

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS**

ELIAS LUIZ DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO E DA CONCENTRAÇÃO DE
BIOMASSA SOBRE A SACARIFICAÇÃO DO PSEUDOCALDE DE
BANANEIRA E AVALIAÇÃO DA DESTOXIFICAÇÃO DO CALDO
HIDROLISADO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL**

JOINVILLE - SC

2016

ELIAS LUIZ DE SOUZA

**INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO E DA CONCENTRAÇÃO DE
BIOMASSA SOBRE A SACARIFICAÇÃO DO PSEUDOCAULE DE
BANANEIRA E AVALIAÇÃO DA DESTOXIFICAÇÃO DO CALDO
HIDROLISADO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL.**

Trabalho apresentado para obtenção do
grau de Mestre em Engenharia de
Processos do Curso de Mestrado em
Engenharia de Processos da
Universidade da Região de Joinville

Orientador: Prof. Dr. Ozair Souza

Coorientador: Profa. Dra. Noeli Sellin

JOINVILLE - SC

2016

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da
Univille

S719i Souza, Elias Luiz de
Influência do pré-tratamento e da concentração de biomassa sobre a
sacarificação do pseudocaule de bananeira e avaliação da destoxificação
do caldo hidrolisado sobre a produção de etanol/ Elias Luiz de Souza;
orientador Dr. Ozair Souza, co-orientadora Dra. Noeli Sellin – Joinville:
UNIVILLE, 2016.

121 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos
– Universidade da Região de Joinville)

1. Biomassa. – Energia. 2. Biocombustível. 3. Bioetanol.
4. Bananeira - Sacarificação. I. Souza, Ozair (orient.). II. Sellin, Noeli
(co-orient.). III. Título.

CDD 662.88

Termo de Aprovação

“Influência do Pré-tratamento e da Concentração de Biomassa sobre a Sacarificação do Pseudocaule da Bananeira e Avaliação da Destoxificação do Caldo Hidrolisado sobre a Produção de Etanol”

por

Elias Luiz de Souza

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.



Prof. Dr. Ozair Souza
Orientador (UNIVILLE)



Profa. Dra. Noeli Sellin
Coorientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ozair Souza
Orientador (UNIVILLE)



Profa. Dra. Noeli Sellin
Coorientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
(UFSC)



Profa. Dra. Elisabeth Wisbeck
(UNIVILLE)

Joinville, 31 de março de 2016.

"E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus. (Romanos 8:28)

Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto no seu tempo; as suas folhas não cairão, e tudo quanto fizer prosperará. (Salmos 1:3)"

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho
À Deus porque dele, por ele e para ele, são todas as coisas
À toda minha Família, em especial, aos meus Pais Edson e Cleide
e à minha Irmã Gabriela.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, porque tem me sustentado e, constantemente, demonstrado seu amor por mim.

Aos meus pais Edson e Cleide, e à minha irmã Gabriela, pois sempre têm me apoiado e me aconselhado com sabedoria.

Ao meu orientador Ozair Souza, por seu excelente trabalho como professor e orientador e por ter me aguentado todos esses anos, desde a iniciação científica até o fim do mestrado.

À minha Coorientadora Noeli Sellin, por ter me orientado durante a discussão das análises de DRX e TGA.

À minha amiga Cláudia Hack Gumz Correia, pela excelente profissional que és e por sempre estar presente, mesmo durante suas férias, para realizar as análises, das minhas amostras, por HPLC.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Aline Scheller Coan e João Guilherme Schulz.

RESUMO

Dentre as diferentes formas de reaproveitamento e valorização da biomassa residual da agroindústria, encontra-se a produção de biocombustíveis. A produção do etanol de segunda geração, comumente denominado de bioetanol ou etanol 2G, tem sido avaliada e proposta como uma das alternativas tecnicamente viáveis para esse fim. Neste trabalho empregou-se como biomassa o pseudocaule da bananeira, resíduo lignocelulósico abundante na região nordeste de Santa Catarina que, normalmente, é deixado no campo para degradação natural. Dois diferentes métodos de pré-tratamento (hidrólise ácida com H_2SO_4 2% m/ m_s e hidrólise alcalina com NaOH 3% m/ m_s) de biomassa seca e moída (70 g/L de massa seca, m_s) foram avaliados e os seus rendimentos em açúcares redutores, AR, após sacarificação enzimática, foram determinados. Em seguida, foi avaliada a influência do incremento de m_s de 70 para 100 g/L sobre o rendimento em açúcares redutores (Y_{AR}), tanto na sua forma seca e moída quanto *in natura* (sem secagem prévia). Alterações na cristalinidade da celulose e na estrutura superficial das biomassas submetidas às diferentes formas de pré-tratamentos foram avaliadas por difração de raio-X e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Os maiores valores de rendimento em AR, tanto em relação ao teor de celulose submetido à sacarificação ($R_{AR} = 79,4 \pm 1,2\%$), quanto em relação à concentração de biomassa empregada ($Y_{AR/m_s} = 32,8 \pm 0,5\%$) foram obtidos com o pré-tratamento ácido. Em comparação ao pré-tratamento alcalino, o pré-tratamento ácido conduziu ao aumento do teor de celulose na mistura reacional de 52,8 para 59,8% em função de maior degradação da hemicelulose; à redução do índice de cristalinidade da celulose de 51,19% para 33,34% e ao aumento de 43,1% em R_{AR} e de 39,5% em Y_{AR/m_s} . Com o aumento de m_s de 70 para 100 g/L de farelo no pré-tratamento ácido, os valores médios de rendimento foram reduzidos para 43,1% em R_{AR} e 18,2% em Y_{AR/m_s} . O emprego do pseudocaule *in natura* sem suco (biomassa prensada, sem secagem prévia), tanto na concentração de 70 g/L quanto 100 g/L, em m_s , assim como no caso do pré-tratamento alcalino, conduziu à obtenção de menores valores médios de R_{AR} (67,2% e 42,2%) e de Y_{AR/m_s} (28,4% e 17,8%), respectivamente. O caldo de biomassa pré-tratada com ácido e sacarificada, foi destoxificado com diferentes teores de carvão ativo (1, 2 e 4% m/v), concentrado até AR = 100 g/L e fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*. Os valores de rendimento ($Y_{P/AR}$) e produtividade (Q_P) em etanol foram determinados e comparados com aqueles obtidos da fermentação de caldo não-concentrado/não-destoxificado (AR = 18 g/L) e caldo concentrado/não-destoxificado (AR = 100 g/L). O maior valor médio de $Y_{P/AR}$ ($0,46 \pm 0,07$ g/g) foi obtido na fermentação do caldo não-concentrado. Esse valor não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com $Y_{P/AR}$ relativo ao caldo concentrado e destoxificado por carvão ativo 1% m/v ($Y_{P/AR} = 0,41 \pm 0,02$ g/g). Entretanto, maior produtividade em etanol ($Q_P = 1,44 \pm 0,02$ g.L⁻¹.h⁻¹) foi obtida com a

destoxificação do caldo. Esse valor foi 75% maior do que Q_P médio determinado no caldo concentrado e não-destoxificado ($Q_P = 0,82 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e 22% maior do que Q_P no caldo não-concentrado ($Q_P = 1,18 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Palavras-chave: biocombustível, bioetanol, biomassa, etanol 2G, sacarificação.

ABSTRACT

Among the different forms of reuse and recovery of agro-residual waste is the production of biofuels. The production of the second-generation ethanol, commonly known as bio-ethanol or ethanol 2G, has been evaluated and proposed as one of the technically viable alternatives for this purpose. This research work employed the banana pseudostem as biomass, a lignocellulosic residue abundant in the northeastern region of Santa Catarina, which is usually left in the field to its natural degradation. Two different chemical pre-treatment methods (acid hydrolysis with H_2SO_4 2% w/w and alkaline hydrolysis with NaOH 3% w/w) of dry and milled biomass (70 g/L of dry matter, m_s) were assessed and the corresponding reducing sugars yield, AR, (Y_{AR}), after enzymatic saccharification, were determined. Following this, the effect on Y_{RS} by increasing the dry matter (m_s) from 70 to 100 g/L, in both forms dry and milled biomass and also fresh (without predrying), were analyzed. Changes in cellulose crystallinity as well as in the biomass superficial structure due to the different chemical pre-treatments were analyzed using X-ray diffraction and scanning electron microscopy, respectively. The acid pre-treatment resulted in higher Y_{AR} values, whether related to the cellulose content under saccharification ($R_{AR} = 79,48 \pm 1,2\%$) or to the biomass concentration employed ($Y_{AR/m_s} = 32,8 \pm 0,5\%$). In a comparison between alkaline and acid pre-treatments, the latter led to an increase in the cellulose content of the reaction mixture from 52,8 to 59,8% as a result of a higher degradation of hemicellulase; also, to a reduction of the cellulose crystallinity index from 51,19 to 33,34% and increases in R_{AR} (43,1%) and Y_{AR/m_s} (39,5%). The increase of dry matter (m_s) bran from 70 to 100 g/L in the acid pre-treatment, resulted in a decrease of average yields in R_{AR} (43,1%) and Y_{AR/m_s} (18,2%). Using the pseudostem fresh with broth removed (pressed biomass, not dry), whether for 70 g/L concentration or 100 g/L in dry matter (m_s), similarly to the alkaline pre-treatment, has led to lower average values in R_{AR} (67,2% and 42,2%) and in Y_{AR/m_s} (28,4% e 17,8%), respectively. The acid pre-treated and saccharificated biomass broth was detoxified with different activated carbon contents (1, 2 and 4% w/v), concentrated up to AR = 100 g/L and fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. The yield values ($Y_{P/AR}$) and productivity (Q_P) in ethanol were determined and compared to those values obtained from the fermentation of non-concentrated/non-detoxified broth (AR = 18 g/L) and concentrated/non-detoxified broth (AR = 100 g/L). The highest average value for $Y_{P/AR}$ ($0,46 \pm 0,07$ g/g) was obtained from the fermentation of non-concentrated broth. This value did not present a significant difference ($p < 0,05$) when compared to the $Y_{P/RS}$ related to the broth concentrated and detoxified by activated carbon 1% w/v ($Y_{P/AR} = 0,41 \pm 0,02$ g/g). However, a higher ethanol productivity ($Q_P = 1,44 \pm 0,02$ g.L⁻¹.h⁻¹) was achieved through broth detoxification. This value was 75% higher than the average Q_P determined using concentrated and non-detoxified broth ($Q_P = 0,82 \pm 0,01$ g.L⁻¹.h⁻¹), and 22%

higher than the Q_P found in the non-concentrated broth ($Q_P = 1,18 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Key-words: biofuels, bioethanol, biomass, ethanol 2G, saccharification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Maiores produtores de banana no estado de Santa Catarina na safra de 2012	19
Figura 2- Morfologia da bananeira.....	20
Figura 3 - Estrutura da parede celular vegetal.....	20
Figura 4 - Estrutura molecular da celulose.	21
Figura 5 - Estrutura molecular da hemicelulose do tipo glucuronoarabinoxilanas.	22
Figura 6 - Estrutura molecular da lignina.....	23
Figura 7 - Rotas tecnológicas para a produção de bioetanol com relação às diferentes matérias primas empregadas.	24
Figura 8 - Efeito do pré-tratamento na estrutura da parede celular vegetal. ...	27
Figura 9 - Ação sinérgica entre endoglucanases, celobio-hidrolase e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.....	30
Figura 10 - Ação das enzimas hemicelulases na hidrólise da molécula de hemicelulose.	31
Figura 11 – Compostos que são formados durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.	32
Figura 12 - Rota metabólica para a produção de etanol.....	34
Figura 13 - Etapas do processo de produção de etanol a partir de resíduos da banana.	38
Figura 14 - Fluxograma geral do processo.....	39
Figura 15 - Fluxograma do processo de avaliação dos pré-tratamentos químicos e respectivas análises realizadas (em vermelho).....	42
Figura 16 –Fluxograma do tratamento das amostras para análises de TGA, DRX e MEV.	50
Figura 17 - Teores de celulose, hemicelulose e lignina obtidos antes e após pré-tratamento ácido (H-Ac) e pré-tratamento alcalino (H-AI). Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.	60
Figura 18 - Análise termogravimétrica (TG de DTG) das fibras de pseudocaule de bananeira <i>Musa cavendishii in natura</i> (sem pré-tratamento), pré-tratadas termicamente (60 °C / 24 h) e pré-tratadas quimicamente (H-AI e H-Ac).....	62

Figura 19 - Difratoogramas de Raio-X realizados das amostras de fibra do pseudocaule de bananeira <i>Musa cavendishii in natura</i> , com pré-tratamento químico (H-AI e H-Ac) e pré-tratamento físico (60 °C / 24 h).	64
Figura 20 - Micrografias das amostras (a) pseudocaule de bananeira <i>Musa cavendishii in natura</i> e (b) seca a 60 °C / 24 h, com ampliação de 40 e 200 x. 66	
Figura 21 - Corte transversal do pseudocaule de bananeira.....	67
Figura 22 - Micrografias da superfície do pseudocaule (a) seco a 60 °C / 24 h e triturado, (b) pré-tratado H-AI e (c) pré-tratado H-Ac, ampliados de 40 e 200 x, respectivamente.	68
Figura 23 – Rendimentos em açúcares redutores baseados no teor de celulose presente na biomassa (R_{AR}) e na concentração de massa seca de biomassa ($Y_{AR/ms}$) obtidos na sacarificação do farelo de pseudocaule de bananeira pré-tratado com NaOH 3% (HEZ-AI) ou com H ₂ SO ₄ 2% (HEZ-Ac). Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.	70
Figura 24 - Rendimentos percentuais em açúcares redutores com base no teor de celulose (R_{AR}) e concentração de biomassa seca ($Y_{AR/ms}$) obtidos na sacarificação de diferentes concentrações de pseudocaule de bananeira*. Letras diferentes entre as concentrações indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.	72
Figura 25 - Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e formação de etanol (P) por <i>S. cerevisiae</i> UNIVILLE 9080 na fermentação de caldo de pseudocaule de bananeira sacarificado, não-concentrado e não-destoxificado (F1), caldo sacarificado, concentrado e não-destoxificado (F2) e caldo sacarificado, concentrado e destoxificado (F3).	77
Figura 26 - Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e formação de etanol (P) por <i>S. cerevisiae</i> UNIVILLE 9080 na fermentação de meio sintético contendo 100 g/L de glicose como substrato (Ensaio F4).....	82
Figura 27 - Curva de calibração da absorbância (Abs) em função da concentração de células (X em g/L).	107
Figura 28 - curva de calibração para a determinação de AR.	108
Figura 29 - curva de calibração para a determinação da concentração de xilose.	109

Figura 30 - curva de calibração para a determinação da concentração de fenóis totais.....	110
Figura 31 - Curva de calibração para a determinação da concentração de AR pelo método DNS.....	111
Figura 32 – Cromatogramas das análises de furfural por HPLC do (a) padrão e das amostras do (b) caldo hidrolisado não-destoxificado e do (c) caldo hidrolisado destoxificado com 4% m/v de carvão ativo Merck.....	114
Figura 33 - Cromatogramas das análises de HMF por HPLC do (a) padrão e das amostras do (b) caldo hidrolisado não-destoxificado e do (c) caldo hidrolisado destoxificado com 4% m/v de carvão ativo Merck.....	115

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Biomassas lignocelulósicas estudadas na produção de etanol de segunda geração.....	25
Tabela 2 – Teores médios \pm desvio padrão de celulose (cel), hemicelulose (hemi) e lignina (lig) em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.	59
Tabela 3 –Temperaturas de degradação da celulose nas amostras de pseudocaule <i>in natura</i> pré-tratado termicamente (60 °C / 24 h) e pré-tratados quimicamente (H-AI e H-Ac).....	64
Tabela 4 - Valores de índice de cristalinidade (IC) obtidos nas análises das fibras de pseudocaule de bananeira seco (60 °C / 24 h) e pré-tratadas e um comparativo de diferença de cristalinidade tendo como referência a amostra <i>in natura</i>	65
Tabela 5 – Valores médias \pm desvio padrão da concentrações de açúcares redutores (AR _f) e xilose (Xil) e rendimentos em açúcares redutores com base na concentração de massa seca (Y _{AR/ms}) e no teor de celulose (R _{AR}) contidos na sacarificação do farelo de pseudocaule de bananeira pré-tratado com NaOH 3% (HEZ-AI) ou com H ₂ SO ₄ 2% (HEZ-Ac). Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância 0,05, que as médias são significativamente diferentes.	70
Tabela 6 – Valores médias \pm desvio padrão das concentrações dos constituintes presentes no caldo sacarificado de pseudocaule de bananeira, antes e após a destoxificação empregando diferentes concentrações de carvão ativo. Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.	74
Tabela 7 – Valores médias \pm desvio padrão das concentrações de AR e P no início e no final da fermentação (t _f) dos ensaios F1, F2 e F3.	78
Tabela 8 – Valores médios \pm desvio padrão do fator de conversão de substrato em produto (Y _{P/AR}) e produtividade (Q _P) obtida para os ensaios de fermentação do caldo sacarificado de farelo de pseudocaule (F1: sem concentração prévia; F2: concentrado; F3: concentrado e destoxificado). Letras iguais entre os ensaios são médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey com nível de significância 0,05.....	80

Tabela 9 – Valores médios de Q_P obtidos por diferentes autores ao fermentar, em processo descontínuo com <i>S. cerevisiae</i> , diferentes tipos de biomassas sacarificadas com variadas concentrações iniciais de açúcar no caldo de fermentação (AR_0).....	83
Tabela 10 - Dados experimentais obtidos na construção da curva de calibração da concentração de células.....	107
Tabela 11 – Teores, em massa seca, de Celulose, Hemicelulose e Lignina nas amostras de pseudocaule sem tratamento, com tratamento ácido (H-Ac) e com tratamento alcalino (H-AI).....	112
Tabela 12 – Rendimentos em açúcares redutores com relação a concentração de biomassa seca ($Y_{AR/ms}$) e com relação ao teor de celulose na biomassa (R_{AR}) das amostras sacarificadas e pré-tratado em meio ácido com diferentes concentrações de biomassa.....	113
Quadro 1 - Tipos de pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica.....	26
Quadro 2 - grupos de enzimas e tipos de reações que catalisam.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

\bar{M} – Massa Molar (g/mol)

%Cel. – Teor de celulose contido na biomassa

%Hemi. – Teor de hemicelulose contido na biomassa

%IC – Índice de cristalinidade

%Lig. – Teor de lignina contido na biomassa

A_A – Área do halo amorfo

Abs – Absorbância

A_C – Área da região cristalina

AR – Açúcar redutor

AR_0 – Concentração de açúcar redutor no início da fermentação (g/L)

AR_f – Concentração de açúcar redutor no fim da fermentação (g/L)

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

C – Teor de celulose (%)

C_B – Concentração de biomassa seca (g/L)

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DRX – Difractometria de Raio-X

DTG – Diferencial da TGA

FPU – Unidade de papel filtro

g_{ms} – Gramas de massa seca (g)

GY – Meio de cultivo sintético contendo glicose e extrato de levedura

H-100 m_s – Pré-tratamento a 100 g de massa seca por litro com posterior hidrólise enzimática

H-70 m_s – Pré-tratamento a 70 g de massa seca por litro com posterior hidrólise enzimática

H-Ac – Pré-tratamento por hidrólise Ácida

H-AI – Pré-tratamento por hidrólise Alcalina

H_{EZ} - Ac – Amostra sacarificada com pré-tratamento ácido

H_{EZ} - AI – Amostra sacarificada com pré-tratamento alcalino

H-in – Pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa in natura

HMF – 5-hidroximetilfurfural

H-m_u100m_s – Pré-tratamento em massa úmida equivalente a 100 g de massa seca por litro com posterior hidrólise enzimática

H-m_u70m_s – Pré-tratamento em massa úmida equivalente a 70 g de massa seca por litro com posterior hidrólise enzimática

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

m – massa (g)

m_s – Massa seca (g)

m_u – Massa úmida (g)

P – concentração de etanol (g/L)

P₀ – Concentração de etanol no início da fermentação onde P é mínimo (g/L)

P_f – Concentração de etanol no fim da fermentação onde P é máximo (g/L)

Q_p – Produtividade em etanol (g.L⁻¹.h⁻¹)

R_{AR} – Rendimento percentual em açúcares com relação ao teor de celulose na biomassa.

S – Concentração de substrato (g/L)

t_f – Tempo final

TGA – Análise termogravimétrica

X₀ – Concentração de inicial de micro-organismos (g/L)

Y_{AR/ms} – Rendimento percentual de açúcares redutores em relação a concentração de biomassa (%)

Y_{P/AR} – Fator de conversão do substrato em etanol (g/g)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. OBJETIVOS	17
1.1 Objetivo Geral.....	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Cultivo da Banana	18
2.2 Características do Resíduo	19
2.2.1 Celulose.....	21
2.2.2 Hemicelulose	22
2.2.3 Lignina	23
2.3 Etanol de Lignocelulósicos	23
2.4 Pré-Tratamento da biomassa lignocelulósica	26
2.5 Hidrólise Enzimática	28
2.6 Destoxificação	31
2.7 Fermentação	33
2.8 Estudos do grupo de pesquisa Valorização de Resíduos e Biomassa sobre a produção de etanol 2G	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Biomassa.....	39
3.2 Preparo da biomassa.	39
3.3 Pré-Tratamento químico	41
3.4 Sacarificação	42
3.4.1 Determinação da concentração ideal de biomassa para sacarificação	43
3.5 Destoxificação	43
3.6 Ensaio de fermentação	44
3.6.1 Concentração do caldo.....	44
3.6.2 Preparo do mosto	44
3.6.3 Preparo de inóculo.....	44
3.6.4 Condução do ensaio.....	45
3.7 Metodologia analítica.....	46
3.7.1 Teor de umidade.....	46

3.7.2	Atividade enzimática.....	47
3.7.2.1	Atividade de celulasas	47
3.7.2.2	Atividade de hemicelulase	48
3.7.3	Análises de DRX, TGA e MEV.	49
3.7.3.1	Tratamento das amostras.....	49
3.7.3.2	Difração de raio-X.....	51
3.7.3.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	51
3.7.3.4	Análise termogravimétrica (TGA).....	51
3.7.4	Concentração de fenóis totais (FT).....	52
3.7.5	Concentração de açúcares e ácidos acético	52
3.7.6	Concentrações de furfural.	53
3.7.7	Concentração de 5-hidroximetilfurfural (HMF).....	53
3.7.8	Concentração de etanol.....	53
3.7.9	Concentração de açúcares redutores (AR)	54
3.8	Cálculos.....	54
3.8.1	Teores de celulose, hemicelulose e lignina	54
3.8.2	Rendimento global em glicose (AR) no processo de conversão da celulose.....	55
3.8.3	Índice de cristalinidade (IC)	56
3.8.4	Velocidade global do consumo de AR.....	56
3.8.5	Fator de conversão de açúcares redutores (AR) em etanol (P)	57
3.8.6	Produtividade em etanol	57
3.9	Análises estatísticas	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Caracterização da biomassa <i>in natura</i>	59
4.2	Pré-tratamento da Biomassa	60
4.2.1	Composição do pseudocaule pré-tratado	60
4.2.1.1	Temperatura de degradação dos constituintes da biomassa	62
4.2.2	Variação na cristalinidade das amostras pré-tratadas.....	64
4.2.3	Efeito dos pré-tratamentos na superfície da biomassa.....	66
4.3	Sacarificação.....	69
4.3.1	Influência do pré-tratamento químico sobre a sacarificação.....	69
4.3.2	Influência da Concentração e Umidade da Biomassa sobre a Sacarificação.....	71

4.4	Destoxificação do caldo.....	73
4.5	Ensaio de fermentação.....	77
	CONCLUSÃO	85
	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXO I.....	107
	ANEXO II.....	108
	ANEXO III.....	109
	ANEXO IV	110
	ANEXO V	111
	ANEXO VI	112
	ANEXO VII	113
	ANEXO VIII	114
	ANEXO IX	115

INTRODUÇÃO

Devido ao constante aumento populacional e às mudanças nas práticas de consumo causadas pelo desenvolvimento econômico, deparamo-nos com diversos problemas ambientais, entre os principais estão os causados pela queima de combustíveis provenientes de fontes fósseis e pela grande geração de resíduos industriais e agrícolas (PIUBELI *et al.*, 2003; SARTO e ANTUNES, 2013).

No Brasil, a agroindústria é de grande importância para a economia do país. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento o setor representou entre 22% e 23% do PIB brasileiro em 2014 (MAPA, 2014).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2014), a agroindústria brasileira se encontra entre os setores da economia com maior geração de resíduos. Atualmente o grande desafio de pesquisa na empresa, é encontrar maneiras de converter esse resíduo em matéria prima.

Dentre as diferentes formas de reaproveitamento da biomassa residual da agroindústria encontra-se a produção de biocombustíveis, tais como bio-óleo por pirólise (PAPARI e HAWBOLDT, 2015), BTL (*Biomass-to-Liquids*) por gaseificação (SUNDE *et al.*, 2011), biodiesel por síntese química (BHARATHIRAJA *et al.*, 2014) e biogás ou bioetanol por fermentação (BUDZIANOWSKI, 2016; GUPTA e VERMA, 2015).

A produção de bioetanol tem grande destaque no cenário mundial. Há uma ampla utilização do produto em motores a combustão. Sua utilização emite menos gases poluentes e, conseqüentemente, menor quantidade de gases do efeito estufa quando comparado aos combustíveis provenientes de fontes fósseis (UNICA, 2007; PITARELO *et al.* 2012).

O etanol de biomassa (bioetanol) é obtido mundialmente pela bioconversão de açúcares fermentescíveis existentes na matéria prima. O etanol de primeira geração (etanol 1G) é caracterizado pela produção a partir de biomassas ricas em açúcares livres (etanol de cana de açúcar no Brasil ou de beterraba na Europa) ou amido (etanol de milho nos Estados Unidos). O etanol 2G (etanol de segunda geração) é obtido a partir de biomassas lignocelulósicas

que necessitam de uma etapa prévia de tratamento (sacarificação) para a obtenção dos açúcares fermentescíveis (BNDES, 2008; CORTEZ, 2010).

O estado de Santa Catarina tem se destacado no cenário nacional como um dos maiores produtores de alimentos. Segundo dados do IBGE (2015), na safra de 2014, o Estado foi o quarto maior produtor de bananas no país com 701 mil toneladas de fruta colhida. A estimativa de resíduos gerados a partir dessa produção, conforme dados levantados por Souza *et al.* (2010), é de 2,8 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos, dos quais 75% é de pseudocaule de bananeira.

Gonçalves Filho (2011) comprovou a potencialidade desse resíduo na produção de etanol 2G. Ao empregar 500 g/L de pseudocaule *in natura*, sem secagem prévia, o autor obteve um vinho com concentração de etanol da ordem de 7 g/L. No entanto, para uma destilação economicamente viável do caldo fermentado, Junqueira (2010) indica uma concentração mínima de etanol de 80 g/L.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes métodos de tratamento do pseudocaule de bananeira para a obtenção de açúcares fermentescíveis, bem como, propor estratégias para o incremento da concentração do produto no caldo fermentado.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Aumentar o rendimento da sacarificação do pseudocaule de bananeira (biomassa) sem reduzir a eficiência da fermentação alcoólica.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o potencial do uso do pseudocaule para a produção de etanol 2G mediante a caracterização dos teores, em massa seca, de celulose, hemicelulose e lignina.
- b) Pré-tratar a biomassa com NaOH (hidróxido de sódio) e com H₂SO₄ (ácido sulfúrico) e indicar o método de pré-tratamento adequado para a etapa de hidrólise enzimática (sacarificação).
- c) Comparar o uso da biomassa *in natura* com biomassa previamente seca e triturada (farelo) na etapa de sacarificação e estabelecer a concentração ideal do substrato para obtenção de alto rendimento em açúcares redutores (AR).
- d) Aumentar a concentração de AR no caldo de fermentação por evaporação do licor sacarificado e avaliar a sua influência sobre a produção de etanol.
- e) Avaliar a influência da destoxificação do licor sacarificado sobre o rendimento e produtividade da fermentação alcoólica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

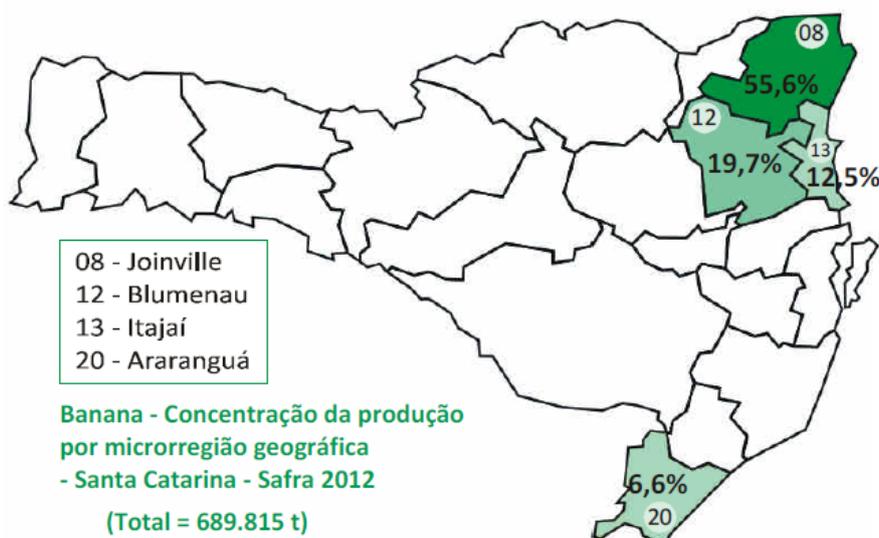
2.1 Cultivo da Banana

Em meio às frutas *in natura* comercializadas a banana apresenta o maior movimento financeiro. Em 2006 apresentou um movimento financeiro de US\$ 5,8 bilhões, passando em 2010 para US\$ 8,1 bilhões, seguida pela uva, maçã e laranja. Mais de 125 países se dedicam ao cultivo da banana no mundo. O continente asiático é o que lidera a produção de banana, com 58% do volume produzido; seguido do continente americano, com 26% (17% América do Sul, e 8% América Central); e o africano, com 14% da produção (VIEIRA, 2013). A produção mundial de banana chega a 106,5 milhões de toneladas (FAO, 2013 *apud* IBGE, 2014).

Entre os maiores produtores mundiais de banana o Brasil ocupa a terceira posição, responsável por 7% da produção, ficando atrás apenas da Índia e da China (LOBATO *et al.* 2013). Conforme Cepa/Epagri (2013), o Brasil apresenta-se favorecido para o cultivo da banana devido às condições de clima (temperatura, umidade relativa, precipitação e insolação) possibilitando a produção durante todo o ano, podendo, desse modo, atender de forma regular as necessidades de consumo.

O estado de Santa Catarina encontra-se, no cenário nacional, como o quarto maior produtor de banana na safra do ano de 2014, responsável por 9,9% da produção nacional, totalizando 701.151 toneladas de banana (IBGE, 2015). Dados do Cepa/Epagri (2013) da safra 2012-2013 mostram que a região nordeste é a que apresenta o maior volume de banana produzida no estado, Figura 1.

Figura 1- Maiores produtores de banana no estado de Santa Catarina na safra de 2012



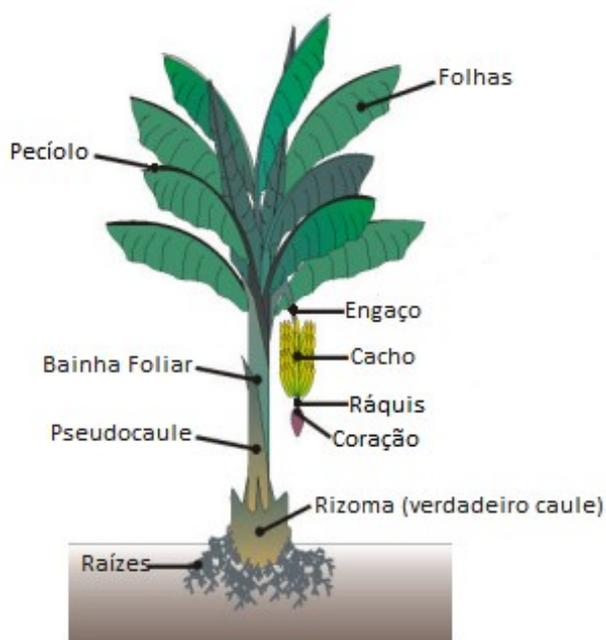
Fonte: Vieira, (2013).

2.2 Características do Resíduo

Durante a colheita o cacho de banana é retirado, a planta é cortada e, normalmente, deixada no campo para degradação natural. Os resíduos desse processo geralmente são formados pelas partes características da planta (Figura 2), que são, as cascas dos frutos, folhas, engaço e pseudocaule. Do volume total desse resíduo o pseudocaule representa a maior parte. Segundo Souza *et al.* (2010), para cada tonelada de frutos colhidos quase 4 toneladas de resíduos lignocelulósicos são gerados, dentre eles, 3 toneladas são de pseudocaule, representando mais de 70% de todo o resíduo.

O pseudocaule da bananeira é a parte da planta semelhante a um tronco. É formado pelas bainhas das folhas sobrepostas a partir do rizoma até a base do pedúnculo (engaço) e atinge a sua altura máxima quando a inflorescência emerge na parte superior da planta. O pseudocaule pode atingir uma altura de 2 a 3 m (IPGRI, 1996). O diâmetro do pseudocaule na base varia de 10 a 50 cm, medidos a 30 cm do solo. Sua massa pode chegar a 100 kg (MOREIRA, 1999 *apud* GUIMARÃES, 2012).

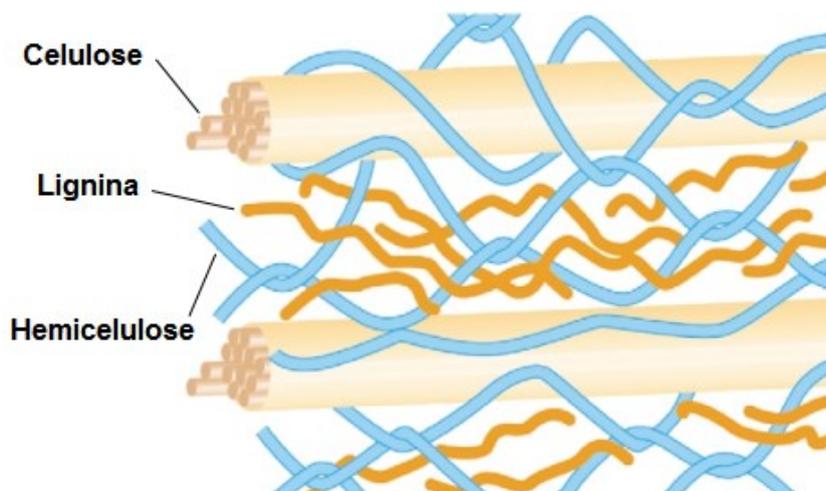
Figura 2- Morfologia da bananeira.



Fonte: Adaptado de Soffner (2001).

Essa biomassa lignocelulósica é constituída, conforme Nelson e Cox (2002), por, basicamente, lignina, hemicelulose e, uma maior parte, celulose (40-50% m/m em base seca). Na Figura 3 está demonstrada de forma simplificada a conformação da lignina, celulose e da hemicelulose na parede celular vegetal.

Figura 3 - Estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: Boudet *et al.*, (2003).

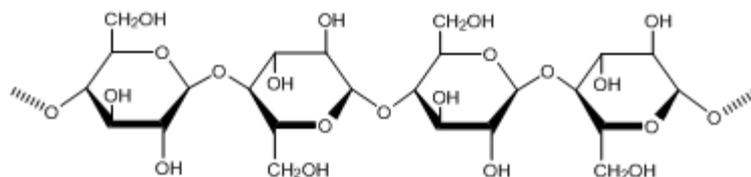
As teias cristalinas de celulose (microfibrilas) da parede celular determinam a forma estrutural da célula, estas estão permeadas por uma matriz (altamente hidratada) de moléculas não-celulósicas chamadas de hemicelulose,

que se ligam por pontes de hidrogênio à celulose. A hemicelulose é responsável por proporcionar a ligação entre a celulose e a lignina. A lignina circunda as teias de celulose e hemicelulose. Do ponto de vista físico, a lignina é rígida e serve para adicionar resistência e impermeabilizar a parede celular (RAVEN *et al.*, 1996; TAIZ e ZEIGER, 2006; RABELO, 2010).

2.2.1 Celulose

A celulose (Figura 4) é um homopolissacarídeo linear e não ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose. As unidades de glicose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). A representação da celulose pode ser por uma série de anéis piranosídicos conectados por um átomo de oxigênio que faz pontes entre dois átomos de carbono (ligação glicosídica) (Nelson e Cox, 2002).

Figura 4 - Estrutura molecular da celulose.



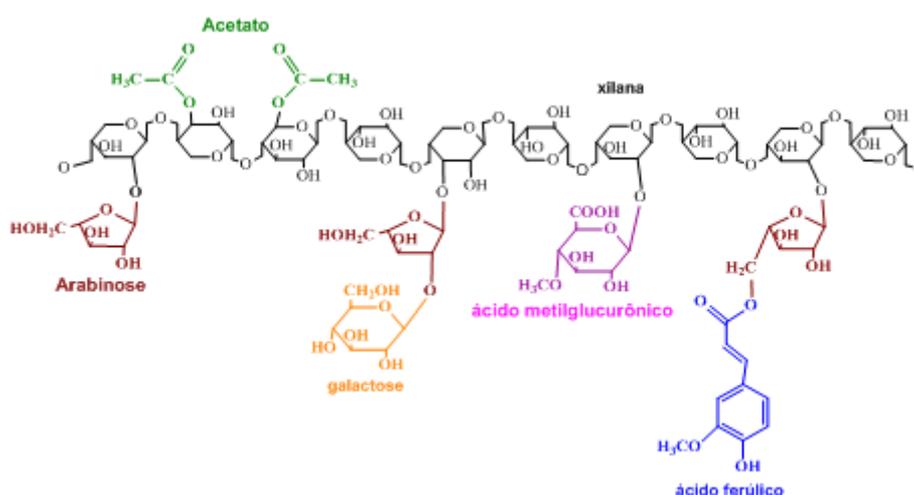
Fonte: adaptado de Luz *et al.*, (2006).

As cadeias de celulose, na parede celular dos vegetais, possuem características cristalinas. Essa cristalinidade deve-se ao fato de estarem ordenadas paralelamente e compactadas através de ligações de hidrogênio (RAVEN *et al.*, 1996; RABELO, 2010). A proporção da região cristalina da celulose é normalmente expressa em porcentagem (Índice de Cristalinidade) (PITARELO, 2007). As microfibrilas de celulose também apresentam algumas regiões amorfas onde são mais facilmente degradadas por enzimas (TAIZ e ZEIGER, 2006).

2.2.2 Hemicelulose

Semelhante a celulose a hemicelulose possui função de suporte na parede celular. No entanto, em contraste, as hemiceluloses são relativamente fáceis de serem hidrolisadas, por soluções ácidas, em seus monômeros (SJÖSTRÖM, 1993). A hemicelulose (Figura 5) possui estrutura menos ordenada que a celulose e grande quantidade de ramificações. Diversos tipos de hemiceluloses, com composições variadas, são encontradas em diferentes espécies de plantas (TAIZ e ZEIGER, 2006). Nas monocotiledôneas, como é o caso das bananeiras, as hemiceluloses são do tipo glucuronoarabinoxilanas (DARVILL *et al.*, 1980; BORGES e SOUZA, 2004).

Figura 5 - Estrutura molecular da hemicelulose do tipo glucuronoarabinoxilanas.



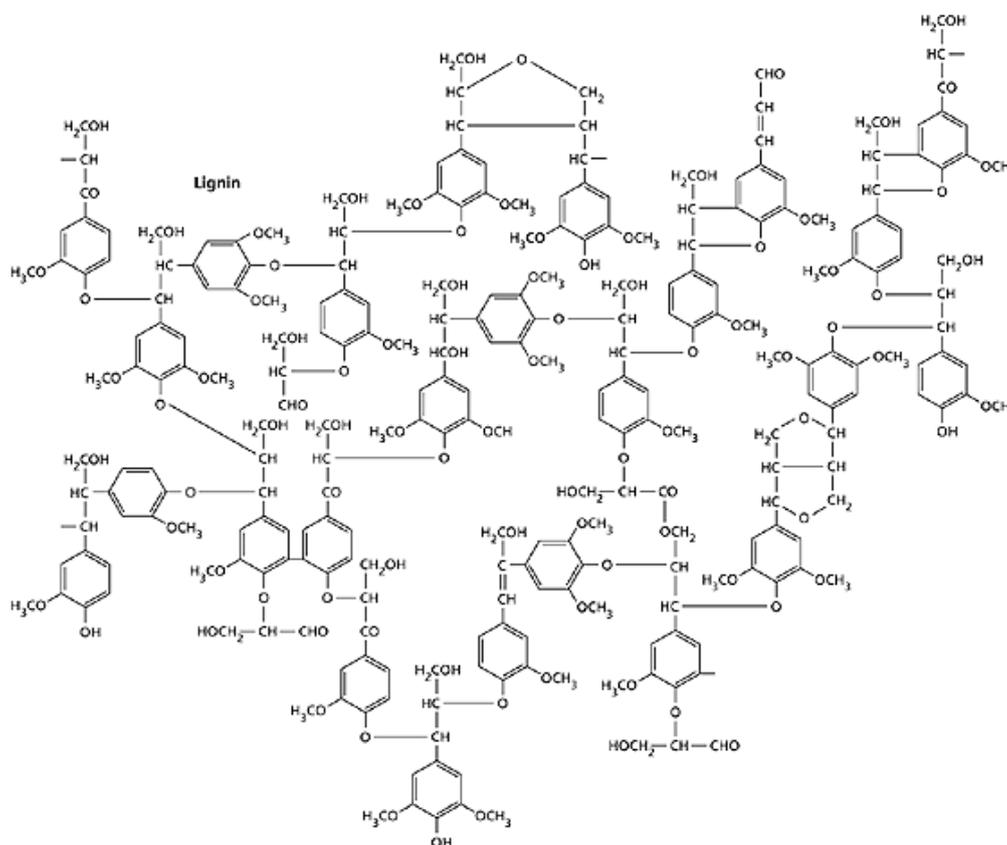
Fonte: Adaptado de Aro *et al.*, (2005).

Essa hemicelulose consiste de vários monossacarídeos polimerizados, incluindo pentoses (como xilose e arabinose), hexoses (como galactose, glicose e manose), ácido 4-O-metilglucurônico e resíduos de ácido galacturônico, também os grupos hidroxilas dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil. A xilana, que é um polímero de xilose, é a unidade mais abundante na hemicelulose (YANG e WYMAN, 2008; GÍRIO *et al.*, 2010).

2.2.3 Lignina

Lignina (Figura 6) é um polímero fenólico, amorfo, de elevada massa molar derivado principalmente de alcoóis hidroxicinamil (WENG e CHAPPLE, 2010). Possui alta energia em suas ligações e isso a torna, entre os três biopolímeros (principais da parede celular vegetal), a mais recalcitrante (CHANG, 2007).

Figura 6 - Estrutura molecular da lignina.



Fonte: Nimz (1974).

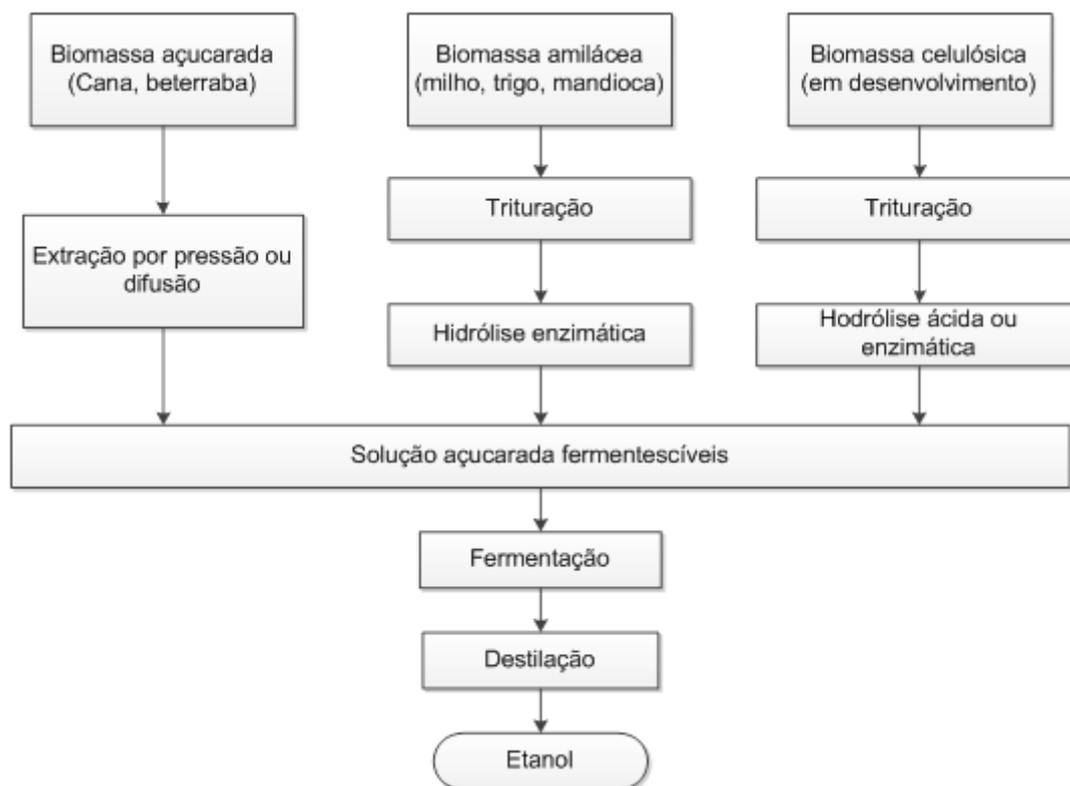
2.3 Etanol de Lignocelulósicos

O Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol do mundo, com mais de 30% da produção mundial, atrás apenas dos EUA. Na safra 2013/2014 o país produziu mais de 37 bilhões de litros (BRASKEM, 2014). A produção industrial em larga escala de etanol no Brasil é originária da fermentação do caldo de cana-de-açúcar. Pois, o país, é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e é

classificado como um dos líderes mundiais na produção do combustível a partir desta biomassa (NASTARI, 2006).

Normalmente, o processo se baseia na extração dos açúcares (por meio da moagem), que podem seguir diretamente para a fermentação e após a fermentação o vinho resultante é destilado. A produção de etanol, tendo como matéria prima a cana-de-açúcar e beterraba, consiste de um processo mais simples e envolve menos etapas que os processos via amido ou celulose, já que os açúcares estão livres na biomassa. Na Figura 7 estão apresentadas as rotas tecnológicas para produção do bioetanol, levando em consideração diferentes matérias-primas.

Figura 7 - Rotas tecnológicas para a produção de bioetanol com relação às diferentes matérias primas empregadas.



Fonte: BNDES (2008).

Na visão energética, biomassa é todo recurso renovável originário de matéria orgânica que pode ser aproveitada na geração de energia. Assim como outras fontes de energia renovável, a biomassa vegetal é uma forma indireta de energia solar (LARSON *et al.*, 2001).

O etanol, dentre os combustíveis produzidos utilizando a biomassa, se destaca, favorecido pela abundância de matéria prima e alto desenvolvimento tecnológico dos processos convencionais de produção. Em vários países, pesquisadores perseguem o desenvolvimento, em escala comercial, da extração de açúcares fermentescíveis da celulose de resíduos agrícolas, podendo assim ampliar a produção de etanol sem aumentar a área plantada nos países que já o produzem, como o Brasil e os Estados Unidos. E quem não produz poderia entrar no mercado (SIMÕES, 2009). Também essa tecnologia se mostra atraente, pois evita que haja competição entre uso da terra para a geração de energia e produção de alimentos (PACHECO, 2011). Na Tabela 1 é destacado algumas biomassas lignocelulósicas que vem sendo estudadas para a produção de etanol via celulose (etanol 2G).

Tabela 1 - Biomassas lignocelulósicas estudadas na produção de etanol de segunda geração.

Biomassa	Massa de etanol produzida / 100 g de biomassa seca	Referências
Bagaço da cana-de-açúcar	46 g	UNICA, 2013
Palha de Trigo	29 g	Saha <i>et al.</i> , 2015
Palha da cana-de-açúcar	24,85 g	UNICA, 2014
Palha de Arroz	19 g	Zhu <i>et al.</i> , 2015
Lascas de pinho	10,6 g	Cotana <i>et al.</i> , 2014
Fibra de Palmeira	5,97 g	Boonsawang <i>et al.</i> , 2012

Atualmente a tecnologia com o maior grau de desenvolvimento, no país, para a produção de segunda geração é para a produção de bioetanol utilizando palha e bagaço da cana-de-açúcar, como já é feito em escala industrial na usina de Alagoas (GRANBIO, 2014).

Para se obter etanol de biomassa lignocelulósica são necessários, basicamente, dois processos: a hidrólise dos polissacarídeos, principalmente da celulose presente na biomassa, em açúcares fermentescíveis e a conversão destes açúcares, via fermentação alcoólica, em etanol (CTEB, 2013).

2.4 Pré-Tratamento da biomassa lignocelulósica

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é um processo essencial para a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, pois colabora na geração de açúcares (degradação da hemicelulose) e facilita a ação enzimática para a sacarificação da celulose (TOQUERO e BOLADO, 2014). O pré-tratamento da biomassa é uma etapa que antecede a hidrólise, pode ser do tipo físico, químico ou combinado. Ainda, cada tipo de biomassa requer um método particular de pré-tratamento, para que minimize a degradação do substrato e maximize a produção de açúcares (HAMELINCK *et al.*, 2005). O Quadro 1 descreve alguns tipos de pré-tratamentos com seus respectivos rendimentos em xilose.

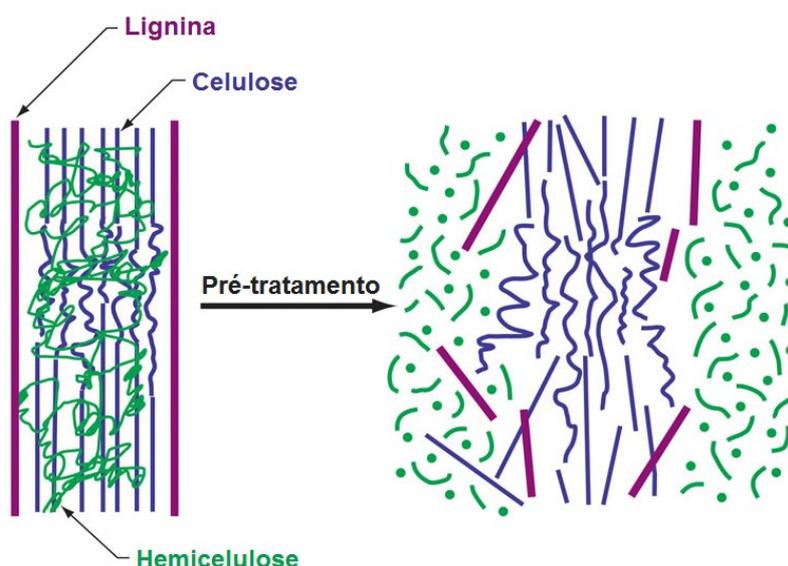
Quadro 1 - Tipos de pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica.

Processo	Descrição	Rendimento em xilose
Físico		
Explosão de vapor	Biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160°-260 °C) seguido de uma rápida descompressão	45 – 65%
Termo-hidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose	88 – 98%
Químico		
Hidrólise ácida	Por meio do uso de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítrico, concentrados ou diluídos	75 – 90%
Hidrólise alcalina	Pelo uso de bases, como hidróxidos de sódio ou cálcio	60 – 75%
Organosolvente	Uma mistura de um solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H ₂ SO ₄ , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose	70 – 80%
Biológicos	Utilização de fungos para solubilizar a lignina. Geralmente, é utilizado em combinação com outros processos	
Combinados		
Explosão de vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ (ou SO ₄) ou CO ₂ na explosão de vapor pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa da hemicelulose	88%
Afex (ammonia fiber explosion)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão	50 – 90%
Explosão de CO ₂	Similar à explosão de vapor	75%

Fonte: Hamelinck *et al.*, 2005

Devido à complexa interação entre hemicelulose e celulose, presentes nas paredes celulares dos vegetais, a natureza cristalina da celulose e a barreira física formada pela lignina (onde as enzimas são adsorvidas fisicamente sobre a lignina impedindo o acesso à celulose) ao redor das fibras celulósicas, se faz necessário o processo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (MOONEY *et al.*, 1998; OGEDA e PETRI, 2010). A finalidade do pré-tratamento é quebrar a lignina e solubilizar a hemicelulose, desta forma reduz a cristalinidade da celulose e aumenta a porosidade do material. Este processo deve favorecer também a formação de açúcares ou habilidade de formação futura de açúcares por hidrólise enzimática (SAHA *et al.*, 2005). Na Figura 8 o efeito do pré-tratamento na parede celular vegetal é apresentado.

Figura 8 - Efeito do pré-tratamento na estrutura da parede celular vegetal.



Fonte: Adaptado de Mosier *et al.* (2005).

O pré-tratamento mais empregado é o tratamento por ácidos, normalmente ácido sulfúrico. Esse é dividido em duas abordagens baseado na concentração do ácido, uma é para o emprego de ácido concentrado, onde se emprega baixa temperatura, e outra para o emprego de ácido diluído, onde utiliza-se alta temperatura. Os tratamentos ácidos apresentam vantagens, na remoção da lignina, na sacarificação da hemicelulose e possuem baixo custo de investimento e menor custo operacional (GÍRIO *et al.*, 2010).

2.5 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é o segundo passo para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Consiste na despolimerização da celulose e hemicelulose e conseqüentemente na liberação de hexoses e pentoses no meio reacional (TAHERZADEH e NIKLASSON, 2004). O rendimento teórico da conversão de celulose em glicose, Reação 1, após hidrólise total do substrato, é de 1,11 g/g.



As enzimas são catalisadoras de reações químicas e são extremamente específicas na escolha do substrato. Quase todas as enzimas conhecidas são proteínas. A catálise ocorre em um local particular, chamado de centro ativo, ponto ativo ou ainda sítio ativo. Por forças intermoleculares, as enzimas aproximam substratos em uma orientação ótima para fazer a quebra das ligações (BENG *et al.*, 2004). As enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (MARZZOCO e TORRES, 1999). O Quadro 2 mostra os tipos de reações de cada grupo de enzimas.

Quadro 2- grupos de enzimas e tipos de reações que catalisam.

Grupo	Tipo de reação
Óxido-redutases	<p>Óxido-redução</p> $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$
Transferases	<p>Transferência de grupos</p> $A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$
Hidrolase	<p>Hidrólise</p> $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$
Liases	<p>Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando duplas ligações.</p> $A=B + X-Y \rightleftharpoons \begin{array}{c} X & Y \\ & \\ A-B \end{array}$
Isomerases	<p>Rearranjos intramoleculares</p> $\begin{array}{c} A-B \\ & \\ Y & X \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} A-B \\ & \\ X & Y \end{array}$
Ligases	<p>Condensação de duas moléculas, associada a hidrólise de uma ligação de alta energia.</p> $A + B \rightleftharpoons A-B$

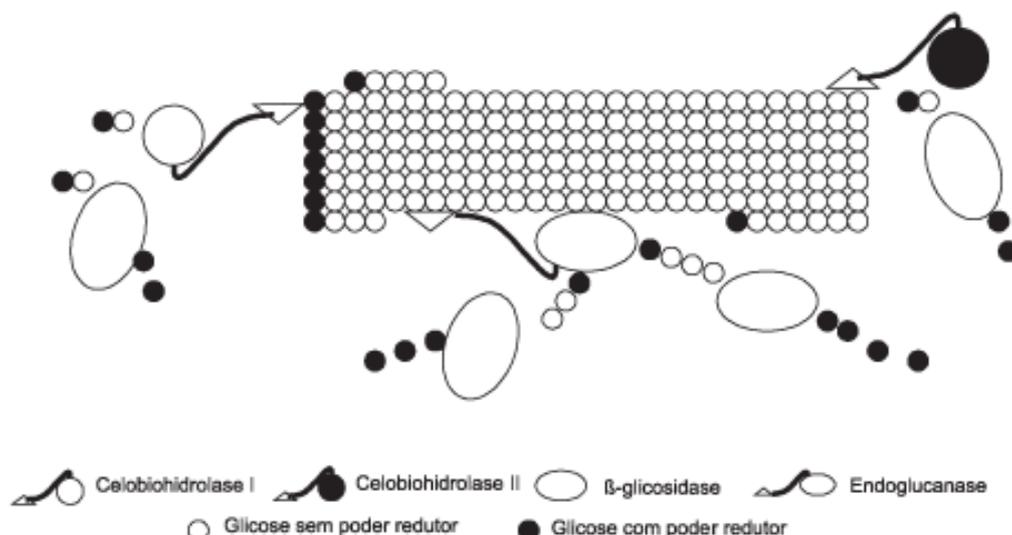
Fonte - adaptado de Marzocco e Torres, (1999).

Após o pré-tratamento as enzimas encontram um caminho mais liberado até a celulose, pois parte, ou toda, a lignina foi quebrada e a hemicelulose sacarificada. A hidrólise da celulose libera glicose (açúcar fermentescível), essa reação pode ser catalisada por enzimas, do tipo hidrólise, denominadas celulasas (CEN e XIA, 1999).

Celulasas podem ser produzidas por fungos e bactérias aeróbicas. Entretanto fungos filamentosos são mais utilizados para a produção dessas enzimas (CHANG, 2007; PANDEY *et al.*, 2000).

Celulasas são um complexo enzimático formado por três grupos de enzimas que atuam juntas sobre a celulose (Figura 9), são elas: as endoglucanases (atuam nas regiões internas da celulose), celobio-hidrolases (agem nas pontas redutoras e não redutoras formadas pelas endoglucanases) e a β -glicosidasas (agem nas unidades de celo-oligossacarídeos e celobiose que são liberadas pelas celobio-hidrolases) (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

Figura 9 - Ação sinérgica entre endoglucanases, celobio-hidrolase e β -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica.

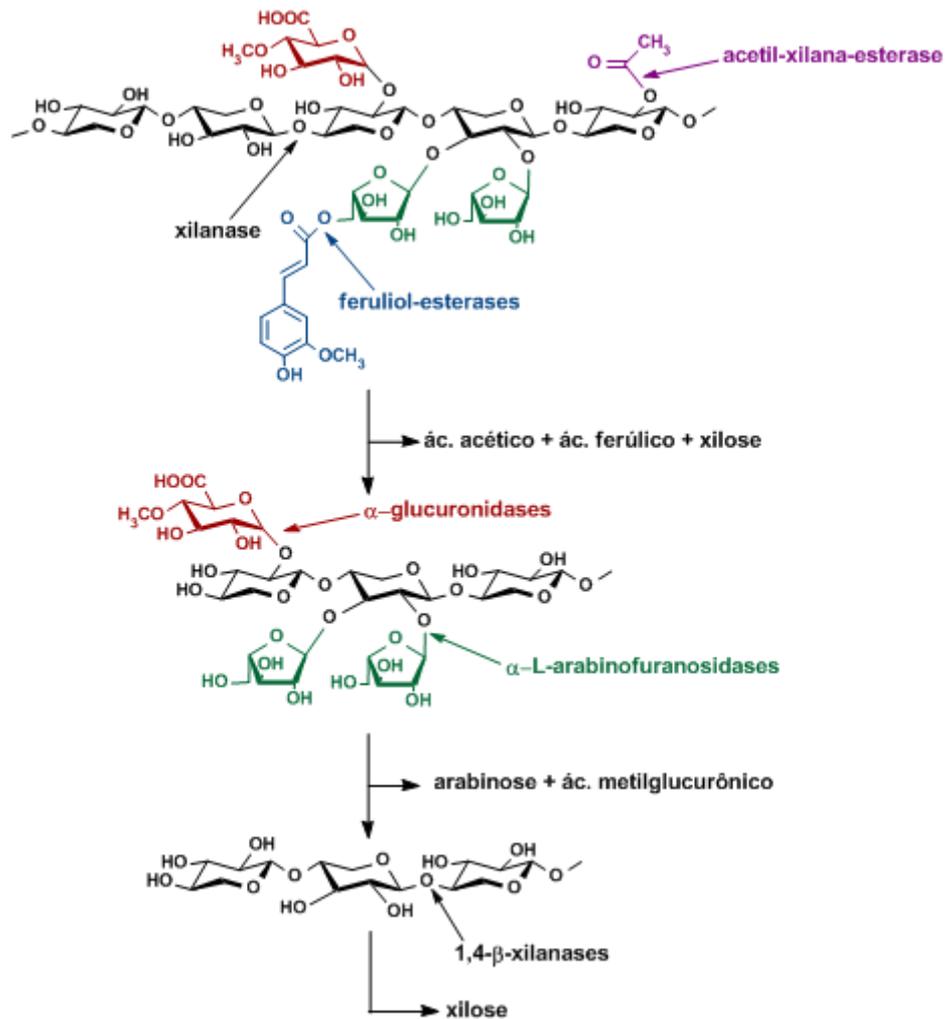


Fonte: Carvalho *et al.* (2009).

A eficiência da hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica pode ser aumentada pela combinação de enzimas celulolítica e hemicelulases e não apenas de celulases (ZHONG *et al.*, 2009). As hemicelulases são formadas por enzimas específicas, como as xilanases (mais abundante) ou manases, que são responsáveis pela hidrólise da hemicelulose (KIM *et al.*, 2002). As hemicelulases podem ser produzidas por bactérias, fungos e por plantas.

Devido à variedade e complexidade da estrutura da hemicelulose requer, igualmente, uma variedade de enzimas para a sua conversão, dentre elas estão as endo-1,4- β -xilanases, β -D-xilosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetil-xilana-esterase e feruloil-esterases (DODD e CANN, 2009). Muitas dessas enzimas atuam exclusivamente sobre os grupos laterais. Sem os grupos laterais a cadeia principal de xilana fica exposta à quebra pelas xilanases. As β -xilosidases quebram xilbiose em dois monômeros de xilose, sendo que esta enzima também pode liberar xilose a partir do final da cadeia principal de xilana ou de um oligossacarídeo (FARINAS, 2011). Na Figura 10 está demonstrada a ação hidrolítica das enzimas hemicelulósicas.

Figura 10 - Ação das enzimas hemicelulases na hidrólise da molécula de hemicelulose.



Fonte: Adaptado de Dodd e Cann (2009).

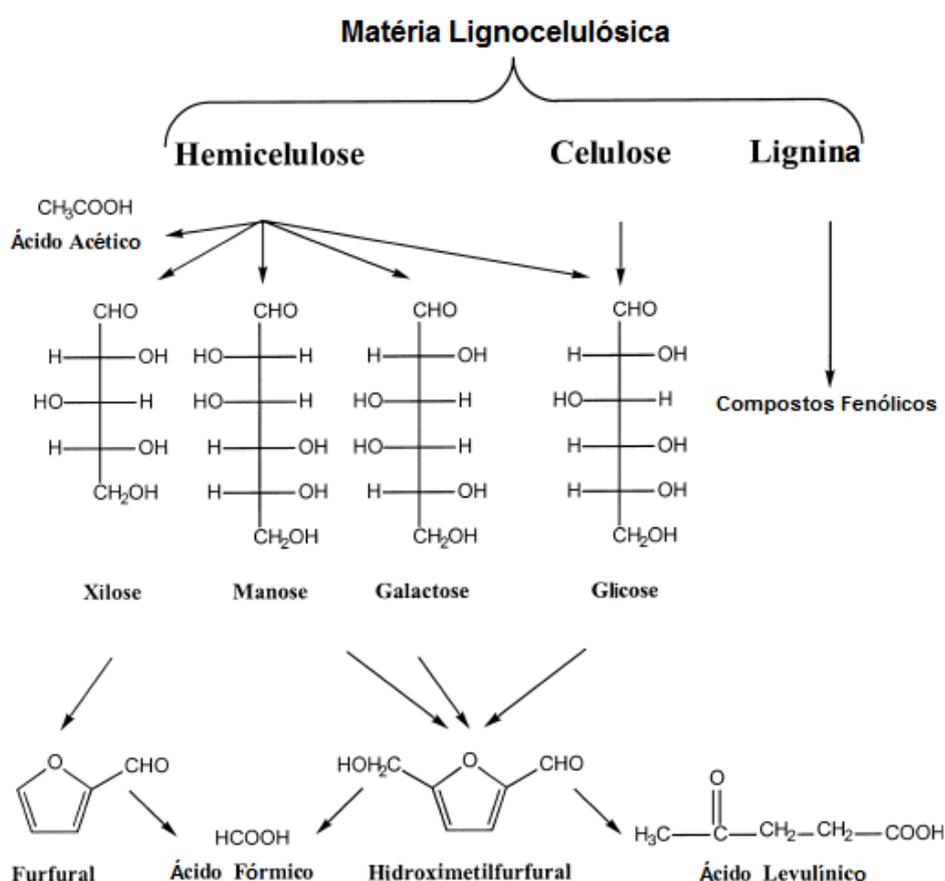
Para se obter um processo de hidrólise enzimática otimizado é essencial ter conhecimento detalhado da estrutura da parede celular da biomassa. Além disso, a conversão da hemicelulose em açúcares fermentescíveis é importante para se aumentar a eficiência e viabilizar economicamente o processo de conversão da biomassa (FARINAS, 2011).

2.6 Destoxificação

Durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos vários compostos são formados ou liberados, dentre eles alguns inibidores microbianos. São divididos em três grupos como, furanos, ácidos

orgânicos e compostos fenólicos, como pode ser observado na Figura 11. Da porção hemicelulósica podem ser gerados furanos como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), ácidos orgânicos como o ácido acético, ácido fórmico e o ácido levulínico. Da lignina são formados os compostos fenólicos, que são responsáveis pela inibição do crescimento e do metabolismo microbiano. Também no pré-tratamento alguma molécula de glicose que for liberada pela porção da celulose, em altas temperaturas, pode se degradar à hidroximetilfurfural (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; DAORATTANACHAI *et al.*, 2012; GU *et al.*, 2014).

Figura 11– Compostos que são formados durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Palmqvist e Hahn-hägerdal (2000).

A fermentação do hidrolisado contendo esses inibidores do metabolismo microbiano é caracterizada pela cinética lenta e produtividade limitada. Para diminuir a concentração e minimizar a ação desses compostos inibidores, vários métodos de destoxificação têm sido propostos e estudados, são eles métodos

biológicos, físicos e químicos (MUSSATTO e ROBERTO, 2004; LARSSON *et al.*, 1999).

Os métodos biológicos de destoxificação envolvem a utilização de enzimas ou micro-organismos específicos que atuam sobre os compostos tóxicos presentes no hidrolisado e alteram a sua composição. Por exemplo, as destoxificações com lacase e peroxidase atuam, reduzindo a concentração de compostos fenólicos e ácidos (LARSSON *et al.*, 1999).

Um método físico de destoxificação do hidrolisado consiste na concentração por evaporação do caldo com isso podendo, por arraste de vapor, reduzir a concentração de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano. Contudo, esse método também pode aumentar a concentração de compostos tóxicos não voláteis (MUSSATTO e ROBERTO, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2001).

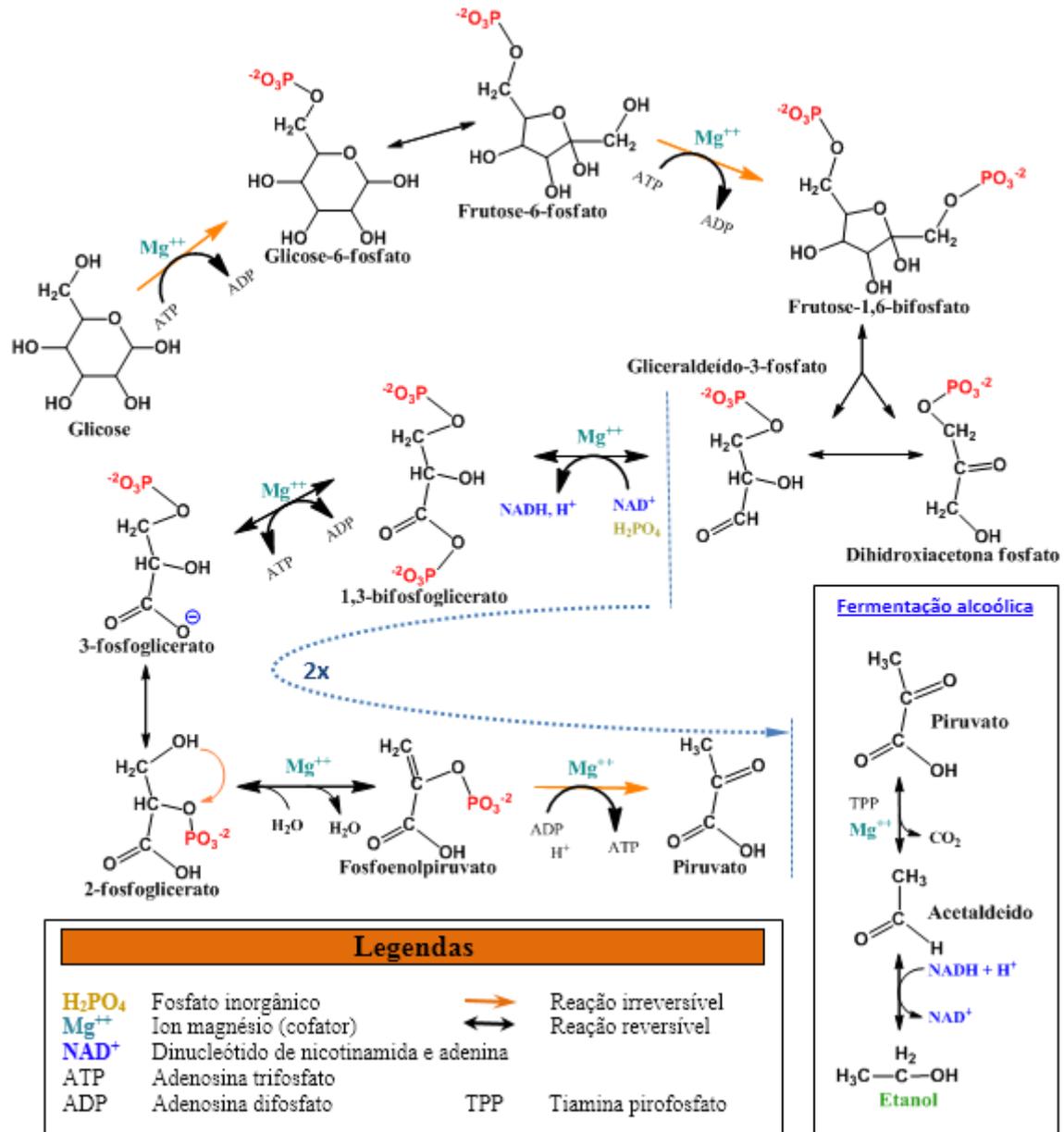
O método químico de destoxificação consiste na precipitação dos compostos tóxicos e ionização de alguns inibidores pelo ajuste de pH podendo assim alterar a toxicidade dos compostos. Para diminuir a concentração desses inibidores também são usados separação com solventes orgânicos ou por adsorção com carvão ativado (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; MUSSATTO e ROBERTO, 2001; KAMAL *et al.*, 2011; MATEO *et al.*, 2013).

2.7 Fermentação

Fermentação é um termo que denota a degradação anaeróbica da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos, dependendo do organismo, para obter energia conservada na forma de ATP. A quebra da glicose é chamada de glicólise, é catalisada por enzimas e possui duas fases, onde, a primeira fase consiste na divisão da glicose em duas moléculas de piruvato (processo comum nos organismos) e a segunda fase consiste na transformação do piruvato em outros compostos (depende do tipo de organismo). Dependendo do organismo o piruvato pode ser convertido a etanol e CO₂, lactato ou completamente oxidado a CO₂ e H₂O. A rota que leva o piruvato a ser oxidado em etanol e CO₂ se dá em condições de anaerobiose e é denominado de fermentação alcoólica (Nelson e Cox, 2002). A rota metabólica para a produção

de etanol, desde a glicólise até a fermentação alcoólica, está ilustrada na Figura 12.

Figura 12 - Rota metabólica para a produção de etanol.



Fonte: Adaptado de Mrabet (2009); Nelson e Cox (2002).

No Brasil a produção de etanol em larga escala se dá pela fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar, que é rico em sacarose, utilizando leveduras (fungos unicelulares) da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, onde após o tempo de fermentação as leveduras são recuperadas por centrifugação e tratadas para posterior reuso (BNDES, 2008). A produção de bioetanol por

sacarose e pela celulose é possível, pois seus monômeros são açúcares fermentescíveis (glicose e frutose e apenas glicose respectivamente), no entanto os açúcares gerados pela sacarificação da hemicelulose são em sua maioria pentoses, que segundo Hahn-Hägerdal (2007) não são fermentados pela levedura da espécie *S. cerevisiae*.

O desempenho do microrganismo no processo fermentativo depende de várias condições, dentre as mais importantes estão o pH, temperatura, concentração de açúcares, concentração do inóculo, disponibilidade de oxigênio, concentração de etanol e contaminação bacteriana.

O pH é um fator importante tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009). Segundo Lima *et al.* (2001) a faixa adequada de pH é entre 4 e 5.

A temperatura afeta a atividade de micro-organismos, influenciando no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular em leveduras (BATISTA, 2001). As temperaturas ótimas para a fermentação situam-se na faixa de 26 a 35°C. Quando se tem temperaturas mais altas a velocidade da fermentação é maior, mas também favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que aumenta a sensibilidade da levedura a toxidez do álcool, levando a formação de metabólitos secundários como o glicerol (LIMA *et al.*, 2001).

As linhagens de leveduras normalmente utilizadas nos processos industriais de fermentação são pouco osmotolerantes. Concentrações elevadas de açúcar resultam em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos etanol (SALMON e MAURICIO, 1994). O aumento da osmolaridade faz com que as células se contraíam, acarretando na perda da viabilidade celular (MAGER e VARELA, 1993 *apud* SOUZA, 2009)

Alta concentração de inóculo permite fermentações mais rápidas, maior produtividade, maior controle sobre as bactérias contaminantes e restringe o crescimento da própria levedura. No entanto exige maior consumo de açúcar para manter as células vivas, maior competição pelos nutrientes do meio (minerais e vitaminas), diminuindo a viabilidade do fermento. Por isso, de acordo com as exigências do processo, é importante haver um teor ótimo de levedura na dorna (LIMA *et al.*, 2001).

Na utilização do oxigênio a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem características facultativas, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência como na presença de oxigênio. Porém em altas concentrações de oxigênio a fermentação alcoólica é inibida, fenômeno este conhecido como “Efeito Pasteur” (SOUZA, 2009). Mas, como se sabe, a presença de oxigênio, em condições ideais, permite uma maior utilização do substrato, aumenta a tolerância da levedura ao etanol, sem que haja decréscimo significativo no rendimento em etanol por quantidade de substrato consumido (MAIA, 1989 *apud* SOUZA, 2009).

O álcool produzido por *S. cerevisiae* durante a fermentação, dependendo da concentração, tem efeito inibitório na célula da levedura, podendo causar inibição da multiplicação celular, morte das células e, por consequência, a inibição da fermentação acarretando em uma menor produtividade em etanol (MOULIN *et al.*, 1984).

Com o processo fermentativo em andamento o caldo passa a ter caráter alcoólico e ácido, com isso os contaminantes tendem a serem resistentes a essas condições que são, na maioria das vezes, bactérias do tipo *Lactobacillus* e *Bacillus*. Esses contaminantes, por sua vez, competem com as leveduras pelo substrato, gerando subprodutos que podem causar a floculação do fermento (SOUZA, 2009).

2.8 Estudos do grupo de pesquisa Valorização de Resíduos e Biomassa sobre a produção de etanol 2G

Em função do estado de Santa Catarina gerar grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos na indústria da bananicultura, a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) vem estudando, desde 2007, formas de converter esses resíduos em etanol 2G.

Schulz (2010) ao pré-tratar com ácido e, posteriormente, hidrolisar com enzimas casca de banana *Musa cavendishii* na concentração de 250 g/L em massa úmida (m_u), obteve 5,77 g/L de açúcares redutores (AR) no caldo, esse valor representou um rendimento em AR de 2,31%. Em seguida, ao fermentar por *Saccharomyces cerevisiae* meio reacional contendo 1210 g/L de casca de banana *in natura* (19,51 g/L de AR) obteve concentração de etanol (P_f), fator de

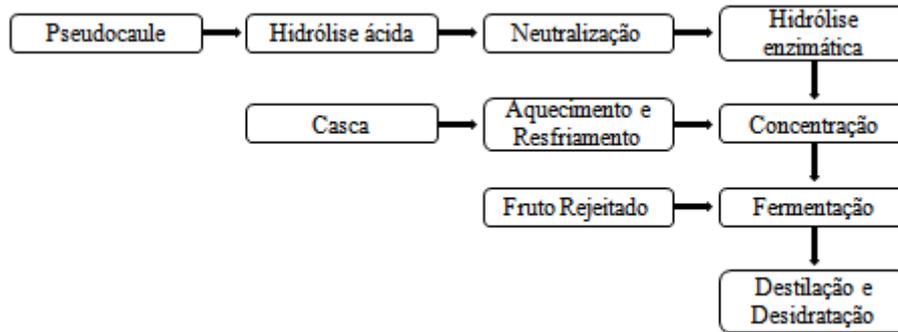
conversão de substrato em etanol ($Y_{P/AR}$) e produtividade (Q_P) de 7,88 g/L, $0,34 \pm 0,11$ g/g e $1,32 \pm 0,03$ g.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente.

Gonçalves Filho (2011) avaliou diferentes processos de despolimerização do pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii* sobre a fermentação alcoólica. Nesse estudo, o autor obteve melhor resultado no rendimento em açúcares redutores com base no teor de celulose da biomassa ($R_{AR} = 74,1 \pm 11,4\%$) quando empregou, sobre o pseudocaule, pré-tratamento alcalino e, posteriormente, lavagem com água e hidrólise enzimática. Na fermentação, por *Saccharomyces cerevisiae*, do caldo hidrolisado de pseudocaule, cujo processo hidrolítico ocorreu por ácido com 500 gm_u/L (23,5 gm_s/L) de pseudocaule pré-tratado em meio alcalino, obteve um fermentado com aproximadamente 7 g/L de etanol, e os parâmetros fermentativos $Y_{P/AR}$ e Q_P foram de $0,31 \pm 0,01$ g/g e $0,90 \pm 0,09$ g.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente.

Hopfner (2015) ao avaliar a produção de etanol por diferentes espécies de micro-organismos a partir de mostos de cascas de banana (frescas ou sacarificadas) com diferentes concentrações de açúcares redutores, identificou que o caldo concentrado ($AR \cong 100$ g/L) de casca *in natura* de banana fermentado por *S. cerevisiae* ATCC 26603, proporcionou, após 24 h de fermentação, um vinho com 32,4 g/L de etanol, resultando em $Y_{P/AR}$ de $0,44 \pm 0,01$ g/g e Q_P de $1,31 \pm 0,01$ g.L⁻¹.h⁻¹.

Souza (2015) ao realizar simulação, em *software* Aspen Hysys®, do processo de produção de etanol a partir de resíduos da bananicultura (Figura 13), indicou que para a produção de etanol em escala industrial, com consumo de energia próximo dos valores propostos pela literatura, são necessários 9046 ton/h de pseudocaule seco, 52,33 ton/h de casca, e 1,58 ton/h de fruto rejeitado para se obter 270 ton/h de mosto, com esses valores foi possível obter, pela simulação, vazões de etanol hidratado e anidro da ordem de 23,52 ton/h e 21,97 ton/h, com frações mássicas de etanol de 93,50 % e 99,50.

Figura 13 - Etapas do processo de produção de etanol a partir de resíduos da banana.

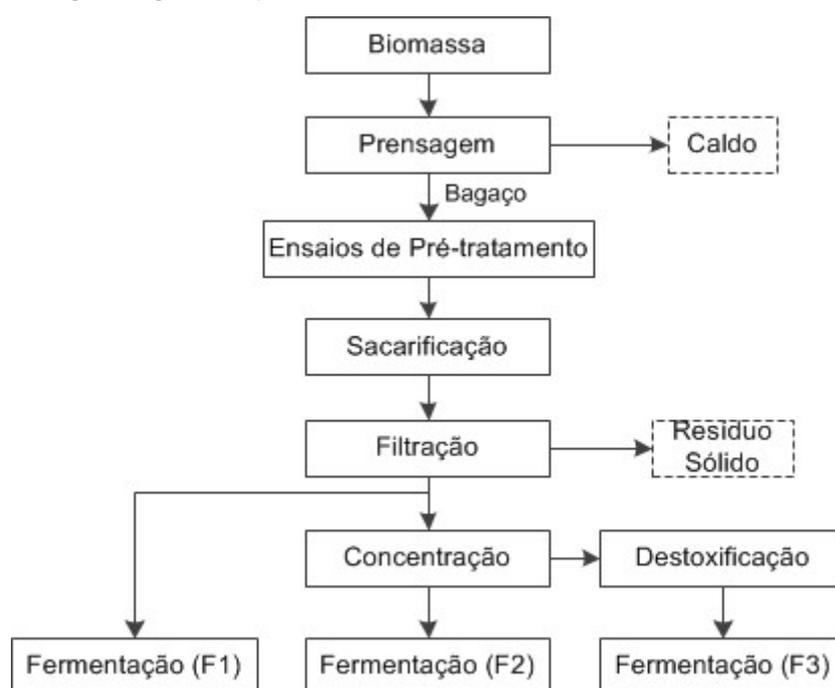


Fonte: Souza 2015.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de avaliar a influência do pré-tratamento químico sobre o rendimento da etapa de sacarificação e fermentação de biomassa, foram estabelecidos diferentes procedimentos da obtenção do resíduo até a obtenção do produto fermentado, conforme pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma geral do processo.



3.1 Biomassa

Foi utilizada como biomassa pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*, popularmente conhecida na região Sul do Brasil, como bananeira nanica. O resíduo lignocelulósico foi obtido em plantações da região Nordeste de Santa Catarina, após a colheita da fruta.

3.2 Preparo da biomassa.

O pseudocaule de bananeira foi inicialmente cortado em tamanho aproximado de 60 cm e separado em suas camadas de bainha foliar. Para os

ensaios de sacarificação da biomassa, uma parte deste material foi utilizado na sua forma integral e o restante, conduzido para extração do suco e secagem.

Para o uso da biomassa integral (Ensaio H-in, item 3.4.1), as bainhas foliares foram cortadas em retângulos de aproximadamente 3 cm de aresta seguido de trituração em liquidificador doméstico para separação e cominuição das fibras até obtenção de mistura homogênea contendo fibras com comprimento máximo em torno de 1 cm.

A prensagem das bainhas foliares para a extração do suco e posterior sacarificação do bagaço foi realizada em escala laboratorial utilizando prensa de rolos de marca Hidro-Industrial. A prensagem do resíduo lignocelulósico foi feita em duas etapas. Na primeira prensagem foi utilizada uma distância entre rolos de 6 mm e, na segunda, 3 mm. O suco extraído foi congelado para análise do seu potencial de aproveitamento a ser realizado posteriormente pelo grupo de pesquisa. O bagaço resultante da prensagem foi hidrolisado em duas diferentes condições: uso da biomassa úmida (prensada), sem secagem prévia (Ensaio H-m_u70m_s e H-m_u100m_s) e uso da biomassa seca (H-Ac, H-AI, H-70m_s e H-100m_s).

Nos experimentos com biomassa úmida, o bagaço foi submetido ao mesmo tipo de cominuição utilizada com o pseudocaule integral, conforme descrito anteriormente, seguido de filtração para remoção do suco resultante da operação.

Para os ensaios com biomassa seca, o bagaço foi inicialmente cortado em pedaços de 3 cm de largura por ± 10 cm de comprimento e secado em secador de bandejas marca COEL HW 500 com convecção forçada (velocidade do ar na entrada do secador de 2,6 m/s e na câmara de secagem igual a 0,22 m/s), a 60 °C durante 24 h, conforme estabelecido por Liebl (2015). O valor médio do teor de umidade de equilíbrio (%U em base úmida) após a secagem foi de $9,7 \pm 0,1\%$, o qual foi equivalente à 0,11 g H₂O/g massa isenta de água (%U em base seca). Após secagem, o material foi moído em moinho de facas Solab com rotação de 1750 rpm até tamanho máximo das partículas de 30 mesh (0,595 mm) e armazenado para posterior sacarificação.

3.3 Pré-Tratamento químico

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de volume de trabalho. Essa etapa do trabalho teve como meta comparar e indicar o método de pré-tratamento químico capaz de proporcionar maior rendimento em açúcar na etapa subsequente de sacarificação (hidrólise enzimática).

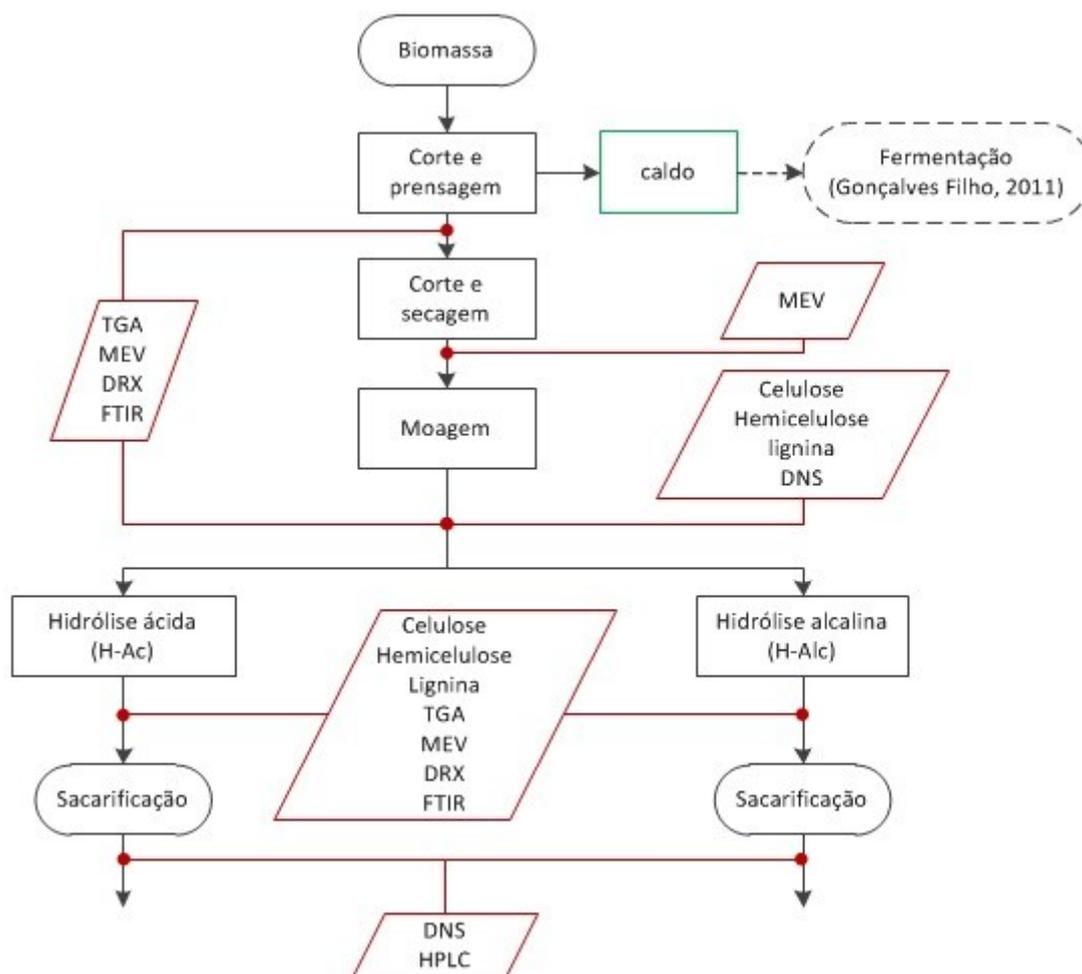
Gonçalves Filho (2011) avaliou os mesmos tipos de pré-tratamentos químicos aqui comparados, porém, utilizou como biomassa o pseudocaule sem secagem prévia na concentração máxima de 23,50 g/L (massa seca). Neste trabalho, empregou-se como biomassa o pseudocaule seco e moído, preparado como descrito anteriormente. Cada ensaio foi realizado em triplicata e cada frasco recebeu 7 g de farelo de pseudocaule contendo $9,7 \pm 0,1\%$ (umidade residual após etapa de secagem). A concentração de biomassa seca no frasco de Erlenmeyer foi de, aproximadamente, 70,2 g/L.

Foram avaliados os dois mesmos tipos de processos de pré-tratamento químico comparados por Gonçalves Filho (2011): (1) Hidrólise ácida, H_2SO_4 2% m/m_s, 121 °C, 15 min (Ensaio H-Ac); (2) Hidrólise alcalina, NaOH 3% m/m_s, 121 °C, 15 min (Ensaio H-AI).

Após pré-tratamento, o pH foi ajustado para 5,5 (NaOH anidro no meio pré-tratado com H_2SO_4 e H_2SO_4 P.A. no meio pré-tratado com NaOH) e a mistura foi conduzida à hidrólise enzimática (sacarificação).

A sequência de operação com respectivos tipos de análises realizadas em cada etapa do processo de avaliação desses pré-tratamentos é mostrada na Figura 15.

Figura 15 - Fluxograma do processo de avaliação dos pré-tratamentos químicos e respectivas análises realizadas (em vermelho).



3.4 Sacarificação

Para a sacarificação da biomassa pré-tratada quimicamente (Figura 15) foi utilizada uma solução aquosa composta das enzimas Celulase NS50013 e Hemicelulase NS22002 da Novozymes®. As respectivas concentrações das enzimas (6% m/m_s e 2% m/m_s), pH reacional (pH 5,5; tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 M), temperatura (45 °C) e tempo de reação (24 h), foram utilizadas conforme indicado por Gonçalves Filho (2011).

Durante os experimentos, as enzimas foram conservadas em geladeira e apresentaram atividades em torno de 30 FPU para celulase e de 1,5 µmol/min.mL para a hemicelulase (item 3.7.2).

Como reator empregou-se frascos de Erlenmeyer 250 mL com 90 mL da mistura pré-tratada quimicamente, adicionada de 10 mL de solução enzimática. Após o tempo de reação, o caldo hidrolisado foi filtrado a vácuo e congelado para posterior fermentação. O resíduo sólido da filtração, após caracterização por TGA, MEV, DRX e análises para determinação dos teores de lignina, celulose e hemicelulose, foi descartado.

3.4.1 Determinação da concentração ideal de biomassa para sacarificação

Após seleção do melhor método de pré-tratamento químico da biomassa indicado para a sacarificação (item 3.3), avaliou-se a influência do uso de diferentes concentrações de biomassa sobre o rendimento em açúcares redutores do processo hidrolítico.

Cinco diferentes ensaios de sacarificação foram realizados: (1) Ensaio H-70m_s (70,2 g/L de farelo); (2) Ensaio H-100m_s (100,3 g/L de farelo); (3) Ensaio H-m_u70m_s (327,8 g/L de biomassa prensada, equivalente a 70,2 g/L de biomassa seca); (4) Ensaio H-m_u100m_s (468,3 g/L de biomassa prensada, equivalente a 100,3 g/L de biomassa seca); (5) Ensaio H-in (1000 g/L de biomassa *in natura*, sem prensagem e secagem, equivalente a 70,6 g/L de biomassa seca). O método de preparo de cada uma dessas biomassas está descrito no item 3.2.

3.5 Destoxificação

Depois de hidrolisado a fração sólida foi separada do caldo por filtração a vácuo e o caldo seguiu para a etapa de destoxificação. A destoxificação do caldo sacarificado foi feita por adsorção com carvão ativo da marca Merck. Três diferentes proporções de carvão foram avaliadas (1%, 2% e 4% m/v) e cada ensaio foi conduzido em triplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL.

Após mistura, os frascos foram incubados em agitador orbital Shaker Incubating LOGEN com frequência de agitação de 200 min⁻¹, 30 °C, durante 60 min, conforme empregado por Mussatto e Roberto (2004) e Ferreira (2013). Em

seguida, o carvão foi removido por filtração a vácuo (pressão de 400 mmHg) e o filtrado foi congelado até fermentação.

Amostras do caldo foram coletadas, antes e após a destoxificação, e conduzidas para análises químicas onde determinou-se as concentrações de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) e açúcares redutores.

3.6 Ensaios de fermentação

3.6.1 Concentração do caldo

Para a etapa de fermentação o caldo hidrolisado foi previamente concentrado até AR \cong 100 g/L em banho de aquecimento da marca Fisatom modelo 558 a uma temperatura de 70 °C, com homogeneização constante através de agitador portátil com pás de hélice a 150 rpm e em recipiente aberto.

3.6.2 Preparo do mosto

Caldo sacarificado e concentrado (AR \cong 100 g/L) foi adicionado de nutrientes, conforme proposto por Souza *et al.* (2012): 3 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,5 K₂HPO₄, 0,1 g/L MgSO₄.7H₂O e 0,1 g/L CaCl₂.

Antes da inoculação, os mostos foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm, durante 15 min e deixados em câmara de fluxo laminar até atingir temperatura ambiente. O meio contendo o carboidrato glicose ou AR da sacarificação foi esterilizado separadamente da solução de nutrientes a fim de evitar-se a reação de Maillard (reação entre carboidratos e aminas).

3.6.3 Preparo de inóculo

O inóculo foi produzido conforme estabelecido por Schulz (2010). Cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae*, isolada de fermento comercial

Fleischmann®, mantida no banco de cepas da UNIVILLE sob número 9080, foi previamente cultivada a 30 °C durante 24 h em placa de Petri contendo meio GY (20 g/L de glicose com nutrientes descritos em 3.6.2) adicionado de 15 g/L de Ágar-Ágar. Em seguida, foi adicionada 5 mL de água destilada por placa e, após raspagem das colônias com auxílio de uma alça de platina, a suspensão microbiana foi coletada por pipetagem e utilizada como pré-inóculo em meio de cultivo GY líquido (2 mL de pré-inóculo / 100 mL de meio) contido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram incubados em agitador orbital (*shaker*) da LOGEN, a 30 °C com frequência de agitação de 120 min⁻¹ durante 18 h (SCHULZ, 2010).

Antes da inoculação dos frascos de fermentação, o inóculo foi padronizado a fim de que cada frasco recebesse a mesma concentração inicial de micro-organismos (X_0). Para a padronização, a suspensão microbiana do inóculo foi centrifugada e a massa celular adicionada de água destilada em volume suficiente para uma absorbância final da mistura de 1,0 em comprimento de onda de 600 nm.

A partir de uma curva de calibração, construída com quatro diferentes concentrações de células em massa seca (Anexo I), verificou-se que a concentração de células no início dos diferentes ensaios de fermentação realizados (X_0) foi em torno de 1,1 g/L.

3.6.4 Condução do ensaio

Foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 80 mL de mosto e 20 mL de inóculo. Quatro diferentes tipos de mostos foram avaliados: (1) Ensaio F1, para avaliar o efeito da concentração do caldo sobre a fermentação, foi utilizado como substrato o mosto de caldo sacarificado de pseudocaule não-concentrado ($AR \cong 18$ g/L); (2) Ensaio F2 contendo como substrato o mosto de caldo sacarificado e concentrado de pseudocaule ($AR \cong 100$ g/L), não-destoxificado; (3) Ensaio F3 contendo como substrato mosto de caldo sacarificado e concentrado de pseudocaule, destoxificado; (4) Ensaio F4 contendo como substrato 100 g/L de glicose (ensaio padrão).

Os frascos foram incubados nas mesmas condições do preparo de inoculo (item 3.6.3). Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, com uma replicata.

3.7 Metodologia analítica

Foram realizadas diferentes análises físicas e químicas para caracterizar a biomassa e os produtos obtidos ao longo de todo o processo de conversão do resíduo a etanol.

Foi determinado o teor de umidade do pseudocaule de bananeira *in natura* e após secagem e moagem da biomassa (farelo), realizadas análises químicas para determinação das atividades das enzimas empregadas na etapa de sacarificação da biomassa, utilizadas as técnicas para análise da cristalinidade da celulose por Difração de Raio-X (DRX) e analisadas as estruturas física do vegetal por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e após cada uma das etapas de pré-tratamento avaliadas.

Durante a etapa de pré-tratamento foram determinadas as concentrações de lignina, celulose e hemicelulose contidas na biomassa empregando as técnicas de digestão seguida por quantificação gravimétrica.

Na etapa de destoxificação do caldo sacarificado foram feitas as análises das concentrações de ácidos orgânicos, furfural, 5-Hidroximetilfurfural e açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e as análises da concentração de fenóis totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau.

As análises das concentrações de etanol (P) antes e após a etapa final de fermentação foram feitas por cromatografia gasosa (CG).

As análises de concentração de açúcares redutores (AR), exceto na etapa da destoxificação, foram feitas pelo método colorimétrico de DNS (3,5 dinitro salicilato).

3.7.1 Teor de umidade

Empregou-se a norma ASTM E871 – 82 com alteração na quantidade de amostra empregada.

A determinação do teor de umidade do farelo de pseudocaule foi feita em triplicata onde pesou-se 4,1 g do farelo em cadinho de porcelana previamente seco e com massa conhecida. Posteriormente, os cadinhos foram colocados em estufa de secagem com circulação forçada de ar da marca SHEL LAB modelo 1370 – FX, a 103 °C durante 16 h. Em seguida, foram armazenados em dessecador até temperatura ambiente (aproximadamente 3 h) e pesados em balança analítica. A secagem e pesagem das amostras foram repetidas até atingir-se massa constante.

3.7.2 Atividade enzimática

Foram determinadas as atividades das enzimas comerciais Celulase NS50013 e Hemicelulase NS22002 da Novozymes® conforme proposto por Adney e Baker (1996) e por Bailey *et al.*(1992), respectivamente.

3.7.2.1 Atividade de celulases

As análises foram feitas em duplicata e conduzidas em quatro tubos de ensaio contendo, cada um, 0,5 mL de solução enzimática (Celulase-complexo NS50013) em tampão citrato de sódio 0,05 M, nas diluições 1:40, 1:80, 1:100 e 1:160, adicionado de mais 1 mL do mesmo tampão.

Para cada diluição avaliada foi utilizado uma tira de papel filtro Whatman nº 1 nas dimensões de 1 x 6 cm como substrato.

Também foram preparadas amostras para serem usadas como testemunhas: um “branco” (ou padrão) para o substrato e um “branco” (ou padrão) para a enzima. O branco do substrato foi feito em duplicata, em tubos de ensaios contendo 1,5 mL de tampão citrato de sódio e uma tira de papel filtro. O branco da enzima foi feito em duplicata em quatro tubos de ensaios contendo 1 mL do tampão citrato de sódio e mais 0,5 mL de cada uma das soluções enzimáticas existentes (1:40, 1:80, 1:100 e 1:160).

Todos os tubos de ensaios foram mantidos em banho termostático a 50°C durante 60 min. Após mantidos em banho termostático, a fração líquida da

mistura contendo o papel hidrolisado foi removida por centrifugação a 1975 g durante 10 min e imediata determinação da concentração de açúcares redutores (AR) pelo método colorimétrico do DNS (item 3.7.9). Dos valores de absorbância dos hidrolisados foram subtraídos os valores das absorbâncias dos “brancos” e calculados os valores de AR (glicose) através da Equação 1, obtida a partir de uma curva de calibração previamente estabelecida (Anexo II).

$$\text{Abs} = 0,231.[\text{AR}] + 0,012 \qquad R^2 = 0,982 \qquad (1)$$

A partir desses valores de AR estimou-se a concentração necessária de enzimas para a formação de 2 mg de glicose e calculou-se a atividade da enzima (Equação 2), expressa em unidade de papel filtro (FPU) que corresponde ao número de mols de glicose liberado por miligrama de enzima por tempo de reação ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), conforme indicado por Adney e Baker (1996).

$$\text{Atividade} = \frac{0,37}{[\text{enzimas}]_{2\text{mg}}} \qquad (2)$$

Onde,

0,37 – corresponde ao número de mols de glicose em 2mg de glicose liberados por volume de enzima diluída após o tempo de reação ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$).

O denominador a concentração de enzimas necessárias para liberar 2 mg de glicose no meio reacional (mg/mL).

3.7.2.2 Atividade de hemicelulase

Conforme proposto por Bailey *et al.* (1992), preparou-se três diferentes misturas em tubos de ensaio: Tubo 1 - 0,5 mL de solução tampão citrato 50 mM (pH 5,0) contendo 1% m/v de xilana de aveia + 0,5 mL de hemicelulase NS22002; Tubo 2 - 0,5 mL de água + 0,5 mL de enzima (branco da enzima); Tubo 3 - 0,5 mL de água + 0,5 mL de solução de xilana (branco do substrato).

Os tubos foram mantidos em banho termostático por 5 min a 50 °C e após adição de 1 mL de DNS, aquecidos a 100 °C durante 5 min para inativação da enzima. Após resfriar até temperatura ambiente, cada tubo recebeu 5 mL de água destilada e procedeu-se à leitura de absorbância para determinação de AR (concentração de xilose em g/mL) através da Equação 3. A curva de calibração construída para a obtenção dessa equação é mostrada no Anexo III.

$$\text{Abs} = 1041.[\text{Xilose}] - 0,023 \quad R^2 = 0,999 \quad (3)$$

Dos valores de absorbância do tubo 1 (em duplicata) subtraiu-se as absorbâncias do branco do substrato e do branco da enzima. Determinado a concentração de xilose, calculou-se a atividade de xilanase (A) pela Equação 4. A atividade, definida como a quantidade micromoles de xilose liberada por mililitro por minuto ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), foi expressa em U/mL.

$$A = \frac{[\text{AR}]}{\bar{M} \cdot t} \left(\frac{V_r}{V_A} \right) \cdot 10^6 \quad (4)$$

Onde,

\bar{M} – massa molar da xilose (150,13 g/mol);

t – tempo da reação (min);

V_r – volume da reação (1,0 mL);

V_A – volume de solução de enzima utilizada (0,5 mL).

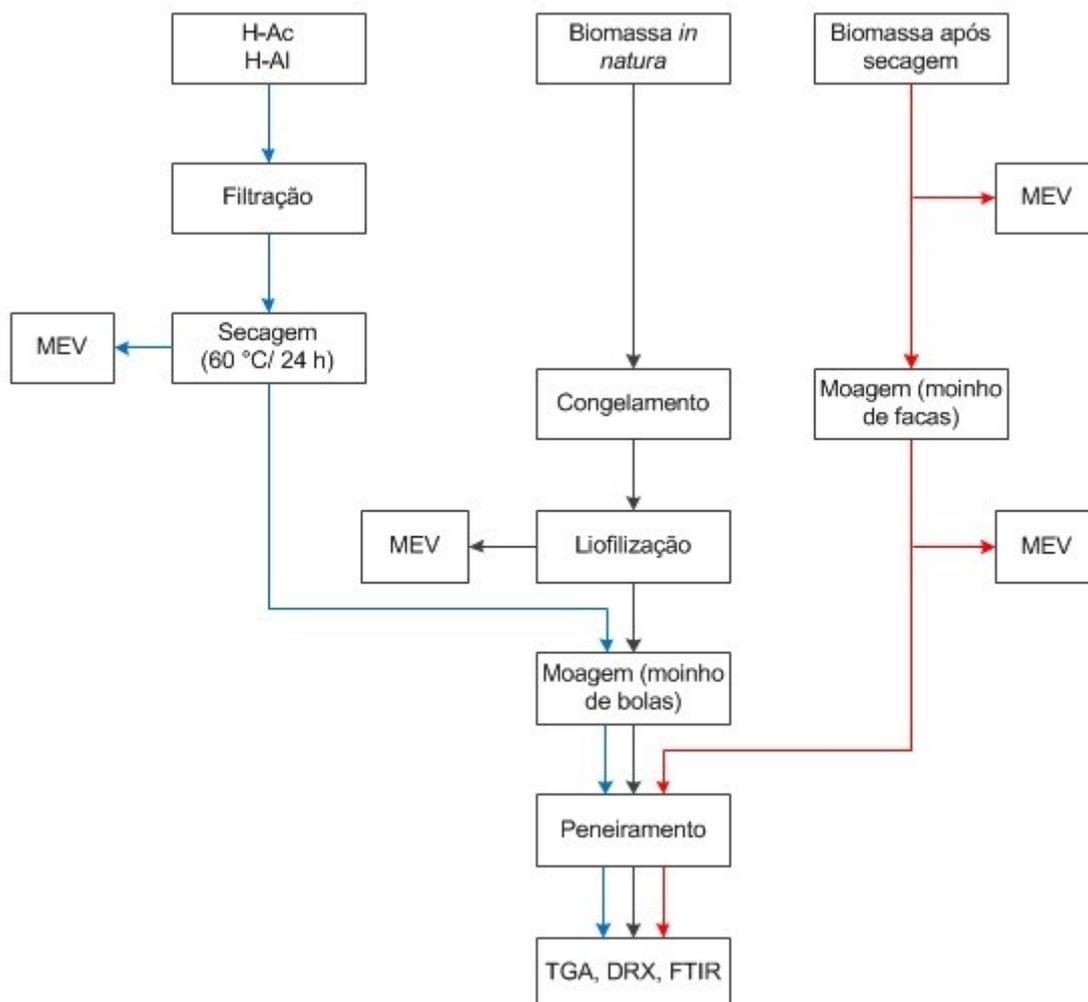
3.7.3 Análises de DRX, TGA e MEV.

3.7.3.1 Tratamento das amostras

As etapas do processo onde foram retiradas amostras da biomassa para as análises de DRX, TGA e MEV foram mostradas na Figura 15.

A sequência de tratamento das amostras relativas à biomassa *in natura* (sem tratamento), da biomassa após secagem (60 °C / 24h) e biomassa hidrolisada (H-Ac e H-Al) está ilustrada na Figura 16.

Figura 16–Fluxograma do tratamento das amostras para análises de TGA, DRX e MEV.



As condições operacionais para prensagem e secagem foram apresentadas no item 3.2.

A filtração foi realizada a vácuo (400 mmHg), temperatura ambiente, utilizando papel filtro comum de laboratório comercializado em folhas de 50 x 50 cm.

Para a liofilização, amostras congeladas foram acondicionadas em liofilizador da marca TERRONI FAUVEL modelo LT – 1000/80 durante 36 h.

A moagem de amostras em moinho de esferas foi conduzida em equipamento da Retsch PM-200 a 460 rpm por 10 min. Para a moagem em moinho de facas foi utilizado o procedimento descrito no item 3.2.

O peneiramento foi realizado por vibração mecânica, durante 30 min, utilizando peneira Tyler de 400 mesh.

3.7.3.2 Difração de raio-X

As análises de difratometria de raio-X foram realizadas no laboratório de materiais da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. As amostras foram analisadas em difrator da marca Shimadzu modelo XDR-6000, com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, faixa de varredura $10^\circ < 2\theta < 30^\circ$ e velocidade de varredura de 2 graus/min. A determinação do índice de cristalinidade (%IC) das amostras foi feita pelo software do próprio equipamento. Para fins de apresentação, os difratogramas foram tratados pela transformada de Fourier com 70% de corte nos pontos, utilizando software OriginPro 7.5. Esse tratamento teve como objetivo a redução dos ruídos e melhor visualização dos picos cristalinos.

3.7.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de MEV foram realizadas no laboratório de materiais da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. As amostras foram primeiramente metalizadas com ouro para torná-las condutivas posteriormente analisadas com microscópio da marca ZEISS modelo DSM – 940A com ampliação de imagem da ordem de 40 e 200 vezes a uma voltagem de 10 kV.

3.7.3.4 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA/DTG) do pó foram feitas em equipamento TA Instruments Q50, faixa de temperatura da ambiente a 900°C ,

empregando taxa de aquecimento de 10 °C/min, com atmosfera inerte (N₂), e fluxo de gás de 40 mL/min.

3.7.4 Concentração de fenóis totais (FT)

A determinação da concentração de fenóis totais foi feita pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Misturou-se 0,5 mL da amostra com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min, à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20% m/v), as amostras foram deixadas em repouso novamente, por 20 min, à temperatura ambiente. Então foi feita a leitura de absorvância no comprimento de onda de 755 nm.

A concentração de fenóis totais foi calculada tendo como base a Equação 5 obtida por uma curva de calibração. A curva de calibração construída para a obtenção dessa equação é mostrada no Anexo IV

$$\text{Abs} = 6,976.[\text{FT}] - 0,006 \qquad R^2 = 0,9981 \qquad (5)$$

3.7.5 Concentração de açúcares e ácidos acético

As análises para determinar as concentrações de açúcares (glicose, frutose, sacarose e xilose na etapa de destoxificação) e ácido acético, foram feitas por cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) da marca Merck, modelo L7000, com coluna íon 300, eluente H₂SO₄ 8,5 µM com fluxo de 0,4 mL / min, temperatura de 80 °C e detector de índice de refração (IR). Para análise as amostra foram diluídas e filtradas em microfiltros com porosidade de 0,45 µm.

3.7.6 Concentrações de furfural.

As análises para determinar as concentrações de furfural foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da marca Merck, modelo D7000, com coluna C8 Lichrospher 100 RP-8 com diâmetro de 5 µm, eluente solução aquosa de ácido acético (1% m/v) e acetonitrila (6:4) com fluxo de 1 mL / min, temperatura de 40 °C e detector de índice de UV no comprimento de onda de 219 nm. Para as análises, as amostras foram diluídas e filtradas em microfiltros da marca Millipore com porosidade de 0,45 µm.

3.7.7 Concentração de 5-hidroximetilfurfural (HMF)

As análises para determinar as concentrações de HMF foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da marca Merck, modelo D7000, com coluna C8 Lichrospher 100 RP-8 com diâmetro de 5 µm, eluente solução aquosa de ácido acético (5% m/v) e metanol (6:4) com fluxo de 0,8 mL / min, temperatura de 40 °C e detector de índice de UV no comprimento de onda de 285 nm. Para as análises, as amostras foram diluídas e filtradas em microfiltros da marca Millipore com porosidade de 0,45 µm.

3.7.8 Concentração de etanol

As análises para determinar a concentração de etanol, antes e após a etapa de fermentação, foram realizadas por cromatografia gasosa (CG). Empregando cromatógrafo da marca Agilent, modelo 6890, acoplado com amostrador automático da Agilent, modelo 7683 e coluna da Hewlett-Packard HP-1 de comprimento 50 m e diâmetro externo de 0,32 mm, com fase estacionária 100% dimetil poli-siloxano e espessura de filme 1,05 µm. Para a análise as amostras foram previamente centrifugadas 1975 g, diluídas em água destilada e filtradas em microfiltros com porosidade de 0,45 µm.

3.7.9 Concentração de açúcares redutores (AR)

Para determinar a concentração de açúcares redutores, durante as etapas que antecedem a destoxificação, usou-se o método colorimétrico de DNS (3,5 dinitro salicilato) proposto por Miller (1959). A leitura de absorvância (Abs) foi feita em espectrofotômetro LKB BIOCHROM, Novaspec II, empregando comprimento de onda de 540 nm. O valor de AR foi determinado a partir da Equação 6 obtida da curva de calibração (Anexo V).

$$\text{Abs} = 0,5602.[\text{AR}] - 0,0068 \quad R^2 = 0,9989 \quad (6)$$

3.8 Cálculos

3.8.1 Teores de celulose, hemicelulose e lignina

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram feitos conforme método descrito por Van Soest e Wine (1968) que consiste na digestão das amostras de fibras em detergente neutro (FDN), digestão em detergente ácido (FDA), oxidação da lignina em solução de permanganato de potássio e solução desmineralizadora (FPM) e cinzas (500 °C durante 2 h).

Os teores, em massa seca, de hemicelulose (Hemi.), celulose (Cel.) e lignina (Lig.), expressos em percentual, foram calculados conforme as Equações 7, 8 e 9 respectivamente.

$$\text{Hemi} = \left(\frac{\text{FDN} - \text{FDA}}{\text{Am}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

$$\text{Cel} = \left(\frac{\text{FPM} - \text{Cinzas}}{\text{Am}} \right) \cdot 100 \quad (8)$$

$$\text{Lig} = \left(\frac{\text{FDA} - \text{FPM}}{\text{Am}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

Onde,

FDA – massa residual da fibra após digestão em detergente ácido (g);

FDN – massa residual da fibra após digestão em detergente neutro (g);

FPM – massa residual da fibra após solubilização da lignina em solução de permanganato de potássio (g);

Cinzas – massa de cinzas após incubação em mufla por 2 h a 500 °C (g);

Am – massa da amostra inicialmente adicionada na digestão (g).

3.8.2 Rendimento global em glicose (AR) no processo de conversão da celulose.

Os valores do rendimento global, em AR, que engloba o pré-tratamento da biomassa e a hidrólise enzimática foram calculados com base na concentração de biomassa seca ($Y_{AR/ms}$) disponível no meio (Equação 10), enquanto os valores de rendimento em AR (R_{AR}) foram obtidos com base no teor de celulose (Equação 11).

$$Y_{AR/ms} (\%) = \left(\frac{AR_f - AR_0}{m_s} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

$$R_{AR} (\%) = \left(\frac{AR_f - AR_0}{1,11 \cdot C} \right) \cdot 100 \quad (11)$$

Onde,

AR_f – concentração de açúcares redutores no licor hidrolisado (g/L).

AR_0 – concentração de açúcares redutores no licor, antes do pré-tratamento químico (g/L).

m_s – concentração de biomassa (pseudocaule) em massa seca (g/L).

1,11 – fator estequiométrico da hidrólise da celulose em glicose (g/g)

C – concentração de celulose na biomassa (g/L), calculada de acordo com a Equação 12.

$$C = 0,38.m_s \quad (12)$$

Onde, valor 0,38 na Equação 12 corresponde à fração mássica de celulose contida no pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* determinada pelo método descrito no item 3.8.1.

3.8.3 Índice de cristalinidade (IC)

O índice de cristalinidade foi calculado, Equação 13, pelo software do equipamento de difratometria de raio-X levando em consideração a razão entre as áreas dos picos cristalinos e da área do halo amorfo.

$$IC(\%) = \left(\frac{A_C}{A_A + A_C} \right) \cdot 100 \quad (13)$$

Onde, A_C corresponde à área dos picos cristalinos e A_A a área do halo amorfo.

3.8.4 Velocidade global do consumo de AR

Os valores de velocidade global do consumo de AR para os ensaios de fermentação F1 ($r_{AR,F1}$), F2 ($r_{AR,F2}$) e F3 ($r_{AR,F3}$) foram calculados pela Equação 14.

$$r_{AR} = \frac{(AR_0 - AR_f)}{(t_f - t_0)} \quad (14)$$

Onde,

AR_0 – concentração de açúcares redutores no início da fase exponencial de consumo do substrato (g/L).

AR_f – concentração de açúcares redutores no fim da fase exponencial de consumo de substrato (g/L).

t_0 – tempo no início da fase exponencial de consumo de substrato (h).

t_f – tempo no fim da fase exponencial de consumo de substrato (h).

3.8.5 Fator de conversão de açúcares redutores (AR) em etanol (P)

Os valores do fator de conversão de AR em P ($Y_{P/AR}$) foram calculados pela Equação 15.

$$Y_{P/AR} = \frac{(P_f - P_0)}{(AR_0 - AR_f)} \quad (15)$$

Onde,

P_f – concentração de etanol no final da fermentação ($t = t_f$) (g/L).

P_0 – concentração de etanol no início da fermentação (g/L).

AR_0 – concentração de açúcares redutores no início da fermentação (g/L).

AR_f – concentração de açúcares (g/L) redutores presentes no meio de fermentação no instante t_f .

Onde, t_f é o tempo final de fermentação correspondente ao início do período em que cessa o acúmulo de etanol no meio de fermentação.

3.8.6 Produtividade em etanol

Para a estimativa dos valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressos em $g.L^{-1}.h^{-1}$, utilizou-se a Equação 16.

$$Q_p = \frac{(P_f - P_0)}{t_f} \quad (16)$$

3.9 Análises estatísticas

As variações nas análises foram tratadas pelo teste Q de Dixon e então analisados pelo método ANOVA com teste de Tukey para $P < 0,05$ empregando o programa computacional Origin 7.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da biomassa *in natura*

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina do pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii* determinados neste trabalho são mostrados na Tabela 2, juntamente com outros valores obtidos da literatura.

Tabela 2 – Teores médios \pm desvio padrão de celulose (cel), hemicelulose (hemi) e lignina (lig) em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.

Biomassa	cel (%)	hemi (%)	lig (%)	Ref.
Pseudocaule (<i>Musa cavendishii</i>)	38,5 \pm 0,1	29,4 \pm 0,3	8,3 \pm 0,2	*
Pseudocaule (<i>Musa balbisiana</i>)	37	21,67	8,57	[1]
Pseudocaule (<i>Musa acuminata</i>)	35,2	24,4	3,4	[2]
Palha da cana-de-açúcar	38	29	24	[3]
Bagaço de cana-de-açúcar	36,36	30,65	9,42	[4]
Bagaço de cana-de-açúcar	40,45	28,85	10,72	[5]
Bagaço de cana-de-açúcar	38,8 \pm 1,4	29,4 \pm 1,7	21,7 \pm 0,7	[6]

* Este Trabalho; [1] Gogoi *et al.*, 2014; [2] Ingale *et al.*, 2014; [3] Silva, 2009; [4] Pereira, 2006; [5] Gomes, 2013a; [6] Wolf, 2011.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, os teores de celulose e hemicelulose, encontrados no pseudocaule da bananeira *M. cavendishii*, foram da mesma ordem de grandeza dos valores determinados para as demais biomassas, que o coloca como potencial matéria-prima para a obtenção de açúcares fermentescíveis. Além disso, possui menor teor de lignina que a palha da cana-de-açúcar (SILVA, 2009) e o bagaço de cana-de-açúcar (WOLF, 2011). Convém lembrar que, para a produção de etanol de 2ª geração a partir de biomassa lignocelulósica, deseja-se baixos teores de lignina, devido aos seus efeitos, e de seus derivados, sobre a sacarificação enzimática (MOONEY *et al.*, 1998) e metabolismo microbiano (GU *et al.*, 2014).

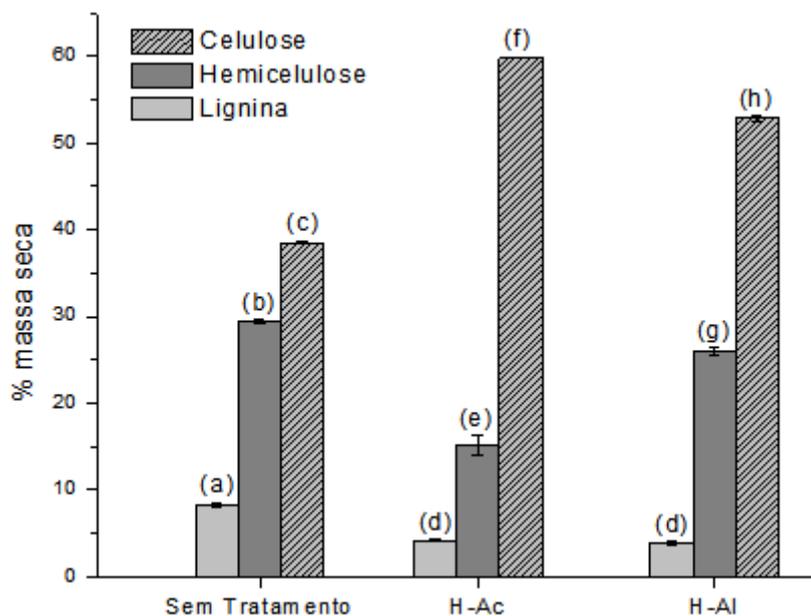
Mediante essas características seria possível indicar os pseudocaulos como a biomassa mais adequada para a produção de bioetanol. No entanto, é necessário avaliá-lo num contexto mais amplo, em termos de rendimento e eficiência das etapas de sacarificação e fermentação.

4.2 Pré-tratamento da Biomassa

4.2.1 Composição do pseudocaule pré-tratado

A variação nas frações de celulose, hemicelulose e lignina do pseudocaule após o pré-tratamento H-Ac e após o pré-tratamento H-AI estão apresentados na Figura 17. A Tabela com os valores dos teores de celulose, hemicelulose e lignina usados para a construção do gráfico na Figura 17 é mostrada no Anexo VI.

Figura 17 - Teores de celulose, hemicelulose e lignina obtidos antes e após pré-tratamento ácido (H-Ac) e pré-tratamento alcalino (H-AI). Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.



Conforme pode ser observado na Figura 17, ao submeter à biomassa fresca aos pré-tratamentos alcalino (H-AI) e ácido (H-Ac) ocorreu redução nos teores de lignina e hemicelulose. Consequentemente, o teor de celulose em base seca de biomassa, aumentou, pois a degradação da celulose em soluções diluídas de ácido e base iniciam-se apenas em temperaturas superiores a 150 e 134 °C respectivamente, como pode ser visto nos resultados de análises termogravimétricas (Item 4.2.1.1).

Os resultados obtidos para os pré-tratamentos (H-Ac e H-AI) do pseudocaule da bananeira (Figura 17) indicam que após o pré-tratamento H-Ac

o pseudocaule resultou em teor de celulose de aproximadamente $59,8 \pm 0,01\%$ e após o pré-tratamento H-Al aproximadamente $52,8 \pm 0,3\%$. Esses valores mostram que ambos os pré-tratamentos resultaram em teores de celulose maiores que o presente no pseudocaule sem tratamento ($38,5 \pm 0,1\%$). Porém nota-se que o pré-tratamento empregando ácido diluído possibilitou maior degradação da hemicelulose, quando comparado ao pseudocaule sem tratamento houve uma redução de aproximadamente 48,3% enquanto que o pré-tratamento conduzido em meio alcalino resultou em uma redução da hemicelulose de aproximadamente 11,6%.

Quanto à degradação da lignina ambos os pré-tratamentos não apresentaram diferença significativa em seus resultados. Quando comparado ao pseudocaule sem tratamento o pré-tratamento H-Ac resultou em uma redução de aproximadamente 49,6% e o pré-tratamento H-Al em uma redução de aproximadamente 53,2%.

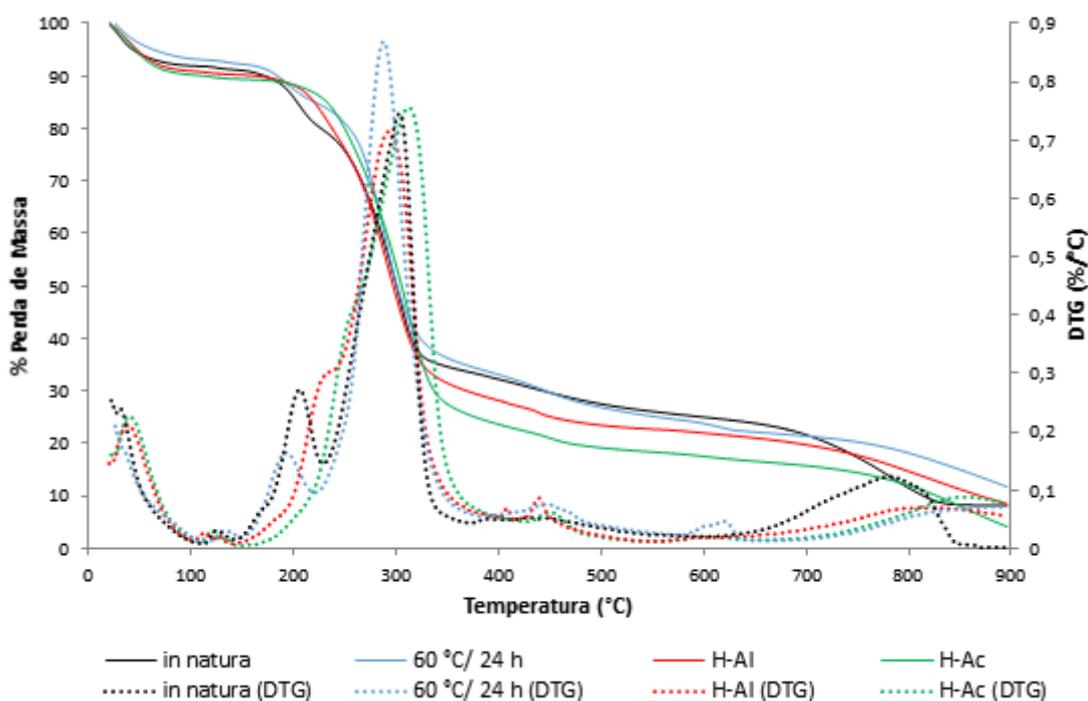
Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Toquero e Bolado (2014) ao realizarem pré-tratamentos em palha de trigo com HCl (1,5% m/m_s) e NaOH (1% m/m_s) a 121 °C durante 60 min. Onde para a palha pré-tratada em meio ácido houve um incremento no teor de celulose, redução nos teores de hemicelulose e lignina de aproximadamente 68%, 77% e 14% respectivamente. No entanto o pré-tratamento alcalino foi mais efetivo apenas na degradação da lignina, mas não o suficiente para resultar em um teor de celulose maior que a palha pré-tratada em meio ácido.

De acordo com os resultados nota-se uma maior efetividade do pré-tratamento ácido sobre a biomassa, pois proporcionou maior degradação da hemicelulose e degradação semelhante da lignina quando comparado ao pré-tratamento alcalino. Cabe ainda estudar a variação da cristalinidade da celulose (item 4.2.2) e verificar se houve formação de poros sobre a superfície da biomassa lignocelulósica (item 4.2.3).

4.2.1.1 Temperatura de degradação dos constituintes da biomassa

Na Figura 18 estão apresentadas as curvas de TGA e DTG das amostras trituradas de pseudocaule sem tratamento (*in natura*), secas a 60 °C por 24 horas, hidrolisadas por ácido (H-Ac) e álcali (H-Al).

Figura 18 - Análise termogravimétrica (TG de DTG) das fibras de pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii in natura* (sem pré-tratamento), pré-tratadas termicamente (60 °C / 24 h) e pré-tratadas quimicamente (H-Al e H-Ac).



A amostra de pseudocaule *in natura* apresentou quatro estágios de degradação térmica. O primeiro estágio, entre a temperatura ambiente até 130 °C é referente à perda de umidade da amostra. O segundo estágio, entre as temperaturas de 130 °C até 220 °C corresponde à degradação da hemicelulose, com máximo de perda de massa em 202 °C. O terceiro estágio, entre 220 °C até 360 °C refere-se, provavelmente, à degradação da celulose, com máximo de perda de massa em 302 °C. O último estágio refere-se à degradação da lignina, como este composto possui estrutura molecular complexa e elevada massa molecular sua degradação é lenta, sendo verificada em uma ampla faixa de temperatura, desde 130 °C até 900 °C. Neste estágio, a perda de massa máxima foi em 783 °C, com um residual de 8,16% em 900 °C.

As faixas de degradação térmica das frações lignocelulósicas do pseudocaulé foram menores que as encontradas por outros autores. Porém, de acordo com Ionashiro (2004), a diminuição do tamanho de partículas, provoca uma diminuição das temperaturas nas quais a reação de decomposição se inicia e termina. Riegel *et al.* (2008) verificaram a degradação das frações de hemicelulose, celulose e lignina em amostra de corte de madeira de acácia com cerca de 6 mm de diâmetro e 2 mm de altura, nos intervalos de temperatura de 230 a 260 °C, de 240 a 400 °C e acima de 400 °C, respectivamente. Gomes *et al.* (2013b), ao fazerem análise termogravimétrica de amostras de pseudocaulé de bananeira tipo prata, com tamanho médio de partículas de 1,19 mm e 0,42 mm, obtiveram a curva de degradação da celulose entre 225 e 400 °C. No entanto, diversos autores, assim como Yang *et al.* (2007), identificaram que na degradação térmica, o primeiro estágio corresponde à degradação, normalmente, da hemicelulose, o segundo da celulose e a lignina apresenta uma degradação lenta durante todo o processo.

A amostra submetida ao processo de secagem em estufa (60 °C / 24 h) apresentou uma pequena variação nas temperaturas em que ocorreram os estágios de degradação térmica quando comparadas com o pseudocaulé *in natura*. No primeiro estágio, a perda da umidade ocorreu da temperatura ambiente até 130 °C. No segundo estágio, referente à degradação da hemicelulose, ocorreu na faixa de 130 °C até 211 °C, com máximo de perda de massa em 193 °C. No terceiro estágio, a degradação da celulose ocorreu de 211°C até 377 °C, com perda de massa máxima a 287 °C. No último estágio, acima de aproximadamente 380 °C são observados picos menos intensos, relacionados à degradação lenta da lignina, que continua degradando acima de 900 °C.

Na Tabela 3, estão apresentadas as temperaturas de degradação da celulose obtidos das curvas de TGA e DTG (Figura 18) das amostras de pseudocaulé *in natura* e com pré-tratamentos térmico e químicos.

Tabela 3—Temperaturas de degradação da celulose nas amostras de pseudocaule *in natura* pré-tratado termicamente (60 °C / 24 h) e pré-tratados quimicamente (H-Al e H-Ac).

Amostras	Temperatura de degradação da celulose (°C)
Pseudocaule <i>in natura</i>	220 – 360
60 °C/ 24 h	211 – 377
H-Al	134 – 378
H-Ac	150 – 433

Conforme resultados dispostos na Tabela 3 podem ser observados que, após os pré-tratamentos a celulose do pseudocaule tende a iniciar sua degradação térmica em temperaturas menores quando comparadas a amostra sem pré-tratamento, onde a redução das temperaturas iniciais de degradação para as amostras 60 °C/ 24 h, H-Al e H-Ac foram da ordem de 4,1%, 39,1% e 31,8%, respectivamente. Esses resultados indicam que após os pré-tratamentos há uma redução na estabilidade térmica da celulose.

4.2.2 Variação na cristalinidade das amostras pré-tratadas

Os difratogramas de raios-X das amostras de pseudocaule *in natura* e submetidos aos pré-tratamentos térmico e químicos estão apresentados na Figura 19 e na Tabela 4, estão os resultados do índice de cristalinidade.

Figura 19 - Difratogramas de Raio-X realizados das amostras de fibra do pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii in natura*, com pré-tratamento químico (H-Al e H-Ac) e pré-tratamento físico (60 °C / 24 h).

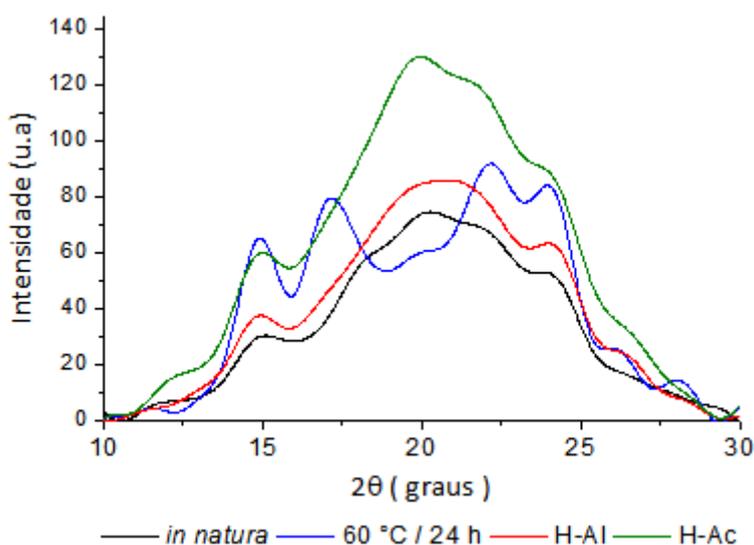


Tabela 4 - Valores de índice de cristalinidade (IC) obtidos nas análises das fibras de pseudocaule de bananeira seco (60 °C / 24 h) e pré-tratadas e um comparativo de diferença de cristalinidade tendo como referência a amostra *in natura*.

Amostras	IC (%)	Diferença do IC
<i>In natura</i>	47,58	-
60 °C / 24 h	60,26	26,65% maior
H-Al	51,19	7,6% maior
H-Ac	33,34	29,93% menor

Observa-se da Figura 19, que quando comparado com o pseudocaule *in natura*, o pseudocaule seco a 60 °C / 24 h exibiu maior quantidade de picos e uma menor área do halo amorfo e, por consequência, apresentou uma maior cristalinidade (aproximadamente 26% maior). Esse comportamento pode ser explicado devido à remoção de água entre as fibras de celulose no processo de secagem. Segundo Diniz *et al.* (2004), a remoção de água entre as fibras faz com que elas se aproximem, aumentando a cristalinidade. Também Fernandes *et al.* (2008), ao fazer ensaios de secagem com fibras de coco, constatou uma redução na espessura das fibras, concluindo que, com a remoção da água, as fibras se tornaram mais próximas aumentando seu empacotamento.

Dos resultados apresentados na Tabela 4, observa-se que a amostra H-Ac apresentou menor índice de cristalinidade (de 33,34%), sendo este valor aproximadamente 34%, 44,7% e 30% menor, em relação aos das amostras que foram submetidas aos pré-tratamentos H-Al, 60 °C / 24 h e ao do pseudocaule *in natura*, respectivamente.

Considerando que os ensaios (H-Al e H-Ac) foram realizados com amostras de pseudocaule secas a 60 °C por 24 h, as amostras submetidas ao pré-tratamento alcalino também tiveram redução da cristalinidade, de aproximadamente 15%. No entanto, o pré-tratamento ácido do pseudocaule ocasionou maior redução na cristalinidade do material.

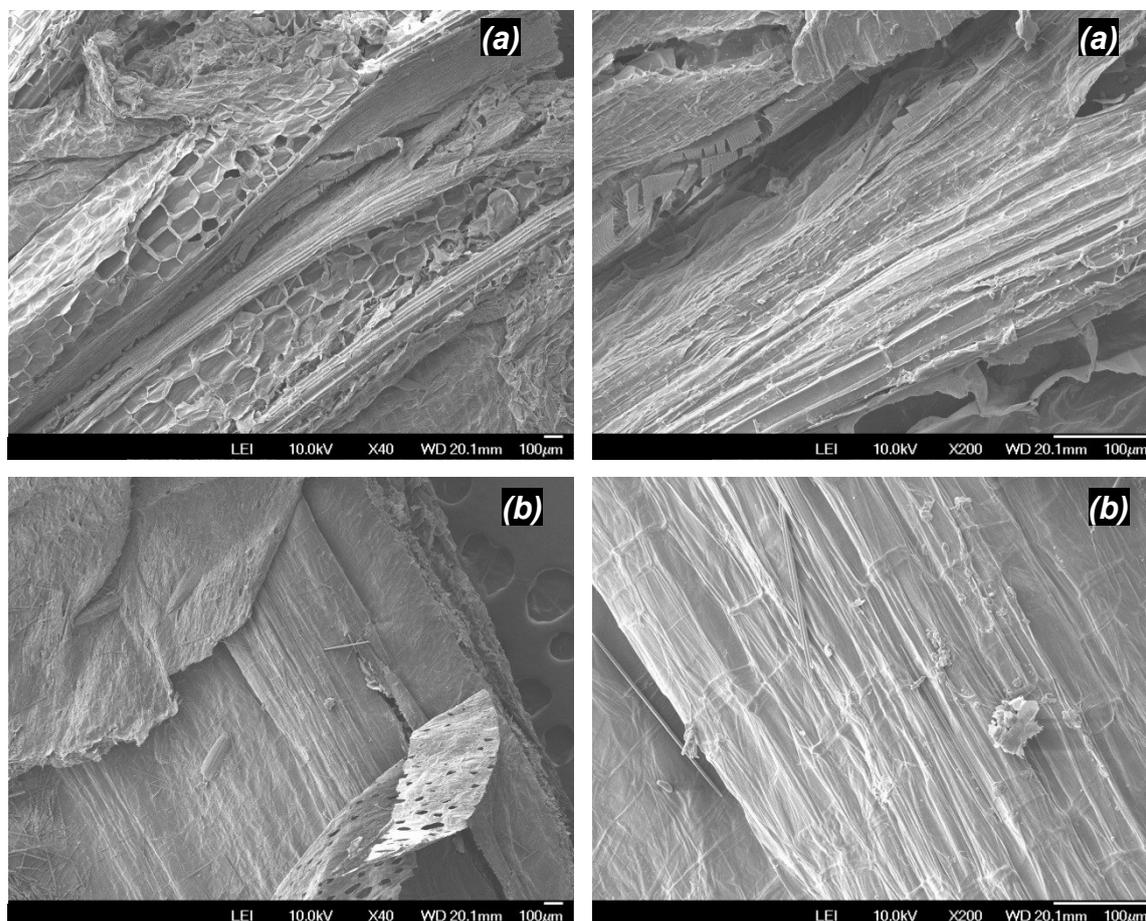
Comparando com os resultados obtidos nos teores de celulose, hemicelulose e lignina (Item 4.2.1), nota-se que as amostras pré-tratadas tiveram teor de celulose maior que a amostra de pseudocaule *in natura*, principalmente a amostra que foi submetida ao pré-tratamento H-Ac. Porém, ainda que apresentando maior teor de celulose na amostra, resultou em um menor índice de cristalinidade (Tabela 4).

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato que, o pré-tratamento ácido, de biomassa lignocelulósica, hidrolisa principalmente a hemicelulose (SAHA e ITEN, 2005). E a hemicelulose é uma substância que une as fibrilas de celulose e contribui para a estabilidade da parede celular das plantas (WYK, 2001). Separando a celulose da hemicelulose, as fibrilas de celulose se abrem (KOTIRANTA *et al.*, 1999), reduzindo o empacotamento das fibras e por consequência sua cristalinidade.

4.2.3 Efeito dos pré-tratamentos na superfície da biomassa

Na Figura 20 (a) e (b) estão apresentadas as micrografias da superfície das amostras de pseudocaule da bananeira *in natura* e seco a 60 °C / 24 h, respectivamente, obtidas por MEV.

Figura 20- Micrografias das amostras (a) pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii in natura* e (b) seca a 60 °C / 24 h, com ampliação de 40 e 200 x.



Observa-se das micrografias da Figura 20 (a), que a amostra de pseudocaule *in natura* possui células em formato hexagonal, tipo colméia, revestidas por uma película. O pseudocaule de bananeira é composto por grandes bainhas foliares superpostas, que são interligadas formando as células hexagonais, como pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 21 - Corte transversal do pseudocaule de bananeira.

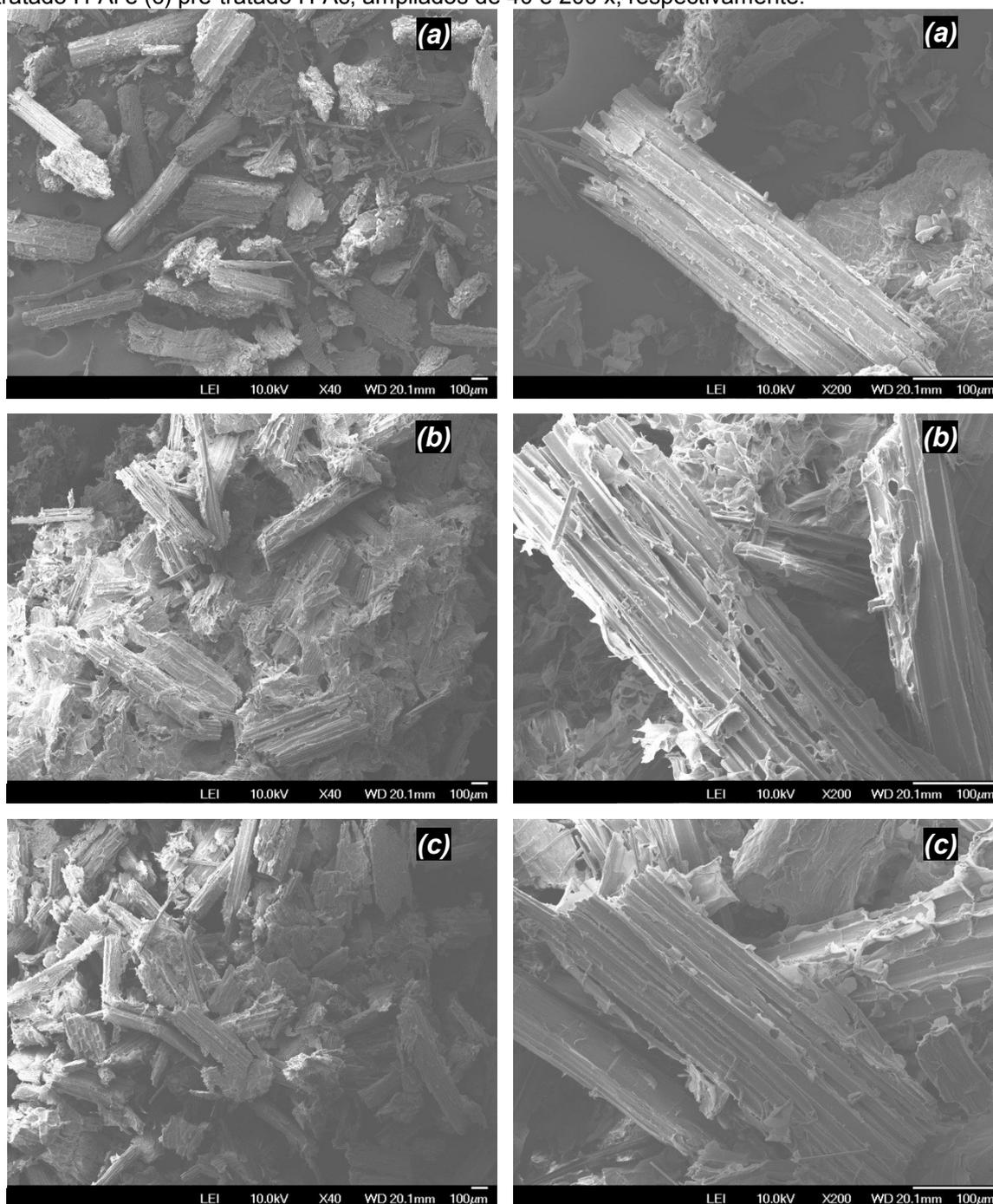


Fonte: EMBRAPA, 2003.

Após a secagem do pseudocaule, Figura 20 (b), verifica-se que as células hexagonais não são mais visualizadas e a superfície mantém-se mais lisa, podendo ainda ser observadas as fibras alongadas. Paul *et al.* (2010) destacam que o aspecto liso das fibras não tratadas deve-se à presença de óleos e substâncias cerosas que estão depositadas sobre a fibra. Gañán *et al.* (2004) e Jayaprabha *et al.* 2011 *apud* Pereira *et al.* (2014) referem-se aos compostos não fibrosos como sendo, em sua maior parte, lignina e hemicelulose.

Na Figura 22 está mostrada a micrografia da superfície da amostra de pseudocaule seco a 60 °C e triturado e com posteriores tratamentos químicos.

Figura 22 - Micrografias da superfície do pseudocaule (a) seco a 60 °C / 24 h e triturado, (b) pré-tratado H-Al e (c) pré-tratado H-Ac, ampliados de 40 e 200 x, respectivamente.



Da Figura 22 (a) observa-se que as amostras de pseudocaule seco e triturado apresentam partículas de diferentes tamanhos e formatos e com superfícies ligeiramente mais rugosas do que as das amostras de pseudocaule seco e não triturado (Figura 20 b). Observa-se também, o destacamento de pequenas partes de material da superfície. Porém, a maior parte da estrutura

mantém sua forma lisa e compacta. Esse tipo de estrutura compacta, segundo Mussatto *et al.* (2008), deve-se à presença de lignina e hemicelulose no material.

Observa-se na Figura 22 (b), que as partículas de pseudocaule pré-tratadas H-AI apresentaram formatos bastante irregulares, com superfície mais rugosa do que da amostra sem pré-tratamento e com poros de diferentes tamanhos. Verifica-se também, uma estrutura mais aberta, evidenciada pelas cavidades entre as fibras. Estas alterações podem ter ocorrido devido à remoção, mesmo que parcial da lignina, conforme observado no item 4.2.1.

Conforme Figura 22 (c), verifica-se que o pré-tratamento H-Ac resultou em uma superfície mais limpa deixando mais exposta as fibras de celulose. A superfície também apresenta poros e rugosidade, porém, aparentemente, em menor grau em relação à amostra H-AI. No entanto mesmo que resultando, aparentemente, em uma menor quantidade de poros na superfície das fibras, a superioridade do pré-tratamento ácido em relação ao pré-tratamento alcalino é comprovada no item 4.2.1, onde é destacada a maior digestão da hemicelulose e digestão da lignina semelhante ao pré-tratamento H-AI. Do mesmo modo, no item 4.2.2 onde avaliou-se a redução da cristalinidade, o pré-tratamento H-Ac demonstrou ser mais efetivo que o pré-tratamento H-AI. Contudo, ainda, cabe estudar a influência de cada pré-tratamento sobre o rendimento em açúcares redutores na etapa de sacarificação enzimática.

4.3 Sacarificação

4.3.1 Influência do pré-tratamento químico sobre a sacarificação

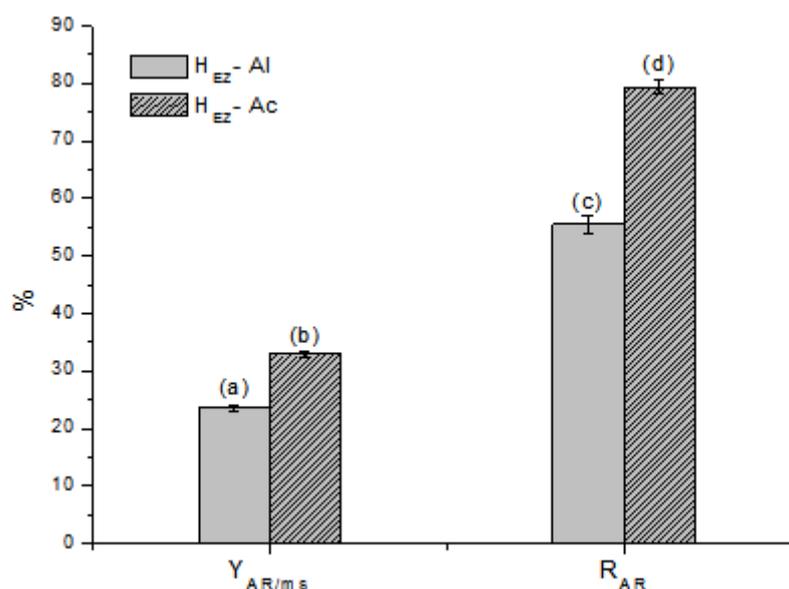
Farelo de pseudocaule de bananeira foi previamente hidrolisado com hidróxido de sódio 3% ou com ácido sulfúrico 2% e submetido à sacarificação enzimática. Os valores das concentrações de açúcares redutores obtidos (AR_i) bem como os rendimentos em AR (R_{AR} e $Y_{AR/ms}$) podem ser vistos na Tabela 5 e na Figura 23, respectivamente.

Tabela 5 – Valores médias \pm desvio padrão da concentrações de açúcares redutores (AR_f) e xilose (Xil) e rendimentos em açúcares redutores com base na concentração de massa seca ($Y_{AR/ms}$) e no teor de celulose (R_{AR}) contidos na sacarificação do farelo de pseudocaule de bananeira pré-tratado com NaOH 3% (HEZ-Al) ou com H₂SO₄ 2% (HEZ-Ac). Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância 0,05, que as médias são significativamente diferentes.

Amostras	AR_f (g/L)	Xil (g/L)	$Y_{AR/ms}$	R_{AR}
HEZ-Al	19,4 \pm 0,4 (e)	< 0,6*	23,5 \pm 0,6 (a)	55,5 \pm 1,5 (c)
HEZ-Ac	32,9 \pm 1,3 (f)	< 0,6*	32,8 \pm 0,5 (b)	79,4 \pm 1,2 (d)

* 0,6 corresponde à menor concentração de xilose na curva de calibração em HPLC.

Figura 23 – Rendimentos em açúcares redutores baseados no teor de celulose presente na biomassa (R_{AR}) e na concentração de massa seca de biomassa ($Y_{AR/ms}$) obtidos na sacarificação do farelo de pseudocaule de bananeira pré-tratado com NaOH 3% (HEZ-Al) ou com H₂SO₄ 2% (HEZ-Ac). Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.



Em ambos os casos de pré-tratamento, a concentração de xilose foi menor que 0,6 g/L. Não foi possível determinar com precisão esse valor visto que o método cromatográfico disponível para análise possui curva de calibração com 0,6 g/L de Xil como menor valor. Apesar deste constituinte não ser de interesse para a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* (GÍRIO *et al.*, 2010), é importante ter-se o conhecimento da sua produção pois é a partir desse composto que se forma o furfural, um conhecido e indesejado inibidor do processo fermentativo (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Normalmente a Xil é produzida a partir da hidrólise da hemicelulose presente na biomassa tratada. Segundo Rodrigues (2007), quanto mais

drásticas as condições de concentração do agente químico hidrolítico e da temperatura, maior a despolimerização da biomassa, principalmente hemicelulose, com conseqüente maior liberação de pentoses no meio reacional.

Observa-se que as amostras submetidas ao pré-tratamento ácido seguido de sacarificação enzimática (HEZ-Ac) proporcionaram maior acúmulo de açúcares redutores no meio hidrolisado ($AR_f = 32,9 \pm 1,3$ g/L) resultando no maior valor de rendimento com base no teor de celulose presente na biomassa ($R_{AR} = 79,4 \pm 1,2\%$). Esse valor foi da ordem de 43% maior do que o rendimento alcançado com o pré-tratamento alcalino (HEZ-Al) ($R_{AR} = 55,5 \pm 1,5 \%$). Comportamento semelhante ocorreu com o rendimento $Y_{AR/ms}$ onde o processo ácido (HEZ-Ac) proporcionou valor da ordem de 40% maior do que o processo HEZ-Al.

O maior rendimento em açúcares após a sacarificação enzimática do pseudocaule pré-tratado em meio ácido (H-Ac) pode ser explicado pelo fato que, conforme já discutido anteriormente (item 4.2.1), o pré-tratamento ácido despolimerizou maior quantidade de hemicelulose e proporcionou um maior teor de celulose na biomassa do que o pré-tratamento alcalino. No entanto, ainda que com maior teor de celulose, os resultados para cristalinidade (item 4.2.2) mostram que o uso do ácido proporcionou uma maior redução da cristalinidade da celulose, deixando-a mais suscetível a ação das enzimas.

Em função dos resultados aqui obtidos, o pré-tratamento ácido foi selecionado para avaliar a influência da umidade e da concentração de substrato sobre o rendimento em AR na etapa de sacarificação enzimática.

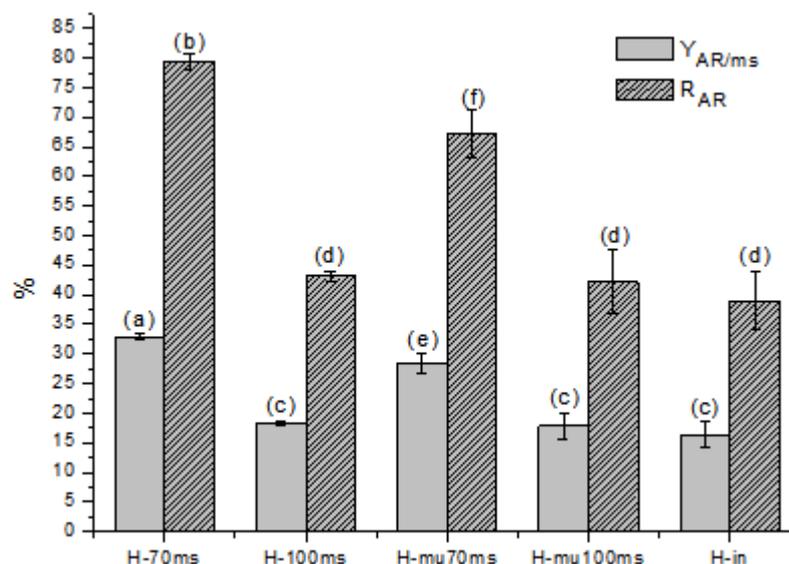
4.3.2 Influência da Concentração e Umidade da Biomassa sobre a Sacarificação

Após avaliar a melhor condição de pré-tratamento a ser empregado, buscou-se identificar a concentração e umidade do substrato ideal para a sacarificação enzimática. Dentre todas as biomassas citadas na Tabela 2, o pseudocaule de bananeira possui o maior teor de umidade. Conforme Gonçalves Filho (2013) o pseudocaule *in natura* da bananeira *M. cavendishii* contém, aproximadamente, $95,3 \pm 0,2\%$ de umidade, esse valor é aproximadamente 2

vezes maior que o teor de umidade contido no bagaço de cana-de-açúcar ($48,53 \pm 2,14\%$) das amostras coletadas em usinas sucroenergéticas por Oliveira (2014) e 4,88 vezes maior que o da palha de cana-de-açúcar ($19,5 \pm 1,4\%$) analisada por Innocente (2011). Sabe-se que quanto maior o teor de umidade na biomassa, menor a massa de material lignocelulósico para sacarificação.

Valores de R_{AR} e $Y_{AR/ms}$ após sacarificação enzimática de diferentes características físicas e concentrações de biomassa podem ser observados na Figura 24.

Figura 24 - Rendimentos percentuais em açúcares redutores com base no teor de celulose (R_{AR}) e concentração de biomassa seca ($Y_{AR/ms}$) obtidos na sacarificação de diferentes concentrações de pseudocaule de bananeira*. Letras diferentes entre as concentrações indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.



* H-70ms: 70,2 g/L de farelo de pseudocaule (biomassa seca); H-100ms: 100,3 g/L de farelo de pseudocaule; H-mu70ms: 327,8 g/L de pseudocaule prensado, equivalente a 70,2 g/L de biomassa seca; H-mu100ms: 468,3 g/L de pseudocaule prensado, equivalente a 100,3 g/L de biomassa seca; H-in: 1000 g/L de pseudocaule *in natura* (sem prensagem e secagem), equivalente a 70,6 g/L de biomassa seca.

Conforme Figura 24, pode-se observar que a sacarificação do substrato previamente seco utilizado na concentração de 70,2 g/L (H-70ms) resultou em maior rendimento percentual em açúcares redutores com base no teor de celulose existente na biomassa ($R_{AR} = 79,4 \pm 1,2\%$) e maior rendimento percentual na conversão de uma unidade de biomassa seca em unidades de açúcares redutores ($Y_{AR/ms} = 32,8 \pm 0,5\%$) quando comparado aos demais experimentos. Os valores de R_{AR} e $Y_{AR/ms}$ em H-70ms foram da ordem de 18,1% e 15,5% maiores do que os respectivos valores alcançados em H-mu70ms (67,2

$\pm 3,9\%$ e $28,4 \pm 1,6\%$), onde se empregou a mesma concentração de biomassa seca, porém sem secagem prévia. Segundo Fengel e Wegener (1989) a degradação das ligações intermoleculares ocorre por inchaço e inserção de grupos químicos nas estruturas supramoleculares da madeira. Então, quando a biomassa foi submetida ao processo de secagem e posteriormente reidratada com solução ácida diluída (ensaio H-70m_s), pode-se favorecer uma maior penetração do ácido na estrutura terciária (empacotamento cristalino das entidades supramoleculares) do material e, com isto, um aumento da eficiência do ácido no rompimento das ligações intermoleculares entre a celulose, hemicelulose e a lignina. Desse modo, a celulose e hemicelulose ficaram mais suscetíveis à ação das enzimas utilizadas na etapa posterior de hidrólise enzimática o que resultou em maior liberação de unidades de açúcares redutores por unidade de massa seca de biomassa.

Ao aumentar-se a quantidade de biomassa na sacarificação (em massa seca) de 70,2 para 100,3 g/L (ensaios H-100m_s e H-m_u100m_s) verificou-se um decréscimo em R_{AR} e Y_{AR/ms}. Como não houve diferença significativa entre R_{AR} e Y_{AR/ms} de H-100m_s e H-m_u100m_s (Figura 24), pode-se afirmar que esses valores foram da ordem de 43% e 18,0% em ambos os ensaios. Menores valores de rendimentos também foram obtidos com o uso da biomassa *in natura* (ensaio H-in) (R_{AR}= $38,8 \pm 4,9\%$; Y_{AR/ms} = $16,4 \pm 2,1\%$). Nesses ensaios, com maiores concentrações de substrato, constatou-se visualmente que a mistura reacional ficou semelhante a uma pasta, sem a homogeneidade observada durante a sacarificação de 70,2 g/L de massa seca. Este comportamento foi mais visível na sacarificação H-in. Segundo Cinelli (2012), para uma hidrólise eficiente é imprescindível garantir a homogeneidade do sistema reacional. Silva (2012) corroborou com isto ao afirmar que boas misturas tendem a ampliar o contato entre o sólido e o líquido.

4.4 Destoxificação do caldo

A variação na concentração dos principais constituintes do caldo hidrolisado após a etapa de destoxificação com carvão ativo pode ser observado na Tabela 6. É importante destacar que para a análise dessa destoxificação

sobre a composição do meio de fermentação foi utilizado caldo sacarificado de pseudocaule previamente estocado em freezer, com AR_0 determinado pelo método do DNS em torno de 45 g/L. Esse valor foi menor do que o utilizado nos ensaios de fermentação ($AR_0 \cong 100$ g/L) realizados na sequência do trabalho, quando foram preparados novos caldos. Como o objetivo desta fase de estudo foi avaliar o efeito da destoxificação do meio sobre a redução dos principais contaminantes existentes no caldo (ácido acético, compostos fenólicos, furfural e HMF), sem, contudo reduzir-se a concentração de açúcares fermentescíveis (glicose, frutose e sacarose), essa diferença entre os valores de AR_0 dessa etapa com aqueles da fermentação não invalida os resultados aqui obtidos.

Tabela 6 – Valores médias \pm desvio padrão das concentrações dos constituintes presentes no caldo sacarificado de pseudocaule de bananeira, antes e após a destoxificação empregando diferentes concentrações de carvão ativo. Letras diferentes entre os tratamentos indicam, pelo teste de Tukey com índice de significância de 0,05, que as médias são significativamente diferentes.

Constituintes	Não-destoxificado	Destoxificado		
		Concentração de carvão ativo usado		
		1% (m/v)	2% (m/v)	4% (m/v)
Glicose (g/L)	38,69 \pm 0,98 (a)	33 \pm 2,26 (a,b)	32,92 \pm 3,18 (a,b)	30,31 \pm 1,8 (c,b)
Frutose (g/L)	5,87 \pm 0,39 (d)	5,04 \pm 0,18 (d)	5,26 \pm 0,5 (d)	4,86 \pm 0,28 (d)
Sacarose (g/L)	0,55 \pm 0,17 (e)	0,47 \pm 0,07 (e,f)	0,28 \pm 0,09 (e,g)	0,23 \pm 0,01 (e,g)
Xilose (g/L)	1,25 \pm 0,32 (h)	1 \pm 0,1 (h)	1,15 \pm 0,1 (h)	1,06 \pm 0,1 (h)
Ác. acético (g/L)	4,99 \pm 0,67 (i)	2,99 \pm 0,25 (j)	3,2 \pm 0,9 (j)	2,28 \pm 0,59 (j)
Compostos fenólicos (g/L)	0,423 \pm 0,004 (k)	0,22 \pm 0,01 (l)	0,19 \pm 0,02 (l)	0,11 \pm 0,01 (m)
Furfural (mg/L)	ND	0,18 \pm 0,04 (n)	0,2 \pm 0,01 (n)	0,21 \pm 0,01 (n)
HMF (mg/L)	ND	ND	ND	ND

ND – Não Detectado

Pode-se observar que em todos os caldos, não-destoxificado e destoxificado, o constituinte em maior concentração foi a glicose, proveniente, principalmente, do teor de celulose presente nas fibras do pseudocaule de bananeira ($Cel = 38,5 \pm 0,1\%$ m/ m_s , conforme Tabela 2).

Ao comparar as concentrações de glicose do caldo não-destoxificado com aqueles destoxificados com diferentes teores de carvão ativo, nota-se que apenas para o caso onde foi utilizado maior teor de adsorvente (4%) houve redução significativa desse açúcar, a qual foi da ordem de 22%.

Para a sacarose, devido ao alto coeficiente de variação (30,9%) do desvio padrão em relação à média determinada no caldo não-destoxificado, não foram observadas diferenças significativas entre esse caldo e aqueles destoxificados, independentemente do teor de carvão empregado. No entanto, entre os meios destoxificados, ao aumentar-se o teor de carvão de 1% para 2% e para 4%, verificou-se uma redução média de 40,4% e 51,0% na sua concentração, respectivamente.

Em relação à frutose e à xilose, este último não metabolizado por *S. cerevisiae* (GÍRIO *et al.*, 2010), o processo de destoxificação não afetou significativamente suas concentrações presentes em relação ao caldo não-destoxificado.

Dentre os constituintes analisados no caldo sacarificado, aqueles que apresentam potencial toxicidade ao metabolismo microbiano são: ácido acético, compostos fenólicos, furfural e HMF.

Conforme Tabela 6 nota-se que não há uma maior redução nas concentrações de ácido acético quando o teor do agente destoxicante passa de 1% para 2 ou 4% m/v. A redução significativa ocorreu apenas quando a comparação foi feita entre a amostra não-destoxicada com aquelas destoxicadas, onde após destoxificação a concentração de ácido acético baixou, em média, de 4,99 g/L para 2,82 g/L. Conforme estudo realizado por Taherzadeh (1999) o crescimento da levedura *S. cerevisiae* é afetado apenas para concentrações de ácido acético superiores a 5 g/L.

Em relação a concentração dos compostos fenólicos, verificou-se que a destoxificação do caldo com 4% de carvão ativo proporcionou maior remoção destes contaminante, de 0,423 para 0,11 g/L. Após aumentar a concentração de carvão ativo de 1% para 2% não houve diferença significativa nas concentrações dos compostos fenólicos ($0,22 \pm 0,01$ e $0,19 \pm 0,02$ g/L respectivamente), porém em relação ao caldo não-destoxificado houve redução de aproximadamente 51% destes compostos. Conforme Pfeifer *et al.* (1984) compostos fenólicos assim como o furfural são os mais fortes inibidores da fermentação, sendo que 1 g/L pode reduzir em 73% a taxa de fermentação. Contudo esses compostos fenólicos podem ser assimilados por alguns micro-organismos como a levedura e convertidos ao álcool correspondente ao fenol como, por exemplo, a vanilina pode ser convertida a álcool vanílico. Conforme identificado por Varga *et al.*

(2004), ao fermentar por levedura *S. cerevisiae* o hidrolisado de palha de milho, após 120 h de fermentação todos os compostos fenólicos foram convertidos aos seus respectivos álcoois. Com isso é comprovado que, após um longo tempo de fermentação, os compostos fenólicos podem ser metabolizados pela levedura.

Conforme os resultados da Tabela 6 nota-se que para o caldo não-destoxificado não foi possível detectar furfural. Isso pode ter ocorrido devido a distorção dos picos do cromatograma, favorecida pela elevada concentração de interferentes com tempo de retenção semelhante ao do furfural. A distorção apresentada é caracterizada por um pico intenso e com grande cauda, que, conforme Santos Neto (2009) pode encobrir por completo um pico de menor intensidade adjacente a ele. Após destoxificação do caldo hidrolisado os picos referentes aos interferentes diminuíram de intensidade, que resultou numa menor distorção e deixou mais evidente o pico referente ao furfural (conforme pode ser visto nos cromatogramas do Anexo VIII). Por causa da ação desses interferentes não é possível afirmar se houve ou não redução na concentração de furfural entre o caldo não-destoxificado com aqueles destoxificados. Porém, de acordo com os resultados, não houve diferença significativa na concentração de furfural entre as amostras destoxificadas, independentemente da quantidade de carvão ativo usado (1, 2 ou 4% m/v) a concentração de furfural entre essas amostras foi, em média, de 0,20 mg/L.

Em relação a concentração de 5-hidroximetilfurfural (HMF) nota-se que este não foi detectado em todas as amostras. Essa não detecção pode ter ocorrido devido a ação dos interferentes que, assim como ocorreu nas análises de furfural apresentaram picos de grande intensidade e com cauda (conforme pode ser visto nos cromatogramas do Anexo IX), que podem ter encobrido por completo o pico referente ao HMF. Contudo, segundo Taherzadeh (1999) se o processo de hidrolise é realizada a temperaturas suaves (inferiores a 200 °C) os hidrolisados são mais facilmente fermentados devido a baixa formação de inibidores como furfural e HMF.

Com a finalidade de avaliar a influência do processo de destoxificação do caldo sobre a produção de etanol, os caldos sacarificados não-destoxificado e destoxificado com 1% de carvão ativo foram fermentados. O uso de menor teor de adsorvente foi selecionado por ser nesta condição que não houve redução significativa dos açúcares glicose e frutose. Além disto, o aumento desse produto

para 2% e 4% não reduziu na mesma proporção as concentrações dos contaminantes indesejados no caldo de fermentação (ácido acético, furfural e compostos fenólicos). Soma-se a isto o fato de que quanto menor a quantidade de destoxificante menor custo pode ser esperado para uma eventual ampliação de escalas.

4.5 Ensaio de fermentação

As cinéticas do consumo de açúcares (AR) e formação de etanol (P) resultante da fermentação de caldo de pseudocaule de bananeira submetido a diferentes tipos de preparo (com e sem concentração por evaporação e destoxificação prévia) são mostradas na Figura 25. As concentrações iniciais e finais de AR e P bem como os tempos finais de fermentação (t_f) estão mostrados na Tabela 7.

Figura 25 - Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e formação de etanol (P) por *S. cerevisiae* UNIVILLE 9080 na fermentação de caldo de pseudocaule de bananeira sacarificado, não-concentrado e não-destoxificado (F1), caldo sacarificado, concentrado e não-destoxificado (F2) e caldo sacarificado, concentrado e destoxificado (F3).

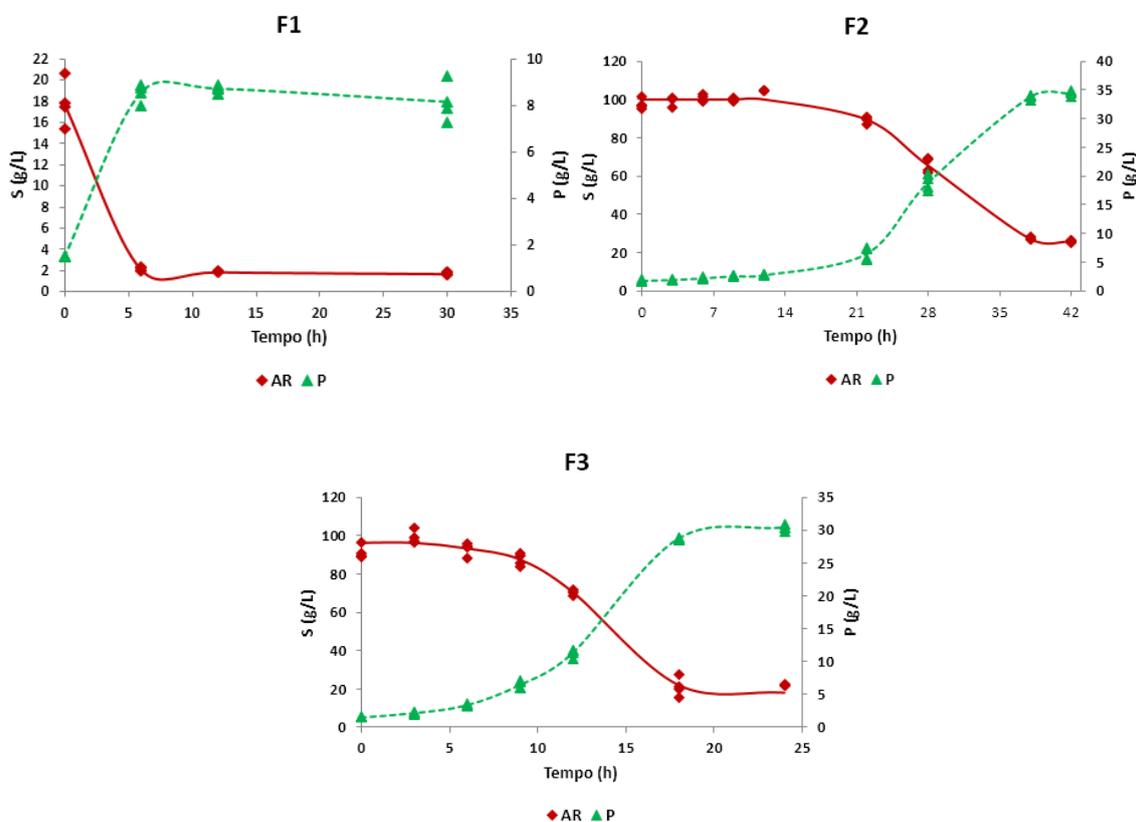


Tabela 7 – Valores médias \pm desvio padrão das concentrações de AR e P no início e no final da fermentação (t_f) dos ensaios F1, F2 e F3.

Ensaio	t_f (h)	AR ₀ (g/L)	AR _f (g/L)	P ₀ (g/L)	P _f (g/L)
F1	6	17,8 \pm 2,1	1,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,0	8,6 \pm 0,4
F2	40	97,5 \pm 2,6	25,7 \pm 0,7	1,7 \pm 0,1	34,4 \pm 0,4
F3	20	91,4 \pm 3,4	21,8 \pm 0,5	1,51 \pm 0,02	30,3 \pm 0,5

Verifica-se na Figura 25 que em todas as fermentações houve um residual de açúcares redutores. Os maiores valores de AR residual ocorreram nos ensaios F2 (25,7 \pm 0,7 g/L) e F3 (21,8 \pm 0,5 g/L), ou seja, nos caldos concentrados de biomassa sacarificada. No ensaio F1, AR final foi de apenas 1,7 \pm 0,1 g/L; resultando num consumo médio de 90,6% do açúcar inicialmente disponível (AR₀ = 17,8 \pm 2,1 g/L). Para F2 e F3 esse consumo percentual foi da ordem de 15 pontos percentuais menor, ou seja, 73,6% em F2 e 76,1% em F3.

Esses altos valores de AR residual em F2 e F3 podem ser resultado da etapa de concentração do caldo sacarificado. Nesse processo buscou-se aumentar a concentração dos açúcares fermentescíveis, porém, também elevou-se a concentração das pentoses que, de acordo Gírio *et al.* (2010), não são metabolizados por *S. cerevisiae*. No entanto, para trabalhos futuros cujo objetivo seja utilizar essas pentoses, se faz necessário uma caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do vinho residual para identificar, com maior precisão, a concentração dos constituintes existentes no fermentado F2 e F3.

Ao comparar os ensaios de fermentação com maiores concentrações de AR₀ (Ensaio F2 e F3) e maiores valores de P_f (34,4 \pm 0,4 g/L e 30,3 \pm 0,5 g/L, respectivamente), com aquele onde utilizou-se caldo sacarificado, porém não-concentrado (Ensaio F1) (P_f = 8,6 \pm 0,4 g/L), verifica-se a existência de diferentes tempos de fermentação necessários para atingir-se a fase estacionária de formação do produto (tempo final da fermentação, t_f).

Ao empregar caldo sacarificado de pseudocaule sem concentração prévia e sem destoxidação (Ensaio F1) o consumo do substrato (AR₀) e a produção de etanol (P_f) ocorreu em t_f de 6 h. Em F2 e F3 esses tempos foram de 40 h e 20 h, respectivamente. Em função de F1 conter menor AR₀ do que F2 e F3, esse menor valor em t_f já era esperado. Contudo, é importante observar que mesmo com t_f menor, a velocidade global da fase exponencial de consumo de AR em F1

($r_{AR,F1} = 2,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi menor do que as velocidades estimadas para F2 e F3 ($r_{AR,F2} = 3,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $r_{AR,F3} = 7,3 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente), o que pode indicar, numa primeira interpretação, que o aumento de AR_0 favoreceu o processo fermentativo. As determinações de rendimentos e produtividades globais desses experimentos podem contribuir para uma comparação mais criteriosa entre eles.

Mesmo antes de “olhar” para os seus valores de produtividade, a Figura 25 mostra, claramente, que ao concentrar 6x o caldo sacarificado (F2 e F3), houve, em relação à F1, uma necessidade de maior tempo de adaptação do micro-organismo ao meio de fermentação.

Conforme pode ser observado no ensaio onde foi utilizado caldo sacarificado, concentrado e destoxificado (F3) o tempo de adaptação do micro-organismo foi de aproximadamente 9 h. Esse valor foi de 2,4 vezes menor que o tempo de adaptação no ensaio F2 (caldo concentrado e não-destoxificado). Em F2 houve maiores concentrações de inibidores compostos fenólicos e ácido acético em comparação ao caldo destoxificado, como mostrado na Tabela 6.

Conforme resultados apresentados por Zardo *et al.* (2008), após fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* de sucos não-destoxificados de três tipos de maçãs com teores de fenóis da ordem de 0,41 a 0,45 g/L, os autores identificaram uma fase de adaptação da levedura no meio de fermentação de aproximadamente 24 h. Este valor é semelhante ao observado em F2.

Larsson *et al.* (2001) demonstraram o efeito inibitório desses fenóis presentes no caldo hidrolisado de cavacos de *Picea abies*, pinheiro típico da Noruega. Como inóculo foram avaliadas duas diferentes cepas de *S. cerevisiae*: sem e com modificações genéticas (produtora de lacase). Como testemunha os autores utilizaram dois meios sintéticos contendo glicose (20 g/L) como principal fonte de carbono: um sem a adição do inibidor e outro contendo 1,2 mM de aldeído coniferílico ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$) (0,21 g/L). No meio sintético onde foi adicionado o micro-organismo produtor de lacase foi constatado o consumo total da glicose inicialmente presente no meio. A fase lag para esse meio foi de 20h. No outro experimento, com *S. cerevisiae* não-produtora de lacase, mesmo após 48h de processo, a concentração de glicose foi a mesma da inicial (20 g/L). Mesmo tipo de comportamento foi constatado com o caldo hidrolisado contendo em torno de 11 g/L de glicose, 9 g/L de manose e 1,4 g/L de compostos fenólicos, com exceção à fase de adaptação do micro-organismo, a qual aumentou para 40 h.

Em trabalho mais recente, Landaeta *et al.* (2013) realizaram diversos ensaios de fermentação de meio sintético contendo glicose e diferentes concentrações dos inibidores mais comuns em caldo hidrolisado de biomassa lignocelulósica. Como inóculo da fermentação foi empregada *S. cerevisiae* NRRL Y-265, uma cepa floculante. Os autores constataram que o ensaio onde as concentrações dos inibidores foram próximas da obtida no caldo hidrolisado de lascas de eucalipto (4,5 g/L de ácido acético, 1 g/L de furfural, 0,2 g/L de HMF e 0,6 g/L de compostos fenólicos) praticamente não houve crescimento celular, mesmo mantendo o tempo de processo em até 39 dias.

A influência desses inibidores (Tabela 6) sobre os parâmetros cinéticos de rendimento e produtividade em etanol obtidos na fermentação de caldo sacarificado de pseudocaule de bananeira pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 8 – Valores médios \pm desvio padrão do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/AR}$) e produtividade (Q_P) obtida para os ensaios de fermentação do caldo sacarificado de farelo de pseudocaule (F1: sem concentração prévia; F2: concentrado; F3: concentrado e destoxificado). Letras iguais entre os ensaios são médias sem diferença significativa pelo teste de Tukey com nível de significância 0,05.

Ensaio	$Y_{P/AR}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)
F1	0,46 \pm 0,07 (a,b)	1,18 \pm 0,07 (c)
F2	0,46 \pm 0,02 (a)	0,82 \pm 0,01 (d)
F3	0,41 \pm 0,02 (b)	1,44 \pm 0,02 (e)

Frente aos resultados obtidos para os fatores de conversão dos açúcares em etanol ($Y_{P/AR}$) observa-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) ao comparar F1 com F2 e F1 com F3. O mesmo não ocorreu ao comparar F2 (caldo sacarificado concentrado não-concentrado) com F3, no qual foi utilizado o mesmo tipo de caldo de F2, porém com destoxificação prévia.

Ao contrário do que se esperava, ao destoxificar o caldo de F3 ocorreu uma redução de 11% em $Y_{P/AR}$ em relação à F2 ($Y_{P/AR} = 0,46$ g/g). Como o emprego da destoxificação reduziu os contaminantes presentes no caldo (Tabela 6), acredita-se que esse fato tenha ocorrido devido a erros experimentais na condução do experimento e/ou na retirada, tratamento e análise das amostras.

Segundo Klinke *et al.* (2004) compostos tóxicos como furanos e fenóis podem afetar o crescimento microbiano mas não o fator de conversão do substrato em etanol ($Y_{P/AR}$).

Os fatores de conversão de AR em P de F1, F2 e F3 ficaram próximos aos obtidos por Steckelberg *et al.* (2009). Os autores avaliaram 21 diferentes linhagens de *S. cerevisiae* na fermentação de meio sintético contendo 150 g/L de glicose durante 24 h. Os valores máximo e mínimo de $Y_{P/AR}$ estimados foram de 0,47 g/g e 0,43 g/g.

Os valores de $Y_{P/AR}$ deste trabalho, nos quais a sacarificação foi conduzida através de hidrólise enzimática, foram superiores ao obtido por Gonçalves Filho (2011) ($Y_{P/AR} = 0,31 \pm 0,01$ g/g). O autor utilizou o mesmo tipo de inóculo empregado neste trabalho e fermentou caldo de pseudocaule de bananeira ($AR_0 = 12$ g/L) pré-tratado quimicamente, mas sacarificado com ácido sulfúrico.

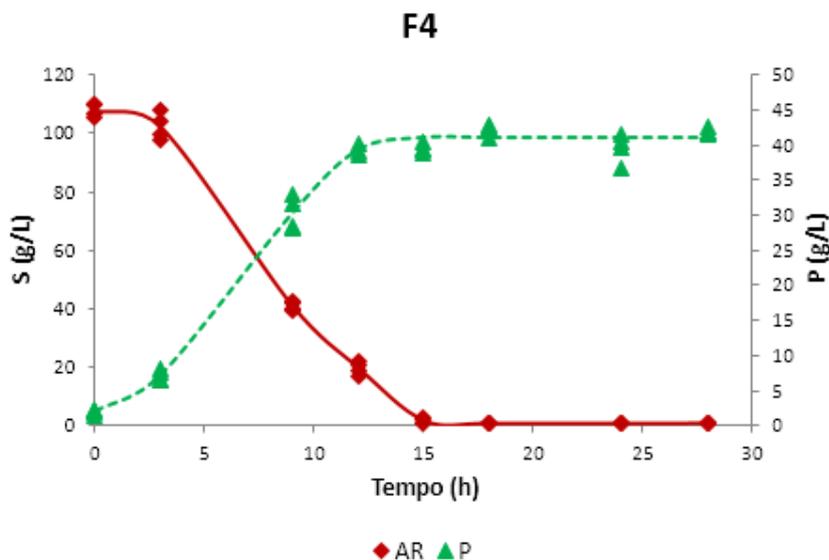
Ao comparar os valores de produtividade em etanol (Q_P), mostrados na Tabela 8, nota-se que o ensaio de fermentação onde foi utilizado caldo sacarificado, concentrado e destoxificado (F3) alcançou-se maior valor médio ($Q_P = 1,44 \pm 0,02$ g/L.h). Esse valor foi 75% maior do que Q_P médio de F2 ($0,82 \pm 0,01$ g/L.h) e 22% maior do que Q_P de F1 ($1,18 \pm 0,07$ g/L.h).

Mesmo F2 tendo uma maior concentração de produto no final da fermentação ($P_f = 34,4 \pm 0,4$ g/L) do que em F3 ($P_f = 30,3 \pm 0,5$ g/L), a sua produtividade foi menor devido a maior fase lag, já observada anteriormente.

A redução de Q_P na fermentação alcoólica de caldo sacarificado pela maior presença desses compostos inibidores já foi observada por Martín e Jönsson (2003), Klinke *et al.* (2004), Talebnia *et al.* (2005) e Gu *et al.* (2014).

Com a finalidade de confirmar o comportamento de Q_P frente a presença de inibidores da fermentação, realizou-se um novo ensaio contendo como substrato 100 g/L de glicose (Ensaio F4) adicionado dos mesmos nutrientes utilizados em F1, F2 e F3. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 26.

Figura 26 - Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e formação de etanol (P) por *S. cerevisiae* UNIVILLE 9080 na fermentação de meio sintético contendo 100 g/L de glicose como substrato (Ensaio F4).



A concentração final de etanol (P_f) de F4 em $t_f = 15$ h foi de $39,4 \pm 0,6$ g/L, resultando num $Q_P = 2,50 \pm 0,04$ g/L.h. Esta produtividade em etanol foi da mesma ordem de grandeza daquelas alcançados por Steckelberg *et al.* (2009) ao fermentar 150 g/L de glicose por *S.cerevisae*, as quais variaram de 2,21 a 2,84 g/L.h.

Comparando Q_P de F4 com aqueles de F1 a F3, onde empregou-se caldo sacarificado de biomassa, verifica-se que o meio sintético, isento dos inibidores provenientes da sacarificação, proporcionou valor médio três vezes maior do que Q_P de F2 (caldo concentrado, não-destoxificado). Em relação à F1 (caldo não-concentrado, $AR_0 = 18$ g/L) e à F3 (caldo concentrado, destoxificado) essa diferença foi reduzida, em média, para 1,75 vezes, comprovando assim a contribuição negativa da presença de inibidores no caldo de fermentação sobre Q_P .

Para ter-se uma visão geral da potencialidade do processo de obtenção de etanol de 2ª geração aqui explorado, é apresentado na Tabela 9 resultados de produtividade da fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* obtidos por diversos autores a partir de caldos sacarificados de biomassa.

Tabela 9 – Valores médios de Q_P obtidos por diferentes autores ao fermentar, em processo descontínuo com *S. cerevisiae*, diferentes tipos de biomassas sacarificadas com variadas concentrações iniciais de açúcar no caldo de fermentação (AR_0).

Biomassa	Sacarificação	AR_0 (g/L)	Q_P (g/L.h)	Autor
Pseudocaule de bananeira	Ácida + Enzimática	91,4	1,44	Este Trabalho, Ensaio F3
Palha de cana-de-açúcar	Explosão a vapor + Alcalina + Enzimática	$\cong 20$	0,36	Oliveira (2010)
Palha de cana-de-açúcar	Ácida + Alcalina + Enzimática	$\cong 22$	0,36	Oliveira (2010)
Fibras de Palmeira	Alcalina + Enzimática	$\cong 42$	1,01	Boonsawang <i>et al.</i> (2012)
Palha de Colza	Ácida + Enzimática	$\cong 88$	1,66	Lopéz-Linares <i>et al.</i> (2014)
Bagaço de cana-de-açúcar	Peroxido de hidrogênio alcalino (PHA) + Enzimática	55 - 58	1,56	Martins <i>et al.</i> (2015)

Conforme pode ser observado na Tabela 9, ao empregar caldo sacarificado de pseudocaule de bananeira como substrato de fermentação com *S. cerevisiae* (Ensaio F3) foi possível obter resultados de produtividade superiores aqueles obtidos por Oliveira (2010) para caldo sacarificado de bagaço e palha de cana-de-açúcar e por Boonsawang *et al.* (2012) que utilizaram caldo proveniente de fibras de palmeira. Oliveira (2010) empregou concentração inicial de micro-organismos ($X_0 = 1,0$ g/L) próxima da utilizada em F3. Boonsawang *et al.* (2012) não determinaram o valor de X_0 em massa seca, apenas em número de células no inóculo ($1,0 \times 10^{14}$ m⁻³). Esses autores empregaram o processo SFS (Sacarificação e Fermentação Simultâneas) para a produção de etanol ao invés do processo utilizado em F3 e por Oliveira (2010): sacarificação seguido por fermentação. O valor de AR_0 identificado na Tabela 8 ($AR_0 = 42$ g/L), correspondeu ao processo SFS, onde P_f máximo foi de 12,1 g/L após 24 h de fermentação.

Valor de Q_P maior do que o valor obtido neste trabalho foi alcançado por Lopéz-Linares *et al.* (2014) ao fermentar o hidrolisado da palha de colza utilizando como inóculo 4% v/v de suspensão microbiana, resultando numa

concentração inicial de células no meio de fermentação de 0,25 g/L. A concentração de etanol acumulada após 24 h de fermentação foi de 39,9 g/L. Essa maior produtividade, mesmo com o uso de menor massa celular no início da fermentação pode ser explicada pelo tipo de micro-organismo empregado. Enquanto neste trabalho foi utilizada linhagem de *S. cerevisiae* isolada de fermento de padeiro, Lopéz-Linares e colaboradores fizeram uso de uma cepa especialmente desenvolvida para fermentação alcoólica (Fermentis Ethanol Red®).

Martins *et al.* (2015), após fermentarem caldo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar apresentaram, também, maior valor de Q_P (1,56 g/L.h) do que o observado neste trabalho. A concentração de etanol acumulada (25 g/L) no trabalho de Martins e colaboradores foi menor do que o valor médio de P_f obtida com o Ensaio F3 (30,3 g/L) após 20 h de fermentação. Entretanto, o seu tempo final de fermentação (16 h) foi menor do que o de F3 (20 h), o que proporcionou maior produtividade em etanol. Assim como Lopéz-Linares *et al.* (2014), os autores utilizaram como inóculo uma cepa industrial, a qual foi fornecida por Santa Adélia Ethanol Plant, indústria alcooleira de São Paulo. Entretanto, não foi informada a concentração inicial de micro-organismos no caldo de fermentação.

CONCLUSÃO

De acordo com a caracterização do pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii*, observou-se que essa biomassa possui potencial para uso como matéria-prima na produção de etanol de segunda geração. Os teores em massa seca de celulose ($38,5 \pm 0,1\%$), hemicelulose ($29,4 \pm 0,3\%$) e lignina ($8,3 \pm 0,2\%$) foram semelhantes aos encontrados em outras biomassas que já vem sendo utilizadas para a produção de etanol celulósico em escala industrial, como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar.

O uso de hidrólise ácida com H_2SO_4 2% m/m_s (H-Ac) como pré-tratamento da biomassa, em comparação à hidrólise alcalina com NaOH 3% m/m_s (H-Al), proporcionou maior solubilização da hemicelulose com consequente aumento da disponibilidade de celulose no meio e menor cristalinidade do polímero para a sacarificação enzimática. O rendimento alcançado na sacarificação enzimática, após o pré-tratamento H-Ac de 70 g/L farelo de biomassa seca (Ensaio H-70m_s), foi de $R_{AR} = 79,4 \pm 1,2\%$ com base no teor de celulose e $Y_{AR/m_s} = 32,8 \pm 0,5\%$ com base na concentração de biomassa empregada. Esses valores foram 43% e 40% maiores do que os respectivos valores de R_{AR} e Y_{AR/m_s} obtidos com o pré-tratamento H-Al. Dentro das condições experimentais avaliadas, o uso do ácido sulfúrico diluído foi indicado como ideal para o pré-tratamento da biomassa.

Ao avaliar o uso de maior concentração de biomassa ($m_s = 100$ g/L) no processo H-Ac, nos seus estados físicos *in natura* e farelo seco, tanto R_{AR} quanto Y_{AR/m_s} foram menores. Portanto, o aumento de m_s de 70 para 100 g/L não contribuiu para o incremento do rendimento em açúcares redutores após a sacarificação enzimática.

Cabe ressaltar que o uso de biomassa *in natura* (Ensaio H-m_u70m_s), sem secagem e moagem prévias do resíduo como no caso do farelo, proporcionou rendimentos médios de $67,2 \pm 4\%$ para R_{AR} e de $28,4 \pm 1,6\%$ para Y_{AR/m_s} . Apesar de menores do que aqueles obtidos em H-70m_s, o uso da biomassa sem as etapas de secagem e moagem poderão contribuir significativamente na redução dos custos de solubilização dos açúcares fermentescíveis. Uma análise econômica detalhada envolvendo todas as etapas de obtenção desses açúcares poderão indicar com precisão quais dos dois processos seria o mais indicado para uma eventual ampliação de escala.

A concentração por evaporação do caldo sacarificado até $AR \cong 100$ g/L (Ensaio F2) possibilitou obter um fermentado com concentração de etanol (P_f) de $34,4 \pm 0,4$ g/L, resultando num rendimento de $Y_{P/AR}$ de $0,46 \pm 0,02$ g/g. O valor de P_f foi quatro vezes maior do que aquele obtido na fermentação do caldo não-concentrado (Ensaio F1) contendo $AR \cong 18$ g/L porém sem diferença significativa ($p < 0,05$) em $Y_{P/AR}$.

Ao destoxificar o caldo sacarificado, antes da etapa de concentração, com diferentes teores de carvão ativo (1, 2 e 4% m/v), observou-se uma redução máxima nas concentrações médias dos inibidores (ácido acético e compostos fenólicos) da fermentação alcoólica ao empregar 4% de carvão ativo. Entretanto, assim como ocorreu com esses inibidores, houve uma maior redução na concentração dos açúcares fermentescíveis em comparação ao uso de menores teores do agente destoxicante (1 e 2%). Em virtude de não ter ocorrido diferença significativa na redução do inibidor ácido acético entre os tratamentos com 1, 2 e 4% m/v de carvão, a concentração de 1% foi selecionada para a obtenção do caldo a ser fermentado.

A fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, do caldo concentrado e destoxicado com 1% m/v de carvão ativo (Ensaio F3), proporcionou rendimento em etanol ($Y_{P/AR} = 0,41 \pm 0,02$ g/g) semelhante aos dos Ensaios F1 e F2. Porém, com uma produtividade em etanol ($Q_P = 1,44 \pm 0,02$ g/L.h) 22% maior do que F1 e 75% maior do que F2. Mesmo sabendo-se que o tratamento com carvão ativo favoreceu o processo fermentativo, a sua indicação como etapa essencial na produção de etanol 2G só poderá ser feita, assim como ocorreu no estudo dos pré-tratamentos da biomassa, após análise econômica de ambos os processos: sem destoxificação e com destoxificação. A implementação da etapa de destoxificação requererá novas operações unitárias a serem introduzidas no processo produtivo em comparação ao processo sem destoxificação: agitação, filtração e/ou centrifugação da mistura.

SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

- Aumentar a concentração de etanol no caldo fermentado para valores superiores a 70 g/L visando favorecer a etapa subsequente de extração do produto por destilação. O aumento da concentração inicial de açúcar no caldo de fermentação bem como o emprego do processo de fermentação com alta densidade celular são alternativas para essa busca.
- Avaliar a influência do uso do caldo sacarificado, concentrado e não-destoxificado como principal fonte de carbono na obtenção do inóculo de fermentação. Com isto, pode-se reduzir o tempo necessário para a adaptação do micro-organismo no meio de fermentação (fase lag) e aumentar-se, ainda mais, a produtividade do processo produtivo.
- Realizar análises econômicas dos processos produtivos de etanol a partir do uso de biomassa *in natura* ou previamente seca/moída e do uso ou não da etapa de destoxificação do caldo sacarificado.

REFERÊNCIAS

- ADNEY, B., BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Technical Report NREL/TP – 510-42628. **National Renewable Energy Laboratory**, p. 1 - 11, 1996.
- AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba – SP, Fermentec, 448p. 2005.
- ARO, N., PAKULA, T., PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 29, p. 719–739, 2005.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p. 57-270,1992.
- BATISTA, A.S. **Saccharomices cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP, Brasil, 2001.
- BAUDEL, H.M., Pré Tratamento e Hidrólise. In: **III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para produção de etanol**, Relatório final, São Paulo, 2007.
- BENG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L. Bioquímica. Enzimas: Conceitos Básicos e Cinética, Cap. 8, p. 201. 5ª ed. Editora: **Guanabara Koogan**, 2004.
- BHARATHIRAJA, B., CHAKRAVARTHY, M., RANJITH KUMAR, R., YUVARAJ, D., JAYAMUTHUNAGAI, J., PRAVEEN KUMAR, R., PALANI, S. Biodiesel production using chemical and biological methods – A review of process, catalyst, acyl acceptor, source and process variables. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 38, p. 368–382, 2014.

BNDES e CGEE. **Bioetanol de Cana-De-Açúcar, Energia para o Desenvolvimento Sustentável**. Capítulo 3: Produção de bioetanol. p. 67 - 101. 1ª ed. Rio de Janeiro, 2008.

BOONSAWANG, P., SUBKAREE, Y., SRINORAKUTARA, T. Ethanol production from palm pressed fiber by prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Biomass and Bioenergy**, vol. 40, p. 127 - 132, 2012.

BORGES, A. L., SOUZA, L. S. O cultivo da bananeira. Capítulo 1: Exigências Edafoclimáticas. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, p. 15, 2004.

BOUDET, A.M., KAJITA, S., GRIMA-PETTENATI, J., GOFFNER, D. Review: Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. **Plant Science**, vol.8, n° 12, p. 576 – 581, 2003.

BRAGA, V. S. **A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça**. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

BRASKEM. **O etanol**. Disponível em: <<http://www.braskem.com.br/site.aspx/Etanol>>. Acesso em Setembro de 2014.

BUDZIANOWSKI, W.M. A review of potential innovations for production, conditioning and utilization of biogas with multiple-criteria assessment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 54, p. 1148–1171, 2016.

CARVALHO, W., CANILHA, L., FERRAZ, A., MILAGRES, A. M. F. Uma Visão Sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação da Madeira. **Química Nova**, n°. 8, vol. 32, p. 2191-2195, 2009.

CEN, P., XIA, L. Production of Cellulase by Solid-State Fermentation. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, vol. 65, p. 69 – 92, 1999.

CHAOVANALIKIT, A., WROLSTAD, R.E. Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. **Food Chemistry and Toxicology**, vol. 69, p. 67-72, 2004.

CHANG, M.C.Y. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 11, p. 677–684, 2007.

CINELLI, B.A. **Produção de Etanol a Partir da Fermentação Simultânea a Hidrólise do Amido Granular de Resíduo Agroindustrial**. 183 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

CORTEZ, L.A.B. Bioetanol de cana de açúcar. P&D para produção e sustentabilidade. MAGALHÃES, P.S., BRAUNBECK, O.A. Parte 3: Novo modelo agrícola para cana de açúcar. LEAL, M.R.L.V., VALLE, T.L., FELTAN, J.C., CARVALHO, C.R.L. Capítulo 17: Outras matérias primas para a produção de etanol. **Editora Edgard Blucher**, 1ª ed, p. 516, 2010.

COTANA, F., CAVALAGLIO, G., GELOSIA, M., NICOLINI, A., COCCIA, V., PETROZZI, A. Production of bioethanol in a second generation prototype from pine. **Energy Procedia**, vol. 45, p. 42 – 51, 2014.

CTBE - **Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, Etanol Celulósico**. Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br/interna/index.php?pg=MzM=>> Acesso em novembro de 2013.

DAORATTANACHAI, P., NAMUANGRUK, S., VIRIYA-EMPIKUL, N., LAOSIRIPOJANA, N., FAUNGNAWAKIJ, K. 5-Hydroxymethylfurfural production from sugars and cellulose in acid- and base-catalyzed conditions under hot compressed water. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, vol. 18, p. 1893 – 1901, 2012.

DARVILL, J. E., MCNEIL, DARVILL, A. G., ALBERSHEIM, P. Structure of Plant Cell Walls. XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells. **Plant Physiology**. Vol. 66, p. 1135-1139, 1980.

DINIZ, J.M.B. F., GIL, M.H., CASTRO, J.A.A.M. Hornification—its origin and interpretation in wood pulps. **Wood Science and Technology**, Vol. 37, p. 489–494, 2004.

DODD, D., CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Glob Change Biol Bioenergy**, vol. 1, 28 p. 2010.

FARINAS, C.S. A Parede Celular Vegetal E As Enzimas Envolvidas Na Sua Degradação. **Documentos 54. Embrapa**, 16 p. 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Chapter 42: Molecular Properties, p. 67. **Berlin; New York: Walter de Gruyte**, 1989.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O Brasil é o país dos resíduos**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br> >. Acesso em Julho de 2014.

ESTERBAUER, H., STEINER, W., LABUDOVA, I., HERMANN, A., HAYN, M. Production of Trichoderma cellulase in Laboratory and Pilot Scale. **Bioresource Technology**. vol. 36, p. 51 – 65, 1991.

FERNANDES, A. P. F. V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática. 201 f. Dissertação (Doutorado em Biologia) - **Universidade Nova de Lisboa**, Lisboa, 2008.

FERNANDES, B.S., GUSSO, A., FORNARI JÚNIOR, C.C.M. Avaliação da Secagem de Fibras de Coco a 100 °C, Visando sua Micronização para Utilização em Compósitos Poliméricos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, vol.10, n.2, p.141-148, 2008.

FERREIRA, J. Produção de Levana e Bioetanol Utilizando Cascas de Banana por *Zymomonas mobilis*. **Dissertação apresentada da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto**. 94 f. 2013.

FINGUERUT, J., Caracterização do Material Lignocelulósico. In: **III Workshop de Hidrólise de Bagaço e Palha de Cana para Produção de Etanol**, São Paulo, 2006.

GAÑÁN, P., ZULUAGA, R., VELEZ, J.M.L, MONDRAGON, I. Biological Natural Retting for Determining the Hierarchical Structuration of Banana Fibers. **Macromolecular Bioscience**, vol 4, p. 978–983, 2004.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7. ed. São Paulo: Editora Nobel, 1984.

GÍRIO, F.M., FONSECA, C., CARVALHEIRO F., DUARTE, L.C., MARQUES, S., BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, vol. 101. p. 4775 – 4800, 2010.

GOGOI, K., PHUKAN, M.M., DUTTA, N., SINGH, S.P., SEDAI, P., KONWAR, B.K., MAJI, T.K. Valorization and Miscellaneous Prospects of Waste *Musabalbisiana* Colla Pseudostem. **Hindawi Publishing Corporation, Journal of Waste Management**, 8 p., 2014.

GONÇALVES FILHO, L. Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização. 84p. **Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville**, Joinville, 2011.

GONÇALVES FILHO, L.C., FISCHER, G.A.A., SELLIN, N., MARANGONI, C., SOUZA, O. Hydrolysis of Banana Tree Pseudostem and Second-Generation Ethanol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Environmental Science and Engineering**, p. 65-69, 2013.

GOMES, G.M.F., VASCONCELOS, A.M., EGITO, A.S., LIMA, A.R., CARNEIRO, J.C., LANDIM, A.V., FONTELES, N.L.O., SALLES, H.O. Degradabilidade in situ do bagaço de cana-de-açúcar para pequenos ruminantes de raças naturalizadas do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 65, n°. 6, p. 1792-1800, 2013a.

GOMES, T.S., VISCONTE, L.L.Y., PACHECO, E.B.A.V. Substituição da Fibra de Vidro por Fibra de Bananeira em Compósitos de Polietileno de Alta Densidade. Parte 1. Avaliação Mecânica e Térmica. **Polímeros**, vol. 23, p. 206-211, 2013b.

GRANBIO. **GranBio inicia produção de etanol de segunda geração**. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/wp-content/uploads/2014/09/partida_portugues.pdf> Acesso em Maio de 2015

GU, H., ZHANG, J., BAO, J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. **Bioresource Technology**, vol. 157, p. 6–13, 2014.

GUIMARÃES, B.M.R. **Tratamento Químico de Partículas de Pseudocaule da Bananeira Visando à Produção de Painéis Aglomerados**. 93 f. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavra, LAVRAS- MG, 2012

GUPTA, A., VERMA, J.P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 41 p. 550–567, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., FONSECA, C., SPENCER-MARTINS, I., Gorwa-Grauslund, M.F. Mini-Review: Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol** (2007) 74:937–953.

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**. vol. 28, p. 384–410. 2005.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/> >. Acesso em Fevereiro de 2015.

INGALE, S., JOSHI, S.J., GUPTA, A. Production of bioethanol using agricultural waste: Banana pseudo stem. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 45, 3 ed., p. 885-892, 2014.

INNOCENTE, A.F. **Cogeração a Partir da Biomassa Residual de Cana de açúcar - Estudo de Caso**. 124 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Butucatu, São Paulo, 2011.

IONASHIRO, M. Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial. Cap. 2 Termogravimetria, p. 21. São Paulo: **Giz Editora**, 2004.

IPGRI – International Plant Genetic Resources Institute. Descriptors for banana (Musa spp.). **Rome (ITA)**. 55p, 1996.

JUNQUEIRA, T. L. **Simulação de colunas de destilação convencional, extrativa e azeotrópica no processo de produção de bioetanol através da modelagem de não equilíbrio e da modelagem de estágios de equilíbrio com eficiência**. 187 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

KAMAL, S.M.M., MOHAMAD, N.L., ABDULLAH, A.G.L., ABDULLAH, N. Detoxification of sago trunk hydrolysate using activated charcoal for xylitol production. **Procedia Food Science**, vol. 1, p. 908 – 913, 2011.

KIM, K.H., TUCKER, M.P., NGUYEN, Q.A. Effects of Pressing Lignocellulosic Biomass on Sugar Yield in Two-Stage Dilute-Acid Hydrolysis Process. **Biotechnology Progress**, vol. 18, p. 489, 2002.

KLINKE, H.B., THOMSEN, A.B., AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. MINI-REVIEW. **Appl Microbiol Biotechnol**, vol. 66, p. 10 – 26, 2004.

KOTIRANTA, P., KARLSSON, J., SIIKA-AHO, M., MEDVE, J., VIKARI, L., TJERNELD, F., TENKANEN, M. Adsorption and Activity of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I, Endoglucanase II, and the Corresponding Core Proteins on Steam Pretreated Willow. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 81, p. 81 – 90, 1999.

LANDAETA, R., AROCA, G., ACEVEDO, F., TEIXEIRA, J.A., MUSSATTO, S.I. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied Energy**, vol. 102, p. 124–130, 2013.

LARSSON, S., CASSLAND, P., JÖNSSON, L.J. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain with Enhanced Resistance to Phenolic Fermentation Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysates by Heterologous Expression of Laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 67, n. 3, p. 1163–1170, 2001.

LARSSON, S., REIMANN, A., NILVEBRANT, N., JONSSON, L.J. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates of Spruce. Applied. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 77-79, p. 91–103, 1999.

LARSON, E.D.; WILLIAMS, R.H., LEAL, R.L.V. A review of biomass integrated-gasifier / gas turbine combined cycle technology and its application in sugarcane industries, with an analysis for Cuba. **Energy for Sustainable Development**, v. 5, p. 54-76, 2001.

LIEBL, G.F. **Influência das Condições de Secagem e Tamanho da Partícula Sobre a Sacarificação do Pseudocaule da Bananeira**. 109f. Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville – Univille, Joinville – SC, 2015.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. LIMA, U.A., BASSO, L.C., AMORIM, H.V. Capítulo 1: Produção de etanol. p. 1 – 39, São Paulo: **Edgard Blücher**, 2001.

LOBATO, P.H., MANSUR, C. **Produtores brasileiros de banana temem importação da fruta colhida no Equador**. Disponível em: <<http://www.em.com.br/>>. Acesso em Fevereiro de 2015.

LÓPEZ-LINARES, J.C., ROMERO, I., CARA, C., RUIZ, E., MOYA, M., CASTRO, E. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, vol. 122, p. 112–118, 2014.

LUZ, S. M., GONÇALVES, A. R., DELARCO JUNIOR, A. P. Microestrutura e Propriedades Mecânicas de Compósitos de Polipropileno Reforçado com Celulose de Bagaço e Palha de Cana. **Revista Matéria**, vol. 11, n. 2, p. 101 – 110, 2006

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em novembro de 2015.

MARTÍN, C., JÖNSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 32, p. 386–395, 2003.

MARTINS, L.H.S., RABELO, S.C., COSTA, A.C. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 191, p. 312–321, 2015.

MARZZOCO, A., TORRES, B.B. Bioquímica Básica. **Enzimas**, Capítulo 5, p. 59. 2ª ed., Universidade de São Paulo, Editora: Guanabara Koogan, 1999.

MATEO, S., ROBERTO, I.C., SÁNCHEZ, S., MOYA, A.J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, vol. 49, p. 196– 203, 2013.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, n. 31, p.426 - 428, 1959.

MONSALVE, J.F., PEREZ, V.I.M., COLORADO, A.A.R. Producción de etanol a partir de La cáscara de banano y almidón de yuca. **Dyna**, vol. 73, n° 150, p. 21-27, 2006.

MOONEY, C.A., MANSFIELD,S.D.,TOUHY,M.G., SADDLE, J.N.The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. **Bioresource Technology**, vol. 64, 2 ed., p.113–119, 1998.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADSCH, M. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. **Bioresource Technology**, vol. 96, p. 673-86, 2005.

MOULIN, G., BOZE, H., GALZY, P. Inhibition of Alcoholic Fermentation. **Biotechnology and Genetic Engineering Review**, vol. 2, p. 365 – 382, 1984.

MRABET, Y. **Esquema general de La Glucólisis**. 2009. Disponível em: < <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gluc%C3%B3lisis.png> >. Acesso em Julho de 2015.

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F., ROBERTO, I.C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 43, p. 124–129, 2008.

MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**. vol. 23, p. 1681–1684, 2001.

MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, vol. 93, p.1–10, 2004.

NASTARI, P.M., **O Setor Brasileiro de Cana-de-açúcar Perspectivas de Crescimento**. Disponível em: < www.portalexame.abril.com.br/static/aberto/complementos/870/nastari_presentation.pdf > Acesso em junho de 2013.

NELSON, D.L., COX, M.M. LEHNINGHER PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA. **Celulose e a quitina são homopolissacarídeos estruturais**, capítulo 9, p 234. 3 ed., São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

NELSON, D.L., COX, M.M. LEHNINGHER PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA. **A Glicólise e o Catabolismo das Hexoses**, capítulo 15, p 409. 3 ed., São Paulo: Editora Sarvier, 2002.

NIMZ, H. Beech Lignin - Proposal of a Constitutional Scheme. **Angewandte Chemie International Edition in English**. vol. 13, p. 313–321, 1974.

OGEDA, T.L., PETRI, D.F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, vol. 33, n°. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, A.F.S. **Avaliação energética da biomassa do bagaço de cana de açúcar em diferentes indústrias sucroenergéticas**. 80 f. Dissertação de Mestrado Profissional em Produção – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, 2014.

OLIVEIRA, F.M.V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 101 f. Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo no programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa. Lorena – SP, 2010.

PACHECO, T.F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Circular Técnica 4**, 1ª ed. 6 p. Brasília – DF, 2011.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, P., GALBE, M., ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology**, vol. 96, p.843–850, 2005.

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

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 74, n° 1, p. 69-80, 2000.

PAPARI, S., HAWBOLDT, K. A review on the pyrolysis of woody biomass to bio-oil: Focus on kinetic models. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 52, p. 1580–1595, 2015.

PAUL, S.A., JOSEPH, K., MATHEW, G.D.G., POTHEN, L.A., THOMAS, S. Influence of polarity parameters on the mechanical properties of composites from polypropylene fiber and short banana fiber. **Composites: Part A** 41, p. 1380–1387, 2010.

PEREIRA, A.L.S., NASCIMENTO, D.M., SOUZA, M.S.M., CASSALES, A.R., MORAIS, J.P.S. PAULA, R.C.M., ROSA, M.F. FEITOSA, J.P.A. Banana (*Musa sp. cv. Pacovan*) Pseudostem Fibers are Composed os Varying Lignocellulosic Composition Throughout the Diameter. **BioResources**, vol 9, p. 7749 – 7763, 2014.

PEREIRA, R.C. **Ensilagem e fenação do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da produção de cachaça**. 214 f. Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, 2006.

PFEIFER, P.A., BONN, G., BOBLETER, O. Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces carlsbergensis* W 34. **Biotechnology Letters**, vol. 6, p. 541-546, 1984.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 142 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, 2007.

PITARELO, A.P., SILVA, T.A., PERALTA-ZAMORA, P.G., RAMOS, L.P. Efeito do Teor de Umidade Sobre o Pré-Tratamento a Vapor e a Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Química Nova**, vol. 35, No. 8, p. 1502-1509. São Paulo, 2012.

PIUBELI, F.A., AMARAL, D.M.A Poluição Atmosférica Interferindo na Qualidade de Vida da Sociedade. **X Simpósio de Engenharia de Produção – SIMPEP**, São Paulo, Anais do X SIMPEP, 2003.

PURWADI, R., NIKLASSON, C., TAHERZADEH, M.J. Kinetic Study of Detoxification of Dilute-acid Hydrolyzates by $\text{Ca}(\text{OH})_2$. **Journal of Biotechnology**. V. 114, p. 187–198, 2004.

RABELO, S.C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 414 f. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. Cap. Célula vegetal: Estrutura e metabolismo, p. 30. A Parede Celular. 5 ed. **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 1996.

RIEGEL, I., MOURA, A.B.D., MORISSO, F.D.P., MELLO, F.S. Análise Termogravimétrica da Pirólise da Acácia-Negra (*Acacia Mearnsi* Wild.) Cultivada no Rio Grande do Sul, Brasil. **SIF**, vol 32, p.533-543, 2008.

RODRIGUES, F.Á. **Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana.** 160 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2007.

RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A., ALMEIDA E SILVA, J.B., VITOLO, M., GÓMEZ, P.V. The Influence of pH, Temperature and Hydrolyzate Concentration on the Removal of Volatile and Nonvolatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolyzate Treated with Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 18, p. 299 – 311, 2001.

SAHA, B., ITEN, L.B. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **Biotechnology Progress**, vol. 21, p. 816 – 822, 2005.

SAHA, B.C., NICHOLS, N.N., QURESHI, N., KENNEDY, G.J., ITEN, L.B., COTTA, M.A. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 175, p. 17–22, 2015.

SAHA, C.B.I., ITEN, L.B., COTTA, M.A., WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol, **Process Biochemistry**, n 40, p. 3693–3700, 2005.

SAITO, I.M., CABELLO, C. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. **Energia na Agricultura**, vol. 21, n.3, p. 34-44, 2006.

SALMON, J.M., MAURICIO, J.C. Relationship Between Sugar Uptake Kinetics and Total Sugar Consumption in Different Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strains During Alcoholic Fermentation. **Biotechnology Letters**, vol.16, n°.1, p. 89 – 94, 1994.

SANTOS NETO, Á. J. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida Parte 1. **Scientia Chromatographica**, vol. 1, p. 69 – 77, 2009.

SARTO, M.T., ANTUNES, M.B.M.P. **Desenvolvimento Econômico: A crescente geração de resíduos e o impacto ambiental**. Disponível em: < <http://www.webartigos.com> >. Acesso em Junho de 2014.

SCHULZ, M.A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: Polpa e Cascas de Banana**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos) – Universidade da região de Joinville, Joinville, 2010.

SHREVE, R.N., BRINK, J.A. **Indústrias de processos químicos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1997.

SILVA, V.F.N. **Estudo do Pré-tratamento e Sacarificação Enzimática de Resíduos Agroindustriais como etapas no Processo de Obtenção de Etanol Celulósico**. 116 f. Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, L. **Estudo da Hidrólise Enzimática em Alta Consistência de Materiais Lignocelulósicos**. 85 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SIMÕES, J. **Etanol de resíduos e algas, gasolina a partir de açúcar, diesel de etanol**: Empresas que inovam foram show do Ethanol Summit. Disponível em: < <http://www.inovacao.unicamp.br> >. Acesso em Dezembro de 2013.

SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry Fundamentals and applications. Capítulo 3: Wood Polysaccharides. California, **USA: Academic Press**, 2 ed, p. 63. 1993.

SOFFNER, M.L.A.P. **Produção de Polpa Celulósica a partir de Engaço de Bananeira**. 51 f. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Madeiras, Piracicaba – SP, 2001.

SOUZA, C.S. **Avaliação da Produção de Etanol em Temperaturas Elevadas por uma Linhagem de *S. cerevisiae***. Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, p. 27- 37, 2009.

SOUZA, F.C.S., SANTOS, J.M.G.M., CAMPOS, L.M.A., CARVALHO, L.S. Análise da Eficiência das Técnicas de Caracterização do Bagaço de Cana-de-Açúcar, Após Pré-Tratamento Ácido, Visando a Produção de Etanol de Segunda Geração (E2G). XIII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, **UNIFACS**, vol. 13, p. 157 – 174, 2014.

SOUZA, O., FEDERIZZI, M., COELHO, B., WAGNER, T.M., WISBECK, E. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 14, nº 4, p. 438-443, 2010.

SOUZA, O., SCHULZ, M.A., FISCHER, G.A.A., WAGNER, T.M., SELLIN, N. Energia alternativa de biomassa: Bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 16, nº 8, p. 915-921, 2012.

STECKELBERG, C., ANDRIETTA, M.G.S., ANDRIETTA, S.R. Leveduras Isoladas de Processos Industriais de Produção de Bioetanol – Taxonomia Numérica e Características Cinéticas, **XVII Simpósio nacional de bioprocessos - Sinaferm**, 6p, São Paulo, 2009.

SUNDE, K., BREKKE, A., SOLBERG, B. Environmental impacts and costs of woody Biomass-to-Liquid (BTL) production and use — A review. **Forest Policy and Economics**, vol. 13, p. 591–602, 2011.

TAHERZADEH, M.J., NIKLASSON, C. Ethanol from lignocellulosic materials: pretreatment, acid and enzymatic hydrolyses, and fermentation. **ACS Symposium Series**, vol. 889, p. 49-68, 2004.

TAHERZADEH M.J. **Ethanol from Lignocellulose: Physiological Effects of Inhibitors and Fermentation Strategies**. 66 f. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy. Department of Chemical Reaction Engineering Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden 1999.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal. Capítulo 15: Paredes celulares**. Editora: Artmed, 3 ed., p. 339, 2006.

TALEBNIA, F., NIKLASSON, C., TAHERZADEH, M.J. Ethanol Production from Glucose and Dilute-acid Hydrolyzates by Encapsulated *S. cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 90, nº. 3, p. 345 – 353, 2005.

TOQUERO, C., BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, vol. 157, p. 68–76, 2014.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Etanol. Associadas da UNICA mais próximas de produzir etanol celulósico.** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/2981091792031156797/associadas-da-unica-mais-proximas-de-produzir-etanol-celulosico/>>. Acesso em Fevereiro de 2016

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR. **Produção e Uso do Etanol Combustível no Brasil.** Respostas às questões mais frequentes. São Paulo-Brasil, 68 p., 2007.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Revolução no canavial.** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/namidia/30765441920338415501/revolucao-no-canavial/>>. Acesso em Fevereiro de 2016

VAN SOEST, P.J., WINE, R.H. Determination of Lignin and Cellulose in Acid-Detergent Fiber with Permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Vol. 51, July. vol. 51, n° 4, p. 779 – 786, 1968.

VARGA, E., KLINKE, H.B., RÉCZEY, K., THOMSEN, A.B. High Solid Simultaneous Saccharification and Fermentation of Wet Oxidized Corn Stover to Ethanol. **Wiley Inter Scienc**, 8 p., 2004.

VIEIRA, L.M. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina - 2012-2013, **Epagri/Cepa** Disponível em: < <http://cepa.epagri.sc.gov.br> >. Acesso em Fevereiro de 2015.

WENG, J.K., CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin Biosynthesis. Tansley review. **New Phytologist**. p. 273 – 285, 2010.

WOLF, L.D. **Pré-Tratamento Organossolve do Bagaço de Cana de Açúcar para a Produção de Etanol e Obtenção de Xilooligômeros.** 147 f. Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, 2011.

WYK, J.P.H.V. Biotechnology and the Utilization of Biowaste as a Resource for Bioproduct Development. **TRENDS in Biotechnology**, vol.19, n° .5, p. 171 – 177, 2001.

WYMAN, C.E., 1994. Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Technology Economics and Opportunities. **Bioresource Technology**. v. 50, p. 3-16, 1994.

YANG, B., WYMAN, C.E. Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. **Bioresource Technology**. vol. 99. p. 5756 – 5762, 2008.

YANG, H., YAN, R., CHEN, H., LEE, D.H., ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, vol. 86, p. 1781–1788, 2007.

ZARDO, D.M., ALBERTI, A., DANTAS, A.P.C., GUYOT, S., WOSIACKI, G., NOGUEIRA, A. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante em fermentados de maçã. **Ciências Agrárias**, vol. 29, n. 4, p. 829-838, 2008.

ZHONG, C., LAU, M.W., BALAN, V., DALE, B.E., YUAN, Y.J. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. **Appl Microbiol Biotechnol**, vol. 84, p. 667–676, 2009.

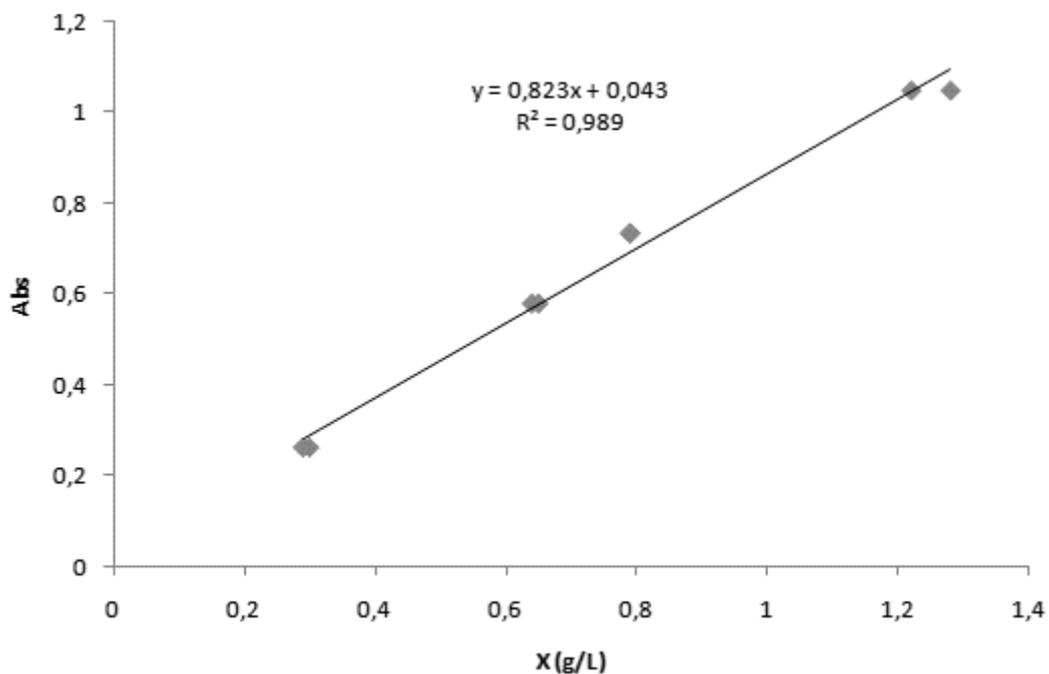
ZHU, S., HUANG, W., HUANG, W., WANG, K., CHEN, Q., WU, Y. Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. **Applied Energy**, vol. 154, p. 190–196, 2015.

ANEXO I

Tabela 10- Dados experimentais obtidos na construção da curva de calibração da concentração de células.

Amostras	Absorbância (Abs)	Células (g)	Concentração (g/L)
1a	1,05	0,0128	1,28
1b	1,05	0,0122	1,22
2a	0,735	0,0079	0,79
2b	0,735	0,0079	0,79
3a	0,58	0,0065	0,65
3b	0,58	0,0064	0,64
4a	0,262	0,003	0,3
4b	0,262	0,0029	0,29

Figura 27 - Curva de calibração da absorbância (Abs) em função da concentração de células (X em g/L).



ANEXO II

A construção da curva padrão para a determinação de AR durante a análise da atividade da enzima celulase NS50013 foi feita em duplicata com quatro diferentes concentrações de glicose da seguinte maneira. Onde preparou-se uma solução mãe contendo 10 mg/mL de glicose e a partir desta seguiu as seguintes diluições:

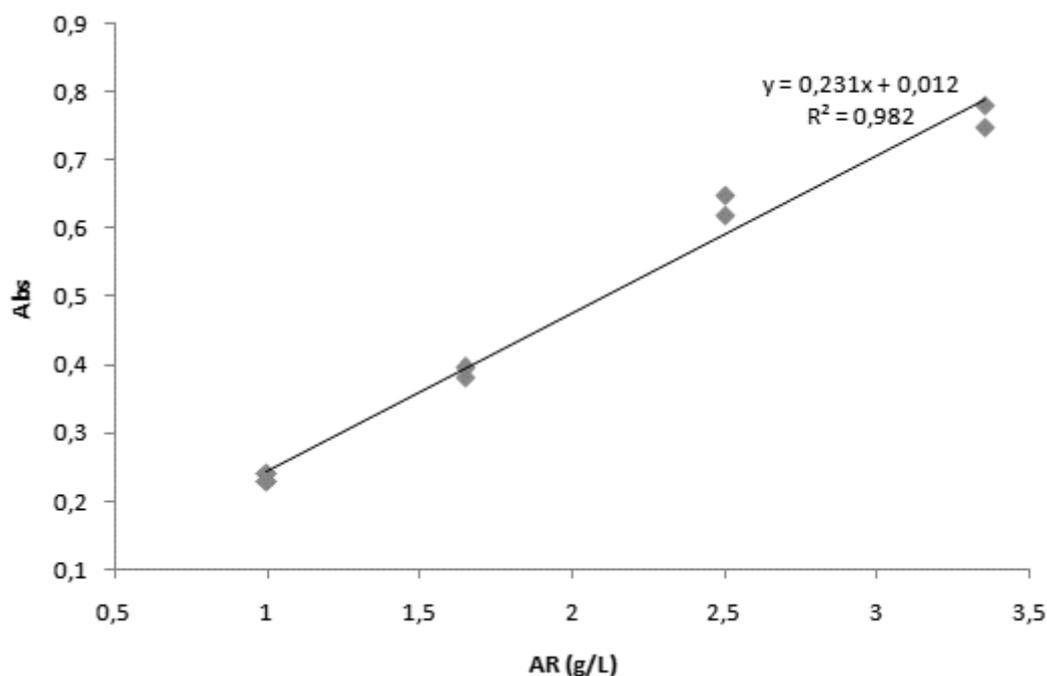
1 mL de solução mãe + 0,5 mL de tampão = 6,7 mg/mL (3,35 mg/0,5 mL).

1 mL de solução mãe + 1,0 mL de tampão = 5 mg/mL (2,5 mg/0,5 mL).

1 mL de solução mãe + 2,0 mL de tampão = 3,3 mg/mL (1,65 mg/0,5 mL).

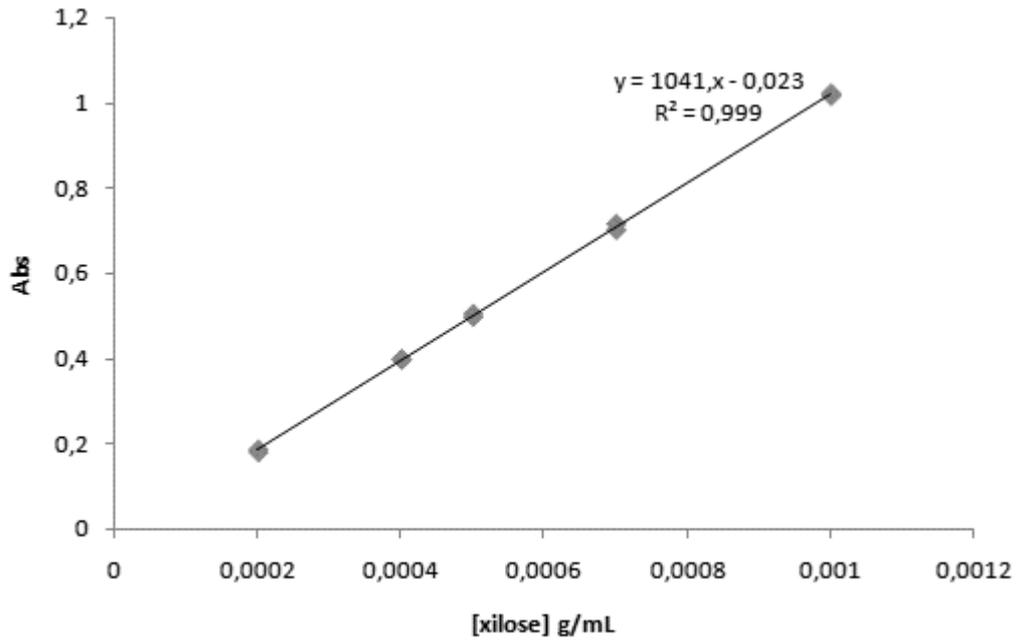
1 mL de solução mãe + 4,0 mL de tampão = 2 mg/mL (1,0 mg/0,5 mL).

Figura 28 - curva de calibração para a determinação de AR.



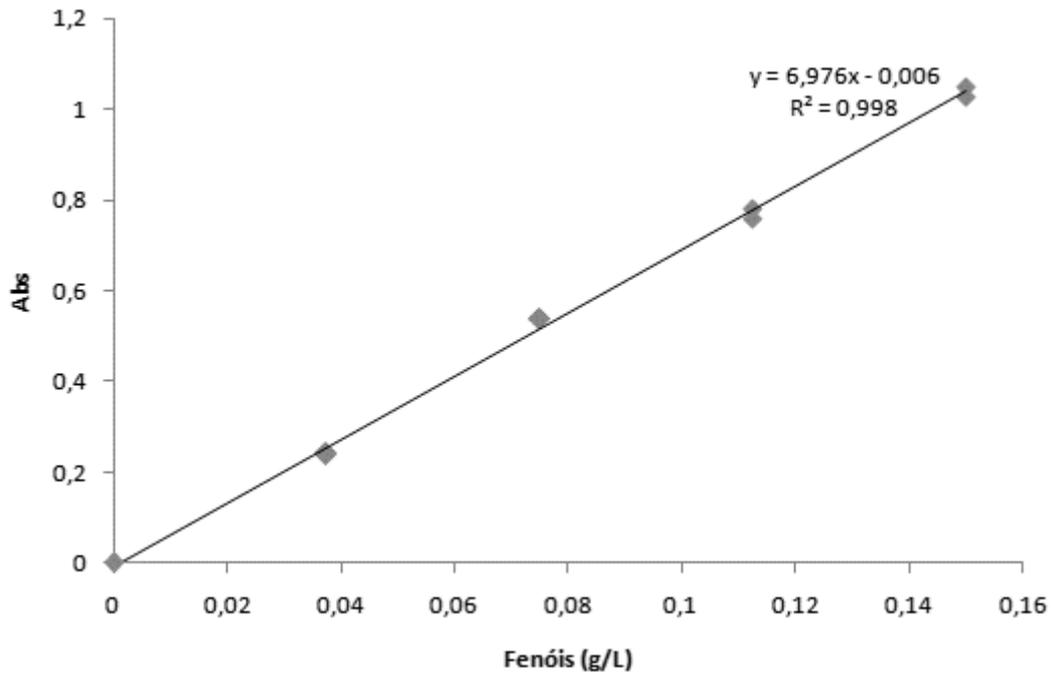
ANEXO III

Figura 29 - curva de calibração para a determinação da concentração de xilose.



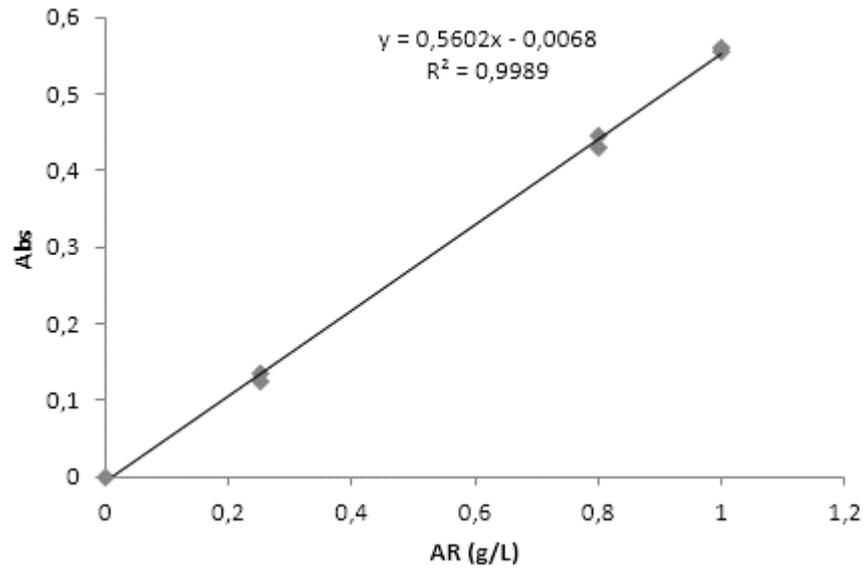
ANEXO IV

Figura 30 - curva de calibração para a determinação da concentração de fenóis totais.



ANEXO V

Figura 31 - Curva de calibração para a determinação da concentração de AR pelo método DNS.



ANEXO VI

Tabela 11 – Teores, em massa seca, de Celulose, Hemicelulose e Lignina nas amostras de pseudocaule sem tratamento, com tratamento ácido (H-Ac) e com tratamento alcalino (H-AI).

Amostras	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Sem tratamento	38,5 ± 0,1 ^(c)	29,4 ± 0,3 ^(b)	8,27 ± 0,2 ^(a)
H-Ac	59,8 ± 0,01 ^(f)	15,2 ± 1,2 ^(e)	4,17 ± 0,2 ^(d)
H-AI	52,8 ± 0,3 ^(h)	25,9 ± 0,4 ^(g)	3,87 ± 0,1 ^(d)

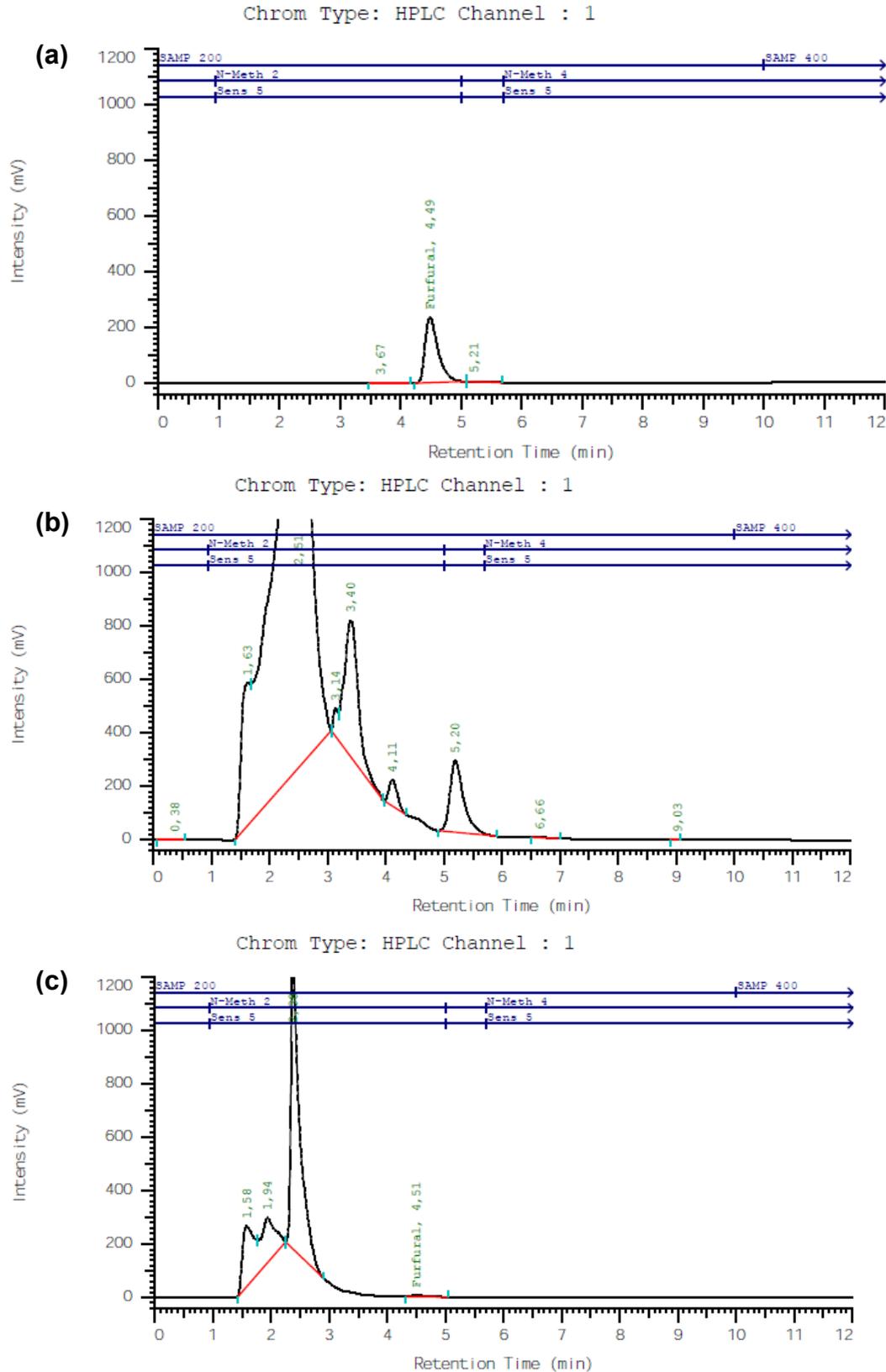
ANEXO VII

Tabela 12 – Rendimentos em açúcares redutores com relação a concentração de biomassa seca ($Y_{AR/ms}$) e com relação ao teor de celulose na biomassa (R_{AR}) das amostras sacarificadas e pré-tratado em meio ácido com diferentes concentrações de biomassa.

Amostras	$Y_{AR/ms}$ (%)	R_{AR} (%)
H-70m _s	32,8 ± 0,5 ^(a)	79,4 ± 1,2 ^(b)
H-100m _s	18,2 ± 0,3 ^(c)	43,1 ± 0,7 ^(d)
H-m _u 70m _s	28,4 ± 1,6 ^(e)	67,2 ± 3,9 ^(f)
H-m _u 100m _s	17,8 ± 2,3 ^(c)	42,2 ± 5,3 ^(d)
H-in	16,4 ± 2,1 ^(c)	38,9 ± 4,9 ^(d)

ANEXO VIII

Figura 32 – Cromatogramas das análises de furfural por HPLC do (a) padrão e das amostras do (b) caldo hidrolisado não-destoxificado e do (c) caldo hidrolisado destoxificado com 4% m/v de carvão ativo Merck.



ANEXO IX

Figura 33 - Cromatogramas das análises de HMF por HPLC do (a) padrão e das amostras do (b) caldo hidrolisado não-destoxificado e do (c) caldo hidrolisado destoxificado com 4% m/v de carvão ativo Merck.

