruiz; Scarlata, C.; Sluiter, A.; Sluiter, J.; Templeton, D. Preparation of samples for compositional analysis. NREL/TP-510-42620, 2008. <https://catalogue.nla.gov.au/Record/4605759> (acessado em 2 de agosto de 2021).

[55] Zeferino, I. A. De M. Identificação de compostos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia Stipitis*. Lorena, SP: Universidade de São Paulo, 2013.