UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDO MARQUES PUTRINO

**Estudo da obtenção de açúcares redutores a partir de casca de coco
verde utilizando CO₂ supercrítico**

Pirassununga

2016

FERNANDO MARQUES PUTRINO

**Estudo da obtenção de açúcares redutores a partir de fibra de coco verde
utilizando CO₂ supercrítico**

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de
Oliveira

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P988e Putrino, Fernando Marques
Estudo da obtenção de açúcares redutores a partir
de fibra de coco verde utilizando CO2 supercrítico.
/ Fernando Marques Putrino ; orientadora Alessandra
Lopes de Oliveira. -- Pirassununga, 2016.
69 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. Casca de coco. 2. Resíduo lignocelulósico. 3.
Deslignificação. 4. Hidrólise enzimática. I.
Oliveira, Alessandra Lopes de , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a minha orientadora, Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira, que me orientou e instruiu em diversos projetos ao longo da graduação e pós-graduação;

Agradeço a minha mulher, companheira e doutoranda em alimentos que sempre me apoiou nos momentos fáceis e difíceis ao longo de todo o processo;

Agradeço aos meus pais, Inez e Orlando, e minhas irmãs Soraria e Sara, responsáveis por me fazer acreditar que o conhecimento nunca é demais;

Agradeço também à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos sem os quais esse projeto não seria possível.

Obrigado a todos que participaram desse trabalho!

“Muitas vezes as coisas que me pareceram verdadeiras quando comecei a concebê-las tornaram-se falsas quando quis colocá-las sobre o papel”

RENÉ DESCARTES

RESUMO

PUTRINO, F. M. **Estudo da obtenção de açúcares redutores a partir de fibra de coco verde utilizando CO₂ supercrítico.** 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A casca de coco verde (*Cocos Nucifera* L.) é um resíduo lignocelulósico amplamente disponível na região Nordeste do Brasil e de grande preocupação ambiental devido ao seu volume elevado. Mas, os materiais lignocelulósicos podem ser recursos renováveis e abundantes para obtenção de açúcares após passarem por hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose. Para uma eficiente hidrólise é necessário romper a rede lignocelulósica que circunda fisicamente as fibras de celulose dificultando contato entre celulose e enzima. Os tratamentos tradicionais de deslignificação que empregam condições drásticas de temperatura e pH levam à formação de alguns compostos que limitam o uso desses hidrolisados em processos biotecnológicos pois inibem a ação microbiana. O tratamento com CO₂ supercrítico pode ser operado em condições amenas de pH e temperatura evitando o problema da formação destes inibidores. Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi a obtenção de açúcares redutores a partir da fibra da casca do coco verde por meio de hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com CO₂ em condições supercríticas. Foram estudadas sete condições de extração em que se variou o tempo de contato do CO₂ com a fibra de coco (3 e 5 horas), modificador de polaridade (NaOH, NaHSO₄ e etanol) e manteve-se constante a extração dinâmica por 1 hora seguida de despressurização rápida no final do processo. A eficiência da extração com CO₂ supercrítico para deslignificação da fibra de coco verde foi baseada na caracterização da fibra pela composição lignocelulósica, imagens de microscopia eletrônica de varredura e análise qualitativa da composição lignocelulósica por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e a quantificação de açúcares redutores. A fibra de coco apresentou teores de lignina, celulose e hemicelulose de 26,66, 46,37 e 16,18 g/100g de fibra de coco verde seca, respectivamente. Para hidrólise enzimática utilizou-se uma enzima comercial composta de três enzimas principais: celulasas, hemicelulasas e β -glucosidases em dois tempos de hidrólise (24 e 72 h) e duas concentrações enzimáticas (6 e 30g de enzima/g de celulose total no substrato) para que fossem avaliadas as situações de aplicação comercial e condições de rendimento máximo. O tratamento com CO₂ supercrítico provocou alterações na estrutura física e química da fibra, aumentando a porosidade e diminuindo o teor de compostos fenólicos e ceras e também afrouxamento das ligações de hidrogênio caracterizando a deslignificação da fibra de coco verde. No entanto, a extração com CO₂ supercrítico não causou aumento significativo da obtenção de açúcares redutores após hidrólise enzimática da fibra de coco. A hidrólise enzimática realizada em 72h gerou aumento em até 134% no teor de açúcares redutores em relação a hidrólise com 24h de reação para a mesma concentração enzimática (30%). A hidrólise enzimática (72h e 30% de enzima) da fibra de coco verde *in natura* apresentou bons valores de açúcares redutores (532,27 μ mol de glicose/g de fibra de coco seca), podendo ser uma nova utilização para o material lignocelulósico do coco verde que é subaproveitado. Os açúcares redutores obtidos da fibra de coco verde *in natura* podem passar por processo de purificação e isolamento de algum açúcar de interesse econômico ou ser utilizado em processos que açúcares redutores são necessários como substrato para fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* na produção de álcool, por exemplo.

Palavras Chave: casca de coco, resíduo lignocelulósico, deslignificação, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

PUTRINO, F. M. **Study of the reducing sugars obtainment from coconut fiber using supercritical CO₂**. 2016. 71 f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The coconut husk (*Cocos nucifera* L.) is a lignocellulosic byproduct widely available in the Brazilian Northeast region and due its high volume is a reason of huge environmental concern. But the lignocellulosic materials are renewable and abundant resources of sugars after submitted to enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose. For efficient hydrolysis is necessary to break the lignocellulosic netting that physically surrounds the cellulose fibers hindering contact between the enzyme and cellulose. The traditional delignification treatment employing drastic conditions of temperature and pH lead to the formation and release of some compounds that limit the hydrolysates use in biotechnological processes since it inhibits microbial action. The treatment with supercritical CO₂ can be operated at lower temperatures avoiding inhibitors formation. Therefore, the aim of this study was to obtain reducing sugars from the husk coconut fiber through enzymatic hydrolysis of pretreated fiber with CO₂ in supercritical conditions. Seven extraction conditions were studied varying the CO₂ contact time with the coconut fiber (3 and 5 hours), polarity modifier (NaOH, NaHSO₄ and ethanol) and maintaining as constants the dynamic extraction time (1 hour) and rapid depressurization at the end of process. The efficiency of extraction with supercritical CO₂ to green coconut fiber delignification was based on the characterization of the fiber by the lignocellulosic composition, images of scanning electron microscopy and qualitative analysis of lignocellulosic composition spectroscopy infrared with Fourier transform and quantification of reducing sugars. Green coconut fiber presents lignin, cellulose and hemicellulose contents of 26.66, 46.37 and 16.18 g/100 g of dry coconut fiber, respectively. For enzymatic hydrolysis used a commercial enzyme composed of three major enzymes: cellulase, hemicellulase and β -glucosidases in two hydrolysis time (24 h and 72) and two enzymatic concentrations (6 and 30 g enzyme / g cellulose in total substrate) to be evaluated situations of commercial application and conditions de maximum yield. Treatment with supercritical CO₂ caused changes in the physical and chemical structure of the fiber, increasing the porosity and decreasing the level of phenolic compounds, waxes and hydrogen bonds attenuation causing the delignification of coconut fiber. However, extraction with supercritical CO₂ didn't significant increase reducing sugars fiber contents after enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysis performed in 72h caused up to 134% increase in reducing sugars compared to smaller hydrolysis time (24) for enzyme concentration of 30%. In general, enzymatic hydrolysis (72 hours and 30% of enzyme) of natural coconut fiber showed good values of reducing sugars (532,27 μ mol glucose/g de dry coconut fiber) and may be used as a new lignocellulosic material from coconut which is underused. Reducing sugars obtained from natural coconut fiber can pass through purification process of purification of some sugar of interest economic or be used in processes that reducing sugars are necessary as a substrate for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, as example in alcohol production.

Keywords: coconut husk, lignocellulosic waste, delignification, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micronutrientes presentes na casca de coco-verde.	15
Tabela 2 - Açúcares presentes na casca de coco (% total).	15
Tabela 3 - Principais aplicações para a casca de coco verde.	16
Tabela 4 - Condições da extração supercrítica de diferentes tratamentos de fibra de coco.	32
Tabela 5 - pH das amostras de fibra de coco verde.	39
Tabela 6 - Umidade das amostras de fibra de coco verde.	40
Tabela 7 - Composição lignocelulósica da fibra de coco natural e tratada com CO ₂ supercrítico. Resultados expresso em g /100g de fibra de coco verde seca.	48
Tabela 8 - Teor dos principais açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde (FCV) seca obtido por Cromatografia de Alta Eficiência. Os valores foram expressos em g/100g de fibra de coco verde seca.	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - (a) <i>Cocos nucifera</i> L. (b) Estrutura do coco.....	14
Figura 2 - Cadeias de celulose rodeados por hemicelulose e lignina.	19
Figura 3 - As reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.	21
Figura 4 - Diagrama de fases do dióxido de carbono.	22
Figura 5 - Diagrama de uma planta piloto de extração com fluido supercrítico equipada com duas células de fracionamento. (1) Bomba de CO ₂ ; (2) Bomba de modificador; (3) extração de amostras de células sólida; (4) Células de fraccionamento; (5) Células de fraccionamento; (5) Células de fraccionamento; (6) Válvula.	24
Figura 6 - Hidrólise enzimática sofrida pela Celulose.....	26
Figura 7 - Hidrólise enzimática sofrida pela hemicelulose.....	27
Figura 8 - Fluxograma operacional da etapa de produção de fibra de coco verde.....	28
Figura 9 - Fluxograma de metodologia resumida das atividades desenvolvidas nesse trabalho.	30
Figura 10 - Extrator supercrítico do Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP).	31
Figura 11 - Imagens capturadas com microscópio (SZX7; Olympus, Tóquio, JP) com câmera acoplada (U-TVO. 5XC-3, JP) utilizando aumento de 0,8 vezes da fibra de coco verde natural (Controle) e tratados com CO ₂ supercrítico (ensaios 1 ao 7).....	41
Figura 12 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco natural utilizando-se um microscópio TM300 (Hitachi, JP) com 500 vezes de aumento.....	42
Figura 13 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde tratada com CO ₂ supercrítico sem uso de modificador de polaridade, sendo (a) Ensaio 1: 3 h de contato; (b) Ensaio 2: 5 h de contato.	43
Figura 14 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde em contato com CO ₂ supercrítico utilizando-se NaOH (0,25 M) como modificador de polaridade, sendo (a) Ensaio 3: 3 horas de contato e relação fibra: modificador de polaridade de 33:67; (b) Ensaio 4: 5 h de contato e relação fibra: modificador de polaridade de 60:40; (c) Ensaio 5: 3 h de contato com relação fibra: modificador de polaridade de 60:40.	45
Figura 15 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde submetida ao ensaio 6: extração com CO ₂ supercrítico com 5 h de contato, etanol 50% como modificador de polaridade e relação fibra: modificador de polaridade de 56:44.	46

Figura 16 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde que passou pelo tratamento 7: extração com CO ₂ supercrítico, 3 h de contato, NaHSO ₄ (0,1%) como modificador de polaridade com relação fibra: modificador de polaridade de 60:40.....	47
Figura 17 - Espectro de absorção da fibra de coco natural (Controle) e tratado com CO ₂ supercrítico.....	50
Figura 18 - Atividade enzimática da celulase expressa em U/g de celulose em duas concentrações diferentes de enzima (6 e 30 g de enzima/100 gramas de celulose).	52
Figura 19 - Atividade enzimática da xilanase expressa em U/g de xilana em duas concentrações diferentes de enzima (6 e 30 g de enzima/100 gramas de xilana).	53
Figura 20 - Atividade enzimática da β-glucosidases expressa em U/g de p-nitrophenyl- β-D-glucopyranoside em duas concentrações diferentes de enzima (6 e 30 g de enzima/100 gramas de p-nitrophenyl- β-D-glucopyranoside).	53
Figura 21 - Açúcares redutores obtidos após hidrólise enzimática de 72 horas da fibra de coco verde natural (controle) e tratada com CO ₂ supercrítico em sete condições diferentes.	55
Figura 22 - Açúcares redutores obtidos da hidrólise enzimática de 24 horas da fibra de coco verde natural (controle) e tratada com CO ₂ supercrítico em sete condições diferentes.	56
Figura 23 - Açúcares redutores da fibra de coco verde natural e tratada com CO ₂ supercrítico em sete condições diferentes antes da lavagem das mesmas.	56
Figura 24 - Cromatograma obtido dos padrões de açúcares quantificados (frutose, glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, xilose e manose).....	59
Figura 25 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde controle.	60
Figura 26 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde do ensaio 2.....	60
Figura 27 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde do ensaio 4.....	61
Figura 28 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde controle do ensaio 7.	61

SUMÁRIO

1.	Introdução	11
2.	Objetivos.....	13
2.1.	Objetivo geral.....	13
2.2.	Objetivos Específicos	13
3.	Revisão Bibliográfica	14
3.1.	Casca de coco.....	14
3.2.	Pré tratamento: Deslignificação de fibras.....	19
3.3.	Extração com Fluido Supercrítico.....	22
3.4.	Processos biotecnológicos - Tratamento enzimáticos	26
4.	Materiais e Métodos	28
4.1.	Materiais	28
4.2.	Métodos	29
4.2.1.	Fluxograma de metodologia de pesquisa.....	29
4.2.2.	Ruptura da parede lignocelulósica usando CO ₂ em estado supercrítico (SFE)	29
4.3.	Caracterização da fibra de coco verde.....	32
4.3.1.	Determinação de pH.....	32
4.3.2.	Determinação da umidade	33
4.3.3.	Morfologia	33
4.3.4.	Determinação de lignina, celulose e hemicelulose	33
4.3.5.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	34
4.3.6.	Determinação de açúcares redutores	35
4.3.7.	Atividade Enzimática	35
4.3.8.	Hidrólise enzimática.....	37
4.3.9.	Quantificação de açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)	37

	10
4.3.10. Análise Estatística	38
5. Resultados e Discussão.....	39
5.1. Caracterização da casca de coco verde.....	39
5.1.1. Determinação de pH.....	39
5.1.2. Determinação de umidade	40
5.1.3. Morfologia	40
5.1.4. Determinação de lignina, celulose e hemicelulose.....	48
5.1.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	49
5.2. Atividade Enzimática	52
5.3. Hidrólise enzimática e obtenção de açúcares redutores da fibra de coco verde pré-tratada com CO ₂ supercrítico	54
5.4. Quantificação de açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde por Cromatografia de Alta eficiência (CLAE)	59
6. Conclusão.....	63
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	64
8. Referências.....	65

1. Introdução

Dentre os resíduos agroindustriais, o resíduo lignocelulósico tem sido subaproveitado devido ao desconhecimento ou inexistência de tecnologias disponíveis para serem prontamente aplicadas (SANTOS *et al.*, 2011).

A casca de coco verde, por exemplo, é um resíduo lignocelulósico amplamente disponível na região Nordeste do Brasil, mas sem utilizações que agreguem valor ao resíduo (OLIVEIRA, 2010). O resíduo da casca de coco verde gera problemas ao serviço de limpeza pública devido ao seu volume e dificuldade de decomposição, entretanto deste pode ser obtido a fibra da casca de coco verde que poderia ser aproveitada em diversas áreas (CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA, 2002). O desenvolvimento de alternativas de aproveitamento da casca de coco verde possibilita a redução da disposição de resíduos sólidos em aterros sanitários e proporciona uma nova opção de rendimento junto aos sítios de produção (ROSA *et al.*, 2002).

Os materiais lignocelulósicos são recursos renováveis abundantes e podem ser utilizados como substrato para a bioconversão em açúcares, que podem ser utilizados como matéria-prima em outros processos como produção de álcool. Para obtenção enzimática dos açúcares a partir da celulose é necessário a quebra de rede lignocelulósica que circunda fisicamente as fibras de celulose dificultando contato entre celulose e enzima (SANTOS; KAWASI; COELHO, 2011).

Tradicionalmente, os tratamentos para quebra da rede lignocelulósica envolvem condições drástica de temperatura e pH. No entanto, tratamentos com elevada temperatura ou sob condições ácidas levam à formação e liberação de alguns compostos (ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos) capazes de limitar a utilização dos hidrolisados para produção de etanol por fermentação (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Para o fim específico de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, o CO₂ supercrítico tem sido utilizado como uma alternativa interessante aos tratamentos tradicionais para deslignificação e maior exposição da celulose para facilitar o ataque enzimático e obter melhores rendimentos de açúcares. O pré-tratamento com CO₂ supercrítico pode ser operado a temperaturas mais baixas em relação aos tratamentos térmicos, assim eliminando o problema da formação de inibidores, dos tratamentos tradicionais, com a degradação da hemicelulose e lignina (SANTOS; KAWASI; COELHO, 2011).

O emprego da tecnologia de extração com CO₂ supercrítico no pré-tratamento da casca de coco verde pode se tornar uma tecnologia alternativa para viabilização da obtenção de açúcares fermentáveis, os quais poderão ser destinados a aplicações como produção de etanol importante para substituição dos combustíveis fósseis, além de diminuir a geração de resíduo sólido.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi a obtenção de açúcares redutores a partir da fibra da casca do coco verde por meio de hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com CO₂ em condições supercríticas para rompimento da parede lignocelulósica da mesma.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- ✓ Identificar o efeito que o tratamento com CO₂ supercrítico provocou na morfologia e na composição química da fibra;
- ✓ Avaliar se o contato com CO₂ em estado supercrítico apresentou efeito satisfatório no rompimento da parede lignocelulósica da casca de coco verde (*Cocos nucifera*);
- ✓ Estudar parâmetros de hidrólise enzimática da fibra de coco pré tratada;
- ✓ Quantificar a presença de açúcares redutores após o tratamento enzimático na fibra de coco tratada com CO₂ supercrítico.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Casca de coco

O coqueiro, *Cocos nucifera* L., (Figura 1a) é uma palmeira tropical amplamente distribuída em toda a Ásia, África, América Latina e região do Pacífico. O seu fruto, o coco, apresenta 300 a 450 mm de comprimento e 150 a 200 mm de diâmetro e é composto pelo epicarpo que recobre a camada fibrosa (mesocarpo) e abriga em seu interior o endosperma sólido (1-2 cm) branco e oleoso e uma grande cavidade parcialmente cheia com água de coco (endosperma líquido) (Figura 1b) (LEON; DELORES, 2004).

O Brasil está entre os cinco maiores produtores de coco, *Cocos nucifera* L., do mundo. No ano de 2013, a produção mundial de coco foi de 62,45 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 2,89 milhões de toneladas dessa produção (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2015).

Figura 1 - (a) *Cocos nucifera* L. (b) Estrutura do coco.

Fonte: VARGAS RAMOS, V. H. A. W. M. D. et al. **Sistema de produção de mudas de coqueiras híbrido e anão (*Cocos nucifera* L.) na região do Distrito Federal**. Planaltina, DF: Embrapa, 2005. p. 1-4. MATTOS, A. L. A. et al. **Beneficiamento da casca de coco verde**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 37 p. (Apostila).

A produção de coco é destinada majoritariamente em seu estágio final de maturação (10 a 11 meses) pela indústria de leite de coco e coco ralado e uma parte menor, mas considerável, dessa produção é direcionada para o consumo do coco *in natura* na forma de água de coco ou para produção de água de coco industrializada, em que o coco é utilizado com cerca de 6-8 meses de idade (BRIGIDA *et al.*, 2010).

Atualmente, o aproveitamento da fibra de coco é utilizado em materiais de baixo valor agregado como na manufatura de colchões de mola, estofamentos de carros, almofadas devido a elasticidade e resistência das fibras, que impregnada com o látex, forma a fibra emborrachada. Outras utilizações são na fabricação de encosto de cabeça, pára-sol-interno, bancos de carros, móveis e decoração de casas e produção de coxim que substitui o xaxim, amplamente utilizado na jardinagem (ARAGÃO; SANTOS; ARAGÃO, 2005).

A fibra é o nome dado ao material fibroso que constitui o mesocarpo do fruto. Para obtenção da fibra, as cascas de coco passam por uma máquina que possui um rolo de facas fixas responsáveis pelo esmagamento da parte fibrosa do fruto e, então, o material triturado é transportado para uma prensa rotativa horizontal, que extrai o excesso de líquido e seguem para uma máquina selecionadora, que utiliza marteletes fixos helicoidais e uma chapa perfurada para separação da fibra e do pó de coco, que correspondem a 30% e 70% respectivamente do produto final (MATTOS *et al.*, 2011).

A casca de coco verde é rica em micronutrientes (Tabela 1) e açúcares (Tabela 2) e sua fibra do coco apresenta porcentagem de lignina de 35% a 45%; de celulose de 23% a 43% e de hemicelulose de 3% a 12% (ARAGÃO; SANTOS; ARAGÃO, 2005).

Tabela 1 - Micronutrientes presentes na casca de coco-verde.

N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
(g/kg)						(mg/kg)			
6,52	1,42	11,5	6,80	1,79	12,5	1973,0	6,6	31,8	23,3

Fonte: ROSA, M. D. F. et al. **Utilização da casca de coco como substrato agrícola**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 24 p.

Tabela 2 - Açúcares presentes na casca de coco (% total).

Açúcar	Casca do coco	Fibra do coco
D-glucose	25,91	34,87
L-arabinose	0,29	0,05
L-galactose	0,32	0,36
L-Rhamose	0,21	0,16
D-xylose	23,93	16,98
D-mannose	0	0,12

Fonte: HAN, J. S. Properties of nonwood fibers. In: NORTH AMERICAN NONWOOD SYMPOSIUM, Atlanta, 1998. **Proceedings...** Atlanta: USDA, 1998. Disponível em: <<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1998/han98a.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

Devido sua rica composição, a casca de coco verde e seus derivados (endocarpo, fibra e mesocarpo) podem ser utilizadas em diversas áreas, desde agronomia até processos biotecnológicos (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais aplicações para a casca de coco verde.

Fonte	Aplicação	Referência
Casca de coco verde	Matéria-prima para produção de xilanase, protease, carboximetilcelulase e poligalacturonase mediante a fermentação com <i>Aspergillus niger</i>	COELHO <i>et al.</i> (2001)
Substrato agrícola da fibra de coco verde	Efeito positivo na produção de tomate em casa de vegetação	CARRIJO; LIZ; MAKISHIMA (2002)
Fibra de coco verde	Apoio para imobilização da enzima α -amilase <i>Bacillus circulans</i> GRS 313 por adsorção	DEY, NAGPAL; BANERJEE (2002)
Casca de coco verde	Extração de taninos	(BRÍGIDA; ROSA, 2003)
Pó de coco seco e verde	Bom substrato para aclimatização de violeta africana	(NETO <i>et al.</i> , 2004)
Folha e mesocarpo	Extração de metabólitos fenólicos	(DEY, CHAKRABORTY; MITRA, 2005)
Fibra de coco	Reforço de compósitos poliméricos.	(CORRADINI <i>et al.</i> , 2006)
Fibra de coco verde	Imobilização covalente <i>Candida antarctica</i> lipase tipo B	BRIGIDA <i>et al.</i> (2007)
Casca de coco	Substrato para a produção de bioetanol	(VAITHANOMSAT <i>et al.</i> , 2011) (GONCALVES <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Própria autoria.

3.1.1. Aplicações agronômicas

Os derivados da casca de coco pode ter aplicação na agricultura e esse emprego já foi estudado por alguns autores. Carrijo, Liz e Makishima (2002) observaram que a utilização de substrato agrícola da fibra de coco verde teve efeito positivo na produção de tomate em casa de vegetação (estufa), e alcançou uma produção de 13,2 kg/m² de frutos ao longo de três anos, valor 7,3% maior do que o obtido quando utilizou-se pó de serra, outro substrato testado também com bom desempenho.

Neto *et al.* (2004) verificaram que o pó de coco seco e verde, bem como outros substratos estudados melhoram o desempenho da fase de aclimação de violeta africana, etapa importante na produção de flores e plantas ornamentais em que as mudas são retiradas do meio de cultivo e transferidas para recipientes contendo substratos.

3.1.2. Aplicações biotecnológicas

Os sub produtos da produção de coco verde também tem aplicação biotecnológica.

Coelho *et al.* (2001) demonstraram que é tecnicamente viável a produção de enzimas (xilanase, protease, carboximetilcelulase, poligalacturonase) mediante a fermentação semi-sólida utilizando a casca de coco verde como matéria-prima e inoculação de *Aspergillus niger*, sendo a produção enzimática máxima na faixa de 24 a 96 horas coerente com o tempo de produção industrial.

A imobilização de enzimas é uma tecnica importante que permite o reuso de enzimas. Estando imobilizada, a atividade enzimática pode ser interrompida apenas removendo a enzima, diferentemente de quando estão dissolvidas. Neste caso, para interromper a atividade enzimática é necessário a desnaturação da enzima (mudança de pH, concentração de sal) não sendo possível a reutilização (MESSING, 1975).

Dey, Nagpal e Banerjee (2002) verificaram que a fibra de coco pode ser utilizada como apoio para imobilização da enzima α -amilase do *Bacillus circulans* GRS 313 por adsorção mantendo 90% da sua atividade inicial por até três ciclos, permitindo a reutilização em processos industriais.

Brigida *et al.* (2007) verificaram em estudos de estabilidade a 60°C que a imobilização covalente de lipase do tipo B de *Candida antarctica* na fibra de coco verde a pH 10,0 tornou-a 363 vezes mais estável do que a enzima solúvel e 5,4 vezes mais estável em pH 7,0.

Vaithanomsat *et al.* (2011) demonstraram alta produtividade de álcool a partir da casca de coco. Os autores utilizaram solução de hidróxido de sódio para pré-tratamento seguida de hidrólise enzimática da celulose (Celluclast e Novozyme 188) e fermentação alcoólica pela

levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e obtiveram rendimento de etanol de 21,21% para hidrólise e fermentação em separado e 20,67% para sacarificação e fermentação simultânea.

Gonçalves *et al.* (2015) também desenvolveram um processo eficiente para a produção de bioetanol a partir da casca de coco verde. Os autores realizaram o pré-tratamento de hidrólise no material lignocelulósico seguido de hidrólise enzimática (Cellic CTEC 2 contendo celulases, hemicelulases e β -glucosidase e HTEC 2 contendo hemicelulases (endoxilase) e obtiveram 92,52% de conversão em glicose e 90,09% de rendimento de etanol obtidos por fermentação de *S. cerevisiae* utilizando processo de sacarificação e fermentação semi-simultânea.

3.1.3. Outras aplicações

A viabilidade técnica de processos de extração de compostos de interesse econômico da fibra de coco contribui para minimizar os impactos ambientais relacionados a grande geração desse resíduo sólido. Brígida e Rosa (2003) verificaram que a casca de coco verde pode ser utilizada como fonte de taninos com teor em base seca de, aproximadamente, 6,03%. Dey, Chakraborty e Mitra (2005) também verificaram que a casca de coco verde pode ser fonte de metabólitos fenólicos de hidroxicinamato (C6-C3)- e hidroxibenzoato (C6-C1)- e encontraram na folha e mesocarpo do coco principalmente ácido 4-hidroxibenzóico além de ácido ferúlico, ácido 4-cumárico, 4-hidroxibenzaldeído e ácido vanílico.

Corradini *et al.* (2006) estudaram a aplicação da fibra de coco em materiais termoplásticos naturais para melhorar suas propriedades, pois apesar de sua biodegradabilidade, disponibilidade e baixo custo estes apresentam elevada afinidade aquosa e baixa resistência mecânica. Segundo os autores a incorporação da fibra de coco em matrizes poliméricas de glúten/amido/glicerol aumentou ligeiramente a hidrofobicidade e reforçou mecanicamente a mesma.

3.2. Pré tratamento: Deslignificação de fibras

Uma das principais aplicações da casca de coco verde é o emprego biotecnológico para obtenção de açúcares a partir da hidrólise enzimática da celulose. Para que seja possível uma eficiente hidrólise enzimática da celulose é indispensável um pré-tratamento para promover o rompimento da biomassa lignocelulósica.

Em plantas, a biomassa lignocelulósica (Figura 2) é formada por um complexo cristalino resistente ao ataque enzimático e insolúvel em água que é constituída por celulose, hemicelulose e lignina em que suas moléculas são mantidas juntas por ligação covalente, várias pontes intermoleculares e forças de van der Waals (SCHACHT; ZETZL; BRUNNER, 2008).

Figura 2 - Cadeias de celulose rodeados por hemicelulose e lignina.

Fonte: DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 259-276, Mar. 2011.

A celulose é um polímero linear que consiste em moléculas de glicose ligadas por ligação glicosídica β 1,4. A hemicelulose consiste de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos de açúcar, com concentrações diferentes, dependendo do tipo de substrato. A lignina é um polímero composto complexo, aromático consistindo de

unidades de p-hidroxifenil propano, que estão ligados por pontes C-C e C-O-C (SCHACHT; ZETZL; BRUNNER, 2008).

Na estrutura da lignocelulose, as fibras de celulose estão imersas em uma matriz de polissacarídeo e lignina. Sua estrutura é complexa, heterogênea e recalcitrante e, portanto, na sua forma *in natura* é resistente à hidrólise enzimática (SAHA, 2005). Portanto, as fibras devem passar por pré-tratamento com a finalidade de aumentar a permeabilidade do material para posterior hidrólise (SANTOS *et al.*, 2011).

Várias opções de pré-tratamento foram estudadas ao longo dos anos para processo de deslignificação como pré-tratamento físicos (fragmentação mecânica, pirólise, pré-tratamento a vapor, explosão a vapor), químicos (pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino, com dióxido de enxofre), biológico (digestão enzimática) e físico químicos (oxidação úmida, irradiação por micro-ondas, explosão de amônia, água quente líquida) e muitas vezes o pré-tratamento tem sido uma das etapas de processamento mais caras na conversão da biomassa celulósica em açúcares fermentáveis (SINGH *et al.*, 2014).

Durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos pode haver formação de compostos capazes de inibir a ação de microorganismos, como ácidos fracos, derivados de furanos e compostos fenólicos, os quais podem limitar a utilização destes para produção de etanol por fermentação, por exemplo (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). A Figura 3 ilustra o processo de formação desses compostos. Com a degradação da hemicelulose são liberados xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose. A hidrólise da celulose libera glucose e em alta temperatura e pressão xilose é degradada em furfural. Da mesma forma, hidroximetil furfural é formado a partir da degradação de hexose. O Ácido fórmico é formado quando o furfural e hidroximetil furfural são decompostos e ácido levulínico é formado por degradação de hidroximetil furfural. Os compostos fenólicos são gerados a partir de desagregação parcial da lignina (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Na escolha do pré-tratamento utilizado para promover a deslignificação da fibra natural é necessário levar em conta processos que reduzam a demanda de energia, minimize os custos e evitem a formação de produtos de decomposição que possam inibir outros passos do processo (SCHACHT; ZETZL; BRUNNER, 2008).

O tratamento com dióxido de carbono supercrítico representa uma alternativa interessante de pré-tratamento para deslignificar a fibra e facilitar a acessibilidade ao substrato pelas enzimas. Outra vantagem em relação aos métodos já conhecidos, é que pode ser operado em condições de temperaturas mais baixas em comparação com tratamentos térmicos, eliminando assim o problema da formação de compostos da degradação da hemicelulose e lignina que podem ser inibidores da hidrólise enzimática (SANTOS; KAWASI, COELHO, 2011).

Figura 3 - As reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Fonte: PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 25-33, Aug. 2000.

3.3. Extração com Fluido Supercrítico

Nos últimos anos cresceu muito o número de estudos envolvendo a tecnologia de extração com fluido supercrítico (EFS). O notável interesse da comunidade científica sobre esta tecnologia tem sido impulsionado pela grande versatilidade do dióxido de carbono, o solvente mais utilizado em processos supercríticos, cujas propriedades podem ser ajustadas a fim de fornecer extratos com composições desejáveis (melhor seletividade), ao mesmo tempo que garante o processo de separação seguro para a saúde humana e para o meio ambiente (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014).

A Figura 4 é um diagrama de fases para o CO_2 , suas curvas caracterizam as temperaturas e pressões às quais duas fases coexistem em equilíbrio. A curva de equilíbrio líquido-gás termina em um ponto importante, o chamado ponto crítico. Este ponto é demarcado pela temperatura crítica e pressão crítica da substância. Para além do ponto crítico, não há mais nenhuma curva de equilíbrio que divide a região líquida e a gasosa; assim, as fases líquida e gasosa já não são distinguíveis. Esta região do diagrama de fases é chamada de região de fluido supercrítico (DOANE-WEIDEMAN; LIESCHESKI, 2004).

Figura 4 - Diagrama de fases do dióxido de carbono.

Fonte: DOANE-WEIDEMAN, T.; LIESCHESKI, P. B. Analytical supercritical fluid extraction for food applications. **Oil Extraction and Analysis: Critical Issues and Comparative Studies**, p. 69-99, 2004. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223875700005 >.

Comparado com solventes orgânicos, a extração utilizando fluidos supercríticos oferece várias vantagens, especialmente quando o CO₂ supercrítico é utilizado, pois este possui baixa toxicidade, é ambientalmente amigável, barato e suas condições críticas de temperatura e pressão são bastante moderadas ($T_{crítica} = 31^{\circ}\text{C}$, $P_{crítica} = 73,8 \text{ bar}$). A sua capacidade de solvente pode ser modificada variando a pressão e temperatura, de modo que o soluto pode ser facilmente separado após a extração por simples redução da pressão (ASSMANN *et al.*, 2013).

As principais aplicações da extração com fluido supercrítico estão na indústria de alimentos e farmacêutica, onde representa um solvente alternativo relativamente barato para extrair uma vasta gama de compostos, como aromas, vitaminas e óleos (ASSMANN *et al.*, 2013). Em geral, compostos apolares são solúveis em CO₂ supercrítico, já a solubilidade de substâncias polares, pode ser melhorada com uma pequena adição de etanol ou outro solvente que possa agir como modificador de polaridade (DOANE-WEIDEMAN; LIESCHESKI, 2004).

Dentre as diversas aplicações do fluido supercrítico, o emprego mais comum é a extração de materiais sólidos, especialmente produtos alimentares (café, chá, gema de ovo em pó com baixo teor de gordura e livre de colesterol, etc.) e ingredientes e suplementos alimentares (lúpulo, aromas para bebidas, aromas e fragrâncias, corantes e carotenóides, extratos ricos em vitamina, óleos de alta qualidade e lipídios, etc.), inseticidas naturais (*Neem*, *Pyrethrum*) e muitos nutra fármacos e fitofármacos (PERRUT, 2004).

Basicamente, um sistema de extração de fluido supercrítico em escala piloto (Figura 5) é constituído por uma bomba de solvente, que distribui fluido em todo o sistema, uma bomba de modificador, se necessário, uma célula de extração ou coluna de extração, para sólidos ou líquidos, respectivamente, e um ou mais separadores (também chamada célula de fracionamento), em que o extrato é recolhido e o solvente é despressurizado. Da mesma forma, célula ou coluna de extração e os separadores são comumente equipado com controle independente da temperatura e de pressão, de tal maneira que o fracionamento dos compostos extraídos pode ser realizado por despressurização gradual. Consecutivamente, compostos diferentes podem ser obtidos dentro de cada separador, em função da sua solubilidade diferencial no fluido supercrítico (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

Figura 5 - Diagrama de uma planta piloto de extração com fluido supercrítico equipada com duas células de fracionamento. (1) Bomba de CO₂; (2) Bomba de modificador; (3) extração de amostras de células sólida; (4) Células de fraccionamento; (5) Células de fraccionamento; (5) Células de fraccionamento; (6) Válvula.

Fonte: HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

3.3.1. Fluido supercrítico no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Alguns trabalhos indicam que o dióxido de carbono supercrítico é eficaz para o pré-tratamento de rompimento da biomassa lignocelulósica de fontes vegetais.

Zheng, Lin e Tsao (1998) verificaram que após manterem materiais celulósicos em um reator sob dióxido de carbono pressurizado a 35°C e promoverem rápida despressurização do sistema promove-se a ruptura da estrutura celulósica aumentando a área de superfície acessível à hidrólise enzimática. Segundo os autores esse pré-tratamento foi capaz de aumentar a taxa de hidrólise do material celulósico melhorando o rendimento de glicose em até 50% e consequentemente aumentando a quantidade de carbono disponível para fermentação e produção de etanol. Portanto, este pode ser método alternativo mais vantajoso e barato comparado ao amoníaco e explosão de vapor, pois é operado em baixa temperatura e não causa a degradação dos açúcares.

Pasquini et al. (2005) testaram o uso de co-solventes (1-butanol /água) na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar com emprego de CO₂ em condições sub e supercríticas variando-se os parâmetros de temperatura (150 e 190 ° C), pressão (7 e 23 MPa), conteúdo de 1-butanol (60 e 90 %, v / v) e tempo de reação (45 e 105 min). O grau de deslignificação superior (94,5%) foi obtido a 7 MPa, 190 ° C, 105 minutos e 60 % de 1-butanol na mistura de co-solvente.

Recentemente, Santos, Kawase e Coelho (2011) verificaram aumento no rendimento de glicose na sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar que passou por pré-tratamento com CO₂ supercrítico em comparação ao bagaço *in natura*. O bagaço tratado com CO₂ supercrítico nas condições de pressão de 12 MPa em diferentes intervalos de tempo 5 e 60 minutos causou aumento no rendimento da glicose em 40 e 30 %, respectivamente, e o tratamento com pressão de 14 MPa por 5 e 60 minutos causou aumento em 13,39 e 62 %. Todos ensaios foram realizados em temperatura constante de 60°C. O uso de extração supercrítica (16 MPa, 60 min) em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH (100°C por 60 min) em pressão atmosférica, também melhorou em 20 % o rendimento de glicose do que o mesmo tratamento sem o tratamento posterior com fluido supercrítico. Segundo os autores, a explosão causada pela rápida despressurização do sistema provoca ruptura da lignina, o que facilita a ação dos agentes de hidrólise.

Levando em conta os resultados obtidos por Santos, Kawase e Coelho (2011), alguns trabalhos preliminares realizados no LTAPPN da FZEA/USP indicaram que o uso de CO₂ em estado sub e supercrítico utilizando NaOH diluído como modificador de polaridade propiciou a deslignificação do bagaço de cana de açúcar (Melo et al., 2012).

Além disso, o emprego de CO₂ no estado supercrítico também é relevante para separação dos produtos. Santos *et al.* (2011) estudaram o emprego da tecnologia supercrítica na separação de xilose e xilitol, pois em processos biotecnológicos, a separação, recuperação e purificação podem alcançar até 80 % do custo final do produto. A mistura de xilose e xilitol foi obtida pela fermentação da xilose (presente na fração hemicelulósica da cana de açúcar hidrolisada quimicamente com H₂SO₄ a 121°C) à xilitol. Através do uso da tecnologia supercrítica foram alcançados bons valores de extração de xilose com a utilização de etanol (co-solvente) adicionada ao CO₂ supercrítico (solvente) a 6,42 % (m/m). A extração de xilose e de retenção de xilitol do meio fermentado alcançou valores da ordem de 48 e 98%, respectivamente, demonstrando a potencialidade de separação destes compostos por esta tecnologia.

3.4. Processos biotecnológicos - Tratamento enzimáticos

Atualmente, a degradação da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis representa desafios técnicos e econômicos significativos, e o seu êxito depende em grande medida do desenvolvimento de enzimas altamente eficientes e eficazes em termos de custos para a conversão de substratos lignocelulósicos previamente tratados em açúcares fermentáveis.

Após o emprego de um pré-tratamento eficiente que promove a deslignificação da fibra, é necessário o processo tecnológico para hidrólise da celulose e hemicelulose através de celulasas e hemicelulasas.

Hidrólise enzimática completa de celulose requer ação sinérgica de três principais tipos de atividades enzimáticas: as endoglucanases, exoglucanases (incluindo cellodextrinases e celobiohidrolases), e β -glucosidases (Figura 6). As endoglucanases atuam na celulose não-cristalina ou em suas regiões amorfas gerando celobiose e celo-oligossacáridos como produtos de hidrólise. As celobiohidrolases atuam nas regiões cristalinas de celulose e produzem celobiose como seu produto de hidrólise principal. Por sua vez, as β -glucosidases convertem celobiose e alguns celo-oligossacarídeos em glicose (VAN ZYL *et al.*, 2011).

Figura 6 - Hidrólise enzimática sofrida pela Celulose.

Fonte: ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Fems Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sep. 2005.

A hemicelulose é degradada em monossacarídeos e ácido acético (Figura 7). Xilanas, o principal carboidrato de hemicelulose, exigem a ação coordenada de várias enzimas hidrolíticas, como xilanases e enzimas auxiliares como esterases (xilana esterase, ferúlico e cumárico esterases, α -arabinofuranosidase e α -4-metil glucuronidasas, entre outras) (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011). A hidrólise de hemiceluloses ocorre pela ação combinada de endoenzimas que quebram internamente sua cadeia principal, exoenzimas que liberam açúcares monoméricos e enzimas auxiliares que clivam as cadeias laterais dos polímeros ou oligossacarídeos conduzindo à liberação de vários mono e dissacarídeos, dependendo do tipo de hemicelulose. Como um exemplo, a quebra da xilana envolve, pelo menos, endo-1,4- β -D-xilanase e β -xilosidase atuando sobre a cadeia principal do açúcar e, dependendo do tipo de xilana, a cadeia lateral de clivagem de enzimas, tais como α -glucuronidase e acetil xilana esterase (ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005).

Figura 7 - Hidrólise enzimática sofrida pela hemicelulose.

Fonte: ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Fems Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sep. 2005.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Fibra de coco

A fibra de coco verde foi doada pela Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE e sua obtenção foi realizada de acordo com o fluxograma da Figura 8.

Figura 8 - Fluxograma operacional da etapa de produção de fibra de coco verde.

Fonte: Adaptada de MATTOS, A. L. A. et al. **Beneficiamento da casca de coco verde**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 37 p. (Apostila).

As cascas de coco verde (*Cocos Nucifera* L.) foram coletadas e passaram por uma esteira de alimentação onde materiais estranhos foram removidos manualmente antes do processo de trituração. A trituração foi realizada por máquinas com rolo de facas fixas responsáveis pelo esmagamento da parte fibrosa do fruto. Na próxima etapa, o material triturado foi transportado para uma prensa rotativa horizontal, que extraiu o excesso de líquido do produto triturado, levando a formação do líquido da casca de coco verde (LCCV) que apresenta em sua composição polifenóis, açúcares e potássio. Em seguida, o material passou por uma etapa de classificação destinada em separar fibra e pó de coco. O material é turbilhonado ao longo do eixo da máquina, o que faz com que o pó caia pela chapa perfurada e a fibra saia no fim do percurso. Essa máquina utiliza marteletes fixos helicoidais e uma chapa perfurada. As fibras, que correspondem a 30% do produto final foram separadas do pó, equivalente a 70% (MATTOS *et al.*, 2011).

4.1.2. Enzima comercial

Um complexo enzimático também foi empregado como matéria prima. Para a realização da hidrólise enzimática, utilizou-se uma enzima comercial, constituída de uma mistura de celulasas, β -glucosidases de alto nível e hemicelulasas com o intuito de se obter uma eficiente degradação da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. Segundo informação do fabricante, a enzima trabalha em condições ótimas de pH 5 e temperatura de 50°C e é sugerida o uso em concentração de 6 e 30% em relação à massa de celulose da amostra. O uso da enzima em baixa dosagem (6%) sugere a viabilidade comercial da hidrólise da celulose, enquanto que em alta dosagem (30%) proporciona uma indicação do teor máximo de celulose acessível enzimaticamente.

4.2. Métodos

4.2.1. Fluxograma de metodologia de pesquisa

A Figura 9 ilustra de maneira resumida a metodologia utilizada neste projeto de pesquisa. Os procedimentos detalhados estão descritos nos itens a seguir.

4.2.2 Ruptura da parede lignocelulósica usando CO₂ em estado supercrítico (SFE)

O tratamento com fluido supercrítico foi realizado com o objetivo de deslignificação da fibra de coco através do rompimento da rede lignocelulósica e exposição da celulose para reações enzimáticas. A celulose é o substrato das enzimas que será convertida em açúcares fermentáveis.

Figura 9 - Fluxograma de metodologia resumida das atividades desenvolvidas nesse trabalho.

Fonte: Própria autoria.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP) em um sistema de extração com CO₂ supercrítico desenvolvido em escala laboratorial por Oliveira (2007) com sistema operante de modo estático e/ou dinâmico que trabalha em até 450 bar e até 100°C (Figura 10).

Figura 10 - Extrator supercrítico do Laboratório de Tecnologia de Alta pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP).

Fonte: SANTIAGO, H. P. C. **Medida da solubilidade de óleo de café verde (*Coffe arábica L.*) em dióxido de carbono supercrítico e modelagem termodinâmica.** Dissertação de mestrado. 2015. 91f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

As condições de pressão, temperatura e tempo de contato adotados neste trabalho derivam de testes realizados preliminarmente com bagaço de cana de açúcar e soluções diluídas de NaOH como modificador de polaridade (MELO *et al.*, 2012). Em adição a solução de NaOH também foram avaliados o etanol, modificador de polaridade comum em extração supercrítica e também solução de bissulfito de sódio, com o intuito de avaliar seu efeito em contato dióxido de carbono supercrítico uma vez que o ácido sulfúrico (H₂SO₂) é muito comum em métodos de deslignificação tradicionais (hidrólise ácida).

Foram estudadas sete condições de extração (Tabela 4), em que se variou o tempo de contato do CO₂ com a fibra de coco (3 e 5 h), o modificador de polaridade (hidróxido de sódio a 0,25 M, etanol 50% e bissulfito de sódio 0,1%). Para cada tratamento, foram acondicionados 50 g de fibra de coco ao extrator juntamente com o modificador de polaridade, de acordo com as proporções adotadas (Tabela 4). O contato entre CO₂ e a fibra previamente misturada ao modificador de polaridade ocorreu em condições controladas de temperatura (70°C) e pressão

(200 bar ou 20 MPa). Após o tempo de contato estático da fibra de coco, com ou sem modificador de polaridade, e o CO₂, procedeu-se 1 hora de extração dinâmica seguida de despressurização rápida.

Tabela 4 - Condições da extração supercrítica de diferentes tratamentos de fibra de coco.

Ensaio	Modificador de polaridade (MP)	Relação Fibra:MP (m/v)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo Estático (Horas)	Tempo Dinâmico (Horas)
1	-	-	200	70	3	1
2	-	-	200	70	5	1
3	NaOH (0,25M)	33:67	200	70	3	1
4	NaOH (0,25M)	60:40	200	70	5	1
5	NaOH (0,25M)	60:40	200	70	3	1
6	Etanol 50%	56:44	200	70	5	1
7	NaHSO ₄ (0,1%)	60:40	200	70	3	1

NaOH: Hidróxido de sódio, NaHSO₄: bissulfito de sódio. Fonte: Própria autoria.

Após a extração supercrítica, a fibra de coco foi lavada para eliminar resíduos de modificador de polaridade. A lavagem foi realizada com água destilada e em seguida, a fibra de coco foi submetida à secagem em estufa de circulação forçada (Estufa MA-035, Marconi, Piracicaba, BR) por 12 horas a 55°C e acondicionadas em sacos plásticos sob refrigeração até o momento de sua caracterização.

4.3. Caracterização da fibra de coco verde

4.3.1. Determinação de pH

Para determinação do pH, aproximadamente 0,25 g de fibra de coco foi acrescida de 20 mL de água destilada, homogeneizados e feito leitura em pHmetro digital (PG1800, Gehaka, São Paulo, BR).

4.3.2. Determinação da umidade

Para determinação da umidade, em cadinhos, pesaram-se aproximadamente 2 gramas de fibra de coco verde. As amostras foram levadas a estufa a 105°C até peso constante (AOAC, 1990).

4.3.3. Morfologia

A morfologia das fibras e suas alterações decorrentes de tratamento com CO₂ supercrítico foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura utilizando-se um microscópio TM300 (Hitachi, JP). As amostras foram fixadas à superfície do suporte utilizando-se fita adesiva dupla face. As imagens foram capturadas utilizando-se um aumento de 500 vezes e a voltagem de aceleração foi de 15 kV.

O aspecto visual das fibras foi avaliado através de imagens obtidas utilizando-se um microscópio (SZX7; Olympus, Tóquio, JP) com uma câmera acoplada (U-TVO.5XC-3, JP) com aumento de 0,8 vezes.

4.3.4. Determinação de lignina, celulose e hemicelulose

As concentrações de lignina, celulose e hemicelulose das fibras de coco, antes e depois dos tratamentos com CO₂ supercrítico, foram determinadas a partir análise da fibra que resta após a dissolução de proteínas, gorduras e hidratos de carbono solúveis, usando um detergente neutro e um detergente ácido de acordo com Silva e Queiroz (2002).

Para determinação das fibras em meio neutro 0,35 g da fibra de coco seca foi adicionada a 35 mL da solução de detergente neutro em tubo de digestão à temperatura ambiente. Esta solução foi levada ao bloco digestor a 100°C por 60 min. A fibra de coco foi então lavada com água destilada (100° C) e em seguida com 30 a 40 mL de acetona (Dinâmica, Diadema, Brasil). A amostra foi então seca a 105°C até atingir um peso constante. A percentagem de fibras em detergente neutro foi calculada pela relação entre a massa de fibra de coco que foi digerido pelo detergente neutro e a massa da amostra.

Para determinação das fibras em meio ácido 0,35 g de fibra de coco seca foi adicionada a 35 mL da solução de detergente ácido. Esta solução foi levada bloco digestor a 100°C por 60 min em seguida foi lavada com água quente (100° C) e em seguida foi lavada com acetona e seca a 105°C até atingir peso constante. O conteúdo de fibra em detergente ácido foi expresso em porcentagem, pela relação entre a massa seca da fibra de coco após digestão ácida e a massa da amostra.

A concentração de hemicelulose foi determinada pela diferença entre os valores percentuais dos conteúdos de fibra em detergente ácido e neutro.

Para determinação de lignina, foi utilizado ácido sulfúrico a 72% (50 ml) por 3 horas para digerir o resíduo da fibra em detergente ácido. Em seguida, a amostra foi lavada com água destilada quente (100°C) para neutralizar o ácido remanescente e seca a 105° C até peso constante. Em seguida, incinerou-se a amostra a 550 ° C durante 4 h. A porcentagem de peso da lignina na fibra de coco foi obtido pela massa da amostra de fibra em detergente ácido digerida pelo H₂SO₄ menos a massa de cinzas da amostra.

A porcentagem de celulose foi quantificada pela diferença das percentagens de fibra em detergente ácido subtraídos da porcentagem de lignina.

4.3.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os principais constituintes da fibra de coco, natural e tratada com CO₂ supercrítico, foram determinados, qualitativamente, utilizando-se a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier de acordo com Brigida *et al.* (2010) em que espectros foram obtidos por 16 varreduras para cada amostra na faixa espectral de 650 a 4000 cm⁻¹ em um espectrofotômetro Spectrum One (Perkin-Elmer, Waltham, USA).

4.3.6. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada em diversas etapas dos experimentos para averiguar se houve liberação. Quantificaram-se os açúcares redutores na fibra de coco antes e após o contato com CO₂ supercrítico além do produto da hidrólise enzimática da fibra de coco. Também foi realizada a quantificação de açúcares redutores na fibra de coco antes da lavagem com o intuito de verificar se a lavagem promoveu perda significativa de açúcares redutores. Todas as análises foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Miller (1959). Em um tubo de ensaio foram misturados 0,5 mL de amostra com 0,5 mL do reagente DNS. O tubo foi mantido em banho a 100°C por 5 minutos e resfriado em banho de gelo por 10 minutos. Adicionou-se 8 mL de água e a absorbância foi determinada a 540 nm em espectrofotômetro Lambda 35 UV/Vis (Perkin Elmer, Waltham, USA).

O reagente DNS foi preparado com 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalissílico (Vetec Química, Rio de Janeiro, BR); 19,8 g de NaOH (Êxodo Científica, Hortolândia, BR); 1.416 mL de água destilada; 7,6 mL de Fenol (fundido a 50°C); 8,3 g de metabissulfito de sódio (Synth, Diadema, BR).

A quantificação de açúcares redutores foi baseada em curva padrão com realização dos procedimentos para diferentes concentrações de açúcares. Para cálculo da atividade enzimática de celulase e xilanase a curva padrão foi realizada com glicose e xilose, respectivamente. Para determinação de açúcares redutores da fibra de coco verde, utilizou-se a curva padrão de glicose e os resultados foram expressos em equivalente de glicose $\mu\text{mol/g}$ de fibra de coco.

4.3.7. Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi realizada, por método espectrofotométrico, para verificar o potencial hidrolítico da enzima diante de um substrato específico. Como a enzima utilizada é uma mistura de celulasas, β -glucosidases e hemicelulase, foram realizadas as atividades enzimática para celulase, β -glucosidases e xilanase.

A atividade enzimática de celulase foi realizada de acordo com Ghose (1987). Uma mistura de reação foi preparada contendo tiras de papel filtro whatman n°1 (6x1,5 cm, pesando

aproximadamente 90 mg) e uma solução com diluição apropriada de enzima em tampão acetato 10 mM (pH 5) de maneira que fossem obtidas concentrações de 6 e 30 g de enzima/100 g de celulose disponível no volume reacional. Os tubos foram incubados com agitação orbital (Marconi, MA420, Piracicaba, BR) de 100 rpm a 50°C por 60 min. A quantidade de glicose formada após o tempo estabelecido foi determinada pelo método DNS (Seção 4.3.6).

A atividade enzimática da xilanase foi determinada de acordo com Suwannarangsee *et al.* (2012). Uma mistura de reação foi preparada com solução de xilana (1%) e uma solução com diluição apropriada de enzima em tampão acetato 10 mM (pH 5) de maneira que fossem obtidas concentrações de 6 e 30 g de enzima/100 g de xilana disponível no volume reacional. Os tubos foram incubados com agitação orbital (Marconi, MA420, Piracicaba, BR) a 50°C a 100 rpm por 20 min. A quantidade de xilose formada após o tempo estabelecido foi determinada pelo método DNS (Seção 4.3.6).

A atividade enzimática da β -glucosidase foi determinada de acordo com Suwannarangsee *et al.* (2012). Uma mistura de reação foi preparada com uma solução 5mM de p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) como substrato e uma solução com diluição apropriada da enzima em tampão acetato 10 mM (pH 5) de maneira que fossem obtidas concentrações de 6 e 30 g de enzima/100 g de p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside disponível no volume reacional. Os tubos foram incubados com agitação orbital (Marconi, MA420, Piracicaba, BR) a 100 rpm por 20 min. a 50°C a quantidade de p-nitrofenol formada foi determinada a 400 nm e comparada por curva padrão feita com diferentes concentrações de p-nitrofenol no mesmo comprimento de onda.

Para todas as atividades enzimáticas foram realizados os brancos de substrato e branco de enzima e descontados das leituras das amostras, pois a enzima ou o substrato podem conter açúcares redutores. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcares redutores, por minuto a 50 °C, onde a atividade enzimática foi expressa em U por grama de substrato (U/g).

4.3.8. Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento com CO₂ supercrítico com modificadores de polaridade, a fibra de coco verde foi hidrolisada enzimaticamente. 0,1 g de fibra de coco verde foram dispersas em 5 mL de solução enzimática em tampão acetato 50 mM (pH 5) de maneira que fossem obtidas concentrações de 6 e 30 g de enzima/100 g de celulose média disponível no volume reacional. Os tubos foram incubados a 50°C com agitação orbital de 100 rpm (Marconi, MA420, Piracicaba, BR). Foram realizados testes com dois tempos de reação: 24 e 72 horas. Para determinação de açúcares redutores produzidos, alíquotas de 0,5 mL da solução do hidrolisado foram retiradas para determinação de açúcares redutores pelo método DNS (item 4.3.6). Os resultados foram expressos em μ mol equivalente de glicose/g de fibra de coco verde seca.

Os ensaios 2, 4 e 7 mais o controle foram enviados para quantificação do perfil de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência por apresentarem resultados relativamente melhores na análise quantitativa de açúcares redutores totais. As amostras para análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência foram mantidas em banho maria com água em ebulição durante 10 minutos para interromper a reação enzimática e foram armazenadas a -20°C até a análise.

4.3.9. Quantificação de açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

A quantificação de açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde foi realizado pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital, Campinas, SP, Brasil). As amostras foram previamente filtradas em papel de filtro qualitativo. Em seguida a amostra foi diluída apropriadamente em acetonitrila pura grau HPLC (J.T. Baker, Center Valley, USA) e filtrou-se novamente amostra em membrana filtrante de celulose regenerada 0,22 μ m. O teor de açúcares (frutose, glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, xilose e manose) foi quantificado em um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Modelo 9100, Young Lin Instrument Co. Ltd, Kyounggi-do, KR) com detector de índice de refração (IR). A separação foi realizada numa coluna amino marca Zorbax Carbohydrate, (4,6 mm DI x 250 mm, 5 μ m) a temperatura de 35 °C. Utilizou-se 20 μ L como volume de injeção. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água na

proporção 77:23 a um fluxo de 1,0 mL/min, no modo isocrático. A identificação dos açúcares foi baseada no tempo de retenção e a quantificação foi feita através de curva de calibração externa. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,01 e 0,02 g/100 mL, respectivamente.

4.3.10. Análise Estatística

Os dados dos experimentos realizados em triplicata foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste de média de Tukey em nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico SAS[®] 9.3 (Cary, NC, EUA).

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da casca de coco verde

A análise da eficiência da deslignificação da fibra de coco verde utilizando CO₂ supercrítico foi baseada na caracterização da fibra pela composição lignocelulósica, imagens de microscopia eletrônica de varredura; análise qualitativa da composição lignocelulósica por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

5.1.1. Determinação de pH

A determinação do pH da fibra de coco verde é de extrema importância para a hidrólise enzimática, pois pH extremos podem causar variações durante as reações, fazendo com que a enzima não trabalhe em suas condições ótimas de pH. Consequentemente haverá queda no rendimento da obtenção de açúcares. O pH foi medido para todos os ensaios (Tabela 5). A lavagem realizada nas amostras após o processo de extração com CO₂ supercrítico foi de extrema importância para que as fibras apresentassem pH próximos a neutralidade.

Tabela 5 - pH das amostras de fibra de coco verde.

Ensaio	Modificador de polaridade (MP)	Relação Fibra:MP (m/v)	Tempo Estático (Horas)	pH antes da lavagem	pH final
C	-	-	-	5,40 ± 0,01	6,27 ± 0,10
1	-	-	3	5,46 ± 0,02	6,16 ± 0,02
2	-	-	5	5,46 ± 0,02	6,23 ± 0,10
3	NaOH (0,25M)	33:67	3	9,42 ± 0,03	8,98 ± 0,37
4	NaOH (0,25M)	60:40	5	7,92 ± 0,08	8,31 ± 0,03
5	NaOH (0,25M)	60:40	3	7,47 ± 0,01	7,91 ± 0,16
6	Etanol 50%	56:44	5	5,53 ± 0,07	7,12 ± 0,19
7	NaHSO ₄ (0,1%)	60:40	3	5,50 ± 0,01	6,58 ± 0,12

Todos ensaios foram realizados a 70°C e 200 bar; MP = modificador de polaridade.

Fonte: Própria autoria.

As amostras apresentaram pH de 6,16 a 8,98. Os pH mais básicos foram obtidos nos tratamentos 3, 4 e 5 em que se utilizou o hidróxido de sódio como modificador de polaridade. Os tratamentos 1 e 2, em que não foram utilizados modificadores de polaridade, apresentaram pH muito próximos ao controle. Os tratamentos 6 e 7 em que se utilizou etanol e NaHSO₄, respectivamente apresentaram pH muito similar ao controle.

5.1.2. Determinação de umidade

A umidade da fibra de coco verde apresentou valores entre 4,56 e 8,30 % (Tabela 6), sendo que o ensaio 6, em que se utilizou etanol como modificador de polaridade, apresentou menor teor de umidade. As fibras mais úmidas (ensaio 7) também apresentaram diferença significativa de todas as demais.

Tabela 6 - Umidade das amostras de fibra de coco verde.

Ensaio	Modificador de polaridade (MP)	Relação Fibra:MP (m/v)	Tempo Estático (Horas)	Umidade (%)
C	-	-	-	$6,02 \pm 0,07^{\text{dc}}$
1	-	-	3	$5,37 \pm 0,73^{\text{d}}$
2	-	-	5	$6,42 \pm 0,30^{\text{cb}}$
3	NaOH (0,25M)	33:67	3	$7,09 \pm 0,25^{\text{b}}$
4	NaOH (0,25M)	60:40	5	$5,52 \pm 0,56^{\text{d}}$
5	NaOH (0,25M)	60:40	3	$6,74 \pm 0,27^{\text{cb}}$
6	Etanol 50%	56:44	5	$4,56 \pm 0,21^{\text{e}}$
7	NaHSO ₄ (0,1%)	60:40	3	$8,30 \pm 0,22^{\text{a}}$

Todos os ensaios foram realizados a 70°C e 200 bar. Fonte: Própria autoria.

5.1.3. Morfologia

A microscopia ótica, com aumento de 0,8 vezes, não permitiu identificar quaisquer modificações visualmente aparente na estrutura da fibra. Em todos ensaios, as fibras demonstraram similaridade na aparência, cor e formato em relação ao controle (Figura 11).

Figura 11 - Imagens capturadas com microscópio (SZX7; Olympus, Tóquio, JP) com câmera acoplada (U-TVO. 5XC-3, JP) utilizando aumento de 0,8 vezes da fibra de coco verde natural (Controle) e tratados com CO₂ supercrítico (ensaios 1 ao 7).

Fonte: Própria autoria.

No entanto, observando as imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 12 a 16), utilizando-se aumento de 500 vezes, nota-se que a estrutura da fibra antes e após o ensaio com CO₂ supercrítico apresentaram-se totalmente diferentes sendo possível observar o rompimento da cadeia lignocelulósica bem como a exposição da celulose em alguns ensaios.

A fibra natural, sem tratamento com CO₂ supercrítico, demonstrou-se íntegra (Figura 12). Já as fibras que passaram pela extração com CO₂ supercrítico demonstraram alterações significativas em sua estrutura, que foi diferente para cada condição de ensaio, indicando que o tempo de contato com CO₂ supercrítico e o uso de modificadores de polaridade favoreceram a desestruturação das fibras.

Figura 12 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco natural utilizando-se um microscópio TM300 (Hitachi, JP) com 500 vezes de aumento.

Fonte: Própria autoria.

As fibras dos tratamentos 1 e 2, em que não foi adicionado modificador de polaridade, o rompimento da parede celular foi mais brando (Figura 13), sendo esse ligeiramente mais acentuado no tratamento 2 em que o tempo de contato entre CO₂ supercrítico e a fibra foi maior, (5 h), em comparação ao tratamento 1 (3 h). Em menor tempo de contato, pode-se observar que houve um desordenamento dos constituintes da fibra sugerindo um leve aumento na área da superfície (Figura 13a) e em maior tempo de contato (Figura 13b), além do desordenamento da fibra houve uma danificação superficial de tecido celular sugerindo aumento na porosidade do material.

Figura 13 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde tratada com CO₂ supercrítico sem uso de modificador de polaridade, sendo (a) Ensaio 1: 3 h de contato; (b) Ensaio 2: 5 h de contato.

Fonte: Própria autoria.

Em geral, o emprego de modificador de polaridade intensificou as alterações na parede celular da fibra de coco (Figuras 14 a 16) em relação aos tratamentos que não foram empregados o modificador de polaridade (Figura 13). Maiores alterações nas paredes lignocelulósicas das fibras ocorreram quando hidróxido de sódio (NaOH) e bissulfito de sódio (NaHSO₄) foram empregados.

O emprego de NaOH como modificador de polaridade em diferentes condições de tempo e relação fibra:modificador de polaridade permitiu a avaliação dos efeitos de ambos fatores nas interações com CO₂ no estado supercrítico. A Figura 14 ilustra as fibras após o contato com CO₂ supercrítico e NaOH (0,25 M) em diferentes condições de ensaio.

A Figura 14c e Figura 14b ilustram a fibra de coco verde após contato com CO₂ supercrítico com mesma relação fibra:solvente de 60:40 mas em diferentes tempo de contato com de 3 e 5 h, respectivamente. A danificação da parede celular foi maior para o tempo de 5 h (Figura 12b), promovendo provavelmente maior destruição da biomassa lignocelulósica e, portanto, maior biodisponibilização da hemicelulose e celulose do que no ensaio 5 (Figura 14c)

com apenas 3 h em que, apesar de também haver danificação da parede celular, essa foi mais superficial. Fato também notado no tratamento com CO₂ supercrítico sem o modificador de polaridade (Figura 13).

Quando se utilizou o NaOH (0,25 M) em diferentes relações de fibra:modificador de polaridade de 33:67 e 60:40 para ensaios 3 e 5, respectivamente, mas mantendo-se constante o tempo de contato da fibra com CO₂ supercrítico, notou-se que a danificação da parede celular foi maior quando a presença do modificador de polaridade foi maior (Figura 14a).

O emprego do etanol como modificador de polaridade provocou leve alteração na parede celular da fibra de coco verde (Figura 15) quando comparada ao próprio controle (Figura 12). A aparência da fibra de coco verde após o tratamento com CO₂ supercrítico na presença de etanol 50% como modificador de polaridade foi similar ao ensaio 1 em que foi empregado CO₂ supercrítico sem a presença de modificador de polaridade (Figura 13a). Observando a estrutura física da fibra pode-se dizer que apesar do ensaio 6 ter causado um desornamento nos constituintes da fibra, é pouco provável que tenha havido uma quebra da biomassa lignocelulósica e exposição da celulose e hemicelulose (Figura 15).

Figura 14 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde em contato com CO₂ supercrítico utilizando-se NaOH (0,25 M) como modificador de polaridade, sendo (a) Ensaio 3: 3 horas de contato e relação fibra: modificador de polaridade de 33:67; (b) Ensaio 4: 5 h de contato e relação fibra: modificador de polaridade de 60:40; (c) Ensaio 5: 3 h de contato com relação fibra: modificador de polaridade de 60:40.

Fonte: Própria autoria.

Figura 15 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde submetida ao ensaio 6: extração com CO₂ supercrítico com 5 h de contato, etanol 50% como modificador de polaridade e relação fibra: modificador de polaridade de 56:44.

Fonte: Própria autoria.

Quando uma solução de NaHSO₄ (0,1%) foi utilizada como modificador de polaridade na relação fibra: modificador de polaridade de 60:40 e emprego de com CO₂ supercrítico por 5 horas de contato, a estrutura da fibra foi consideravelmente alterada (Figura 16). Pode ser observada a danificação da parede celular e o aparecimento de constituintes internos da fibra de coco verde reforçando a possibilidade de as condições do tratamento terem rompido a barreira da biomassa lignocelulósica e dessa forma expor a celulose e hemicelulose, constituintes da fibra ricos em carboidratos compostos de interesse para indústria de alimentos, pois quando hidrolisado à açúcares fermentáveis podem ser aproveitados para a produção de álcool, por exemplo.

Figura 16 - Imagem de Microscopia eletrônica de varredura da fibra de coco verde que passou pelo tratamento 7: extração com CO₂ supercrítico, 3 h de contato, NaHSO₄ (0,1%) como modificador de polaridade com relação fibra: modificador de polaridade de 60:40.

Fonte: Própria autoria.

Os ensaios provocaram de maneira diferenciada o rompimento da parede celular da fibra de coco verde. A desestruturação da parede celular pode ser resultado da rápida despressurização do sistema que emprega o CO₂ supercrítico associado a presença do modificador de polaridade. O aumento do tempo de contato entre a fibra vegetal e o CO₂ causaram maior rompimento do tecido lignocelulósico. De forma geral, quanto maior o tempo de exposição a condição estática de CO₂ supercrítico, maior foi o efeito do desordenamento dos constituintes da fibra e exposição da celulose e hemicelulose. Desta forma é possível afirmar que o processo de extração supercrítico a 200 bar e 70°C com despressurização rápida causa mudanças na estrutura lignocelulósica da fibra de coco verde.

5.1.4. Determinação de lignina, celulose e hemicelulose

O tratamento com fluido supercrítico foi realizado com o intuito de promover a deslignificação da fibra, facilitando dessa forma o acesso das enzimas ao seu substrato: a celulose e hemicelulose. Portanto, a determinação da composição lignocelulósica da fibra de coco verde (Tabela 7) foi realizada para comparar através dos teores de celulose, lignina e hemicelulose, o efeito dos tratamentos empregados. Esperava-se que o emprego de CO₂ no estado supercrítico provocasse a redução dos teores de lignina e aumento nos teores de celulose e hemicelulose.

No entanto, apesar das diferenças notáveis na estrutura física da fibra de coco tratada com CO₂ supercrítico observadas nas imagens de microscopia eletrônica de varredura foram observados valores muito próximos de lignina para todos os ensaios. Apesar do teor de lignina encontrado para a maioria dos ensaios ser inferior ao controle, estes foram estatisticamente iguais. Apenas os ensaios 1 e 2 apresentaram valores de lignina inferior e estatisticamente significativo em relação ao controle. Nesses ensaios não se utilizou o emprego de modificador de polaridade e a morfologia da fibra não apresentou grandes alterações em sua estrutura celular (Figura 13), ao contrário do esperado para a deslignificação de materiais lignocelulósicos.

Tabela 7 - Composição lignocelulósica da fibra de coco natural e tratada com CO₂ supercrítico. Resultados expresso em g /100g de fibra de coco verde seca.

Ensaio	Lignina	Celulose	Hemicelulose
C	26,66 ± 0,47 ^{abc}	46,37 ± 0,41 ^{bc}	16,18 ± 0,64 ^{abc}
1	26,38 ± 0,53 ^{bc}	48,51 ± 0,85 ^{ac}	15,14 ± 1,18 ^{cd}
2	25,95 ± 0,19 ^c	46,83 ± 0,57 ^{bc}	16,79 ± 0,64 ^{ab}
3	27,84 ± 0,93 ^a	48,56 ± 0,98 ^a	14,63 ± 0,55 ^d
4	26,63 ± 0,84 ^{abc}	47,28 ± 1,17 ^{abc}	17,61 ± 0,82 ^a
5	26,90 ± 1,03 ^{abc}	46,40 ± 0,95 ^{bc}	16,26 ± 0,91 ^{abc}
6	26,92 ± 0,51 ^{abc}	47,13 ± 0,40 ^{abc}	15,95 ± 0,79 ^{bcd}
7	27,55 ± 0,51 ^{ab}	47,44 ± 0,68 ^{ab}	14,93 ± 0,77 ^{cd}

Fonte: Própria autoria.

O teor de celulose encontrado para cada ensaio apresentou valores ligeiramente superiores ao controle. O ensaio 3 que se utilizou-se NaOH como modificador de polaridade na relação 33:67 de fibra:modificador de polaridade e 3 h de contato com CO₂ supercrítico

apresentou o maior teor de celulose, sendo este estatisticamente diferente ao controle. Novamente, o teor encontrado de celulose não está de acordo com o esperado, pois o ensaio 3 (Figura 14a) não foi a condição em que houve maior alteração na fibra de coco verde como discutido anteriormente.

O teor de hemicelulose encontrado, apesar de algumas diferenças significativas, apresentou comportamento variado com valores superiores e inferiores ao controle. Os resultados obtidos na quantificação dos teores de lignina celulose e hemicelulose foram pouco conclusivos e notou-se a necessidade de uma nova maneira de avaliar a composição lignocelulósica da fibra de coco verde para se afirmar a eficácia do emprego do CO₂ supercrítico na deslignificação. Portanto, optou-se pela realização da análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para análise qualitativa da composição lignocelulósica do material.

Outros tratamentos empregados para a deslignificação da fibra de coco mostraram-se eficazes. De acordo com Ding, Hii e Ong (2012), o perfil de composição da fibra da casca de coco foi significativamente alterada mediante o tratamento alcalino assistido por microondas aumentando o teor de celulose de 18-21% para 38-39% e diminuindo o teor de lignina de 46-53% para 31-33%. Fatmawati et al. (2012) ao realizar o pré tratamento alcalino (NaOH 11% e 100°C) do pó da fibra de coco observaram remoção de 14,53% de lignina e aumento do teor de celulose em até 50,23%.

5.1.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Analizando o espectro de absorção da fibra de coco verde natural (controle) e tratado com CO₂ supercrítico (Figura 17), notou-se diferença na intensidade das bandas características correspondentes à lignina, celulose e hemicelulose.

A banda com pico intenso em 3.340 cm⁻¹, corresponde a vibração e alongamento das ligações de hidrogênio (O-H) da estrutura de celulose e lignina da fibra e a banda característica da hemicelulose está por volta de 1.728 cm⁻¹ (BRIGIDA *et al.*, 2010).

Figura 17 - Espectro de absorção da fibra de coco natural (Controle) e tratado com CO₂ supercrítico.

Fonte: Própria autoria.

Nota-se que a banda com absorção máxima em 3.340 cm^{-1} apresentou menor intensidade nos ensaios 1, 4 e 7. Essa redução na intensidade da banda pode estar relacionada à redução no grau da ligação de hidrogênio estabelecidas entre lignina e celulose (GONÇALVES *et al.*, 2014). O afrouxamento das ligações de hidrogênio entre celulose e lignina podem ser resultado da deslignificação do material. O ensaio 1 demonstrou menor teor de lignina (Tabela 7) e os ensaios 4 e 7 apresentaram elevada danificação da parede celular (Figura 14b e 16) concordando com a discussão feita anteriormente (Vide páginas 40 e 48). Curiosamente, o controle também apresentou essa banda com baixa intensidade, enquanto os tratamentos 2, 3, 5 e 6 demonstraram maior intensidade, indicando maiores ligações entre lignina e celulose, o que tornaria o tratamento enzimático mais difícil nessas amostras, pois lignina e celulose estão ligadas por pontes de hidrogênio.

A banda característica da hemicelulose (1.728 cm^{-1}) está ligeiramente mais intensa nos tratamentos 2, 5 e 6, indicando uma maior exposição da hemicelulose. No entanto, a banda em 3.340 cm^{-1} , caracterizada pelas ligações de hidrogênio entre celulose e lignina também é intensa nesses ensaios. Esses tratamentos, nas imagens de microscopia eletrônica de varredura, demonstraram pouca alteração na estrutura da fibra (Figura 15 e 14c) se comparada à fibra natural (controle).

A banda em absorção máxima em 1.238 cm^{-1} está relacionada a vibração das ligações (C-O) de esters, éters e grupos fenólicos atribuídos principalmente à presença de ceras do tecido da epiderme (HERRERA-FRANCO; VALADEZ-GONZALEZ, 2005; BRIGIDA *et al.*, 2010). Nesse comprimento de onda específico percebe-se que o controle e os ensaios 4 e 7 apresentaram intensidade menor, revelando que essas amostras demonstram menor presença de ceras em seu tecido resultando na redução da polaridade superficial da fibra. No ensaio 4 utilizou-se NaOH como modificador de polaridade na relação fibra:modificador de polaridade de 60:40 e 5 h de contato com CO_2 supercrítico e no ensaio 7 utilizou-se o NaHSO_4 como modificador de polaridade e 3 h de contato com CO_2 supercrítico, sendo esses ensaios os que demonstraram através da microscopia eletrônica de varredura maior danificação da parede celular (Figura 14b e 16).

De acordo com Schacht, Zetzl e Brunner (2008), o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica deve eliminar o impedimento estérico e aumentar a porosidade do material. Apesar dos resultados da composição lignocelulósica demonstrar pouca alteração da concentração de lignina entre os tratamentos (Tabela 7), notou-se pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura que após os ensaios com CO_2 supercrítico houve aumento da porosidade da fibra (Vide página 40) e pelos espectros (Figura 17) pode-se concluir que a houve deslignificação da fibra de coco por meio da redução do impedimento estérico e pelo afrouxamento das ligações estabelecidas entre celulose e lignina.

5.2. Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi realizada para atestar o potencial hidrolítico da enzima diante de três substratos: celulose, p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside e xilana, uma vez que o complexo enzimático é composto de uma mistura de celulasas, β -glucosidases e hemicelulasas. A atividade enzimática das celulasas, β -glucosidases e hemicelulasas estão expressas na Figura 18, Figura 19 e Figura 20, respectivamente. Todas as atividades enzimáticas foram testadas em duas concentrações diferentes: 6 e 30g de enzima/100g de celulose total do substrato. O uso da enzima em baixa dosagem (6%) sugere a viabilidade comercial da hidrólise da celulose, enquanto que em alta dosagem (30%) proporciona uma indicação do teor máximo de celulose acessível enzimaticamente.

Figura 18 - Atividade enzimática da celulase expressa em U/g de celulose em duas concentrações diferentes de enzima (6 e 30 g de enzima/100 gramas de celulose).

Fonte: Própria autoria.

Figura 19 - Atividade enzimática da xilanase expressa em U/g de xilana em duas concentrações diferentes de enzima (6 e 30 g de enzima/100 gramas de xilana).

Fonte: Própria autoria.

Figura 20 - Atividade enzimática da β -glucosidases expressa em U/g de p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside em duas concentrações diferentes de enzima (6 e 30 g de enzima/100 gramas de p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside).

Fonte: Própria autoria.

A melhor atividade enzimática do complexo utilizado foi obtida para a xilanase seguida da celulase e β -glucosidases. Portanto, a enzima estudada tem potencial hidrolítico maior para a xilana. Para as três enzimas estudadas obteve-se atividade enzimática similar para 6% e 30% de concentração enzimática, indicando que mesmo estando em baixa dosagem a enzima alcançou praticamente o máximo teor de substrato acessível enzimaticamente.

Os resultados da análise de atividade enzimática permitem concluir que em ambas concentrações serão capazes de acessar todo o substrato e convertê-lo em açúcares. Porém como a fibra de coco é uma matriz complexa foi decidido conduzir os testes de conversão de açúcares para cada um dos ensaios em ambas as concentrações de enzima por grama de substrato. E assim avaliar se a capacidade de acesso ao substrato disponível se manteria neste tipo de matriz.

5.3. Hidrólise enzimática e obtenção de açúcares redutores da fibra de coco verde pré-tratada com CO₂ supercrítico

A hidrólise enzimática da fibra de coco verde também foi realizada em duas concentrações enzimáticas diferentes (6 e 30 g de enzima/100 g de celulose da amostra) e dois tempos de hidrólise (24 e 72 horas). A avaliação de dois tempos diferentes, bem como no teor de enzimas, permitiu discutir as diferenças dos resultados obtidos em uma hidrólise com maior viabilidade comercial (menor tempo) em relação ao provável máximo rendimento que se pode ocorrer em intervalos de tempo maiores.

A avaliação da efetiva ação enzimática na fibra de coco verde nos dois tempos e teores de enzima estudados foi controlada pela concentração de açúcares redutores presentes nos hidrolisados.

As maiores concentrações de açúcares redutores foram obtidas para hidrólise enzimática realizada em 72 h (Figura 21). O total de açúcares redutores entre o controle e diferentes ensaios com aplicação de enzima a 30% em 72 h tiveram variação de 246,78 a 540,09 μmol de glicose/g de fibra de coco seca. O controle, fibra de coco sem tratamento supercrítico, apresentou 532,27 μmol de glicose/grama de fibra de coco seca, valor estatisticamente igual ao ensaio 2, tratamento em que se obteve o melhor rendimento.

No mesmo tempo, de 72 horas, a hidrólise realizada com apenas 6 g de enzima/100 g de celulose da amostra foi muito inferior à maior concentração testada (30%), mas o comportamento em relação aos tratamentos foi similar. O mesmo procedimento foi realizado sem a adição de enzima e notou-se uma pequena liberação de açúcares redutores de 25,25 a 32,12 μmol de glicose/grama de fibra de coco.

Comportamento similar foi obtido para hidrólise enzimática realizada em 24 horas (Figura 22), mas com valores inferiores ao mesmo tratamento em 72 horas.

Figura 21 - Açúcares redutores obtidos após hidrólise enzimática de 72 horas da fibra de coco verde natural (controle) e tratada com CO₂ supercrítico em sete condições diferentes.

Fonte: Própria autoria.

A determinação de açúcares redutores também foi realizada na fibra de coco após o tratamento com extrator supercrítico antes das mesmas serem lavadas (Figura 23), para assegurar que na lavagem para remover o modificador de polaridade, não estavam sendo perdidos açúcares redutores. No entanto, a quantidade de açúcares redutores na etapa de lavagem foi baixa (28,75 – 34,56 μmol de glicose/g de fibra de coco seca).

Figura 22 - Açúcares redutores obtidos da hidrólise enzimática de 24 horas da fibra de coco verde natural (controle) e tratada com CO₂ supercrítico em sete condições diferentes.

Fonte: Própria autoria.

Figura 23 - Açúcares redutores da fibra de coco verde natural e tratada com CO₂ supercrítico em sete condições diferentes antes da lavagem das mesmas.

Fonte: Própria autoria.

Contrariamente ao esperado, os ensaios com melhor rendimento de açúcares redutores (ensaio 1 e 2) demonstraram menor deslignificação da fibra nas análises de caracterização da fibra de coco (vide página 40) e o emprego de tratamento com CO₂ supercrítico não favoreceu significativamente a obtenção de açúcares redutores (Figura 21 e Figura 22).

Outros autores também avaliaram a obtenção de açúcares a partir de outros resíduos lignocelulósicos e obtiveram bons resultados para deslignificação e aumento na obtenção de açúcares após hidrólise enzimática de amostras pré tratadas com CO₂ supercrítico.

Pasquini *et al.* (2005) observaram que o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com dióxido de carbono supercrítico promoveu remoção da lignina e preservação do polissacarídeo em altas pressões e baixo teor de 1-butanol como co-solvente na mistura.

Zheng, Lin e Tsao (1998) demonstraram que materiais celulósicos (Avicel, papel reciclado, bagaço de cana-de-açúcar e resíduo de formação da pasta de papel reciclado) quando pré-tratados com dióxido de carbono supercrítico demonstraram aumento na taxa de hidrólise de material celulósico, melhorando o rendimento de glicose em até 50%. O aumento na produção de açúcares totais favorecerá processos biotecnológicos, como a produção de álcool, pois aumento do teor de carbono disponível (açúcar) no meio de fermentação torna o processo mais eficiente do que a utilização do bagaço de cana de açúcar hidrolisado enzimaticamente que não passou por pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico.

No entanto, para a fibra de coco verde estudada nesse trabalho, o emprego da tecnologia supercrítica não aumentou consideravelmente o rendimento de açúcares redutores (Figura 21). O insucesso do pré-tratamento pode estar associado à flexibilidade da fibra. Santos, Kawasi e Coelho (2011) ao analisarem a melhora do rendimento de glicose a partir de amostras de bagaço e palha da cana-de-açúcar pré-tratados com CO₂ supercrítico em comparação ao rendimento do material não tratado, notaram que para as mesmas condições de tratamento os resultados foram melhores para a palha do que para o bagaço. Segundo os autores, os tratamentos são mais eficazes para materiais com estrutura mais rígida do que para materiais com estrutura flexível.

A fibra de coco é mais flexível do que o bagaço de cana-de-açúcar, provavelmente por sua composição lignocelulósica. Enquanto o bagaço de cana tem em média 47,7; 8,9 e 34,3 % de celulose, hemicelulose e de lignina total (Gouveia et al., 2009), a fibra de coco tem 46,37; 16,18 e 26,66 % de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente (Tabela 7).

Outra possibilidade na elucidação da falta da eficácia do tratamento com CO₂ supercrítico da fibra de coco verde na obtenção de açúcares redutores é a baixa umidade do material, inferior a 8,4% (Tabela 6). Os autores Kim e Hong (2001) estudaram a aplicação da tecnologia de dióxido de carbono supercrítico como pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, aspen (madeira dura) e pinheiro amarelo do sul (madeira macia), para a hidrólise enzimática da celulose. Ambos materiais foram pré-tratados com CO₂ supercrítico (3.100 e 4.000 psi, 112 - 165°C, 10 - 60 min) e hidrolisados com celulase comercial. A obtenção de açúcares no hidrolisado foi altamente dependente da umidade da amostra, principalmente para a madeira dura. Na ausência de umidade, o rendimento final de açúcares redutores na hidrólise foi semelhante ao de Aspen não tratado com CO₂ supercrítico (14,2 % do máximo teórico). No entanto em umidade de 73%, o teor de açúcares obtidos foi de 84,7% do máximo teórico. Para o pinheiro amarelo do sul, em ausência de umidade obteve-se 12,8 % do máximo teórico obtido e em umidade de 73%, antes do pré-tratamento, esse valor passou para 27,3 %.

Estes estudos encontrados na literatura sugerem que o processo de hidrólise e obtenção de açúcares seria mais eficaz para materiais com estrutura mais rígida e teores de umidade do material a ser tratado superior ao encontrado nos ensaios deste estudo.

Outra possibilidade para justificar a baixa eficiência no processo enzimático poderia ser uma inibição da atividade enzimática pelo pH da fibra de coco dos ensaios tratados com NaOH. Os resultados de pH apresentados na Tabela 5 (pagina 40) indicam que mesmo após o processo de lavagem com água destilada os ensaios 3, 4 e 5 apresentam valores de pH básicos. O fato pode estar relacionado a um efeito de migração de NaOH para dentro da estrutura da fibra de coco durante o período estático dos processos de lignificação. Esta diferença de pH poderia levar a uma inibição de atuação das enzimas quando em contato com este substrato saturado de hidróxido de sódio.

5.4. Quantificação de açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde por Cromatografia de Alta eficiência (CLAE)

Na Figura 24 pode-se observar o cromatograma obtido para os padrões (frutose, glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, xilose e manose) em seus respectivos tempos de retenção.

Figura 24 - Cromatograma obtido dos padrões de açúcares quantificados (frutose, glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, xilose e manose).

Fonte: Própria autoria.

Nas Figuras 25, 26, 27 e 28 podem ser observados os cromatogramas dos hidrolisados de fibra de coco verde dos ensaios controle, 2, 4 e 7 com 30% de enzima durante 72 horas de hidrolise, que obtiveram, relativamente, melhores resultados para açúcares redutores totais. Na determinação de açúcares para o ensaio controle (Figura 25), foram quantificados apenas frutose e glicose em concentrações de 3,1 g/100 g de fibra de coco verde seca (Tabela 8).

Figura 25 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde controle.

Fonte: Própria autoria.

Para o ensaio 2, foram observados frutose e glicose (Figura 26). Já no ensaio 4 (Figura 27), apenas frutose foi identificada e no ensaio 7, além de frutose e glicose, que foram quantificados, pode-se observar a presença de xilose, porém em quantidades abaixo do limite de quantificação.

Figura 26 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde do ensaio 2.

Fonte: Própria autoria.

Figura 27 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde do ensaio 4.

Fonte: Própria autoria.

Figura 28 - Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra de coco verde controle do ensaio 7.

Fonte: Própria autoria.

Como discutido, muitos dos açúcares investigados como xilose, manose e galactose não foram encontrados em nenhum dos ensaios (Tabela 8). Frutose e glicose foram encontradas em baixas concentrações. Como na determinação de açúcares redutores totais obteve-se valores de 532,27 μmol de equivalente em glicose/g de fibra de coco verde (Figura 21) para o controle e esse valor representa em massa aproximadamente 9,6 gramas de açúcares/100 g de fibra de

coco verde, indicando que existem outros açúcares presentes na fibra de coco que não foram investigados.

Uma possibilidade seria a presença de dissacarídeos nas amostras considerando que a atuação da enzima foi inibida por algum fator previamente apresentado (umidade das amostras, saturação por NaOH da fibra de coco, tempo de reação insuficiente ou flexibilidade da estrutura da fibra). A baixa atividade da enzima pode ter inibido a conversão de açúcares complexos em açúcares simples. Nos cromatogramas (Figura 25, 26, 27 e 28) é possível notar a presença de sacarose e maltose. Esses resultados corroboram com a conclusão de que a enzima adicionada não teve capacidade de acesso total ao substrato disponível. Novos estudos precisam ser realizados para encontrar as condições de processo que garantam conversão total do substrato em açúcares simples.

Tabela 8 - Teor dos principais açúcares presentes no hidrolisado da fibra de coco verde (FCV) seca obtido por Cromatografia de Alta Eficiência. Os valores foram expressos em g/100g de fibra de coco verde seca.

Açúcar (g/100g FCV)	Ensaio			
	Controle	2	4	7
Xilose	ND	ND	ND	ND
Manose	ND	ND	ND	ND
Frutose	3,1	3,1	2,1	1,6
Galactose	ND	ND	ND	ND
Glicose	3,1	2,5	ND	1,6
Rafinose	ND	ND	ND	ND
TOTAL	6,2	5,6	2,1	3,2

ND- Não detectado; Limite de detecção = 0,01g de açúcar/100 mL. Fonte: Própria autoria.

Prado *et al.* (2014) a partir da hidrólise da casca de coco com água subcrítica, em temperatura de 212°C, obtiveram teores de frutose, glicose e xilose de 0,32; 1,17 e 1,58 g/100 g de matéria seca. Os valores encontrados pelos autores para glicose e frutose são inferiores ao encontrado nesse estudo, mas superior para xilose.

6. Conclusão

Através de análises complementares de microscopia eletrônica de varredura, determinação da composição lignocelulósica e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, notou-se que o tratamento com CO₂ supercrítico provocou alterações na estrutura física e química da fibra, aumentando a porosidade e diminuindo o teor de compostos fenólicos, ceras e afrouxamento das ligações de hidrogênio causando a deslignificação da fibra de coco verde. No entanto, não houve aumento significativo da obtenção de açúcares redutores após hidrólise enzimática da fibra de coco que passou por extração com CO₂ supercrítico.

Embora, pelos métodos investigados, não tenha sido possível detectar que o pré-tratamento com CO₂ supercrítico tenha influenciado a deslignificação das fibras de coco, o que se viu foi que com ou sem pré-tratamento, a hidrólise enzimática da fibra de coco verde *in natura* apresentou bons valores de açúcares redutores. Esta constatação indica uma nova utilização para o material lignocelulósico do coco verde que é subaproveitado no Brasil. Os açúcares redutores obtidos da fibra de coco verde *in natura* podem passar por processo de purificação e isolamento de algum açúcar de interesse econômico ou ser utilizado como substrato para fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* na produção de álcool.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Futuros estudos devem ser realizados para investigar melhor o efeito que a umidade, condições de conversão enzimática, saturação por NaOH e a flexibilidade do material lignocelulósico podem ter na eficácia do uso de dióxido de carbono em condições supercríticas para deslignificação dos mesmos.

O aprofundamento nesse assunto é de extrema importância para que seja possível obter melhores resultados na obtenção de açúcares redutores mediante hidrólise enzimática desses materiais.

8. Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990.

ARAGÃO, W. M.; SANTOS, V. A. J.; ARAGÃO, F. B. Produção de fibra de cultivares de coqueiro. **Comunicado Técnico 36**, Aracaju, SE, p. 1-4, jan. 2005.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Fems Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005.

ASSMANN, N. et al. Supercritical extraction of lignin oxidation products in a microfluidic device. **Chemical Engineering Science**, Kidlington, v. 99, p. 177-183, Aug. 2013.

BRIGIDA, A. I. S. et al. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 79, n. 4, p. 832-838, Mar. 2010.

BRIGIDA, A. I. S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 137, p. 67-80, Sept. 2007.

BRÍGIDA, A. I. S.; ROSA, M. D. F. Determinação do teor de taninos na casca de coco verde (*Cocos nucifera*). In: ANNUAL MEETING INTERAMERICAN SOCIETY FOR TROPICAL HORTICULTURE, 49nd., 2003, Fortaleza. **Proceedings...** Miami, 2003. v. 47, p. 25-27.

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

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

CORRADINI, E. et al. A preliminary study for the use of natural fibers as reinforcement in starch-gluten-glycerol matrix. **Macromolecular Symposia**, Weinheim, v. 245, p. 558-564, 2006.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 92, p. 115-176, Aug. 2014.

DEY, G.; CHAKRABORTY, M.; MITRA, A. Profiling C-6-C-3 and C-6-C-1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. **Journal of Plant Physiology**, Muenchen, v. 162, n. 4, p. 375-381, Apr. 2005.

DEY, G.; NAGPAL, V.; BANERJEE, R. Immobilization of alpha-amylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 102, p. 303-313, Jul./Dec. 2002.

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

DOANE-WEIDEMAN, T.; LIESCHESKI, P. B. Analytical supercritical fluid extraction for food applications. In: LUTHRIA, D. L. **Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies**. Champaign: AOCS Publishing, 2004. p. 69-99.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 259-276, Mar. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Database agricultural**: production: crops primary: coconut. 2015. Disponível em: < <http://faostat.fao.org> >. Acesso em: 10 abr. 2015.

FATMAWATI, A. et al. Enzymatic hydrolysis of alkaline pretreated coconut coir. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL AND MATERIAL ENGINEERING, 2012, Semarang Indonesia. **Proceeding...** Semarang Indonesia: Department of Chemical Engineering Diponegoro University, 2012. p. 1-6.

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

GONÇALVES, F. A. et al. Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 77, p. 1-12, Dec. 2015.

GONÇALVES, A. F. et al. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, Oxford, v. 131, p. 66-76, Sep. 2014.

GOUVEIA, E. R. et al. Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HAN, J. S. Properties of nonwood fibers. In: NORTH AMERICAN NONWOOD SYMPOSIUM, Atlanta, 1998. **Proceedings...** Atlanta: USDA, 1998. Disponível em: < <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1998/han98a.pdf> >. Acesso em: 20 abr. 2015.

HERRERA-FRANCO, P. J.; VALADEZ-GONZALEZ, A. A study of the mechanical properties of short natural-fiber reinforced composites. **Composites Part B-Engineering**, Kidlington, v. 36, n. 8, p. 597-608, 2005. ISSN 1359-8368.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.

KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 139-144, Apr. 2001.

LEON, S. Y.; DELORES, M. I. Coconu. In: Barret, D. M., Somogyi, L., Ramaswami, H. Processing fruits - science and technology. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 29, P. 707-738.

MATTOS, A. L. A. et al. **Beneficiamento da casca de coco verde**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 37 p. (Apostila).

MELO, S. S. et al. Innovación del pre tratamiento del bagazo de caña de azúcar utilizando CO₂ supercrítico y solución diluida de NaOH como modificador de polaidad. In: CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN DE TÉCNICOS AZUCAREROS DE LATINOAMERICA U DEL CARIBE, 8., CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE TÉCNICOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR, 9., Santiago de Cali, 2012. **Resumenes...** Santiago de Cali, 2012. P. 570-571.

MESSING, R. A. **Immobilized enzymes for industrial reactors**. New York: Academic Press, 1975.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NETO, C. P. C. T. et al. Efeito de diferentes substratos na aclimatização “ex-vitro” de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 4, n. 2, 2004. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/500/50040211.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

OLIVEIRA, A. L. F. **Montagem de um equipamento de extração supercrítica e otimização de processos para obtenção de extratos de produtos naturais com princípios ativos pelo emprego desta tecnologia**. 2007. 97 f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

OLIVEIRA, S. L. D. R. D. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera*) para produção de celulases**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2010.

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

PASQUINI, D. et al. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 125-131, Jun. 2005.

PERRUT, M. Applications of supercritical fluid solvents in the pharmaceutical industry. In: MARINSKY, J. A. et al. (Ed.). **Ion exchange and solvent extraction**. New York: CRC Press, 2004. v. 17, cap. 1, p. 1-35.

PRADO, J. M. et al. Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 89, p. 89-98, May. 2014.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotecnología Aplicada**, Havana, v. 28, n. 4, p. 205-215, 2011

ROSA, M. D. F. et al. **Utilização da casca de coco como substrato agrícola**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 24 p.

SAHA, B. C. Enzymes as biocatalysts for conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars In: HOU, C. T. (Ed.). **Handbook of industrial biocatalysis**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. cap. 24, p. 24-1–24-12.

SANTOS, A. L. F.; KAWASI, A. Y. F.; COELHO, G. L. V. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 56, p. 277-282, 2011.

SANTOS, D. T. D. et al. Tecnologia supercrítica como uma alternativa para purificar xilitol biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 621-632, abr/jun. 2011.

SCHACHT, C.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 299-321, Oct. 2008.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. . Viçosa: UFV, 2002.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 32, p. 713-728, Apr. 2014.

SUWANNARANGSEE, S. et al. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 252-261, Sep. 2012.

VAITHANOMSAT, P. et al. The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. **Kasetsart Journal**, Chatuchak, v. 45, p. 159-164, 2011.

VAN ZYL, W. H. et al. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. **Interface Focus**, London, v. 1, n. 2, p. 196-211, Apr. 2011.

VARGAS RAMOS, V. H. A. W. M. D. et al. **Sistema de produção de mudas de coqueiras híbrido e anão (Cocos nucifera L.) na região do Distrito Federal**. Planaltina, DF: Embrapa, 2005. p. 1-4.

ZHENG, Y. Z.; LIN, H. M.; TSAO, G. T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 14, n. 6, p. 890-896, Nov./Dec. 1998.