

## Artigo

**Produção de Etanol de Segunda Geração a Partir de Aguapé:  
Uma Revisão****Teixeira, D. A.; \* Santos, A. S.; Pantoja, L. A.; Brito, P. L.; Costa, A. S. V.***Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 28 de janeiro de 2019<http://rvq.sbq.org.br>**Production of Second Generation Ethanol from Water Hyacinth: A  
Review**

**Abstract:** The water hyacinth is a floating aquatic macrophyte plant found in several environments such as lakes and reservoirs of hydroelectric power plants. The high development of these plants can form dense carpets resulting in reduction of oxygen in the water and aquatic flora and fauna. The high growth of water hyacinth and its lignocellulosic chemical composition are factors that contribute to the use of water hyacinth as a promising source for the production of second generation ethanol. The present study aims to perform a review about different technologies for the production of bioethanol from the water.

**Keywords:** *Eichhornia crassipes*; bioethanol; pretreatment; biomass; biofuels.

**Resumo**

O aguapé é uma planta macrófita aquática flutuante encontrada em diversos ambientes como lagos e reservatórios de usinas hidrelétricas. O alto desenvolvimento destas plantas pode formar tapetes densos resultando em redução do oxigênio na água e diminuição da flora e fauna aquática. O alto crescimento do aguapé e sua composição química lignocelulósica são fatores que contribuem para a utilização do aguapé como fonte promissora para a produção de etanol de segunda geração. O presente estudo tem como objetivo realizar uma revisão acerca de diferentes tecnologias para a produção de bioetanol a partir do aguapé.

**Palavras-chave:** *Eichhornia crassipes*; bioetanol; pré-tratamento; biomassa; biocombustíveis.

\* Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Pós-Graduação em Biocombustíveis, CEP 39100-000, Diamantina-MG, Brasil

✉ [danielteixeira@unipacto.com.br](mailto:danielteixeira@unipacto.com.br)

DOI:

## Título

**Daniel de Azevedo Teixeira,\* Alexandre Soares dos Santos, Lílian Araújo Pantoja, Philipe Luan Brito, Alexandre Sylvio Vieira da Costa**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Departamento de Pós-Graduação em Biocombustíveis, CEP 39100-000, Diamantina-MG, Brasil.

\* [danielteixeira@unipacto.com.br](mailto:danielteixeira@unipacto.com.br)

*Recebido em 23 de maio de 2018. Aceito para publicação em 7 de dezembro de 2018*

1. Introdução
2. Produção e Composição do Aguapé
3. A Utilização de Aguapés para Produção de Etanol de 2ª Geração
  - 3.1. Pré-Tratamento da biomassa de aguapé (*Eichhornia crassipes*)
  - 3.2. Hidrólise enzimática do aguapé
  - 3.3. Fermentação da biomassa lignocelulósica
4. Conclusão

### 1. Introdução

O aguapé (*Eichhornia crassipes*) é uma macrófita aquática emersa flutuante originária da região amazônica.<sup>1</sup> Estas plantas aquáticas apresentam taxonomia bastante diversificada, as classificações taxonômicas são definidas de acordo com a sua forma de vida ou tipo biológico/ecológico que está relacionada à sua forma de crescimento e fixação. As principais formas de vida são: macrófitas emersas, com folhas flutuantes, submersas enraizadas, submersas livres e flutuantes livres.<sup>2</sup>

Altas colonizações de aguapé trazem impactos negativos na economia pesqueira, pois reduzem a concentração de oxigênio dissolvido na coluna d'água; favorecem a proliferação de insetos, larvas e moluscos transmissores de doenças como encefalite,

malária e esquistossomose; influenciam a redução do fluxo de água em canais, represas e rios; dificultam a navegação e a pesca; e são responsáveis por elevadas perdas de água por evapotranspiração.<sup>3-4</sup>

A baixa diversidade e densidade de inimigos naturais e a eutrofização do ambiente são as duas principais causas do excessivo crescimento das macrófitas aquáticas.<sup>2</sup> Por ser muito intenso, o crescimento da *Eichhornia crassipes* pode levar à cobertura total da lâmina d'água de rios e lagos, o que implica diretamente em prejuízos para a flora e fauna locais. Além disso, em represas artificiais, o acúmulo do aguapé nos reservatórios atrapalha o funcionamento das turbinas de usinas hidrelétricas. Por causar todos esses problemas ambientais e econômicos, o aguapé é considerado uma praga aquática nos contextos não naturais.<sup>5-6</sup> Nessas

condições há necessidade do controle populacional dessas plantas para manter as colonizações dentro de limites em que seus efeitos benéficos ao ambiente aquático suplantem os efeitos prejudiciais. Esse controle pode ser feito pelo aumento de pressão de inimigos naturais (controle biológico) ou pela promoção da morte (controle químico) ou retirada das plantas do corpo hídrico (controle mecânico). A retirada do aguapé presente nos corpos hídricos das hidrelétricas é prática muito comum e resulta em grande volume de biomassa como resíduo.

A biomassa residual pode ser utilizada para diversas finalidades. Exemplos disso são seu uso como fertilizante, alimento animal e para a produção de biocombustíveis, além de fonte de energia, na forma briquetes ou biogás.<sup>7</sup> No setor de biocombustível, essa biomassa pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração.<sup>8,9,10</sup> Portanto, o artigo propõe uma revisão sobre diversas tecnologias empregadas para a produção de etanol de segunda geração a partir do aguapé.

## 2. Produção e Composição do Aguapé

As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para a produção do etanol, assim como para outros biocombustíveis. Vários processos têm sido desenvolvidos utilizando a biomassa lignocelulósica como substrato para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como: proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos.<sup>11</sup>

Originárias da América do Sul, as plantas macrófitas aquáticas como o aguapé são bastante conhecidas pelo seu rápido crescimento e os problemas ambientais que a mesmas provocam.<sup>12</sup> Seu crescimento promove o desenvolvimento de tapetes

densos dificultando a passagem de luz para as plantas, reduzindo o oxigênio na água e tornando os ecossistemas menos férteis.<sup>6</sup>

O aguapé pode ser aplicado como uma fonte útil de biomassa devido à sua composição química e ao seu rápido crescimento e expansão. O desenvolvimento desta macrófita ocorre principalmente em águas ricas em nutrientes, e apresenta grande resistência a variações nos níveis de nutrientes, temperatura e pH. Diante destes fatores, o aguapé pode ser uma promissora fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis devido aos vários aspectos positivos como: 1) não compete com recursos utilizados na cultura alimentar; 2) não causa mudanças no uso da terra ou no agrossistema para a produção de biocombustível; 3) o baixo custo econômico; 4) os potenciais benefícios para o ecossistema durante o período de extração.<sup>13</sup>

A taxa de crescimento do aguapé apresenta valores bastante elevados em diversos locais: 220 ton/ha/dia em reservatórios,<sup>8</sup> 17,5 ton/ha/dia de biomassa úmida em lagoas de esgoto doméstico;<sup>14</sup> 215 ton/ha/dia retirado em lagos da cidade de Madrid<sup>15</sup>  $2,4 \times 10^7$  ton/dia retiradas no leito dos rios do Pantanal.<sup>16</sup> Essa rápida taxa de crescimento, junto com a capacidade de competir com outras plantas aquáticas e sua facilidade de adaptação tornam o aguapé uma das plantas mais invasivas, pois, atualmente, é possível encontrar essa planta nos cinco continentes. Essas características proporcionam a esse vegetal capacidade de gerar quantidade significativa de biomassa que pode estender-se em grande extensão na superfície de um corpo hídrico, causando muitos problemas ambientais e econômicos.<sup>17-10</sup> Um dos principais problemas associados ao crescimento do aguapé deve-se à inviabilidade de tráfego de navios em regiões pesqueiras, a morte de peixes por efeito tóxico e anóxia proveniente da eutrofização. A eutrofização por aguapé no Lago Victoria (maior lago tropical do mundo) representa um prejuízo de cerca de US\$ 350 milhões por ano caracterizando grande impacto econômico nas atividades

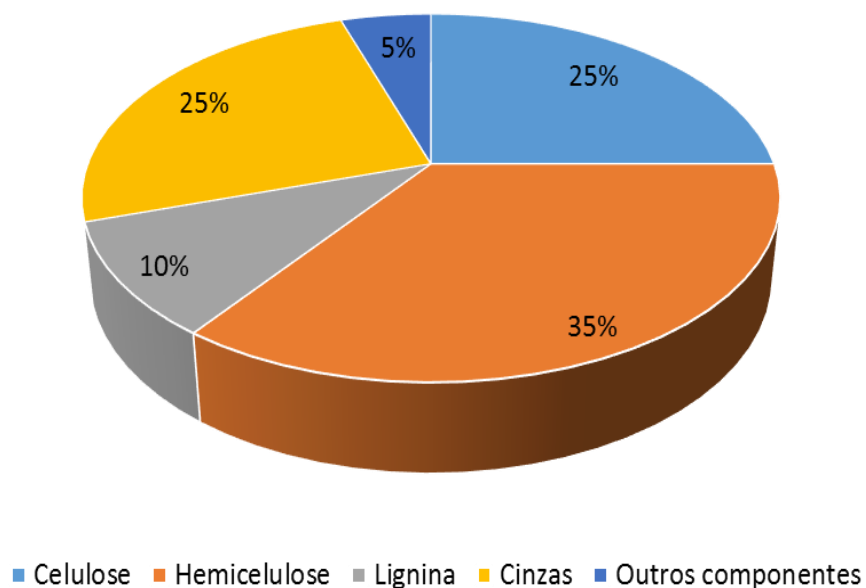
pesqueiras de um terço da população do Quênia, Tanzânia e Uganda.<sup>18</sup>

A aplicação de herbicidas para o controle de aguapé é uma alternativa que demonstrou-se eficaz e de baixo custo, entretanto a deposição das plantas mortas no leito dos lagos e rios pode contribuir para o processo de decomposição anaeróbica e resultar na morte de peixes. Além disso, a ação dos herbicidas pode afetar também plantas nativas que são benéficas e necessárias para a manutenção do ecossistema.<sup>18</sup> Outra alternativa interessante trata-se da remoção física, manual ou mecânica do aguapé, processo que pode garantir a retirada total da biomassa nos reservatórios aquáticos. Embora, a remoção manual apresente ótima eficiência, a profundidade da água pode se apresentar como fator limitante ao alcance e à segurança dos trabalhadores. O processo de remoção mecânica utilizando barcos especializados reduz significativamente os problemas com a segurança, toda via, os cortes realizados no aguapé podem resultar em aumento da biomassa através da reprodução assexuada pela divisão dos rizomas e deposição de detritos no fundo dos reservatórios, ocasionando diminuição da oxigenação e emissão de gases de efeito estufa por decomposição orgânica.<sup>19</sup>

Os inúmeros danos ambientais provocados pelos resíduos de aguapé tornam essa biomassa uma das alternativas mais interessantes para a utilização industrial. Outro aspecto interessante são os diversos produtos de valor agregado que podem ser produzidos a partir do resíduo de aguapé. Estes produtos incluem diferentes enzimas (celulase,  $\beta$ -glicosidase, xylanase), xantogenato de celulose, ácido levulínico, ácido shikímico, biogás, biohidrogênio, biopolímero, biobutanol, biofertilizantes, polímero superabsorvente, fibra de carbono, xilitol e bioetanol.<sup>20</sup>

Um dos fatores mais importantes para a utilização de uma determinada matéria-prima na produção de biocombustíveis é a sua composição química. O aguapé, apresenta um significativo teor de água. Em comparação com a sua matéria seca, esse valor é superior a 90 %. A caracterização química da sua biomassa seca é composta por aproximadamente 25 % de celulose, 35 % de hemicelulose, 10 % de lignina, 25 % de cinzas (Figura 1). O valor das cinzas é alto por causa da propriedade desta planta de retirar substâncias dos corpos hídricos, com metais pesados.<sup>5,7,21</sup> Devido ao seu processo natural de bioissorção, o aguapé configura-se como uma alternativa importante para fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados com metais pesados.<sup>22</sup> Os principais metais pesados identificados no aguapé através do processo de sorção são: Cádmio (Cd), Zinco (Zn), Crômio (Cr), Chumbo (Pb) e Cobre (Cu). As concentrações destes componentes é dependente das contaminações presentes nos reservatórios e dos resíduos liberados nos efluentes.<sup>23</sup>

A composição mineralógica do aguapé baseia-se na presença de Carbono (C) 38,4 %, Hidrogênio (H) 5,85 %, Oxigênio 28,1 %, Nitrogênio (N) 2,9 %, Enxofre (S) 0,47 %, Fósforo (P) 0,77 %, Potássio (K) 2,78 %, Cálcio (Ca) 1,32 %, Sódio (Na) 1,44 %.<sup>24-25</sup> Os elementos centrais C, H, O, S são compostos interessantes para o desenvolvimento de biocombustíveis através da pirólise e gaseificação, embora em comparação com outras biomassas o aguapé apresente baixos rendimentos, sendo necessário estratégias de recuperação de calor para otimização do processo da obtenção de bio-óleo e o biochar (produto sólido semelhante ao carvão) que são produtos da pirólise<sup>26-27</sup> além da gaseificação, que gera uma mistura de gás-hidrogênio e monóxido de carbono.<sup>28</sup>



**Figura 1.** Composição química do Aguapé (*Eichhornia crassipes*)

Dentre os principais componentes do aguapé destaca-se o alto valor de proteína bruta, aproximadamente 20% da massa seca, sendo alternativa interessante para suplementação de porcos, patos, peixes e ruminantes.<sup>29</sup> Os altos teores de celulose e hemicelulose permitem obter maiores concentrações de açúcares fermentescíveis

que poderão ser convertidos a etanol por ação microbológica como demonstrado em diversas pesquisas na Tabela 1. Portanto, devido ao seu rápido crescimento e baixo teor de lignina o aguapé pode ser considerado fonte promissora de biomassa para conversão de açúcares fermentescíveis em etanol

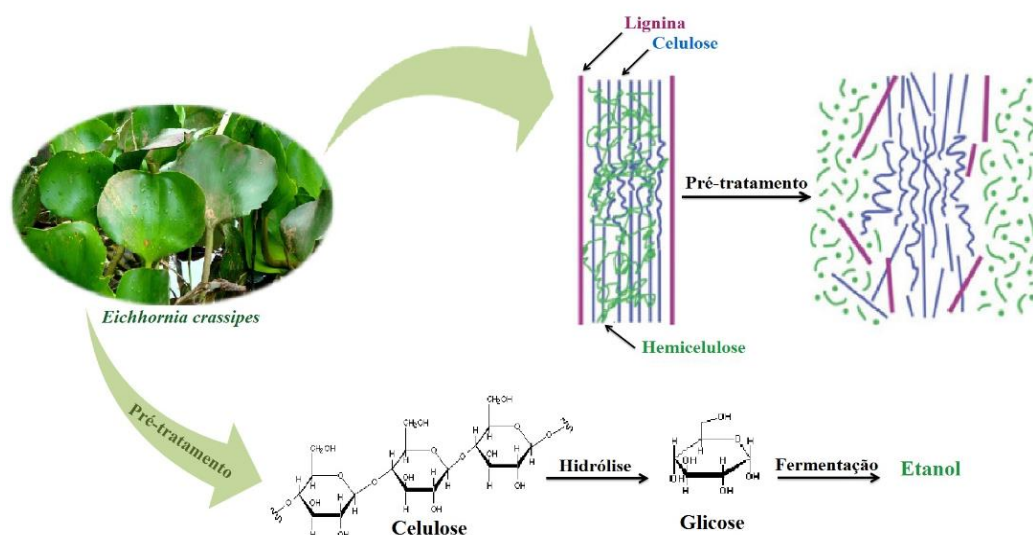
**Tabela 1.** Estudos envolvendo o uso de aguapé como biomassa para produção de biocombustíveis.

Produto	Microrganismo	Referência
Bioetanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Bioetanol	<i>Zymomonas mobilis</i>	31
Bioetanol	<i>Pichia stipites</i>	32
Bioetanol	<i>Candida shehatae</i>	32
Bioetanol	<i>Clostridium thermocellum</i>	33
Bioetanol	<i>Candida intermedia</i> NRRL Y-981	34
Biogás	Consórcio de microrganismos	35
Biohidrogênio	<i>Clostridium diolis</i> C32-KKU	36
Biobutanol	<i>Clostridium beijerinckii</i>	37
Biopolímero	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Fibra de carbono	-	39
Biofertilizante	-	40
Briquetes de combustível	-	7
Combustível de alto valor calorífico	-	41

### 3. A Utilização de Aguapés para Produção de Etanol de 2ª Geração

As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, tornando-se atrativas para a produção do etanol, assim como para outros biocombustíveis. A utilização do aguapé como fonte de produção de etanol de segunda geração se apresenta de forma bastante interessante de acordo com dados obtidos recentemente apresentando a composição química da macrófita com 20 % de celulose, 48 % de Hemicelulose e 3,5 % de Lignina.<sup>35-36</sup>

O aguapé como material lignocelulósico apresenta seus componentes arranjados de forma que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactas através das ligações de hidrogênio e lignina que promovem a rigidez da planta, enquanto a lignina circundante fixa os componentes e age como uma barreira física para o ataque dos microrganismos e/ou enzimas e a água (Figura 2). A hemicelulose, por sua vez, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa.<sup>42</sup> As concentrações desses constituintes na biomassa variam muito de uma espécie vegetal para outra, ou até mesmo, dentro da mesma espécie.



**Figura 2.** Esquema representativo das etapas para obtenção de etanol a partir de Aguapé (*Eichhornia crassipes*). Fonte: Adaptação de 43

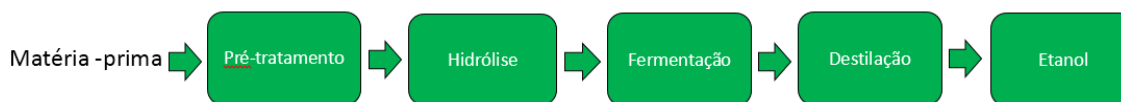
Diante disso, os dois maiores obstáculos para impedir a hidrólise da celulose do aguapé são a recalcitrância da celulose cristalina, proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas em microfibrilas, e a alta proteção que a lignina proporciona à estrutura celulósica, atuando como uma barreira física contra o ataque enzimático.<sup>44</sup>

A produção de etanol de segunda geração envolve quatro principais etapas: inicia-se

pelo pré-tratamento da biomassa, seguido da hidrólise com produção de açúcares simples. Na etapa de hidrólise são liberados os açúcares (monômeros) a partir das frações de celulose (homopolímero formado de glicose) e a hemicelulose (heteropolímero constituído principalmente do monômero xilose).<sup>20</sup> Após o processo de hidrólise os açúcares serão levados para a etapa de fermentação e, em seguida a separação do produto pelo processo de destilação (Figura 3).<sup>20</sup> O pré-

tratamento dos materiais lignocelulósicos visa aumentar a área superficial da celulose e reduzir sua cristalinidade, uma vez que esta se encontra envolvida por camadas de lignina e hemicelulose. Realizar a hidrólise da biomassa nativa sem a etapa de pré-

tratamento significa obter um rendimento inferior a 20 % no processo devido às suas características estruturais como cristalinidade, porosidade, superfície de contato e revestimento por lignina e hemicelulose.<sup>45</sup>



**Figura 3.** Fluxograma das etapas de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica

A etapa de hidrólise consiste na degradação das cadeias poliméricas da celulose em monômeros de glicose. Há dois principais tipos de hidrólise, a ácida e a enzimática. A ácida envolve um catalisador ácido e sua conversão é rápida, sendo necessário um minucioso controle da reação com o objetivo de evitar a formação de produtos indesejáveis e inibidores do

processo. Na hidrólise enzimática o catalisador é de origem biológica, o qual possui ação altamente específica sendo necessário um controle específico do meio de reação.<sup>45</sup> Portanto, existem diferentes tecnologias empregadas para a obtenção de etanol a partir do aguapé como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Tecnologias e resultados de processos propostos para a produção de etanol a partir de aguapé.

Tecnologia	Resultados	Referência
Combinação de pré-tratamento ácido com hidrólise enzimática e sacarificação e fermentação simultânea (SSF).	402, 93 mg de açúcares redutores e 1,289 g L <sup>-1</sup> de Bioetanol.	47
Pré-tratamento alcalino com sacarificação e fermentação simultânea (SSF) utilizando <i>Kluyveromyces marxianus</i> .	8.04 g L <sup>-1</sup> de Bioetanol.	48
Pré-tratamento alcalino com SSF utilizando <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> com <i>Pichia stipitis</i> .	0,411 g g <sup>-1</sup> de Bioetanol- a método de SSF apresentou maiores concentrações de bioetanol em comparação com hidrólise e fermentação separadas 0,344 g g <sup>-1</sup> .	49
Pré-tratamento ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 1 % v-v com hidrólise e fermentação separadas, utilizando <i>S.cerevisiae</i> e celulase para <i>Trichoderma reesei</i> .	Açúcares redutores 714 mg g <sup>-1</sup> e concentração de bioetanol 0,45 mg g <sup>-1</sup> de glicose.	50
Três diferentes tipos de pré-tratamento: oxidação úmida,	Maior produção de etanol por AFEX 1,52 g L <sup>-1</sup> , por ácido	51

ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ )-acetona, explosão de fibra de amônia com SSF utilizando <i>S. cerevisiae</i> e <i>Candida shehatae</i> .	fosfórico-acetona $1,31 \text{ g L}^{-1}$ e por oxidação úmida $1.23 \text{ g L}^{-1}$ .	
Pré-tratamento ácido com variação das concentrações de $H_2SO_4$ (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, e 2.0) na razão de 1:8 com SHF utilizando <i>C. intermedia</i> , <i>P. stipitis</i> , <i>P. tannophilus</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	Produção de etanol por: <i>C. intermedia</i> ( $0,021 \text{ g g}^{-1}$ ), <i>P. stipitis</i> ( $0,037 \text{ g g}^{-1}$ ) <i>P. tannophilus</i> ( $0,043 \text{ g g}^{-1}$ ) e <i>S. cerevisiae</i> ( $0,015 \text{ g g}^{-1}$ ).	52
Tratamento alcalino por micro-ondas e organosolv com SSF em balão e biorreator com GH5 isolados de <i>C. thermocellum</i> + hemicelulose recombinante G43+. <i>S.cerevisiae</i> + <i>C. shehatae</i>	Produção de etanol em balão de $9.78 \text{ g L}^{-1}$ e $13.7 \text{ g L}^{-1}$ através de biorreator.	33
Tratamento com micro-ondas com ácido sulfúrico diluído 1 % com SSF em béquer e utilizando <i>P. stipitis</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> e hidrólise por <i>T. reesei</i>	Produção de açúcares redutores de $482.8 \text{ g.g}^{-1}$ e $0.19 \text{ g.L}^{-1}$ de Bioetanol.	53
Pré-tratamento através de NaOH 3 % e $H_2O_2$ 1,5 % com SSF utilizando <i>Kluyveromyces marxianu</i> .	Produção de açúcares redutores de $223.53 \text{ g.g}^{-1}$ e $7.34 \text{ g.L}^{-1}$ de Bioetanol.	54
Pré-tratamento com líquido ultrassônico assistido com surfactante.	Produção de açúcares redutores de $2.339 \text{ mg ml}^{-1}$ .	55
Pré-tratamento ácido associado ao pré-tratamento biológico utilizando fungos <i>Echinodontium taxodii</i> e <i>Antrodia sp.</i>	Produção de etanol com pré-tratamento associado $0.192 \text{ g g}^{-1}$ , produção de etanol apenas com pré-tratamento ácido $0.146 \text{ g g}^{-1}$ .	56
Pré-tratamento com ácido diluído 2 %.	Produção de etanol $33.3 \text{ g L}^{-1}$ .	57
Pré-tratamento com ácido diluído e fermentação mista utilizando <i>S. cerevisiae</i> (MTCC 173) e <i>Zymomonas mobilis</i> (MTCC 2428)	Produção de etanol em $13.6 \text{ mg ml}^{-1}$ através de fermentação mista.	58
Pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática para produção do etanol, utilizando processos de hidrólise e fermentação separados (SHF).	Produção teórica de etanol $3.39 \text{ g L}^{-1}$ apresentando 96,07 % de rendimento com produtividade volumétrica de $0,221 \text{ g L}^{-1}$ .	59



### 3.1. Pré-tratamento da biomassa de aguapé (*Eichhornia crassipes*)

O pré-tratamento do aguapé tem por objetivo aumentar a área de superfície da biomassa, aumentar a porosidade dos materiais e reduzir a cristalinidade da celulose. Estas alterações promovidas na estrutura da biomassa permitem que a celulose se torne mais acessível na etapa subsequente que é a hidrólise enzimática. Além disso, um bom pré-tratamento deve preservar as pentoses para aumentar os rendimentos de etanol e evitar a formação de inibidores da fermentação.<sup>60</sup>

O aguapé quando hidrolisado na sua forma natural apresenta rendimentos muito baixos, menores que 20%.<sup>61</sup> Isso ocorre porque a biomassa possui uma estrutura celular rígida, complexa e recalcitrante à decomposição devido às características estruturais dos tecidos vegetais e às interações de natureza físico-químicas estabelecidas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina. Em geral, o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos é alto, sendo interessante o uso de pré-tratamento que diminua o índice de cristalinidade da celulose.<sup>62</sup>

Cada pré-tratamento altera de forma diferente a estrutura da biomassa. Entretanto, já foram descritos métodos físicos, químicos e estratégias híbridas para o pré-tratamento do aguapé. Dentre os vários métodos utilizados destaca-se o pré-tratamento ácido,<sup>63</sup> alcalino,<sup>49-64</sup> biológico,<sup>65</sup> com água quente,<sup>66</sup> micro-alcalino,<sup>47</sup> ultrassom alcalino combinado,<sup>67</sup> catalítico por liquefação hidrotermal,<sup>68</sup> com peróxido de cálcio,<sup>12</sup> microemulsões líquidas iônicas isentas de tensoativos,<sup>69</sup> conversão termoquímica<sup>70</sup> e micro-ondas assistido organo-solvente alcalino.<sup>71</sup>

A eficiência do pré-tratamento é baseada no desempenho da hidrólise. Em geral, um bom pré-tratamento proporciona altos rendimentos e taxas de hidrólise, não gera inibidores da fermentação, tem baixo custo, não apresenta perda de carboidratos ou

degradação da biomassa, possibilita a recuperação da lignina e consome pouca energia.<sup>72</sup>

A utilização de ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  diluído (0,5 – 4 %) tem sido a melhor proposta na solubilização da hemicelulose. Neste caso, os ácidos são utilizados como catalisadores no processo de solubilização das biomassas como o aguapé. A hemicelulose solubilizada pode ser recuperada na forma de seus monossacarídeos presentes no hidrolisado ácido, a fração sólida resultante da hidrólise apresenta celulose e lignina isoladas. A otimização do pré-tratamento do aguapé com ácidos diluídos já fora padronizada em um estudo que apresentou um rendimento superior a 90 % de açúcares redutores, com o emprego de ácido sulfúrico a 2 % a 110 °C durante 90 min.<sup>73</sup>

Entretanto, o uso de ácidos diluídos não proporciona um inchamento adequado da região cristalina da celulose, o que leva a uma baixa taxa de conversão celulose-açúcar. Para se alcançar taxas aceitáveis de conversão da celulose à glicose, em tempos razoavelmente curtos e com o uso de ácidos diluídos, é necessário um incremento na pressão e na temperatura, devido à inacessibilidade dos cristalitos de celulose, o que provoca a degradação de uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel, levando a um baixo rendimento da hidrólise e da fermentação.<sup>62</sup> Portanto, uma alternativa interessante é conjugar o pré-tratamento ácido do aguapé com o pré-tratamento alcalino.

O pré-tratamento alcalino trata-se de um processo tecnológico que objetiva utilizar soluções alcalinas, tais como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio ( $Ca(OH)_2$ ) ou hidróxido de amônia ( $NH_4(OH)$ ), para remover a lignina e parte da hemicelulose, aumentando eficientemente a acessibilidade da enzima à celulose.<sup>74</sup> O pré-tratamento alcalino de aguapé apresentou redução de aproximadamente 87 % do teor de lignina, sem apresentar alteração nos teores de celulose, portanto, apresenta-se como uma

eficiente alternativa para o processo de deslignificação.<sup>9</sup>

### 3.2. Hidrólise enzimática do aguapé

A hidrólise do material lignocelulósico é uma etapa fundamental no processo de produção de etanol. O objetivo principal deste processo concentra-se em possibilitar a conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis que poderão ser convertidos a etanol por ação microbiológica. A presença de hemicelulose e lignina dificulta o acesso dos reagentes de hidrólise à celulose, reduzindo a eficiência desta etapa.

Diante disso, a remoção destes compostos aumenta a porosidade do material, melhorando significativamente o processo de hidrólise.

A hidrólise enzimática do Aguapé geralmente ocorre através do emprego de um conjunto enzimático composto por celulasas. As celulasas são classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. O conjunto de celulasas é dividido em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e  $\beta$ -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose.<sup>75</sup>

A Celluclast<sup>®</sup> é uma enzima comercial produzida pela Novozymes<sup>®</sup> composta por um coquetel de enzimas com boa empregabilidade no processo de sacarificação enzimática. A hidrólise enzimática de amostras pré-tratadas de aguapé utilizando a enzima Celluclast<sup>®</sup> apresentou rendimentos superiores a 80 % na liberação de açúcares redutores.<sup>21</sup> Toda via, algumas outras enzimas têm sido empregadas na conversão de biomassas lignocelulósicas. A Cellic CTec2<sup>®</sup> Novozymes<sup>®</sup> (celulasas agressivas e altos níveis de  $\beta$ -glicosidases), foi utilizada na hidrólise de palha de trigo apresentando 98 % de

rendimento na conversão de açúcares contra 81% de rendimento da Celluclast<sup>®</sup>, configurando-se como uma boa alternativa para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos como o aguapé.<sup>76</sup> Entretanto, o atual emprego de enzimas comerciais neste processo, denominado sacarificação enzimática, apresenta alto custo, o que torna a produção do etanol de segunda geração mais onerosa.<sup>77</sup> Toda via, existem pesquisas para o desenvolvimento tecnológico de obtenção de etanol lignocelulósico utilizando enzimas de baixo custo, como por exemplo, através da seleção de microrganismos produtores de hidrolases provenientes de resíduos agroindustriais e pela otimização de processos. Dentre esses microrganismos destacam-se os produtores de celulasas e xilanasas como: os fungos filamentosos *Trichoderma reesei* (NS 50013 complexo de celulasas), *Aspergillus niger* (NS 50010  $\beta$ -glicosidases);<sup>68</sup> leveduras, dos gêneros *Trichosporium* e *Cryptococcus* e bactérias, como as dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Cellulomonas*.<sup>78,79,80</sup> Outro fator interessante é otimizar as condições de temperatura e pH para melhor rendimento no processo de hidrólise enzimática. A otimização da hidrólise de aguapé após pré-tratamento ácido demonstrou melhores condições associadas a 50 °C de temperatura, pH (5,0 – 5,5) com 5 % de substrato e considerando 30 FPU-g de carga enzimática.<sup>9</sup>

Os diferentes processos de pré-tratamento dependem do material utilizado e da finalidade proposta de utilização das frações dos materiais lignocelulósicos. O pré-tratamento proporciona uma mudança na estrutura morfológica da biomassa, tornando a celulose mais acessível ao ataque de enzimas ou produtos químicos para a produção de açúcares fermentescíveis.<sup>81-82</sup>

A maior capacidade dos microrganismos ou enzimas em hidrolisar os materiais lignocelulósicos para a conversão de glicose reflete no que se pode considerar uma maior digestibilidade da biomassa. Um dos fatores primordiais para viabilizar a ação microbiológica sobre a biomassa

lignocelulósica é o processo de pré-tratamento das fibras celulósicas proporcionando maior superfície de contato para a ação enzimática.<sup>83</sup>

O pré-tratamento deve ser eficiente do ponto de vista energético e químico e vários critérios devem ser considerados, como preservar a fração de hemiceluloses, evitar a degradação ou perda de celulose, bem como a formação de compostos inibidores ao crescimento de microrganismos da fermentação e minimizar os custos. A geração de lignina de alto valor agregado também pode ser um parâmetro de comparação entre os diversos tipos de pré-tratamento no custo das etapas posteriores de recuperação de produto.<sup>84</sup>

### 3.3. Fermentação da biomassa lignocelulósica

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico, no qual os microrganismos transformam os açúcares em etanol e CO<sub>2</sub>. Os microrganismos fermentadores devem ser capazes de fermentar todos os monossacarídeos presentes e, além disso, resistir a ação de possíveis inibidores presentes nos hidrolisados.<sup>84</sup> Na produção industrial de etanol geralmente utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros inibidores (formados tanto durante o pré-tratamento de matérias-primas quanto durante a fermentação) e à capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbicas que são caracteristicamente estabelecidas durante a fermentação em larga-escala.<sup>85</sup> Além deste fato, esta espécie é de fácil disponibilidade e manipulação, apresentando baixo custo.

Entretanto, a *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de fermentar xilose. Diante disso, torna-se interessante a utilização da levedura *Pichia stipits* para fermentação industrial de pentoses, por se tratar de um microrganismo

que fermenta xilose e com alta produção de etanol aparentemente.

As cepas mais utilizadas para a produção de etanol através do aguapé são *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipits* e *Zymomonas mobilis*. Porém já foram descritos processos fermentativos do aguapé utilizando as cepas de *Trichoderma reesei* em monoculturas ou associadas a *Pichia stipits*;<sup>49</sup> *Candida shehatae*,<sup>86</sup> e *Candida intermedia*.<sup>34</sup> Outra alternativa interessante é a utilização de bactérias termotolerantes como o *Clostridium thermocellum* para a fermentação do aguapé. Este microrganismo demonstrou capacidade de produzir 13,45 g / L de bioetanol em uma incubação de 44 °C de temperatura.<sup>33</sup> Normalmente, a fermentação realizada com *Saccharomyces cerevisiae* ocorre em temperaturas de 32-35 °C. Temperaturas superiores podem dificultar a viabilidade das leveduras. Diante disso, o uso de bactérias termotolerantes pode caracterizar-se como uma alternativa promissora.

## 4. Conclusão

A utilização da biomassa aguapé para a produção de etanol de segunda geração constitui como uma boa alternativa para as políticas de incentivo ao uso de biocombustíveis. A sua composição química e a necessidade de estabelecer medidas para o controle do crescimento desta planta são fatores que contribuem para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a produção de bioetanol a partir do aguapé.

Pode-se afirmar que o pré-tratamento com ácido diluído (0,5 – 4 %) apresenta-se como a melhor alternativa para a solubilização da hemicelulose e o pré-tratamento alcalino demonstrou bastante eficiência na deslignificação, com valores de 87 % na redução de lignina. Na etapa de fermentação do aguapé o microrganismo mais utilizado em escala industrial é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*,

entretanto outras cepas como *Trichoderma reesei*, *Pichia stipitis*; *Candida shehatae*, *Candida intermedia* e *Clostridium thermocellum* têm sido empregadas como inovações do processo.

Portanto, o estudo propõe o desenvolvimento de tecnologias associadas à otimização das etapas de pré-tratamento e a melhoria genética de microrganismos para a maior produtividade da hidrólise e fermentação. A otimização dos processos tecnológicos podem impactar em maior rendimento da produção de etanol de segunda geração a partir do aguapé.

### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Priya, E. S.; Selvan, P. S. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) – An efficient and economic adsorbent for textile effluent treatment – A review. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *10*, S3548. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Zheng, J.-C.; Liu, H.-Q.; Feng, H.-M.; Li, W.-W.; Lam, M. H.-W.; Lam, P. K.-S.; Yu, H.-Q. Competitive sorption of heavy metals by water hyacinth roots. *Environmental Pollution* **2016**, *219*, 837. [CrossRef]
- <sup>3</sup> De Melo, M. M. R.; Silva, R. P.; Silvestre, A. J. D.; Silva, C. M. Valorization of water hyacinth through supercritical CO<sub>2</sub> extraction of stigmaterol. *Industrial Crops and Products* **2016**, *80*, 177. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Thi, B. T. N.; Ong, L. K.; Thi, D. T. N.; Ju, Y.-H. Effect of subcritical water pretreatment on cellulose recovery of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **2017**, *71*, 55. [CrossRef]
- <sup>5</sup> Ganguly, A.; Chatterjee, P. K.; Dey, A. Studies on ethanol production from water hyacinth—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2012**, *16*, 966. [CrossRef]
- <sup>6</sup> Das, A.; Ghosh, P.; Paul, T.; Ghosh, U.; Pati, B. R.; Mondal, K. C. Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Biotechnology* **2016**, *6*, 70. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>7</sup> Reznia, S.; Ponraj, M.; Din, M. F. M.; Songip, A. R.; Sairan, F. M.; Chelliapan, S. The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *41*, 943. [CrossRef]
- <sup>8</sup> Bayrakci, A. G.; Koçar, G. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *30*, 306. [CrossRef]
- <sup>9</sup> Das, M.; Raychaudhuri, A.; Ghosh, S. K.; Supply Chain of Bioethanol Production from Whey: A Review. *Procedia Environmental Sciences* **2016**, *35*, 833. [CrossRef]
- <sup>10</sup> Patel, S. I.; Patel, N. G. Production of bioethanol using water hyacinth, an aquatic weed, as a Substrate. *Journal of Environmental and Social Sciences* **2015**, *2*, 108. [Link]
- <sup>11</sup> Zheng, Y.; Shi, J.; Tu, M.; Cheng, Y.-S., Chapter One - Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. *Advances in Bioenergy* **2017**, *2*, 1. [CrossRef]
- <sup>12</sup> Cheng, J.; Lin, R.; Song, W.; Xia, A.; Zhou, J.; Cen, K. Enhancement of fermentative hydrogen production from hydrolyzed water hyacinth with activated carbon detoxification and bacteria domestication. *International Journal of Hydrogen Energy* **2015**, *40*, 2545. [CrossRef]
- <sup>13</sup> Bergier, L.; Salis, M. M.; Miranda, C. H. B.; Ortega, E.; Luengo, C. A. Biofuel production from water hyacinth in the Pantanal wetland. *Ecohydrology & Hydrobiology* **2012**, *12*, 77. [CrossRef]
- <sup>14</sup> Wolverton, B. C.; McDonald, R. C., Compiled data on the vascular aquatic plant program. *NASA Report, Washington, D.C.*, **1978**, 150. [Link]

- <sup>15</sup> Delgado, M., Bigeriego, M., Guardiola, E. Water hyacinth biomass production in Madrid. *Biomass and Bioenergy* **1992**, *3*, 57. [[CrossRef](#)]
- <sup>16</sup> Ramires, J. R. S.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil, 1993.
- <sup>17</sup> Téllez, T. R.; López, E. M. R.; Granado, G. L.; Pérez, E. A.; López, R. M.; Guzmán, J. M. S. The water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). *Aquatic Invasions* **2008**, *3*, 42. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Güereña, D.; Neufeldt, H.; Berazneva, J.; Duby, S. Water hyacinth control in Lake Victoria: Transforming an ecological catastrophe into economic, social, and environmental benefits. *Sustainable Production and Consumption* **2015**, *3*, 59. [[CrossRef](#)]
- <sup>19</sup> Woome, P. L.; Muzira, R.; Bwamiki, D.; Mutetikka, D.; Amoding, A.; Bekunda, M. A. Biological management of water hyacinth waste in Uganda. *Biological Agriculture & Horticulture* **2000**, *17*, 181. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology* **2016**, *199*, 76. [[CrossRef](#)]
- <sup>21</sup> Gao, J.; Chen, L.; Zhang, J.; Yan, Z. Improved enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass through pretreatment with plasma electrolysis. *Bioresource Technology* **2014**, *171*, 469. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Gonçalves Junior, A. C.; Lindino, C. A.; da Rosa, M. F.; Bariccatti, R.; Gomes, G. D. Remoção de metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo em biofertilizante suíno utilizando macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) como bioindicador. *Acta Scientiarum Technology* **2008**, *30*, 9. [[CrossRef](#)]
- <sup>23</sup> Rubio, J.; Scheneider, I. A. H.; *XIX Prêmio Jovem Cientista*, Porto Alegre, Brasil, 2003.
- <sup>24</sup> Chynoweth, D. P.; Ghosh, S.; Henry, M. P.; *Proceedings of the 1981 International Gas Research Conference Gas*, Research Institute: Los Angeles, 1981.
- <sup>25</sup> Matsumura, Y.; Minowa, T.; Potic, B.; Kersten, S. R. A.; Prins, W.; van Swaaij, W. P. M.; van de Beld, B.; Elliott, D. C.; Neuenschwander, G. G.; Kruse, A.; Antal Jr., M. J. Biomass gasification in near- and super-critical water: status and prospects. *Biomass and Bioenergy* **2005**, *29*, 269. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Mesa-Pérez, J. M.; Cortez, L. A. B.; Rocha, J. D.; Brodsard-Pérez, L. E.; Olivarez-Gomez, E. Unidimensional heat transfer analysis of elephant grass and sugar cane bagasse slow pyrolysis in a fixed bed reactor. *Fuel Processing Technology* **2005**, *86*, 565. [[CrossRef](#)]
- <sup>27</sup> Boateng, A. A.; Dugaard, D. E.; Goldberg, N. M.; Hicks, K. B. Bench-Scale Fluidized-Bed Pyrolysis of Switchgrass for Bio-Oil Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2007**, *46*, 1891. [[CrossRef](#)]
- <sup>28</sup> Higmana, C.; van der Burgt, M. *Gasification*, Elsevier: Amsterdam, 2008.
- <sup>29</sup> Oguniade, Y.; Afolabio, A.; Osuntogun, O. A.; Okeo, L.; *Proceedings of the international workshop/seminar on water hyacinth, Lagos*, 1988.
- <sup>30</sup> Gunja; Vipin, G.; Priyanka, J.; Kant, S. C.; Dixit, A. K.; Jain, R. K. Production of bioethanol from water hyacinth by isolated thermotolerant bacteria. *International Journal of Current Science and Technology* **2016**, *4*, 219. [[Link](#)]
- <sup>31</sup> Sambo, S.; Faruk, U. Z.; Shahida, A. Ethanol production from fresh and dry water hyacinth using ruminant microorganisms and ethanol producers. *Global Advanced Research Journal of Biotechnology* **2015**, *4*, 23. [[Link](#)]
- <sup>32</sup> Ganguly, A.; Das, S.; Bhattacharya, A.; Dey, A.; Charttejee, P. K. Enzymatic hydrolysis of water hyacinth biomass for the production of ethanol: optimization of driving parameters. *Indian Journal of Experimental Biology* **2013**, *51*, 556. [[Link](#)]
- <sup>33</sup> Das, S.P.; Gupta, A.; Das, D.; Goyal, A. Enhanced bioethanol production from water

- hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by statistical optimization of fermentation process parameters using Taguchi orthogonal array design. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2016**, *109*, 174. [[CrossRef](#)]
- <sup>34</sup> Manivannan, A.; Jayarani, P. H.; Narendhirakannan, R. T. Enhanced acid hydrolysis for bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) using fermenting yeast *Candida intermedia* NRRL Y-981. *Journal of Scientific Industrial Research* **2012**, *71*, 51. [[Link](#)]
- <sup>35</sup> Okewale, A. O.; Omoruwou, F.; Ojaigho, R. O. Alternative energy production for environmental sustainability. *British Journal of Renewable Energy* **2016**, *1*, 18. [[Link](#)]
- <sup>36</sup> Muanruska, P.; Khongsay, N.; Fiala, K. Optimization of conditions for direct biohydrogen production from water hyacinth by *Clostridium diolis* C32-KKU. *KKU Research Journal* **2016**, *21*, 267. [[Link](#)]
- <sup>37</sup> Park, B.-J.; Park, H. M.; Yun, H. S. Production of biobutanol by *Clostridium beijerinckii* from water hyacinth. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering **2016**, *31*, 79. [[CrossRef](#)]
- <sup>38</sup> Preethi, K.; Vineetha; Umesh, M. Water hyacinth: A potential substrate for bioplastic (PHA) production using *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Applied Research* **2015**, *1*, 349. [[Link](#)]
- <sup>39</sup> Soenjaya, S. A.; Handoyo, N.; Soetaredjo, F. E.; Angkawijaya, A. E.; Ju, Y.-H.; Ismadji, S. Preparation of carbon fiber from water hyacinth liquid tar. *International Journal of Industrial Chemistry* **2015**, *6*: 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>40</sup> Vidya, S.; Girish, L. Water hyacinth as a green manure for organic farming. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Science* **2014**, *2*, 65. [[Link](#)]
- <sup>41</sup> Lu, W.; Wang, C.; Yang, Z. The preparation of High caloric fuel (HCF) from water hyacinth by deoxy-liquefaction. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 6451. [[CrossRef](#)]
- <sup>42</sup> Nanda, S.; Kozinski, J. A.; Dalai, A. K. Biomass-an overview on classification, composition and characterization. *Biomass Processing, Conversion and Biorefinery* **2013**, *1*.
- <sup>43</sup> Santos, F. A.; de Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova* **2012**, *35*, 1004. [[CrossRef](#)]
- <sup>44</sup> Aditiya, H. B.; Mahlia, T. M. I.; Chong, W. T.; Nur, H.; Sebayang, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *66*, 631. [[CrossRef](#)]
- <sup>45</sup> Iroba, K. L.; Tabil, L. G. Lignocellulosic biomass: Feedstock characteristics, pretreatment methods and pre-processing for biofuel and bioproduct applications, U.S. and Canadian perspectives. *Biomass Processing, Conversion and Biorefinery* **2013**, *61*. [[Link](#)]
- <sup>46</sup> Sanchez, A.; Gomez, D.; Analysis of historical total production costs of cellulosic ethanol and forecasting for the 2020-decade. *Fuel* **2014**, *130*, 100. [[CrossRef](#)]
- <sup>47</sup> Zhang, Q.; Weng, C.; Huang, H.; Achal, V.; Wang, D. Optimization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous saccharification and fermentation process. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *6*, 1411. [[CrossRef](#)]
- <sup>48</sup> Narra, M.; Divecha, J.; Shah, D.; Balasubramaniam, V.; Vyas, B.; Harijan, M.; Macwan, K. Cellulase production, simultaneous saccharification and fermentation in a single vessel: A new approach for production of bio-ethanol from mild alkali pre-treated water hyacinth. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2017**, *5*, 2176. [[CrossRef](#)]
- <sup>49</sup> Pothiraj, C.; Arumugam, R.; Gobinath, M. Sustaining ethanol production from lime pretreated water hyacinth biomass using mono and co-cultures of isolated fungal strains with *Pichia stipitis*. *Bioresources and Bioprocessing* **2014**, *1*, 27. [[CrossRef](#)]

- <sup>50</sup> Guragain, Y. N.; Coninck, J. D.; Husson, F.; Durand, A.; Rakshit, S. K. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 4416. [[CrossRef](#)]
- <sup>51</sup> Das, S.P.; Ravindran, R.; Ghosh, A.; Deka, D.; Das, D.; Jawed, M.; Fontes, C. M. G. A.; Goyal, A. Efficient pretreatment for bioethanol production form water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) involving naturally isolated and recombinant enzymes and its recovery. *Environmental Progress & Sustainable Energy* **2014**, *33*, 1396. [[CrossRef](#)]
- <sup>52</sup> Manivannan, A.; Narendhirakannan, R. T. Response surface optimization for co-production of cellulase and xylanase enzymes by *Trichoderma reesei* NRRL- 3652. *International Journal ChemicTech Research* **2014**, *6*, 3883. [[Link](#)]
- <sup>53</sup> Cheng, J.; Wang, X.; Huang, R.; Liu, M.; Yu, C.; Cen, K. Producing ethanol from water hyacinth through simultaneous saccharification and fermentation with acclimatized yeasts. *Bioresources* **2014**, *9*, 7666. [[CrossRef](#)]
- <sup>54</sup> Yan, J.; Wei, Z.; Wang, Q.; He, M.; Li, S.; Irbis, C. Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide-pretreated water hyacinth via simultaneous saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianu* strain. *Bioresource technology* **2015**, *193*, 103. [[CrossRef](#)]
- <sup>55</sup> Chang, K.-L.; Han, Y.-J.; Wang, X.-Q.; Chen, X.-M.; Leu, S.-Y.; Liu, J.-Y.; Peng, Y.-P.; Liao, Y.-L.; Potprommanee, L. The effect of surfactant-assisted ultrasound-ionic liquid pretreatment on the structure and fermentable sugar production of a water hyacinth. *Bioresource Technology* **2017**, *237*, 27. [[CrossRef](#)]
- <sup>56</sup> Ma, S.; Wang, H.; Wang, Y.; Bu, H.; Bai, J. Bio-hydrogen production from cornstalk wastes by orthogonal design method. *Renewable Energy* **2011**, *36*, 709. [[CrossRef](#)]
- <sup>57</sup> Reales-Alfaro, J.-G.; Trujillo-Daza, L. T.; Arzuaga-Lindado, G.; Castaño-Peláez, H.-I.; Pólo-Córdoba, A.-D. Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, **2013**, *5*, 101. [[Link](#)]
- <sup>58</sup> Das, A.; Paul, T.; Jana, A.; Halder, S. K.; Ghosh, K.; Maity, C.; Mohapatra, P. K. D.; Pati, B. R.; Mondal, K. C. Bioconversion of rice straw to sugar using multizyme complex of fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. *Industrial Crops and Products* **2013**, *46*, 217. [[CrossRef](#)]
- <sup>59</sup> Sornvoraweat, B.; Kongkiattikajorn, J. Separated hydrolysis and fermentation of water hyacinth leaves for ethanol production. *KKU Research Journal* **2010**, *15*, 795. [[Link](#)]
- <sup>60</sup> Toquero, C.; Bolado, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology* **2014**, *157*, 68. [[Link](#)]
- <sup>61</sup> Mood, S H.; Golfeshan, A. H.; Tabatabaei, M.; Jouzani, G. S.; Najafi, G. H.; Gholami, M.; Ardjmand, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2013**, *27*, 77. [[CrossRef](#)]
- <sup>62</sup> Patel, H.; Chapla, D.; Shah, A. Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. *Renewable Energy* **2017**, *109*, 323. [[CrossRef](#)]
- <sup>63</sup> Satyanagalakshmi, K.; Sindhu, R.; Binod, P.; Janu, K. U.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A. Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research* **2011**, *70*, 156. [[Link](#)]
- <sup>64</sup> Awasthi, M.; Kaur, J.; Rana, S. Bioethanol production through water hyacinth, *Eichhornia crassipes* via optimization of the pretreatment conditions. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering* **2013**, *3*, 42. [[link](#)]

- <sup>65</sup> Sinegani, A. A. S.; Emtiazi, G.; Hajrasuliha, S.; Shariatmadari, H. Biodegradation of some agricultural residues by fungi in agitated submerged cultures. *African Journal of Biotechnology* **2005**, *10*, 1058. [[Link](#)]
- <sup>66</sup> Saha, P.; Alam, M. F.; Baishnab, A. C.; Khan, M. R.; Islam, M. A. Fermentable sugar production and separation from water hyacinth using enzymatic hydrolysis. *Sustainable Energy* **2014**, *2*, 20. [[CrossRef](#)]
- <sup>67</sup> Soontornchaiboon, W.; Kim, S. M.; Pawongrat, R. Effects of alkaline combined with ultrasonic pretreatment and enzymatic hydrolysis of agricultural wastes for high reducing sugar production. *Sains Malaysiana* **2016**, *45*, 955. [[Link](#)]
- <sup>68</sup> Singh, R. S.; Balagurumurthy, B.; Prakash, A.; Bhaskar, T. Catalytic hydrothermal liquefaction of water hyacinth. *Bioresource Technology* **2015**, *178*, 157. [[CrossRef](#)]
- <sup>69</sup> Xu, J.; Wang, Z.; Sharma-Shivappa, R. R.; Cheng, J. J. Enzymatic hydrolysis of switchgrass and coastal bermuda grass pretreated using different chemical methods. *Bioresources* **2011**, *6*, 2990. [[Link](#)]
- <sup>70</sup> Huang, L.; Liu, J.; He, Y.; Sun, S.; Chen, J.; Sun, J.; Chang, K.; Kuo, J.; Ning, X. Thermodynamics and kinetics parameters of co-combustion between sewage sludge and water hyacinth in CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> atmosphere as biomass to solid fuel. *Bioresource Technology* **2016**, *218*, 631. [[CrossRef](#)]
- <sup>71</sup> Das, S. P.; Gupta, A.; Das, A.; Goyal, A. Enhanced bioethanol production from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) by statistical optimization of fermentation process parameters using Taguchi orthogonal array design. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2016**, *109*, 174. [[CrossRef](#)]
- <sup>72</sup> Ibrahim, H. A. Pretreatment of straw for bioethanol production. *Energy Procedia* **2012**, *14*, 542. [[CrossRef](#)]
- <sup>73</sup> Fileto-Pérez, H. A.; Rutiaga-Quiñones, J. G.; Aguilar-González, C. N.; Paéz, J. B.; López, J.; Rutiaga-Quiñones, O. M. Evaluation of *Eichhornia crassipes* as an Alternative Raw Material for Reducing Sugars Production. *BioResources* **2013**, *8*, 5340. [[CrossRef](#)]
- <sup>74</sup> Romero-Güiza, M. S.; Wahid, R.; Hernández, V.; Moller, H.; Fernández, B. Improvement of wheat straw anaerobic digestion through alkali pre-treatment: Carbohydrates bioavailability evaluation and economic feasibility. *Science of the Total Environment* **2017**, *595*, 651. [[CrossRef](#)]
- <sup>75</sup> Kumar, M.; Singh, P.; Sukla, L. B. Addition of expansin to cellulase enhanced bioethanol production. *Process Biochemistry* **2016**, *51*, 2097. [[CrossRef](#)]
- <sup>76</sup> Montiel, C.; Hernández-Meléndez, O.; Vivaldo-Lima, E.; Hernández-Luna, M.; Bárzana, E. Enhanced Bioethanol Production from Blue Agave Bagasse in a Combined Extrusion–Saccharification Process. *BioEnergy Research* **2016**, *9*, 1005. [[CrossRef](#)]
- <sup>77</sup> Liao, H.; Fan, X. T.; Mei, X.; Wei, Z.; Raza, W.; Shen, Q.; Xu, Y. Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. *Biomass and Bioenergy* **2015**, *74*, 122. [[CrossRef](#)]
- <sup>78</sup> Hansen, G. H.; Lübeck, M.; Frisvad, J. C.; Lübeck, P. S.; Andersen, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry* **2015**, *50*, 1327. [[CrossRef](#)]
- <sup>79</sup> Singhanian, R. R.; Sukumaran, R. K.; Patel, A. K.; Larroche, C.; Pandey, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* **2010**, *46*, 541. [[CrossRef](#)]
- <sup>80</sup> Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology* **2016**, *199*, 76. [[CrossRef](#)]
- <sup>81</sup> Timung, R.; Mohan, M.; Chilukoti, B.; Sasmal, S.; Banerjee, T.; Goud, V. V. Optimization of dilute acid and hot water pretreatment of different lignocellulosic



- biomass: A comparative study. *Biomass and Bioenergy* **2015**, *81*, 9. [[CrossRef](#)]
- <sup>82</sup> Ebrahimi, M.; Caparanga, A. R.; Ordone, E. E.; Villaflores, O. B. Evaluation of organosolv pretreatment on the enzymatic digestibility of coconut coir fibers and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation. *Renewable Energy* **2017**, *109*, 41. [[CrossRef](#)]
- <sup>83</sup> Rastogi, M.; Shrivastava, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, *80*, 330. [[CrossRef](#)]
- <sup>84</sup> Mohapatra, S.; Mishra, C.; Behera, S. S.; Thatoi, H. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, *78*, 1007. [[CrossRef](#)]
- <sup>85</sup> Cheng, N.; Koda, K.; Tamai, Y.; Yamamoto, Y.; Takasuka, T. E.; Uraki, Y. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation conditions with amphipathic lignin derivatives for concentrated bioethanol production. *Bioresource Technology* **2017**, *232*, 126. [[CrossRef](#)]
- <sup>86</sup> Reis, V. R.; Antonangelo, A. T. B. F.; Bassi, A. P. G.; Colombi, D.; Ceccato-Antonini, S. R. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* **2017**, *48*, 268. [[CrossRef](#)]
- <sup>87</sup> Ganguly, A.; Das, S.; Bhattacharya, A.; Dey, A.; Chatterjee, P. K. Enzymatic hydrolysis of water hyacinth biomass for the production of ethanol: optimization of driving parameters. *Indian Journal of Experimental Biology* **2013**, *51*, 556. [[CrossRef](#)]