

**LUIZ CARLOS GONÇALVES FILHO**

**Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização.**

**JOINVILLE**

**2011**

**LUIZ CARLOS GONÇALVES FILHO**

**Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização.**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville – Univille.

Orientador: Prof. Dr. Ozair Souza

**JOINVILLE**

**2011**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

G635u Gonçalves Filho, Luiz Carlos  
Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação  
alcoólica : avaliação de diferentes processos de despolimerização / Luiz Carlos  
Gonçalves Filho ; orientador Dr. Ozair Souza – Joinville: UNIVILLE, 2011.

98f. : il. ; 30 cm

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

1. Fontes de energia alternativas. 2. Energia da biomassa. 3. Fontes renováveis de energia. 4. Fonte de biomassa lignocelulósica. 5. Biomassas dos resíduos da bananicultura. I. Souza, Ozair. II. Título.

CDD 662.88

## Termo de Aprovação

### “Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização”

por

Luiz Carlos Gonçalves Filho

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)

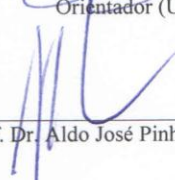


Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck  
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

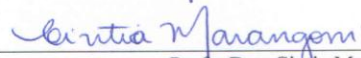
#### Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ozair Souza  
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon  
(UCS)



Prof. Dra. Cintia Marangoni  
(UNIVILLE)

Joinville, 24 de agosto de 2011.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microrregião de Joinville produtora de banana em Santa Catarina. ....	8
Figura 2 - Bananeira e suas partes .....	9
Figura 3 - Estrutura de uma fibra vegetal .....	17
Figura 4 - Representação da estrutura molecular da celulose.....	18
Figura 5 - Representação esquemática da hemicelulose. A: arabinose; FeA: Ácido Ferúlico; G:galactose; Glc: Ácido Glicurônico; X: xilose.....	18
Figura 6-Estrutura geral da lignina .....	19
Figura 7-Unidades básicas das ligninas. ....	19
Figura 8 - Fluxograma operacional simplificado para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. ....	21
Figura 9 - Fluxograma operacional global utilizado nos diferentes experimentos realizados neste trabalho. Linha tracejada indica etapa a ser realizada em trabalhos futuros. ....	32
Figura 10 - Cinéticas do consumo de açúcares fermentescíveis (● AT), produção de etanol (■ P) e valor de pH (Δ pH) observadas na fermentação por <i>Saccharomyces cerevisia</i> empregando diferentes tipos de substrato: Ensaio EG - glicose (ensaio padrão), Ensaio EP1 - 11,75 g ms L <sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira <i>Musa cavendishii</i> submetido à despolimerização com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 120 °C, 30 min, sem pré-tratamento químico com NaOH, Ensaio EP2 - 23,50 g ms L <sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira <i>Musa cavendishii</i> submetido à despolimerização com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 120 °C, 30 min, com pré-tratamento químico com NaOH 1%.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plantas piloto em funcionamento até 2007 (SOLOMON <i>et al.</i> , 2007). .....	15
Tabela 2 - Plantas de demonstração até 2007 (SOLOMON <i>et al.</i> , 2007).....	15
Tabela 3 - Plantas comerciais ativas em 2010 de acordo com previsão de Sollomon <i>et al.</i> 2007. ....	16
Tabela 4 - Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina em massa seca de resíduos lignocelulósicos. ....	20
Tabela 5 - Composição percentual em massa seca dos resíduos da bananeira .....	20
Tabela 6 - Condições experimentais de concentração de ácido sulfúrico, temperatura e tempo de reação, empregadas na hidrólise ácida do pseudocaule da bananeira sem o uso da deslignificação prévia - Ensaio HA-P.....	36
Tabela 7– Condições experimentais de concentração de hidróxido de sódio, ácido sulfúrico, temperatura da hidrólise ácida (T) e tempo de reação (t), empregadas na despolimerização do pseudocaule da bananeira <i>Musa cavendishii</i> .....	37
Tabela 8– Enzimas e dosagem recomendadas e empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática do pseudocaule previamente deslignificado com NaOH.....	38
Tabela 9 – Propriedades físico-químicas do pseudocaule da bananeira <i>Musa cavendishii</i> .....	49
Tabela 10 - Concentração de açúcares totais (AT) e respectivos valores médios de rendimento em bases seca (R) obtidos na hidrólise ácida de 250 g mu L <sup>-1</sup> (11,75 g ms L <sup>-1</sup> ) de dois (Séries 1 e 2) pseudocaules da bananeira <i>Musa cavendishii</i> , sem a remoção do seu caldo natural.....	53
Tabela 11- Concentração de açúcares totais (AT) e respectivos valores de rendimento em base seca (R) obtidos na hidrólise ácida de 23,50 g ms L <sup>-1</sup> (500 g mu L <sup>-1</sup> ) de dois pseudocaules (Séries 1 e 2) da bananeira <i>Musa cavendishii</i> , sem a remoção do seu caldo natural.....	56
Tabela 12 – Valores médios de concentração de açúcares totais (AT), rendimento em base seca (R) e eficiência (ε) obtidos na hidrólise ácida de 23,50 g ms L <sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira <i>Musa Cavendishii</i> sem o caldo natural (fase líquida). ....	58
Tabela 13 – Concentrações de açúcares totais (AT) obtidos na despolimerização de 11,75 g ms L <sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira por hidrólise enzimática e respectivos valores de rendimento (R) e eficiência (ε) do processo hidrolítico. ....	60

Tabela 14 - Rendimentos em etanol ( $Y_{P/AT}$ ), produtividade ( $Q_P$ ) e eficiência do processo de fermentação ( $\epsilon$ ) observadas na fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* em meios de cultivo contendo glicose (Ensaio EG, ensaio padrão) ou pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* com diferentes concentrações do resíduo (Ensaio EP-1: 11,75 g ms L<sup>-1</sup>; Ensaio EP-2: 23,50 g ms L<sup>-1</sup>) e submetidos à despolimerização com ácido sulfúrico sem e com deslignificação prévia, respectivamente.....65

Tabela 15 – Tempo final de fermentação ( $t_f$ ), concentração inicial de açúcares totais ( $AT_0$ ), concentrações inicial ( $P_0$ ) e final ( $P_f$ ) de etanol e parâmetros produtivos de rendimento ( $Y_{P/AT}$ ), produtividade ( $Q_P$ ) e eficiência ( $\epsilon$ ) obtidos na fermentação do caldo puro do pseudocaule da bananeira por *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator de bancada.....66

Tabela 16 – Atividade enzimática e densidade ( $\rho$ ) das enzimas fornecidas pela Novozymes® e faixas de pH, temperatura (T) e dose recomendadas pela empresa. .81

Tabela 17- Concentração de sacarose (Scr), glicose (Glc), frutose (Frt) e açúcares totais (AT) contidos no pseudocaule úmido (500 g L<sup>-1</sup>) da bananeira *Musa cavendishii* após trituração em solução aquosa.....83

Tabela 18 - Concentração de sacarose (Scr), glicose (Glc), frutose (Frt) e açúcares totais (AT) contidos no caldo puro extraído do pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* por esmagamento. ....84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AT – Açúcares totais

$AT_0$  - Concentração de glicose, frutose e sacarose no início da fermentação

$AT_f$  - Concentração de glicose, frutose e sacarose no tempo final de fermentação

Atlas NAS - Atlas of Nutritional Data on United States and Canadian Feeds

CENBIO – Centro Nacional de Referência em Biomassa

CEPA - Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola

CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Biotecnologia do Bioetanol

CG - Cromatografia gasosa

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

E - Fermentação em francos Erlenmeyer

EF - Fermentação em biorreator

FAO – Organização das Nações Unidas Para a Agricultura e Alimentos

Frt - Frutose

Glc - Glicose

HA-P - Hidrólise ácida do pseudocaule

HE-P – Hidrolise enzimática do pseudocaule

HAHE-P - Hidrólise ácida + Hidrolise enzimática do pseudocaule

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LHW - Termo-hidrólise ( *Liquid Hot Water* )

MS – Massa seca de biomassa



MU – Massa úmida de biomassa

MCT - Ministério da Ciência e Tecnologia

ONU – Organização das Nações Unidas

P – Produto (etanol)

pH – Potencial hidrogeniônico

$P_f$  - Concentração de etanol no tempo final de fermentação

$P_0$  - Concentração de etanol no início do processo fermentativo

Proálcool - Programa Nacional do Álcool

$Q_P$  - Produtividade total em etanol de cada processo

R – Rendimento percentual em AT

RFA – Renewable Fuels Association

Scr - Sacarose

SSF – Sacarificação e fermentação simultâneas

$t_f$  - tempo final de fermentação

Única - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo

$Y_{P/AT}$  - Rendimento em etanol

$\varepsilon$  - Eficiência do processo fermentativo

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABELAS .....	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	IV
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO .....	3
2. OBJETIVOS .....	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos .....	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
3.1 Cultura da banana .....	7
3.2 Resíduos da bananicultura .....	10
3.2.1 Pseudocaule da bananeira .....	10
3.3 Etanol de segunda geração.....	12
3.4 Característica dos resíduos lignocelulósicos.....	16
3.5 Produção do etanol a partir de resíduos lignocelulósicos .....	21
3.5.1 Pré-tratamento físico dos resíduos lignocelulósicos .....	21
3.5.2 Pré-tratamentos químicos dos resíduos lignocelulósicos.....	23
3.5.3 Despolimerização da celulose (hidrólise) .....	25
3.5.4 Fermentação .....	28
3.5.4.1 Fermentação e sacarificação simultâneas – Processo SSF .....	31
4. MATERIAL E METODOS .....	32
4.1 Substrato de fermentação .....	33
4.1.1 Pré-tratamento físico.....	33
4.1.2 Tratamentos químicos e/ou enzimáticos .....	33
4.1.2.1 Deslignificação .....	34
4.1.2.2 Despolimerização por ácido.....	35
4.1.2.3 Despolimerização por enzimas .....	37
4.2 Ensaio de fermentação.....	39
4.2.1 Microrganismo.....	39

4.2.2 Meios de cultivo.....	39
4.2.3 Preparo de inóculo .....	40
4.2.4 Fermentação em frascos Erlenmeyer .....	40
4.2.4.1 Ensaio padrão - Ensaio EG .....	40
4.2.4.2 Ensaios com substrato lignocelulolítico – Ensaios EP .....	41
4.2.5 Fermentação em biorreator de bancada - Ensaio FC .....	41
4.3 Metodologia analítica.....	41
4.3.1 Umidade.....	42
4.3.2 Determinação da concentração de lignina, hemicelulose e celulose do pseudocaule da bananeira	42
4.3.2.1 Determinação da Fibra em detergente neutro (F.D.N) .....	43
4.3.2.2 Determinação da fibra em detergente ácido.....	43
4.3.2.3 Determinação da lignina .....	44
4.3.2.4 Determinação da celulose .....	44
4.3.3 Determinação da concentração de açúcares totais – AT.....	45
4.3.3.1 Em amostras hidrolisadas com ácido sulfúrico.....	45
4.3.3.2 Em amostras hidrolisadas com enzimas .....	45
4.4 Cálculos do rendimento em AT e eficiência do processo de despolimerização do pseudocaule.....	46
4.5 Cálculos dos parâmetros de produção.....	47
4.5.1 Produtividade .....	47
4.5.2 Rendimento em etanol - Fator de Conversão Global.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
5.1 Caracterização do pseudocaule da bananeira.....	49
5.2 Ensaios de despolimerização do pseudocaule.....	51
5.2.1 Hidrólise ácida .....	51
5.2.2 Hidrólise ácida com deslignificação prévia .....	57
5.2.3 Hidrólise enzimática .....	59
5.3 Ensaios de fermentação.....	62
5.3.1 Fermentações em frascos Erlenmeyer - Ensaios E .....	62
5.3.2 Fermentações em biorreator de bancada - Ensaio F .....	66

5.3.3 Comparando com a fermentação alcoólica de outras biomassas .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXO I.....	81
ANEXO II.....	82
ANEXO II.....	83
ANEXO III.....	84

## RESUMO

O desenvolvimento de métodos alternativos para o fornecimento de energia não oriunda de fontes fósseis tem sido o objetivo de diversas pesquisas científicas. Dentre as possíveis fontes destacam-se a solar, eólica, geotérmica e biomassa (recurso renovável oriundo de matéria orgânica ou resíduo lignocelulósico). Dentre os combustíveis produzidos utilizando a biomassa, se destaca o etanol que é produzido pela fermentação direta do caldo de cana-de-açúcar e por outro processo que esta sendo aprimorado e é classificado de 2<sup>a</sup> geração, onde o etanol é obtido da hidrólise dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos. A fermentação é uma técnica bem conhecida e dominada enquanto que a hidrólise dos lignocelulósicos possui uma série de gargalos que necessitam ser avaliados para sua melhor reprodução em escala industrial. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes processos de despolimerização do pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* e utilizar esta biomassa como substrato de fermentação alcoólica. Foram avaliados os métodos de despolimerização do substrato por ácido diluído (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% e 2%), por enzimas e por ácido e enzimas combinados, empregando duas concentrações de substrato: 11,75 g L<sup>-1</sup> e 23,50 g L<sup>-1</sup> de massa seca (ms). Nos processos isolados de hidrólise ácida e enzimática verificou-se a influência do pré-tratamento por NaOH 1 e 3%. A hidrólise ácida foi conduzida a 90, 100 e 120°C, com tempos de residência de 15 e 30 min. Para a hidrólise enzimática foram utilizadas enzimas comerciais Novozymes® com tempo de reação de 24 h, pH inicial 5,5 e temperatura de 45 °C. A maior eficiência na obtenção de açúcares fermentáveis (74,1±11,4%) foi alcançada com o emprego da hidrólise enzimática com pré-tratamento alcalino (NaOH 1%). Para a hidrólise ácida, a maior eficiência (49%) foi obtida empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, 120 °C, 30 min e substrato na concentração de 11,75 g ms L<sup>-1</sup>. A fermentação dos hidrolisados se mostrou satisfatória com eficiência acima de 70%.

## ABSTRACT

The development of alternative methods for the supply of energy other than fossil fuels has been the subject of several scientific studies. Among the possible sources, the following stand out: solar, wind, geothermic and biomass (renewable resource derived from organic matter or lignocellulosic waste). Standing out among the fuels produced using the biomass is ethanol, which is produced through direct fermentation of sugarcane juice and by another process which is being improved and can be classified as 2<sup>nd</sup> generation, where ethanol is obtained from hydrolysis of the polysaccharides found in lignocellulosic waste. Fermentation is a mastered and well known technique while that of hydrolysis of lignocellulosic biomass has a series of bottlenecks that need to be evaluated for efficient production on an industrial scale. The aim of this study was to evaluate different pseudostem depolymerization processes for the *Musa cavendishii* banana plant and use this biomass as an alcohol fermentation substrate. Substrate depolymerization methods were evaluated for dilute acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% and 2%), enzymes and acid and enzymes combined, using two substrate concentrations: 11.75 g L<sup>-1</sup> and 23.50 g L<sup>-1</sup> dry mass (dm). In the isolated processes of acid and enzymatic hydrolysis the influence of pretreatment by NaOH 1 and 3% was verified. The acid hydrolysis was conducted at 90, 100 and 120°C, with resident times of 15 and 30 min. Commercial Novozymes® enzymes were used for the enzymatic hydrolysis with a reaction time of 24 h, pH initial 5.5 and temperature of 45 °C. Highest fermentable sugar (74.1±11.4%) efficiency was reached using enzymatic hydrolysis with alkaline (NaOH 1%) pre-treatment. For the acid hydrolysis, the greatest efficiency (49%) was obtained using H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, 120 °C, 30 min and substrate in a concentration of 11.75 g ms L<sup>-1</sup>. Fermentation of hydrolysates was satisfactory with efficiency above 70%.

## INTRODUÇÃO

A geração e o fornecimento de energia é motivo de preocupação mundial. Diante da necessidade elevada de combustíveis, diversas pesquisas científicas têm apresentado objetivos similares tais como amenizar os impactos gerados pela diminuição futura no fornecimento de combustíveis fósseis e reduzir os impactos ambientais ocasionados por sua combustão.

Segundo Lora (2002), as fontes renováveis de energia (solar, eólica, geotérmica, biomassa, etc.), caracterizadas por impactos ambientais muito menores que o uso de combustíveis fósseis, são alternativas bastante atraentes para a produção energética.

Do ponto de vista energético, biomassa é todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica que pode ser utilizada na produção de energia. Assim como a energia hidráulica e outras fontes renováveis, a biomassa é uma forma indireta de energia solar. (LARSON *et al.*, 2001).

Dentre os combustíveis produzidos utilizando a biomassa, se destaca o etanol favorecido pela abundância de matéria-prima e alto desenvolvimento tecnológico dos processos convencionais. No Brasil, o etanol é produzido industrialmente em larga escala a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar. O país é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e classifica-se como um dos líderes mundiais na produção do combustível a partir desta biomassa (NASTARI, 2009).

De acordo com dados estatísticos da associação de indústrias produtoras de etanol (RFA, 2007) e do Balanço Nacional da Cana-de-açúcar e Agroenergia, elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2008), até o ano de 2005, o Brasil era o maior produtor mundial de etanol; mas o crescente interesse mundial no uso do biocombustível como aditivo da gasolina motivou um aumento da produção pelos Estados Unidos. Em 2006, os EUA produziram 18,37 milhões de m<sup>3</sup> de etanol, enquanto a produção brasileira foi de 15,81 milhões de m<sup>3</sup>. Em 2009, a produção de etanol dos Estados Unidos atingiu 40,1 milhões de m<sup>3</sup> e do Brasil 27,5 milhões de m<sup>3</sup>, de acordo com dados da safra 2008-2009 (BRASIL, 2009).

O setor industrial sucroalcooleiro, devido às suas modernizações em processos e equipamentos, apresenta projetos que visam o aproveitamento da biomassa residual

da extração do caldo da cana utilizado na fermentação. Exemplos disto é o uso do bagaço da cana-de-açúcar como biomassa na cogeração de energia térmica através da sua queima e geração de vapor (SÁNCHEZ, 2003), na gaseificação para geração de energia elétrica (LARSON, 2001) e na obtenção de etanol de segunda geração (BAUDEL, 2007).

Entende-se como etanol de segunda geração o produto da fermentação de açúcares obtido após o tratamento de polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica, com vantagens ambientais e econômicas proporcionadas pela utilização de resíduos sem valor econômico para seu uso direto e com potencial de poluição pela sua degradação no meio-ambiente, assim proporcionando uma destinação correta e agregando valor para tais resíduos. Atualmente o tratamento dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) da biomassa é realizado pela hidrólise ácida ou enzimática, tecnologias ainda em fase de aperfeiçoamento. (BAUDEL, 2007).

O uso de resíduos lignocelulósicos como substrato de fermentação requer a sua disponibilidade em abundância e, estrategicamente, ser de baixo custo de aquisição e de transporte.

Na região nordeste de Santa Catarina, vislumbra-se a possibilidade do uso dos resíduos provenientes da cultura da banana. É importante ressaltar que o interesse nesta biomassa disponível não é direcionado aos frutos (alimento) e sim aos resíduos lignocelulósicos compostos por pseudocaule, folhas e cascas. Além de permitir a redução da poluição ambiental e ao mesmo tempo agregar valor à cultura da banana através da geração de energia renovável, o aproveitamento destes resíduos poderá transforma-los numa verdadeira commodity.

Destaca-se como potencial fonte de biomassa lignocelulósica o pseudocaule da bananeira tendo em vista que este representa até 75% dos resíduos da bananicultura, incentivando assim as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento do setor de produção de etanol em Santa Catarina que atualmente não apresenta volume industrial registrado (UNICA, 2011), favorecer a diversificação na utilização de outras fontes de biomassa e incluir na lista de biomassas os resíduos da bananicultura tendo em vista que esta cultura esta disseminada por todo o país.

Diante de um processo ainda em desenvolvimento que é a produção de etanol de segunda geração, independente da biomassa utilizada, pesquisas intensivas se fazem necessárias para caracterizar o material proposto a ponto de desenvolver a



melhor rota de tratamento deste e proporcionar um melhor rendimento de polissacarídeos e minimizar os custos decorrentes do processo (CTBE, 2009).

Em 2008, o grupo de pesquisa Fontes Alternativas de Energia da Univille iniciou projeto de pesquisa com objetivo de avaliar a potencialidade do uso desses resíduos como substrato de fermentação, visando a produção de etanol e/ou biogás. O objetivo deste trabalho é contribuir com o desenvolvimento dos estudos relacionados à fermentação alcoólica avaliando a influência de diferentes processos de tratamento do pseudocaule na conversão da sua celulose em açúcares fermentescíveis, sem contudo inibir o processo de fermentação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estabelecer as condições operacionais de hidrólise para o uso do pseudocaule da bananeira como substrato da fermentação alcoólica.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Determinar o rendimento da conversão de biomassa de pseudocaule em açúcares fermentescíveis (despolimerização) empregando a hidrólise ácida e/ou enzimática.
2. Avaliar o efeito da deslignificação alcalina prévia do substrato sobre o rendimento da despolimerização.
3. Estimar os parâmetros de rendimento, produtividade e de eficiência do processo de fermentação em relação ao produto (etanol) obtido.
4. Avaliar o processo global de fermentação do caldo hidrolisado obtido perante aos possíveis inibidores formados durante a despolimerização do substrato.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cultura da banana

Conforme Fioravanço (2003), a banana é uma das frutas mais importantes do mundo, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização. Para muitos países, além de ser um alimento complementar da dieta da população, a banana apresenta grande relevância social e econômica, servindo como fonte de renda para muitas famílias de agricultores, gerando postos de trabalho no campo e na cidade e contribuindo para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção. Para outros países, a banana é um produto de exportação responsável por uma parte muito significativa dos ingressos relativos à exportação agrícola.

De acordo com a Organização de Alimentos e Agricultura dos Estados Unidos (FAO, 2011) a produção mundial de bananas em 2009 foi de 97,4 milhões de toneladas, sendo a Índia o líder mundial, com produção aproximada de 26,9 milhões de toneladas. Neste mesmo ano, o Brasil registrou uma produção de 6,8 milhões de toneladas totalizando 6,9% da oferta mundial, sendo o quarto país no *ranking*.

A cultura da banana está distribuída por todo território nacional participando com significativa importância na economia de diversos estados brasileiros. O Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, divulgado pelo IBGE no mês de maio de 2011 ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)) mostra que o Estado de Santa Catarina foi o terceiro maior produtor nacional em 2009, responsável por 9,2 % da produção do País. Os estados que mais produziram no mesmo ano foram São Paulo com 18,5% e Bahia com 15,0%.

Segundo o Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola de Santa Catarina (CEPA, 2011), as principais espécies de bananeiras cultivadas no estado de Santa Catarina são a *Musa sapientum* e *Musa cavendishii*, produtoras das bananas branca e nanica, respectivamente ([www.cepa.epagri.sc.gov.br](http://www.cepa.epagri.sc.gov.br)).

Ainda de acordo com o CEPA (2011), em Santa Catarina, a bananeira é uma das principais frutíferas cultivadas, ficando atrás apenas da cultura da maçã. Mais de 25 mil produtores rurais exploram a cultura da banana no Estado em cerca de 5000

estabelecimentos agrícolas. Esta atividade, desenvolvida por produtores rurais familiares os quais, em sua maioria, cultivando áreas inferiores a 10 hectares é, sem dúvida, fator de grande importância social para o Estado de Santa Catarina.

Quanto ao desempenho da safra por microrregião geográfica, merece destaque a microrregião de Joinville (Figura 1) sendo responsável por 55,0% do volume total produzido, seguida pelas microrregiões de Blumenau e Itajaí, que produziram, respectivamente, 19,1% e 15,4% do total estadual. A soma dessas microrregiões perfaz 89,5% de participação em relação ao volume total estadual de banana que foi de 624,2 mil toneladas na Safra 2008 (CEPA, 2008).

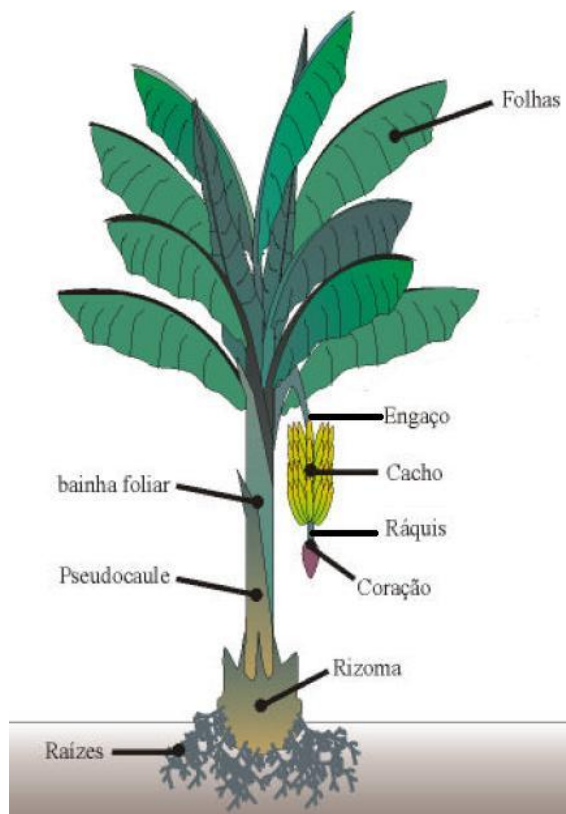


**Figura 1** - Microrregião de Joinville produtora de banana em Santa Catarina.  
Fonte: BANANACATRINENSE (2011)

A bananeira é um vegetal herbáceo completo que pertence à divisão *Angiospermae*, classe *Monocotyledoneae* e família *Musaceae*. Essa família é constituída por dois gêneros: o que apresenta bananas comestíveis denominado de *Musa*, com 35 espécies e o que apresenta bananas silvestres, não comestíveis,

denominado de *Ensete*, com 7 espécies (CRONQUIST, 1981<sup>1</sup> e ROCHELLE *et al.*, 1991<sup>2</sup> *apud* MEDEIROS, 2007).

Basicamente, a bananeira (Figura 2) é constituída por raiz, rizoma, pseudocaule, bainha foliar, folhas e cacho. O cacho é composto pelas partes: engaço, ráquis, pencas de bananas e botão floral ou “coração” (Portal São Francisco, 2009).



**Figura 2** - Bananeira e suas partes

Fonte: SOFFNER, 2001

<sup>1</sup> CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

<sup>2</sup> ROCHELLE, L. A. ; RODRIGUES, R. R.; CAPELLARI JUNIOR. Famílias de Plantas Fanerogâmicas de Interesse Econômico. Piracicaba: Esalq/Usp, 1988 (Apostilas).

## **3.2 Resíduos da bananicultura**

Após a colheita da banana, três tipos de resíduos vegetais são gerados: pseudocaule, folhas e engaço. Com a industrialização da fruta, dois novos resíduos são produzidos: rejeitos de frutas de má qualidade e descarte de cascas devido ao beneficiamento da polpa.

De acordo com dados levantados em uma empresa de alimentos situada no município de Garuva-SC, para cada tonelada de bananas colhidas, 100 kg do fruto são rejeitados e aproximadamente 4 t de resíduos lignocelulósicos são gerados, sendo 3 t de pseudocaule, 160 kg de engaços, 480 kg de folhas e 440 kg de cascas. Considerando esta informação e estendendo para a produção da safra de 2008 em Santa Catarina que foi de 624.205 t (CEPA, 2008), é possível estimar que foram gerados aproximadamente 1.872.615 t de resíduos de pseudocaule, 62.420 t de fruto rejeitado, 99.873 t de engaços, 299.618 t de folhas e 274.650 t de cascas.

Normalmente, com exceção às bananas rejeitadas e uma parte das cascas que são destinadas à alimentação de suínos, esses resíduos permanecem no campo para decomposição natural.

A prática de manter o pseudocaule e as folhas no campo é justificada pelos agricultores em função desse material formar uma cobertura morta para manter a umidade e evitar a erosão do solo, controlar plantas daninhas e devolver nutrientes ao solo, reduzindo assim custos de adubação (BAKRY *et al.*, 1997).

No entanto, essa opção de espalhar material orgânico no campo favorece a geração de gás metano e dióxido de carbono pela degradação das matérias orgânicas através da ação de bactérias específicas normalmente encontradas na natureza, podendo causar problemas ambientais (ZHANG *et al.*, 2005).

### **3.2.1 Pseudocaule da bananeira**

De acordo com Soffner (2001) e Cordeiro *et al.* (2004), a utilização do pseudocaule de bananeira para obtenção de fibras “técnicas” ou “comerciais” com

averiguação da viabilidade destas na produção de polpa celulósica são objetivos de muitos pesquisadores.

Espécies de bananeira como a *M. textiles*, conhecida como abacá ou bananeira-de-corda, são cultivadas especialmente para a produção de fibras têxteis a partir de seu pseudocaule. Essas fibras são utilizadas na manufatura de tecidos para roupas em geral e produtos artesanais como bolsas, sacolas e chapéus (MEDINA, 1959; HIROCE, 1972; JARMAN *et al.* 1997, SOFFNER *et al.* 1998).

De acordo com Jarman *et al.* (1997), o pseudocaule da bananeira é constituído de feixes fibrosos com comprimentos relacionados ao comprimento do pseudocaule e representa de 1-1,5% da composição. Os outros constituintes são substâncias mucilaginosas (4 a 8%) e água (90 a 96%).

Além do elevado teor de umidade, Silva (1998) e Cordeiro *et al.* (2004) verificaram um elevado teor de extrativos para o pseudocaule de bananeira: 14,1% de extrativos (em base seca) em solvente água-álcool-tolueno para pseudocaules de *M. acuminata*.

O aproveitamento desse resíduo como insumo na produção de um bem ou a sua transformação em *commodity*, além de permitir a redução da poluição ambiental, pode possibilitar agregar valor à cultura da banana que tem enfrentado nos últimos anos grandes desafios gerados pela oscilação do produto no mercado nacional.

Numa análise dos dados disponibilizados por CEPA (2009) pode-se verificar que, em relação à banana nanica (a mais importante por se tratar da exploração dominante, com cerca de 85% da área cultivada no Estado), durante o período de 2000 a 2009 (até junho), houve uma maior desvalorização da fruta nos anos de 2002 e 2005, registrando em 2005 a sua menor cotação devido à ocorrência da Sigatoka Negra (doença que ataca as folhas, reduzindo a área fotossintética da planta). Oscilações no preço do produto no mercado são comuns em todas as culturas de frutas; no entanto, esse tipo de comportamento, quando conduz a prejuízos ao setor, tem obrigado aos produtores a busca por novas alternativas para agregar valor à cultura, reduzindo assim as suas perdas econômicas.

Entre as possibilidades de aproveitamento do pseudocaule da bananeira, a utilização como biomassa na geração de etanol de 2ª geração pode ser uma boa alternativa.

### 3.3 Etanol de segunda geração

Entende-se por etanol de 2<sup>a</sup> geração o produto obtido da hidrólise dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos, transformando estes em açúcares e a fermentação destes em etanol. A fermentação é um processo bem conhecido e dominado enquanto que a hidrólise possui uma série de gargalos que necessitam ser avaliados para sua melhor reprodução em escala industrial.

A hidrólise pode ser realizada por processos que utilizam ácidos, bases, solventes orgânicos ou enzimas. Dentre estes, a rota enzimática tem sido amplamente estudada nos últimos anos visando obter o máximo da sua potencialidade em proporcionar maiores rendimentos (por ser realizado à pressão ambiente e temperaturas moderadas de 50 a 60 °C) e não formar subprodutos indesejáveis. Porém, fatores como o alto custo das enzimas e processos em fase de desenvolvimento resultam na baixa produtividade e dificuldade em se atingir os rendimentos esperados atualmente têm se mostrado importantes desafios científicos para o sucesso comercial da técnica (CTBE, 2009)

Segundo Alfred Szwarc, consultor de emissões e tecnologia da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2008), nos últimos anos, vem se observando no mundo, um grande interesse pela utilização de resíduos lignocelulolíticos na obtenção de etanol. Isso está claramente definido na atual “Lei da Energia” norte-americana, que estabelece limites para o uso de etanol produzido de milho com tecnologia convencional (estabilização da produção em 57 bilhões de litros, a partir de 2015). Para complementar a oferta de etanol, essa lei prevê a introdução gradual no mercado americano do etanol produzido com “tecnologias avançadas” (etanol de cana-de-açúcar poderá se qualificar para esse segmento de mercado, iniciando com 400 milhões de litros em 2009 e crescendo para 15 bilhões de litros em 2022); e com “tecnologias de segunda geração” (iniciando com 1 bilhão de litros em 2011 e crescendo para 61 bilhões de litros em 2022). Nos EUA, o governo federal e empresas de capital de risco têm irrigado as pesquisas científicas com centenas de milhões de dólares. Outros centros avançados de pesquisas localizados no Canadá, Japão e nos países nórdicos também vêm conduzindo programas de pesquisa nessa área.



No Brasil, apesar dos investimentos serem mais modestos, há importantes iniciativas em curso como as do Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT). O Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), construído em Campinas/SP pelo MCT têm entre os seus objetivos a pesquisa, desenvolvimento e inovação (PDeI) na área de etanol de segunda geração de cana. Esse centro disponibiliza sua infraestrutura para que universidades e institutos de pesquisa públicos e privados desenvolvam projetos relacionados à sua missão e dispõe de tecnologias e informações estratégicas para a indústria, mediante cooperações de interesse comum.

No panorama nacional destaca-se a proposta da Novozymes que promete em 2012 apresentar após 12 anos de pesquisa uma nova enzima a custos viáveis, resultado de uma parceria formada com o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Petrobras e com a fabricante de equipamentos Dedini (BRASILAGRO 2011).

O Brasil apresenta uma grande vantagem competitiva em relação a outros países que buscam essa tecnologia: o baixo custo e a fácil disponibilidade de grandes quantidades de matéria-prima.

A possibilidade de uso do bagaço e da palha da cana-de-açúcar nos novos processos de 2ª geração é um fato que destaca mais uma vez o Brasil de seus concorrentes e tem despertado o interesse de diversos grupos internacionais na produção deste combustível no país. Projeções existentes indicam que processos de hidrólise poderiam produzir cerca de 300 litros de etanol por tonelada de bagaço seco, aumentando o rendimento de produção de etanol por hectare em até 100%, dependendo da quantidade de matéria-prima direcionada para o processo e da eficiência do mesmo (UNICA, 2008).

A disposição mundial para o desenvolvimento do processo de produção de etanol de 2ª geração aponta para uma alternativa futura da estabilização do consumo das matérias-primas atualmente empregadas (cana-de-açúcar no Brasil, milho nos EUA e beterraba na Comunidade Europeia). Com isto, ameniza-se o clima nos debates sobre a possível competição entre combustíveis e alimentos.

Segundo Ramos (2008), no Brasil existe uma vasta biodiversidade e assim, uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais que podem ser bioprocessados para trazer benefícios sócio-econômicos. Exemplos desses resíduos são os derivados de atividades das indústrias de papel e celulose (cavacos de eucalipto e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana) e, de um

modo geral, unidades de produção agrícola (palhas de cereais, sabugo de milho, cascas de arroz, etc.).

A produção comercial de etanol pela fermentação de materiais lignocelulósicos é uma alternativa conhecida desde o final do século XIX, mas a busca de menores custos de produção, necessários para a competição no mercado de combustíveis, é uma proposta relativamente nova e com uma abordagem maior durante os últimos vinte anos (MACEDO,2005<sup>3</sup> *apud* SEABRA, 2008).

Segundo Sollomon (2007), até 2007 não existia em funcionamento no mundo planta comercial para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos, apenas plantas pilotos (Tabela 1) e de demonstração (Tabela 2).

---

<sup>3</sup> MACEDO, I.C, Biomass as a Source of Energy. Report prepared for the inter Academy Council study on “Transitions to Sustainable Energy Systems”September 2005.

Tabela 1- Plantas piloto em funcionamento até 2007 (SOLOMON *et al.*, 2007).

<b>Companhia</b>	<b>Local</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Capacidade</b>	<b>Início</b>
Iogen	Ottwa, Canadá	Cavaco de madeira	900 kg/dia	1985
Iogen	Ottwa, Canadá	Palha de trigo	900 kg/dia	1993
Masada/TVA	Muscle Shoals, EUA	Madeira	ND	1993
SunOpta	Norval, Canadá	Vários (não-madeira)	450 kg/dia	1995
Arkenol	Orange, EUA	Vários	900 kg/dia	1995
Bioengineering Resources	Fayetteville	Madeira mole e casca de árvore	ND	1998
NREL/DOE	Golden, EUA	Palha de milho, outros	900 kg/dia	2001
Pearson Technologies	Abardeen, EUA	Resíduos de madeira, palha de arroz	27 Mg/dia	2001
NEDO	Izumi, Japão	Cavaco de madeira	300 L/dia	2002
Dedini	Pirassununga, Brasil	Bagaço	1.600 m <sup>3</sup> /ano	2002
Tsukishima Kikai Co.	Ichikawa, Chiba, Japão	Resíduos de madeira	900 kg/dia	2003
Etek EtanolTeknik	Ornskoldsvik, Suécia	Serragem de abeto	5000 L/dia	2004
Pure Vision	Ft. Lupton, Eua	Palha de milho, bagaço	90 kg/dia	2004
Universal Entech	Phoenix, EUA	Lixo municipal	100 L/dia	2004
Sicco A/S	Odense, Dinamarca	Palha de trigo	100 kg/h	2005
Abengoa Bioenergy	York, EUA	Palha de milho <sup>a</sup>	2000 m <sup>3</sup> /ano	2006

<sup>a</sup> Em conjunto com uma planta de etanol e grãos

Tabela 2 - Plantas de demonstração até 2007 (SOLOMON *et al.*, 2007).

<b>Companhia</b>	<b>Local</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Capacidade</b>	<b>Início</b>
Iogen	Ottwa, Canadá	Palha de trigo, aveia e cevada	3000 m <sup>3</sup> /ano	2004
Clear Fuels Technology	Kauai, EUA	Bagaço e resíduos de madeira	11400 m <sup>3</sup> /ano	2007
Celunol	Jennings, EUA	Bagaço e casca de arroz <sup>a</sup>	5000 m <sup>3</sup> /ano	2007

<sup>a</sup> Em conjunto com uma planta de etanol e grãos

Em 2010, conforme Sollomon *et al.*, 2007, diversas plantas comerciais já estariam em funcionamento ou em fase final de instalação, das plantas destacadas na Tabela 3 é apresentado algumas unidades ativas em 2010.

Tabela 3 - Plantas comerciais ativas em 2010 de acordo com previsão de Sollomon *et al.* 2007.

<b>Companhia</b>	<b>Local</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Capacidade</b>	<b>Início</b>
Bioethanol Japan Kansai	Sakai, Japão	Resíduos de madeira de construção	1.400-4.000 m <sup>3</sup> /ano	2007
Abengoa Bioenergy e SunOpta	Babilafuente, Espanha	Palha de trigo <sup>a</sup>	5.000 m <sup>3</sup> /ano	2007
Xethanol e Spring Hope	Spring Hope, EUA	Cavaco de madeira dura, resíduos de madeira, outros	130.000 m <sup>3</sup> /ano	2007
Biofuels Xethanol e Coastal	Augusta, EUA	Resíduos de madeira, outros	190.000 m <sup>3</sup> /ano	2007
Dedini	Brasil	Bagaço	20.000 m <sup>3</sup> /ano	2007
Colusa Biomass Energy	Colusa, EUA	Palha e casca de arroz, palha de milho	38.000 m <sup>3</sup> /ano	2007
Future Fuels	Toms River, EUA	Resíduos de madeira, outros	200.000 m <sup>3</sup> /ano	2008
Genahol	Orrville, EUA	Lixo municipal	15.000 m <sup>3</sup> /ano	2008
Pencor-Masada OxyNol	Middletown, EUA	Lixo municipal	34.000 m <sup>3</sup> /ano	2008
Etek EtanolTeknik	Suécia	Resíduos de madeira mole (pinho e abeto)	30000 m <sup>3</sup> /ano	2009

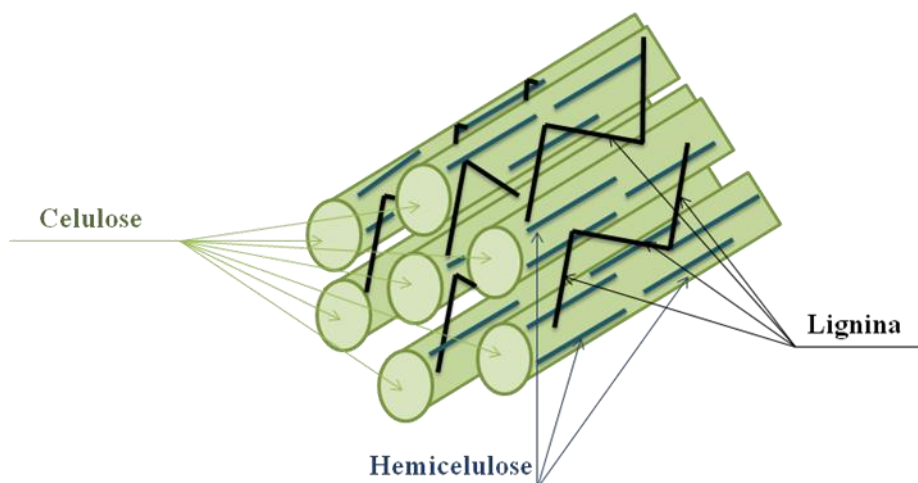
<sup>a</sup> Em conjunto com uma planta de etanol e grãos

### 3.4 Característica dos resíduos lignocelulósicos

Resíduos lignocelulósicos são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa de planta (BADHAN *et al.* 2007).

Essa biomassa apresenta em sua composição básica alguns componentes-chaves, tais como, celulose, hemicelulose e lignina os quais consistem de vários carboidratos polimerizados (YU *et al.*, 2008).

De acordo com Jayaraman (2003), as fibras vegetais podem ser consideradas compósitos de fibras de celulose mantidas coesas por uma matriz constituída de lignina e hemicelulose, cuja função é agir como barreira natural à degradação microbiana e servir como proteção mecânica (Figura 3). Suas características estruturais estão relacionadas à natureza da celulose e à sua cristalinidade. Entende-se por cristalinidade o grau de ordenação das cadeias de celulose e influenciam diretamente nas características de resistência mecânica das plantas (SILVA, 2009).

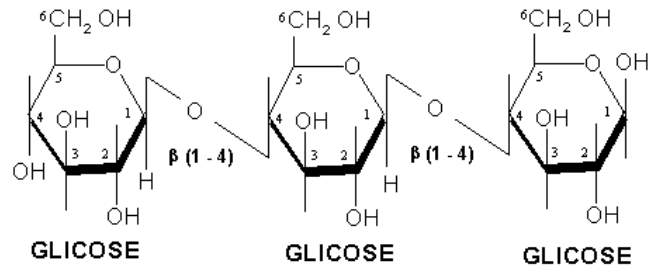


**Figura 3** - Estrutura de uma fibra vegetal

Fonte: do Autor

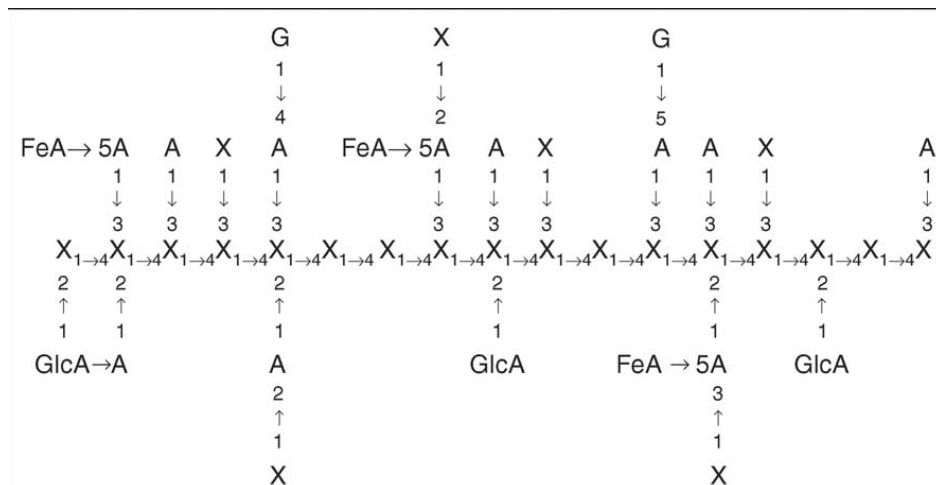
Segundo Dekker (1985), as percentagens desses componentes na maioria das fibras vegetais podem variar de 40 a 50% para a celulose, 15 a 30% para a hemicelulose e 10 a 30% para a lignina.

Conforme Araújo *et al.* (2008), a celulose é o material orgânico mais abundante na terra, com uma produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas. A celulose é um polímero linear do dímero celobiose (Figura 4) e sua hidrólise gera glicose. A hidrólise pode ser catalisada por ácidos concentrados ou não e também por enzimas (celulases).



**Figura 4** - Representação da estrutura molecular da celulose.  
 Fonte: (Wikipedia., 2009)

A hemicelulose (Figura 5) é constituída basicamente por pentoses, com uma cadeia principal de xilose e várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico entre outros.

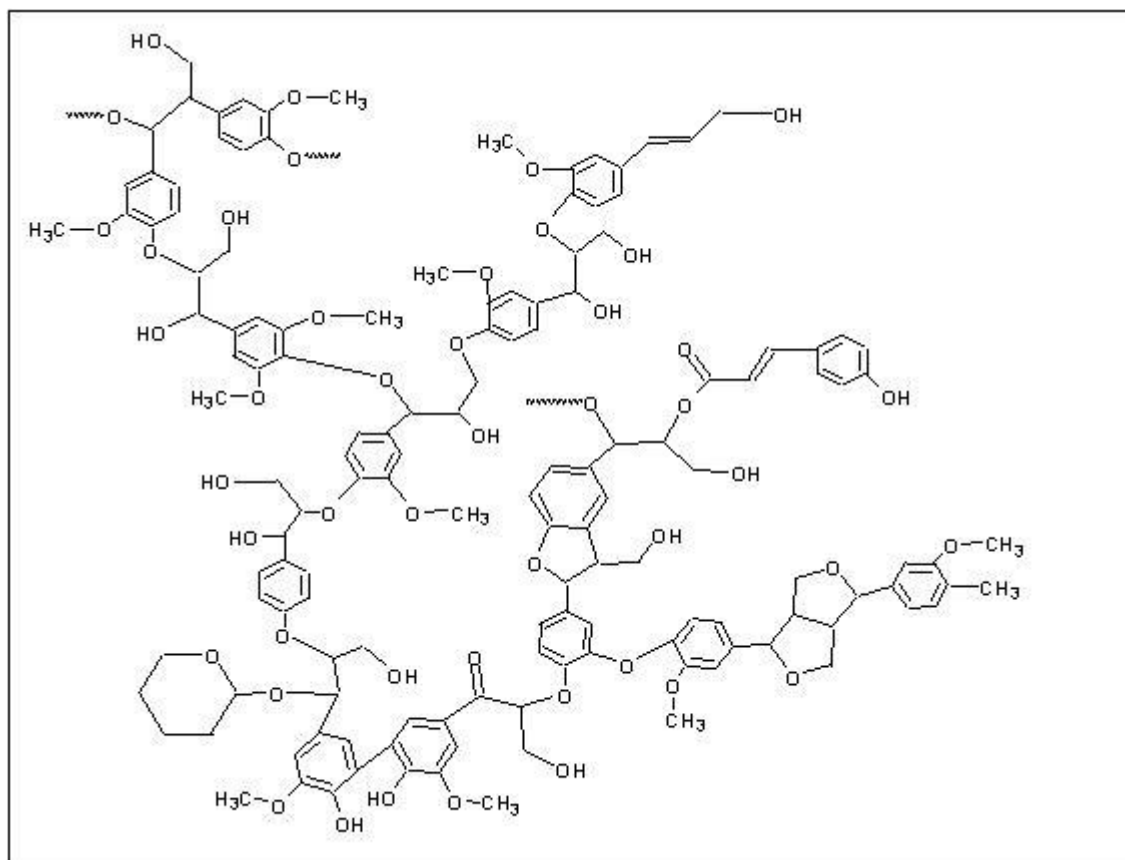


**Figura 5** - Representação esquemática da hemicelulose. A: arabinose; FeA: Ácido Ferúlico; G:galactose; Glc: Ácido Glicurônico; X: xilose.  
 Fonte: (GRAY *et al.*, 2006)

A hidrólise da hemicelulose é mais fácil se comparada com a celulose, mas a fermentação de açúcares de cinco carbonos ainda não é tão desenvolvida quanto à da glicose, isto se deve principalmente ao seu baixo rendimento em etanol, geralmente atribuído à co-produção de xilitol e ácido acético e à baixa tolerância dos microorganismos ao produto gerado (GRAY *et al.*, 2006).

Diferentemente da celulose e hemicelulose que têm estruturas bem definidas e conhecidas, as ligninas ( Figura 6) são biopolímeros tri-dimensionais amorfos com

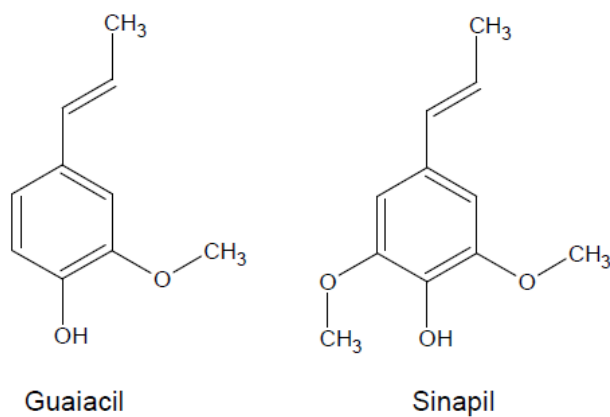
uma estrutura molecular complexa e variável que depende da espécie vegetal, localização, idade da planta, estação do ano, etc.



**Figura 6**-Estrutura geral da lignina

Fonte: (Wikipedia., 2009)

As ligninas são constituídas basicamente por duas unidades básicas guaiacil e sinapil, apresentadas na Figura 7.



**Figura 7**-Unidades básicas das ligninas.

Fonte: Centro Virtual de Desenvolvimento de Compósitos Biodegradáveis (2010)

Diversos trabalhos científicos caracterizaram inúmeros tipos de resíduos lignocelulósicos por diferentes objetivos e seus resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina em massa seca de resíduos lignocelulósicos.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Madeira de Oliveira	31,4	15,8	18,8	Cara <i>et al.</i> (2008)
Bagaço de Cana	54,87	16,52	23,33	Guimarães <i>et al.</i> (2009)
Fibra de Milho	14,28	16,8	8,4	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Madeira de Pinho	46,4	8,8	29,4	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Milho	37,5	22,4	17,6	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Palha de trigo	38,2	21,2	23,4	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Papel de Escritório	68,6	12,4	11,3	Mosier <i>et al.</i> (2005)
Casca de abacaxi	19,8	11,7		Bardiaya <i>et al.</i> (1996)

Em relação à composição química dos resíduos da bananeira, Oliveira *et al.* (2007) analisaram a composição química de diversas partes da bananeira *M. Dwarf Cavendish*, inclusive o pseudocaule. Bardiaya *et al.* (1996), avaliaram as cascas de banana enquanto que Cordeiro *et al.* (2004) e Guimarães *et al.* (2009) analisaram exclusivamente o pseudocaule e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição percentual em massa seca dos resíduos da bananeira

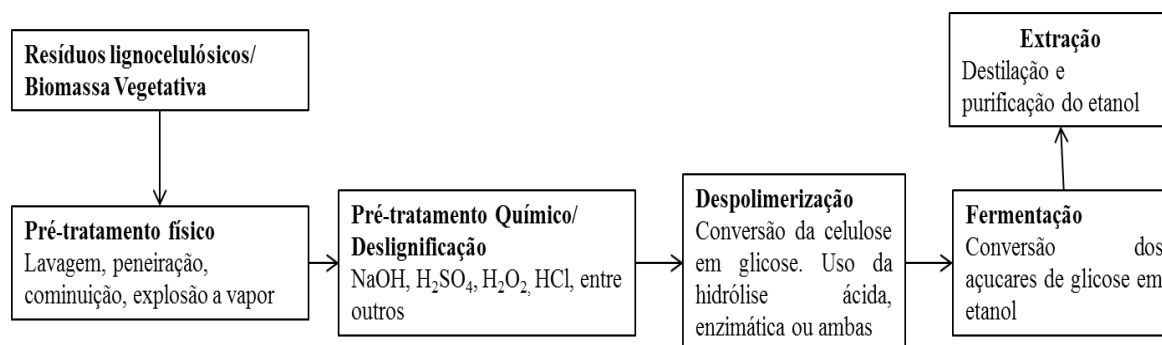
Partes da Bananeira	Celulose %	Hemicelulose %	Lignina %	Fonte
Nevura das Folhas	39,5	23,2	18	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
Casca da banana	11,11	5,36		Bardiaya <i>et al.</i> (1996)
Engaço	28,4	9,5	10,5	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
Engaço	33,34	11,12	8,79	Soffner (2001)
Folhas	20,7	11,4	24,3	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
Pseudocaule				
<i>Musa cavendishii</i>	37,1	12,6	13,3	Oliveira <i>et al.</i> (2007)
Pseudocaule				
<i>Musa acuminata</i>	34,5	25,6	12	Cordeiro <i>et al.</i> (2004)
Pseudocaule				
<i>Musa sapientum</i>	50,15	0,77	17,74	Guimarães <i>et al.</i> (2009)



A maioria dessas pesquisas não apresentou em suas metodologias as considerações relativas à localização da plantação, espécie, tamanho da planta, tipo de solo, condições climáticas, idade de planta e outros parâmetros que podem favorecer a diferenciação entre amostras de uma mesma espécie de planta. Esta situação já foi observada por Rowell *et al.* (2000) e por Satyanarayana *et al.* (2007).

### 3.5 Produção do etanol a partir de resíduos lignocelulósicos

O processo de produção de etanol que utiliza materiais lignocelulósicos (biomassa) como substrato pode ser resumido basicamente em cinco etapas operacionais (Figura 8): pré-tratamento físico, pré-tratamento químico (deslignificação), despolimerização, fermentação e extração/purificação do etanol.



**Figura 8** - Fluxograma operacional simplificado para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos.

Fonte: do autor

#### 3.5.1 Pré-tratamento físico dos resíduos lignocelulósicos

De acordo com Baudel (2007), o processo de produção de etanol de 2ª geração a partir de resíduos lignocelulósicos demanda a transformação da celulose e hemiceluloses em seus respectivos monômeros (glicose e xilose) e subsequente

conversão dos mesmos pelos microrganismos em etanol. Entretanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignina-carboidrato, de modo que a celulose torna-se muito resistente à ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão da celulose em glicose. Portanto, torna-se necessário realizar um pré-tratamento da biomassa de modo a incrementar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos.

Entre esses pré-tratamentos, os mais simples são a trituração e a secagem do substrato, conforme empregados por Inoue *et al.* (2005), Yat *et al.* (2008) e Cara *et al.* (2007), entre outros. Esses tipos de processos, assim como os de lavagem, peneiração e explosão a vapor visam facilitar o acesso do agente hidrolítico na conversão dos polímeros em seus monômeros (despolimerização).

O uso do pré-tratamento da biomassa depende do tipo de substrato empregado. Normalmente, esta operação é utilizada para alterar a estrutura física do material permitindo assim um melhor rendimento das operações de deslignificação e/ou hidrólise. Exemplo disto é a explosão a vapor (*steam exploded*) empregada por vários autores no pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar (DAWSON e BOOPATH, 2007; ROSSELL, 2007) e de cavacos de madeira (SASSNER *et al.*, 2007; SÖDERSTRÖM *et al.*, 2003). Outro exemplo é o processo denominado *Termo-hidrólise (LHW – Liquid Hot Water)*, o qual utiliza água quente em pressões acima do ponto de saturação para hidrolisar a hemicelulose. Em ambos os processos não se costuma utilizar catalisadores químicos o que pode torná-los economicamente interessantes e ambientalmente atrativos (HAMELINCK *et al.*, 2005).

A explosão a vapor dos resíduos lignocelulósicos é um processo largamente utilizado e proporciona um aumento considerável da área superficial da celulose aumentando a susceptibilidade à etapa de despolimerização. É considerado um método alternativo de polpação de madeiras duras (folhosas), de madeiras moles (coníferas) e de gramíneas, como o bagaço de cana (KAAR *et al.* 1998)

O processo denominado *Termo-hidrólise (LHW – Liquid Hot Water)* utiliza água quente em pressões acima do ponto de saturação para hidrolisar a hemicelulose. Neste processo não se utiliza catalisadores químicos (HAMELINCK *et al.*, 2005). Segundo Mosier *et al.* (2005), no processo LHW o contato da biomassa com a água líquida pressurizada pode ser de até 15 min em temperaturas que variam de 200 a

230°C. O processo pode dissolver até 60% da biomassa com remoção de 4-22% da celulose, 35-60% da lignina e toda a hemicelulose.

### **3.5.2 Pré-tratamentos químicos dos resíduos lignocelulósicos**

Os pré-tratamentos químicos são baseados na hidrólise e fragmentação das ligninas e da hemicelulose e visam proporcionar aos resíduos lignocelulósicos uma maior eficiência da reação de hidrólise da celulose tanto pela remoção dessas substâncias interferentes quanto pelo aumento da porosidade do substrato (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

Diferentes técnicas de tratamentos químicos visando a deslignificação têm sido propostas (SÁNCHEZ & CARDONA, 2008; OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2009; PARAJO et al., 1998; TAHERZADEH & KARIMI, 2007) para utilização de resíduos lignocelulósicos como matéria-prima na obtenção de produtos.

A deslignificação tem como objetivo a extração da lignina presente na biomassa através da sua solubilização no meio líquido, de maneira que a celulose e a hemicelulose possam ser hidrolisadas com maiores rendimentos em seus açúcares fermentáveis hexoses e pentoses, respectivamente (HAMELINK *et al.* 2005).

Dependendo do tipo de biomassa empregada, a remoção adequada da lignina tem sido apontada como imprescindível na obtenção de etanol economicamente viável. A escolha do processo ideal pode favorecer tanto uma alta taxa de extração de lignina e hemicelulose como evitar a perda de celulose pela sua degradação prévia. A parte sólida constituída por celulose e, normalmente, um residual de lignina e de hemicelulose, segue para a etapa de obtenção da glicose.

É importante observar que condições muito severas na deslignificação ou remoção da hemicelulose podem também favorecer a uma maior produção de inibidores dos processos subsequentes. De acordo com Del Campo *et al.* (2006), ao se utilizar a hidrólise ácida, dependendo das condições operacionais empregadas, pode haver a formação de furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) a partir da pentose e hexose presentes no meio, respectivamente. Esses compostos são tóxicos e inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação alcoólica.

Conforme Hamelink *et al.* (2005), a deslignificação com hidrólise catalisada por álcalis como NaOH ou Ca(OH)<sub>2</sub> é um processo interessante do ponto de vista que a remoção da lignina é quase que total juntamente com a hemicelulose e os custos relativos com equipamentos são menores. Com a remoção da lignina e parte da hemicelulose a reatividade da celulose na etapa de sacarificação é aumentada e os custos dos reatores são menores se comparado com os processos que utiliza ácido.

Muito difundido pelas indústrias de papel e celulose, o processo Organosolv que utiliza solventes orgânicos (etanol, metanol) associados com água e às vezes com um catalisador ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl), é apontado por Hernandez (2007) como uma outra possibilidade da deslignificação e remoção da hemicelulose. De acordo com o autor, a volatilidade do solvente utilizado nesse processo facilita a sua recuperação por destilação e resulta em um menor impacto ambiental comparado aos demais processos.

A integração de processos de pré-tratamentos físicos e pré-tratamentos químicos que visam aperfeiçoar a deslignificação para a obtenção de celulose de resíduos lignocelulósicos é hoje objetivo de vários estudos.

De acordo com Sun e Cheng (2002), quando se utiliza a explosão a vapor catalisada com ácidos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é possível aumentar a eficiência da despolimerização enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e promover uma remoção mais completa de hemicelulose. As condições ótimas deste pré-tratamento para o bagaço de cana foram reportadas como: 220°C, 30 segundos de residência, 50% de sólidos e 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Da mesma maneira que a explosão a vapor pode ser catalisada por ácido, Sun e Cheng (2002), relatam o processo que utiliza como catalisador a amônia líquida a alta temperatura e pressão, AFEX (do inglês - Ammonia Fiber EXplosion). No entanto é salientado que o processo melhora a hidrólise e extração da hemicelulose, mas apresenta resultados ruins em biomassa com alto teor de lignina.

Hamelinck *et al.* (2005) citam o processo de explosão de CO<sub>2</sub> que é similar à explosão a vapor. Os rendimentos de glicose na hidrólise enzimática posterior são baixos (75%) comparados com as explosões de vapor e amônia. Entretanto, de forma geral a explosão de CO<sub>2</sub> tem custos melhores que a explosão de amônia e não causa a formação de inibidores como no caso da explosão com vapor.

Segundo Rossell e Olivério (2004), atualmente um processo que se destaca é o DHR (Dedini Hidrólise Rápida), de propriedade da indústria brasileira Dedini Industrias de Base. Processo baseado na hidrólise ácida do bagaço de cana para obtenção de etanol, a DHR é considerada pela Dedine como uma das rotas tecnológicas mais promissoras para o aumento da produção de etanol. O processo DHR utiliza a metodologia da extração de lignina e hemicelulose baseada na combinação do processo organosolv com o da hidrólise ácida. Como a fração das pentoses não é utilizada, o rendimento de etanol é relativamente baixo (109 L/t de bagaço *in natura*); mas, considerando as evoluções tecnológicas previstas e o aproveitamento das pentoses, o rendimento de etanol pode chegar a 180 L/t .

### 3.5.3 Despolimerização da celulose (hidrólise)

Na etapa de despolimerização da celulose ocorre a conversão do polímero em glicose (1) a partir da reação de hidrólise catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou enzimas (celulase).



O rendimento teórico da conversão de celulose em glicose, após hidrólise total do substrato, é de 1,11 g g<sup>-1</sup> (FINGERUT 2006).

De acordo com Hamelinck *et al.*, (2005) o rendimento real do processo quando não existe o pré-tratamento chega a ser inferior a 20%, mas pode ultrapassar os 90% quando a biomassa é pré-tratada.

Segundo Dipardo (2000), a despolimerização por hidrólise ácida (tanto concentrada, quanto diluída) ocorre em temperaturas mais altas do que as aplicadas no pré-tratamento, favorecendo assim a hidrólise da fração celulósica. O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempos de reação de segundos a alguns minutos, facilitando o uso de processos contínuos. Já os processos com ácido

concentrado são conduzidos em condições mais amenas, mas com tempos de reação tipicamente mais longos (GRAF e KOEHLER, 2000).

A hidrólise com ácido diluído é a tecnologia mais antiga para a conversão de biomassa em etanol. De acordo com informações do Departamento Americano de Energia e Eficiência Energética e Energias Renováveis (EERE, 2007) o processo de hidrólise de madeira para produção de álcool teve início comercialmente em 1898 na Alemanha. O processo envolve duas reações; primeiramente o material celulósico é convertido em açúcares, mas, se a reação continua, os açúcares são convertidos em outras moléculas como o furfural que atuam negativamente diminuindo os rendimentos da fermentação (GRAF e KOEHLER, 2000). Com o intuito de não ocorrer a formação de tais inibidores, a primeira etapa do processo envolve condições brandas (por exemplo, 0,7% de ácido sulfúrico, 190 °C, 3 min) proporcionando a extração dos açúcares de 5 carbonos provenientes da hemicelulose, enquanto a segunda etapa utiliza condições mais severas (0,4%, 215 °C, 3 min) para liberar os açúcares de 6 carbonos provenientes da hidrólise da celulose.

O processo de hidrólise com ácido concentrado, usualmente ácido sulfúrico, favorece a produção de um gel que pode ser separado do material sólido, rico em celulose, a ser conduzido para a obtenção da glicose (DIPARDO, 2000).

Para processos de hidrólise do bagaço de cana pré-tratados, de acordo Hamelinck (2005), os rendimentos são de 89% para manose, 82% para galactose, e apenas 50% para glicose; já no processo com ácido concentrado utilizando de 30% a 70% de ácido sulfúrico, a baixas temperaturas (40°C), com tempos de reação de 2 a 6 horas, é possível se obter altos rendimentos de açúcares (90%) com baixo nível de degradação.

Sarrouth *et al.* (2007) verificaram a hidrólise de bagaço com ácido concentrado (70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e obtiveram 88% de rendimento no tratamento realizado a 50 °C/60 min para uma relação de teor de sólidos/solução ácida de 0,02g g<sup>-1</sup>. Os autores também investigaram um processo alternativo, no qual a hidrólise ocorre em duas etapas: a primeira com ácido concentrado (70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 50°C) e a segunda com uma solução um pouco mais diluída (30-40% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 80°C). Os rendimentos alcançaram até 97,5%. Entretanto, os autores alertam que o aumento dos custos associados a essa alternativa tornam-na economicamente inviável.

Söderström *et al.* (2003), empregaram a hidrólise ácida duas vezes para a bioconversão de resíduos de madeira do pinus *Picea abies* em etanol. A primeira hidrólise foi realizada em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% m/m, a 180 °C durante 10 min, contendo 30 % de massa seca (ms) de resíduo, produzindo uma solução rica em glucano (53,7 % ms) que foi separada por centrifugação para posterior fermentação; e a segunda hidrólise, feita no resíduo sólido resultante da centrifugação, foi conduzida em diferentes condições operacionais (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1-2% m/m, 180-220°C, 2-10 min) com posterior filtração para separação dos sólidos residuais. As soluções líquidas resultantes de cada hidrólise foram submetidas a dois diferentes tipos de hidrólise enzimática por celulase, adicionada de β-glucosidase: hidrólise e fermentação realizadas ao mesmo tempo no biorreator e hidrólise e fermentação realizadas em separado. De acordo com os autores, o maior rendimento em etanol (0,69 g produzido/g teórico) foi alcançado quando a hidrólise enzimática foi realizada separadamente da fermentação com a segunda hidrólise ácida conduzida a 210 °C com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% m/m, durante 2 min.

Recentemente, Sassner *et al.* (2006, 2007), realizaram semelhantes estudos com cavacos de *Tora* (variedade de salgueiro, híbrido de *Salix schwerinii* e *Salix viminalis*, cultivado no sul da Suécia) e também recomendaram a hidrólise ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% m/m, 210 °C, 8 min) seguido da hidrólise enzimática nas mesmas condições de Söderström e colaboradores para a produção de bioálcool. O rendimento máximo em etanol foi de 0,78 g g<sup>-1</sup>, com concentração final de 16 g etanol L<sup>-1</sup> após fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, a 30°C, durante 72 horas.

Segundo Hamelinck *et al.* (2005), a hidrólise da biomassa pela celulase é economicamente interessante pois existe a possibilidade de se produzir a enzima na própria planta e até no mesmo reator onde ocorre a hidrólise e fermentação. Bactérias e fungos podem produzir as enzimas da celulase, mas os fungos têm recebido mais atenção por conta do crescimento em aerobiose e pela boa produtividade. No entanto, atualmente é difícil combinar as condições ótimas de produção da enzima e hidrólise da biomassa.

Dipardo (2000) e Lynd *et al.* (1996) também destacam a hidrólise enzimática e a consideram como a “chave” para a produção de etanol com menores custos no longo prazo. Segundo Sun e Cheng (2002) a redução nos custos dos processos enzimáticos se dá em função destes serem conduzidos em condições mais amenas (pH 4,8 e

temperatura entre 45-50 °C) reduzindo assim o custo com utilidades e manutenção de equipamentos.

A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à hidrólise ácida, como por exemplo, maior especificidade do biocatalisador, menores taxas de degradação da glicose, condições brandas de temperatura e pressão de operação e menores custos de separação devido a menor formação de subprodutos indesejáveis. No entanto, ainda é necessário o avanço no desenvolvimento de enzimas para tornar viável a implantação dos processos de hidrólise enzimática em escala comercial (SEABRA, 2008).

Adsul *et al.* (2005) testaram a hidrólise enzimática de algumas amostras de bagaço deslignificado por diferentes pré-tratamentos. O melhor rendimento (94,6%, conduzido a 50°C durante 60 min) foi obtido para uma amostra pré-tratada com explosão de vapor. Inoue *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes (91,7% de rendimento de glicose a 45 °C durante 75 h), mas com o bagaço pré-tratado somente por trituração. Em fermentação subsequente, os autores obtiveram rendimento de 0,2 L de etanol por kg de biomassa seca.

### **3.5.4 Fermentação**

A fermentação do caldo de açúcares redutores, obtido após os a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, é um estágio importante para atingir um processo de obtenção de etanol de 2ª geração que assegure uma conversão mínima destes açúcares e seja compatível com um custo de produção factível, sob uma visão técnica e econômica. Ainda deve ser levado em conta o consumo energético associado às condições de fermentação e a concentração de etanol no vinho final obtido (ROSSELL, 2007).

Os materiais lignocelulósicos, constituídos de celulose, hemicelulose e lignina quando hidrolisados disponibilizam uma fração de hexoses resultante da celulose que é facilmente fermentável. A hidrólise da hemicelulose fornece pentoses (xilose e arabinose), carboidratos estes não diretamente fermentáveis por leveduras industriais, sendo a biotransformação destas pentoses a etanol um dos desafios mais importantes a



resolver no âmbito científico e tecnológico. Ainda, da hemicelulose resultam hexoses tais como: glicose, manose e galactose; sendo que esta última exige linhagens de levedura específicas para a produção de etanol (GRAY *et al.*, 2006).

Pesquisadores têm recorrido à engenharia genética para adicionar rotas metabólicas de pentose em leveduras e outros microorganismos etanologênicos e também melhorar o rendimento dos microorganismos que já têm a capacidade de fermentar ambos os açúcares. Muito embora tenha se conseguido muito sucesso nesse sentido, a fermentação de misturas dos açúcares da biomassa ainda não atingiu um patamar comercialmente viável (SEABRA, 2008).

Até o momento a maioria dos processos descarta a fração de pentoses, ou fermenta em etapas distintas hexoses e pentoses, o que compromete sua viabilidade econômica. A evolução do processo é a combinação das diferentes reações em um menor número de reatores com microorganismos capazes de fermentar ambos os açúcares com alto rendimento (WOOLEY *et al.*, 1999).

Ainda a experiência em fermentação alcoólica convencional a partir dos açúcares extraíveis da cana-de-açúcar não pode ser esquecida quando a questão é avaliar propostas de rotas de fermentação de licores hidrolíticos.

O processo de fermentação alcoólica consiste de uma série de reações químicas catalisadas por um microorganismo, usualmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação se dá em condições de anaerobiose como meio de provisão de energia para manutenção das atividades vitais e crescimento.

Na fermentação alcoólica uma molécula de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) é convertida em duas de etanol ( $C_2H_5OH$ ) e mais duas de  $CO_2$ . Estequiometricamente, o rendimento teórico da reação é de  $0,511 \text{ g etanol (g glicose)}^{-1}$ . No entanto, parte dos açúcares presentes no meio é consumida em reações paralelas necessárias para a síntese de etanol. Além do crescimento microbiano, outros produtos podem ser formados, dentre eles o glicerol e ácidos orgânicos, principalmente acético e succínico, além de outros alcoóis. Industrialmente a fermentação alcoólica apresenta eficiência (relação percentual entre rendimento real e rendimento teórico) da ordem de 90% (DIAS, 2008).

Levando em conta a necessidade de realizar processos de pré-tratamento da biomassa sem os quais a hidrólise torna-se inviável, independente da mesma ser

catalisada por ácidos ou enzimas, haverá a formação de uma série de compostos secundários durante estes pré-tratamentos (ácidos alifáticos de baixa massa molecular, derivados de furanos e derivados fenólicos), que inibem fortemente a atividade fermentativa dos microorganismos em geral e a levedura em particular. Com o propósito de aumentar a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos após o pré-tratamento é necessário reduzir a concentração, ou eliminar totalmente do meio, os compostos tóxicos gerados no pré-tratamento, ou então utilizar linhagens robustas de microorganismos resistentes (GRAY *et al.*, 2006).

Os métodos de desintoxicação do hidrolisado podem ser físicos, químicos ou biológicos; cada um tem um efeito sobre a fermentabilidade e composição do hidrolisado, permitindo também que várias estratégias de fermentação possam ser utilizadas para melhorar o rendimento da produção de etanol (SEABRA, 2008).

Palmiquivist e Hahn-Hagerdal (2000) e Chandel *et al.* (2007) testaram alguns métodos de desintoxicação de hidrolisados de bagaço e concluíram que o método por troca iônica foi o mais eficaz, resultando no melhor rendimento da fermentação com *Candida shehatae*. Em uma técnica alternativa, Martín *et al.* (2007) obtiveram bons resultados para a fermentação do hidrolisado de bagaço com uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* adaptado a meios com alto teor de inibidores. Por reduzir a necessidade de desintoxicação, a técnica de adaptação de microorganismos pode ser uma alternativa muito interessante para a redução de custo do etanol para os processos futuros (SEABRA, 2007).

Especificamente em relação aos resíduos agroindustriais gerados na bananicultura, Hammond *et al.* (1996) avaliaram a produção de etanol empregando (a) polpa de banana verde, (b) cascas de banana e (c) fruto com casca. Os autores realizaram a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática (uso de  $\alpha$ -amilase e glucoamilase) sobre o rendimento do processo, porém não especificaram as variáveis operacionais utilizadas. De acordo com os autores, o maior rendimento em etanol ( $0,499 \text{ L kg}^{-1}$  massa seca) foi obtido com o fruto com casca previamente hidrolisado por enzimas.

### 3.5.4.1 Fermentação e sacarificação simultâneas – Processo SSF

No processo SSF (do inglês Simultaneous Saccharification and Fermentation), os açúcares produzidos na hidrólise são simultaneamente fermentados a etanol, reduzindo enormemente a inibição dos produtos à hidrólise. Nesta configuração existe um contraponto entre o custo de produção da celulase e o custo da hidrólise/fermentação. Tempos de reação menores para a hidrólise envolvem maiores custos de celulase (HAMELINCK *et al.*, 2005).

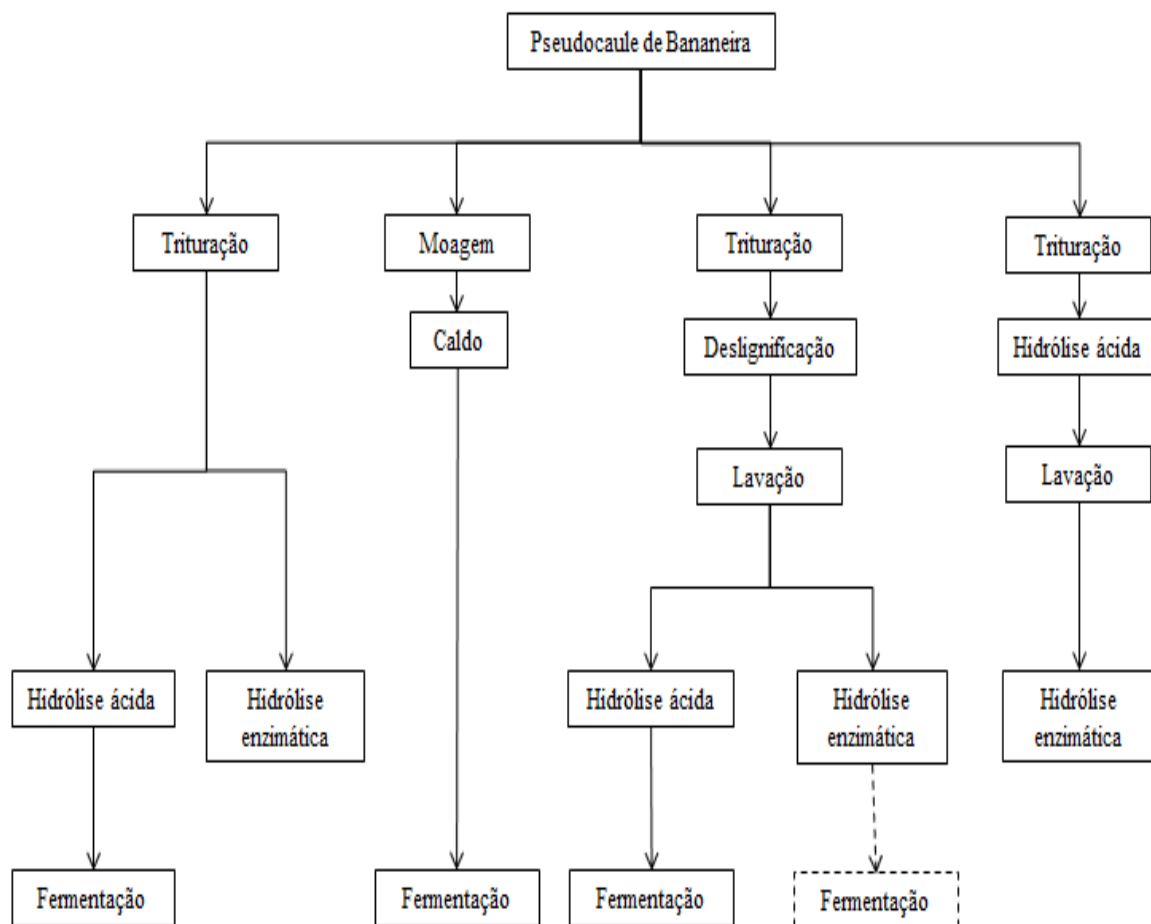
Uma evolução do processo SSF é a inclusão da co-fermentação de substratos com múltiplos açúcares, permitindo o consumo de pentoses e hexoses no mesmo reator. Essa nova proposta tem sido denominada de processo SSCF, do inglês Simultaneous Saccharification and CoFermentation e já foi testada em escala piloto.

Para Hamelinck *et al.* (2005), o final da evolução da tecnologia parece ser o estabelecimento do bio-processo consolidado (CBP – do inglês Consolidated BioProcessing), no qual as quatro transformações biológicas envolvidas na produção do etanol (produção de enzimas, sacarificação, fermentação de hexoses e fermentação de pentoses) ocorrem em uma única etapa. Neste caso, segundo Wyman (2007), microorganismos termofílicos necessitariam produzir anaerobicamente complexos enzimáticos (celulossomos) com melhor atividade celulolítica que as típicas enzimas de fungos e fermentariam todos os açúcares liberados no mesmo reator. De acordo com Lynd *et al.* (2005) um fenômeno que impacta sobre a performance desta configuração é a sinergia entre enzima-microorganismo, a qual possibilitaria um aumento da efetividade da celulase na presença do complexo celulose-enzima-microorganismo em comparação com os complexos celulose-enzima.

Conforme Seabra (2008), ainda não existem microorganismos (ou combinações) capazes de produzir enzimas e etanol com os rendimentos requeridos, mas evoluções têm ocorrido. Apesar das expectativas, ainda não existe consenso sobre qual seria o melhor caminho para a redução dos custos de produção do etanol de 2ª geração. Enquanto alguns pesquisadores acreditam que para alcançar o sucesso nesse processo a “chave” esteja na redução do número de etapas do processo, outros sugerem que o melhor seria buscar otimização dos reatores separadamente, por conta da diferença de condições ótimas de cada etapa e também por permitir um melhor controle do processo.

#### 4. MATERIAL E METODOS

A Figura 09 apresenta o fluxograma operacional das etapas envolvidas nos experimentos realizados neste trabalho.



**Figura 9** - Fluxograma operacional global utilizado nos diferentes experimentos realizados neste trabalho. Linha tracejada indica etapa a ser realizada em trabalhos futuros.

## **4.1 Substrato de fermentação**

Foi empregado o pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*, popularmente conhecida em Santa Catarina como nanica. O resíduo foi coletado na Indústria de Alimentos Waldemar Arndt situada em Garuva-SC, fornecedora de produtos industrializados de banana e detentora da marca Tipikus.

Após ser cortado em fatias de aproximadamente 10 cm de largura, quando não usado no mesmo dia, o material foi colocado em sacos plásticos e congelado até o dia da sua utilização.

O teor de umidade do substrato, previamente determinado por gravimetria (secagem do material a 90 °C até massa constante) e considerado igual para todos os experimentos realizados e foi de 20,4 gramas de água por grama de massa seca (g/g ms), ou seja, 95,3% de umidade absoluta.

### **4.1.1 Pré-tratamento físico**

O resíduo *in natura*, após descongelamento para o caso de material armazenado, foi picado manualmente com faca em tamanhos de aproximadamente 3 cm e em seguida triturado em liquidificador doméstico com adição de água suficiente para a concentração inicial de substrato desejada. A água empregada foi a da rede pública e o tempo de cominuição no liquidificador variou de 1 a 3 min, até a obtenção de partículas sólidas de tamanho inferior a 2 mm (inspeção visual).

### **4.1.2 Tratamentos químicos e/ou enzimáticos**

Foram empregadas quatro diferentes formas de tratamento do substrato: (1) Ensaios HA-P – uso de hidrólise ácida sem pré-tratamento químico de deslignificação; (2) Ensaios DPH-P – hidrólise ácida com deslignificação prévia; (3)

Ensaio HAHE-P – hidrólise enzimática precedida de hidrólise ácida; (4) Ensaio DHE-P – hidrólise enzimática com deslignificação prévia.

As concentrações de substrato utilizadas em todos os tratamentos avaliados foram de 250 g de massa úmida por litro de solução aquosa ( $\text{g mu L}^{-1}$ ), equivalente a 11,75 g de massa seca por litro ( $\text{g ms L}^{-1}$ ). Excepcionalmente para os Ensaio HA-P foi avaliado também a concentração de 500  $\text{g mu L}^{-1}$  (23,50  $\text{g ms L}^{-1}$ ).

A concentração de 11,75  $\text{g ms L}^{-1}$  foi definida com o objetivo de se obter uma mistura (por inspeção visual) que não apresentasse grande dificuldade para homogeneização e possuisse alta fluidez e assim, reduzir interferências nos tratamentos e erros nas amostragens. O uso de maior concentração de substrato teve como objetivo buscar o aumento da concentração de açúcares fermentáveis bem como aumentar o rendimento do tratamento.

#### **4.1.2.1 Deslignificação**

Em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de mistura aquosa do substrato (densidade  $\sim 1,0$ ) foi adicionado NaOH para deslignificação em duas diferentes concentrações: 1 e 3 % m/m em base seca. Em seguida, os frascos foram acondicionados em agitador orbital e mantidos sob agitação constante ( $120 \text{ min}^{-1}$ ) a 40 °C durante 60 min. Após a reação a mistura foi filtrada e os sólidos retidos, submetidos a sucessivas lavagens com água industrial para retirada do NaOH remanescente. Esses sólidos, após escoamento da água de lavagem, foram encaminhados para a despolimerização da celulose através da hidrólise ácida ou da hidrólise enzimática.

#### 4.1.2.2 Despolimerização por ácido

Como reatores foram empregados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de volume de trabalho (VT) (90 mL de mistura aquosa do substrato + massa de ácido sulfúrico + água destilada suficiente para completar VT).

Inicialmente foi realizada uma série de ensaios com diferentes temperaturas e tempos de residências, utilizando apenas o ácido sulfúrico diluído como agente de hidrólise sem a deslignificação prévia (Ensaio HA-P). Durante esses experimentos não foram removidos quaisquer eventuais subprodutos gerados no processo de despolimerização. Somente no final da operação a mistura hidrolisada foi submetida à filtração em papel filtro para a separação dos sólidos residuais do caldo a ser fermentado.

A massa de ácido adicionada em cada reator foi calculada com base na massa úmida de substrato contida na mistura, ou seja, 2,5 e 5,0 g de ácido para os respectivos casos de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% e 2% m/m quando utilizado 11,75 g ms L<sup>-1</sup> de substrato; e 5,0 e 10 g de ácido, nos mesmos casos, quando empregado o dobro do substrato.

Na Tabela 6 são apresentadas as condições experimentais empregadas. Para os ensaios realizados nas temperaturas de 90 e 100°C, os frascos Erlenmeyer foram acondicionados em banho termostaticado “Banho Maria” da Quimis e para os ensaios a 120°C, foi utilizada a autoclave elétrica Quimis – M25160. Em ambos os casos não houve agitação dos frascos.

Tabela 6 - Condições experimentais de concentração de ácido sulfúrico, temperatura e tempo de reação, empregadas na hidrólise ácida do pseudocaule da bananeira sem o uso da deslignificação prévia - Ensaios HA-P.

Ensaio	Condições Experimentais		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)	Temperatura (°C)	Tempo de reação (min)
HA-P <sub>0,Amb,0</sub>	0	Ambiente	0
HA-P <sub>0,90,15</sub>	0	90	15
HA-P <sub>0,90,30</sub>			30
HA-P <sub>1,90,15</sub>	1	90	15
HA-P <sub>1,90,30</sub>			30
HA-P <sub>2,90,15</sub>	2	90	15
HA-P <sub>2,90,30</sub>			30
HA-P <sub>0,100,15</sub>	0	100	15
HA-P <sub>0,100,30</sub>			30
HA-P <sub>1,100,15</sub>	1	100	15
HA-P <sub>1,100,30</sub>			30
HA-P <sub>2,100,15</sub>	2	100	15
HA-P <sub>2,100,30</sub>			30
HA-P <sub>0,120,15</sub>	0	120	15
HA-P <sub>0,120,30</sub>			30
HA-P <sub>1,120,15</sub>	1	120	15
HA-P <sub>1,120,30</sub>			30
HA-P <sub>2,120,15</sub>	2	120	15
HA-P <sub>2,120,30</sub>			30

As quatro melhores condições experimentais selecionadas nessa série de ensaios foram repetidas, empregando agora o tratamento prévio do resíduo com NaOH (Tabela 7).



Tabela 7– Condições experimentais de concentração de hidróxido de sódio, ácido sulfúrico, temperatura da hidrólise ácida (T) e tempo de reação (t), empregadas na despolimerização do pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*.

Ensaio*	Condições experimentais				Observações
	NaOH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	T	t	
	(% m/m)	(% m/m)	(°C)	(min)	
HA <sub>1,120,15</sub>	0	1	120	15	Sem tratamento prévio com NaOH
D <sub>1</sub> HA <sub>1,120,15</sub>	1	1	120	15	
D <sub>3</sub> HA <sub>1,120,15</sub>	3	1	120	15	

\* O símbolo HA corresponde ao uso da hidrólise ácida. A identificação do ensaio com a letra D representa o uso da deslignificação prévia do resíduo antes da hidrólise ácida.

#### 4.1.2.3 Despolimerização por enzimas

Foram realizados 3 ensaios de despolimerização do substrato por enzimas hidrolíticas, com tempo de reação de 24 h:

- (1) Ensaios HE-P – substrato sem tratamento prévio
- (2) Ensaios HAHE-P – substrato previamente hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, 120°C, 30 min
- (3) Ensaio D<sub>1</sub>HE-P – substrato previamente deslignificação com NaOH 1% m/m e sem hidrólise ácida.

Como branco foi utilizado o pseudocaule *in natura* triturado.

Com objetivo de se verificar a eficiência máxima deste tipo de tratamento, um mix de enzimas comerciais cedidas pela Novozymes® (Tabela 8) foi elaborado e aplicado em todos os experimentos.

Tabela 8– Enzimas e dosagem recomendadas e empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática do pseudocaule previamente deslignificado com NaOH.

Enzima	Descrição	Dose <sup>a</sup> (% m/m)
NS50013 Celulase-complexo	Os principais produtos da reação são a celobiose e a glicose	6
NS50010 β-glicosidase	Hidrolisa a celobiose, um dímero de glicose. Também conhecida como celobiase	0,6
NS50012 Complexo enzimático	Contém arabinase, β-glucanase, celulase, hemicelulase, pectinase e xilanase	0,4
NS50030 Xilanase	É um purificado de endo-xilanase com alta especificidade para pentosanas	0,5
NS22002 Hemicelulase	Contém uma mistura de β-glucanase e xilanase	2

<sup>a</sup> porcentagem expressa em base seca de substrato

Os valores de pH inicial (5,5) e de temperatura (45 °C) empregados foram valores médios estabelecidos em função das faixas ideais recomendadas pelo fornecedor das enzimas para essas variáveis (Anexo I). Para a correção do pH inicial, após deslignificação com NaOH, foi empregado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Como reatores foram empregados frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 90 mL de substrato (11,75 g ms L<sup>-1</sup>) e 10 mL de solução enzimática.

O volume de solução enzimática foi proveniente de “solução-mãe” previamente preparada em tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 M, pH 5,5, e conservada em geladeira até uso. A massa de cada uma das enzimas utilizadas na solução-mãe foi calculada de forma que 10 mL desta solução resultassem nas concentrações apresentadas na Tabela 8.

## 4.2 Ensaaios de fermentação

Foram realizados ensaios de fermentação em frascos Erlenmeyer (Ensaaios E) e em fermentador de bancada (Ensaaios F). Todos os ensaios foram realizados, no mínimo, em duplicatas. Como ensaio padrão de fermentação foi empregada a glicose P.A. como fonte de carbono.

As esterilizações dos diferentes meios de cultivos empregados foram realizadas a 120 °C, durante 15 min, em autoclave elétrico da marca Quilmes®. O substrato utilizado, em cada caso, como fonte principal de glicose, foi esterilizado separadamente dos outros componentes do meio de forma a evitar a reação de Meinert (complexação da glicose com as proteínas contidas no meio de cultivo), também conhecida como reação de caramelização.

### 4.2.1 Microrganismo

Para a fermentação alcoólica foi empregada cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de fermento biológico seco Fleischmann®. O microrganismo foi conservado em geladeira (4 °C) e mantido através de repiques quinzenais em placas de Petri (semeadura por alça de platina em cultivo sólido de superfície) contendo meio GY (item 4.2.2), adicionado de Agar-Agar na concentração de 15 g L<sup>-1</sup>. O período de incubação das placas de Petri semeadas, antes de irem para a geladeira, foi de 48 h, a 30 °C.

### 4.2.2 Meios de cultivo

Como meio base de cultivo foi empregado o meio de cultura, aqui denominado, GY. Este meio foi proposto por Schulz (2010) a partir da composição dos meios utilizados por Monsalve (2006), Pamarola-Adrados *et al.* (2005) e por Saito

(2006). As concentrações de nutrientes, exceto fonte principal de carbono, empregadas no meio GY foram de (em g L<sup>-1</sup>): extrato de levedura, 3; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 e CaCl<sub>2</sub>, 0,1.

#### **4.2.3 Preparo de inóculo**

O inóculo foi preparado a partir do cultivo do microrganismo em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio GY com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 2 mL de suspensão microbiana (pré-inóculo) proveniente de placas de Petri (cultivo de manutenção, item 4.2.1). O pré-inóculo foi obtido em água estéril (2 mL/placa) a partir da raspagem de colônias desenvolvidas na superfície do meio sólido contido nas placas. Após receber o pré-inóculo, os frascos foram incubados em agitador orbital CERTOMAT<sup>®</sup> S com frequência de agitação de 120 min<sup>-1</sup>, 30 °C, durante 18 h.

#### **4.2.4 Fermentação em frascos Erlenmeyer**

Foram conduzidos em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de volume de trabalho (V<sub>T</sub>) com 20% v/v de inóculo. Os frascos foram incubados durante 24 h nas mesmas condições empregadas no preparo do inoculo.

##### **4.2.4.1 Ensaio padrão - Ensaio EG**

Utilizando a glicose como principal fonte de carbono, este ensaio foi realizado com o objetivo de obter valores padrões de produtividade e rendimento em etanol visando comparar com os mesmos parâmetros a serem alcançados nos ensaios com o uso do pseudocaule como substrato. Como meio de cultivo foi utilizado o mesmo meio empregado na obtenção do inóculo (meio GY com glicose 20 g L<sup>-1</sup>).

#### **4.2.4.2 Ensaio com substrato lignocelulolítico – Ensaio EP**

Foram realizados dois ensaios de fermentação: Ensaio EP1 – uso do pseudocaule triturado e hidrolisado com ácido, sem deslignificação prévia; e Ensaio EP2 – uso do pseudocaule triturado, deslignificado com NaOH e hidrolisado com ácido.

#### **4.2.5 Fermentação em biorreator de bancada - Ensaio FC**

Foi realizada apenas com o caldo puro extraído por esmagamento do pseudocaule *in natura*.

A fermentação foi conduzida em biorreator Biostat<sup>®</sup> B da B.Braun, com dorna de 2 L e  $V_T$  de 1,5 L . Tanto o inóculo como os nutrientes utilizados foram os mesmos daqueles utilizados em frascos Erlenmeyer.

A temperatura do processo foi de 30°C e o pH controlado em 4,5 com adição automática de HCl 1 M ou KOH 1 M.

Para agitação do meio em fermentação foi empregada uma turbina com seis pás planas (plate-blade) posicionadas rente ao fundo do biorreator. A frequência de agitação foi de 150 min<sup>-1</sup>.

### **4.3 Metodologia analítica**

Todas as análises, exceto as realizadas em HPLC, foram realizadas, no mínimo, em duplicatas.

### 4.3.1 Umidade

A determinação da umidade percentual foi baseada na metodologia utilizada por Crippa (2002).

Em cadinho limpo, previamente seco até peso constante, pesou-se três gramas da amostra *in natura* (MU) em balança analítica e secou-se a 105 °C em estufa a 105 °C durante 24 horas.

Em seguida resfriou-se em dessecador e pesou-se a amostra seca (MS). Com os valores encontrados utilizou-se a Equação 2 para o cálculo da umidade. As análises foram feitas em triplicatas.

$$Umidade \% = \frac{MU - MS}{MU} 100 \quad (2)$$

### 4.3.2 Determinação da concentração de lignina, hemicelulose e celulose do pseudocaule da bananeira

Inicialmente foi realizado o ensaio denominado Fibra em Detergente Neutro (F.D.N) onde o conteúdo celular que é constituído principalmente por proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água foram extraídos em um aparelho digestor com temperatura controlada e volume constante. Van Soest e Wine (1968) propuseram um complemento ao método anterior com mais uma digestão que serviu para a determinação apenas da celulose e lignina, nesta etapa a digestão foi realizada com detergente ácido e o ensaio é denominado de Fibra em Detergente Ácido (F.D.A). Conhecendo-se a porcentagem dos constituintes da parede celular (F.D.N) e da F.D.A do material analisado, foi possível calcular a fração de hemicelulose apenas pela diferença entre aquelas frações. A determinação de lignina envolveu a oxidação do resíduo da F.D.A. com uma solução tamponada de ácido acético e permanganato de potássio e por fim a concentração da celulose e minerais

insolúveis foram obtidas pela diferença de massa após cada etapa de solubilização controlada e incineração da amostra.

#### **4.3.2.1 Determinação da Fibra em detergente neutro (F.D.N)**

A determinação dos constituintes da parede celular foi realizada com a digestão de 1,0 g de amostra previamente seca (90 °C, 24h) em solução F.D.N. composta de 1 L de água destilada, 30,0 g de sulfato láurico de sódio [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>OSO<sub>3</sub>Na)], 18,61 g de EDTA. (Na<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O), 6,81 g de borato de sódio deca-hidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O), 4,56 g de fosfato ácido de sódio anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 10 mL de 2-metoxietanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>). O pH da solução de F.D.N. utilizada foi de 7,0.

Para a digestão foi utilizado 100 mL de solução F.D.N., 2 mL de decaidronaftaleno e 0,5 g de sulfito de sódio. O tempo de digestão foi de 60 min, após o início da fervura. Após a digestão realizou-se a filtragem a quente em cadinho filtrante previamente pesado, lavado os sólidos com acetona, seco por 12 horas a 100°C e resfriado em dessecador. A concentração dos constituintes insolúveis da parede celular foi obtida pela proporção de massa ainda presente no filtro em relação a massa inicial da amostra e esta fração foi considerada como celulose, hemicelulose, lignina e matéria mineral.

#### **4.3.2.2 Determinação da fibra em detergente ácido**

A etapa de digestão utilizada na determinação F.D.A. foi realizada com uma solução composta de 20 g de brometo-cetil\_trimetiamônio (CTAB) em 1 L de ácido sulfúrico 1N. O processo foi realizado em digestor onde aproximadamente 1 g de amostra previamente seca em estufa reagiu por 60 min com a solução F.D.A. em temperatura de fervura. Após a digestão foi realizada a lavagem e filtração em cadinho filtrante seguida de lavagem com acetona e secagem onde a diferença na

massa inicial e final proporcionou concentração de F.D.A. que expressa a relação de celulose e lignina presente na amostra.

#### **4.3.2.3 Determinação da lignina**

A determinação da lignina foi realizada a partir da fibra em detergente ácido (celulose, lignina, cutina, minerais e sílica) utilizando o método da oxidação da lignina com Permanganato de Potássio ( $\text{KMnO}_4$ ).

Utilizando-se uma solução tamponada de ácido acético e permanganato de potássio contendo ferro trivalente e prata monovalente, como catalisadores oxidou-se aproximadamente 1g de amostra proveniente da etapa anterior (determinação F.D.A). determinou-se a proporção de lignina na amostra de acordo com a quantidade de lignina oxidada extraída da amostra antes dos ensaios e após sucessivas lavagens com etanol 80% e secagem das amostras a 100 °C durante 12 horas.

#### **4.3.2.4 Determinação da celulose**

Posteriormente a oxidação e extração da lignina das amostras o material restante, considerado celulose, presente nos cadinhos foram incinerados durante 2 horas a 500 °C, resfriados em dessecador e pesados. A porcentagem de celulose foi obtida pela diferença nas pesagens, antes e depois da incineração.



### **4.3.3 Determinação da concentração de açúcares totais – AT**

#### **4.3.3.1 Em amostras hidrolisadas com ácido sulfúrico**

Após corrigido o valor do pH de cada amostra para valor aproximado de 6,0 (adição estequiométrica de BaCO<sub>3</sub>, parcialmente dissolvido em água deionizada para mesmo volume da mistura hidrolisada) a mistura foi peneirada em malha 1 mm para reter a fase sólida grosseira residual e então, submetida à filtração à vácuo com papel filtro qualitativo Whatman<sup>®</sup> n° 1. Em seguida, 2 mL do filtrado foi conduzido à centrifugação, durante 5 minutos em temperatura ambiente, empregando centrífuga BLB Eppendorf 5415C com frequência de giro de 10000 min<sup>-1</sup>. O sobrenadante foi então submetido à filtração manual (uso de seringas descartáveis) em filtros Millex (Millipore Indústria e Comércio Ltda) de diâmetro 13 mm e porosidade da membrana de 0,45 µm.

As determinações das concentrações de glicose (Gli), frutose (Fru) e sacarose (Sac) foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) empregando cromatógrafo Merck Hitachi D- 7000 IF equipado com detector de índice de refração Merck RI-71 e coluna Knauer-Eurokat Pb, série SE212. Como eluente foi empregado água ultrapura (água Milliq) com fluxo de 0,5 ml. min<sup>-1</sup>. O valor de AT foi calculado a partir da soma das concentrações de Gli, Fru e Sac e expresso na unidade g L<sup>-1</sup>.

Juntamente com os açúcares solúveis, o uso deste método analítico possibilitou a determinação da concentração de etanol presente na mesma amostra.

#### **4.3.3.2 Em amostras hidrolisadas com enzimas**

As fases sólidas e líquidas das amostras submetidas à hidrólise enzimática foram separadas da mesma forma descrita em 4.3.2.1. Nessas amostras não houve a

necessidade do uso de BaCO<sub>3</sub> para correção do pH, visto as hidrólises terem sido realizadas em meio tamponado pH 5,5.

As determinações das concentrações de AT foram realizadas em HPLC conforme descrito no item 4.3.2.1.

#### **4.3.3.3 Durante os ensaios de fermentação**

Durante os ensaios de fermentação foram retiradas duas amostras periódicas (2 em 2 horas até final da fonte de AT) de 2 mL cada uma, centrifugadas e seguido de filtração em filtro Millipore de 0,45 µm e analisadas em HPLC conforme descrito em 4.3.3.1. Além das concentrações de AT a concentração de etanol também foi determinada.

#### **4.4 Cálculos do rendimento em AT e eficiência do processo de despolimerização do pseudocaule**

Os valores de rendimento percentual em AT foram calculados utilizando a Equação (3).

$$R \% = \frac{(AT_f - AT_0)}{MS} 100 \quad (3)$$

$AT_f$  - concentração de açúcares totais dissolvidos na mistura hidrolisada (g L<sup>-1</sup>)

$AT_0$  - concentração de açúcares totais dissolvidos na mistura antes da hidrólise (g L<sup>-1</sup>)

$MS$  – massa seca do resíduo (pseudocaule) utilizada na hidrólise (g L<sup>-1</sup>)

A eficiência das reações de despolimerização foi calculada utilizando a Equação (4):

$$\varepsilon = \frac{R}{R_t} 100 \quad (4)$$

$\varepsilon$  - eficiência da reação (%)

$R$  – rendimento em açúcares totais obtida após tratamento (%)

$R_t$  – rendimento teórico em açúcares totais a ser obtido na hidrólise total da celulose contida no resíduo tratado (%)

Conforme Fingerut (2006) o rendimento teórico da conversão de celulose em glicose, após hidrólise total do substrato, é de 1,11 g g<sup>-1</sup>. Para o caso do pseudocaule utilizado neste trabalho, cujo teor de celulose foi de 44 % da massa seca (MS), conforme caracterização realizada, o valor de rendimento teórico é de 0,4884 g g<sup>-1</sup> MS de substrato, ou seja,  $R_t = 48,84$  %.

## 4.5 Cálculos dos parâmetros de produção

### 4.5.1 Produtividade

Os valores de produtividades totais de cada processo ( $Q_p$ ), expressos em massa do produto fermentado por unidade de tempo e por unidade de volume (g/h.L) foram obtidos através da Equação (5), conforme definição dada por Gaden (1959).

$$Q_p = \frac{P_f - P_o}{t_f} \quad (5)$$

$P_f$  - concentração de etanol no tempo final de fermentação (g.L<sup>-1</sup>)

$P_o$  - concentração de etanol no início do processo fermentativo (g.L<sup>-1</sup>)

$t_f$  - tempo final de cultivo do processo fermentativo correspondente ao final da fonte de carbono (h)

#### 4.5.2 Rendimento em etanol - Fator de Conversão Global

Para os cálculos de rendimento em etanol, também denominado de fator de conversão de substrato em etanol, foi utilizada a Equação (6).

$$Y_{P/AT} = \frac{(P_f - P_0)}{(AT_0 - AT_f)} = \frac{(P_f - P_0)}{AT_0} \quad (6)$$

$Y_{P/AT}$  – rendimento em etanol ou fator de conversão de substrato em etanol ( $\text{g g}^{-1}$ ).

$AT_0$  – concentração inicial de substrato no meio de cultivo ( $\text{g L}^{-1}$ ).

$AT_f$  – concentração de substrato no final do cultivo ( $AT_f = 0 \text{ g L}^{-1}$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do pseudocaule da bananeira

As propriedades físico-químicas determinadas e expressas em base de massa úmida (mu) e em base de massa seca (ms) do pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*, são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Propriedades físico-químicas do pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*.

Propriedades	% um (base úmida)	% ms (base seca)
Teor de umidade (UA)	95,3±0,2	
Lignina	0,38±0,07	8,1±2,1
Celulose	2,06±0,09	44,0±2,0
Hemicelulose	0,77±0,16	16,5 ± 3,5

O alto teor de umidade encontrado no pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* (Tabela 9) foi semelhante ao valor de 96,5 % determinado por Oliveira *et al.* (2007) para a mesma espécie de bananeira e próximo aos valores estimados por outros autores para a *Musa Acuminata* (94%) (SILVA, 1998; MEDEIROS, 2007).

De acordo com Jarman *et al.* (1997), o valor de UA para o pseudocaule de bananeira varia de 90 a 96%. Comparativamente aos outros resíduos lignocelulósicos da mesma espécie de bananeira, o pseudocaule apresentou UA 6,7 % maior do que o das cascas (UA = 88,6%) (SCHULZ, 2010), 25,2 % maior do que o das folhas (UA=17,7%) (BEZERRA *et al.*, 2002) e 25,2% maior do que o da polpa (UA = 70,1%) (SCHULZ, 2010).

Quanto maior o teor de umidade no resíduo lignocelulósico, menor a disponibilidade de biomassa seca por unidade de massa do resíduo úmido para a conversão da celulose estrutural em açúcares fermentáveis. Conseqüentemente, menor

rendimento em etanol de 2ª geração pode ser esperado para cada tonelada de resíduo úmido utilizado.

Em relação ao teor de lignina encontrado ( $8,07 \pm 2,11$  %; Tabela 9) pode-se verificar que este valor foi menor do que aqueles encontrados na maioria dos vegetais que vem sendo estudados para a produção de etanol de 2ª geração. Em palha de cana-de-açúcar, Silva (2009) estimou um teor de lignina de  $24,2 \pm 0,2$ % enquanto Satyanarayana (2007) encontrou valores entre 12 e 16% na palha de arroz e Mendes (2002), 45% na fibra de coco.

Uma menor concentração de lignina no pseudocaule da bananeira não significa que o processo de deslignificação pode ser efetuado com uma carga de reagente ou catalisador menor. Empregando o processo alcalino com NaOH 1% m/v como catalisador, Silva (2009) removeu 62,3% da lignina contida no pseudocaule da bananeira enquanto que, para a palha de cana-de-açúcar, a qual possui 3 vezes mais lignina do que o pseudocaule, essa remoção foi de 78%. Portanto, o sucesso na remoção da lignina do complexo lignocelulósico depende não só da relação catalisador/substrato, mas também da estrutura física dos resíduos vegetais avaliados.

Além da remoção desse polímero indesejado, o sucesso na produção de etanol de 2ª geração depende, além de outros fatores, do teor de açúcares fermentáveis proveniente da celulose e, segundo alguns autores, também da hemicelulose.

A fração de hemicelulose encontrada no substrato avaliado ( $16,5 \pm 3,5$  %) foi próxima ao valor determinado por Oliveira *et al.* (2007) na mesma espécie de bananeira (12,6%) e inferior ao valor estimado por Cordeiro *et al.* (2004) na bananeira *M. acuminata* ( $25,30 \pm 0,30$  %).

Quanto à celulose, o teor médio existente no pseudocaule (44% em base seca, Tabela 9) foi próximo ao estimado por outros autores para este mesmo tipo de biomassa: Oliveira *et al.* (2007) determinaram teor de celulose de 37,1%; enquanto Cordeiro *et al.* (2003) encontraram o valor médio de 37,3%. Em seu trabalho, sem especificar a espécie de bananeira utilizada, Silva (2009) estimou o teor de 46,9% de celulose no pseudocaule.

Comparativamente a outros resíduos vegetais que vêm sendo avaliado para a produção de etanol, o teor de celulose no pseudocaule de bananeira foi superior ao da palha de trigo (38,2 %) (BARDIAYA *et al.*, 1996) e ao da madeira de Oliveira (31,4%) (CARA *et al.*, 2008), próximo ao da madeira de pinho (46,4 %) (MOSIER *et*

*al.*, 2005) e menor do que o do bagaço de cana-de-açúcar (54,87%) (GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Considerando o rendimento teórico de 1,11 g de glicose a partir da hidrólise de 1 g de celulose (FINGUERUT, 2006) e tomando como base o rendimento teórico da conversão de glicose em etanol de 0,511 g g<sup>-1</sup> (DIAS, 2008) seria possível obter, no máximo, 249,6 kg etanol/t resíduo seco (194,7 L etanol/t resíduo seco). Porém, na análise da obtenção do produto em relação ao substrato *in natura* (úmido) este rendimento é reduzido para 16,3 kg etanol/t de resíduo úmido (12,7 L etanol 95%/t de resíduo úmido).

Torna-se evidente aqui uma análise futura cuidadosa, tanto em termos operacionais quanto econômico. Será necessário estabelecer qual a melhor forma de utilizar este tipo de substrato para a conversão da celulose em glicose: remover inicialmente parte da fase líquida por prensagem, secar completamente todo o material ou empregá-lo *in natura*. Todas as três opções irão necessitar do uso de equipamentos específicos para a operação, tais como moendas, moinhos, secadores, picadores, filtros, etc. Conseqüentemente, diferentes valores de aquisição, instalação e operação desses equipamentos poderão afetar significativamente o custo final do produto desejado (etanol combustível).

## **5.2 Ensaio de despolimerização do pseudocaule**

### **5.2.1 Hidrólise ácida**

Na Tabela 10 são apresentadas apenas as concentrações de açúcares fermentescíveis (AT) por *Saccharomyces cerevisiae* e obtidas com a hidrólise ácida do pseudocaule da bananeira previamente triturado em meio aquoso. A composição global desse caldo hidrolisado incluindo os resultados analíticos da manose e do inidor 5-HMF, assim como a detecção de outros compostos pode ser vista no Anexo II.

O Ensaio HA-P<sub>0,amb,0</sub> foi considerado como “branco”, ou seja, o substrato foi analisado *in natura*, sem adição de ácido e sem aquecimento, apenas previamente triturado conforme descrito em 4.1.1. Na Série 1 de ensaios foram agrupados os resultados de todas as diferentes condições operacionais planejadas de hidrólise ácida (item 4.1.2.2); enquanto que na Série 2, constam as repetições das condições da série 1 que apresentaram maior rendimento em AT.

Os valores de AT apresentados na Série 1 foram resultantes da análise de uma única amostra, após a mistura do volume de dois reatores (duplicata) relativo a cada um dos ensaios avaliados. Este procedimento foi adotado com o objetivo de reduzir o tempo de análise das amostras bem como reduzir o seu custo analítico em cromatografia líquida (para cada amostra analisada é usado e descartado um filtro Millipore). Na Série 2, os valores médios apresentados foram calculados a partir dos resultados analíticos de amostras separadas, cada qual proveniente de um ensaio (duplicata).



Tabela 10 - Concentração de açúcares totais (AT) e respectivos valores médios de rendimento em bases seca (R) obtidos na hidrólise ácida de 250 g mu L<sup>-1</sup> (11,75 g ms L<sup>-1</sup>) de dois (Séries 1 e 2) pseudocauls da bananeira *Musa cavendishii*, sem a remoção do seu caldo natural.

Ensaio <sup>1</sup>	Série 1		Série 2	
	AT* (g L <sup>-1</sup> )	R (%)	AT <sup>2</sup> (g L <sup>-1</sup> )	R (%)
HA-P <sub>0,amb,0</sub> <sup>3</sup>	1,29	-	2,78/2,68	-
HA-P <sub>0,90,15</sub>	1,43	1,2		
HA-P <sub>0,90,30</sub>	1,61	2,7		
HA-P <sub>0,100,15</sub>	1,53	2,0		
HA-P <sub>0,100,30</sub>	1,24	0		
HA-P <sub>0,120,15</sub> <sup>(a)</sup>	1,52	2,0	3,74/3,00	5,4±3,8 <sup>b</sup>
HA-P <sub>0,120,30</sub> <sup>(b)</sup>	1,64	3,0	2,81/3,27	2,6±3,3 <sup>a</sup>
HA-P <sub>1,90,15</sub>	1,91	5,3		
HA-P <sub>1,90,30</sub>	2,05	6,5		
HA-P <sub>1,100,15</sub>	2,58	11,0		
HA-P <sub>1,100,30</sub>	1,92	5,4		
HA-P <sub>1,120,15</sub> <sup>(c)</sup>	2,85	13,3	5,47/6,01	25,6±3,8 <sup>d,e,f</sup>
HA-P <sub>1,120,30</sub> <sup>(d)</sup>	3,80	21,4	5,97/4,85	22,8±6,1 <sup>c,d,f</sup>
HA-P <sub>2,90,15</sub>	2,26	8,3		
HA-P <sub>2,90,30</sub>	1,77	4,1		
HA-P <sub>2,100,15</sub>	1,81	3,6		
HA-P <sub>2,100,30</sub>	2,92	13,9		
HA-P <sub>2,120,15</sub> <sup>(e)</sup>	3,36	17,7	6,02/5,05	23,9±5,2 <sup>c,d,f</sup>
HA-P <sub>2,120,30</sub> <sup>(f)</sup>	5,27	33,9	6,13/4,25	28,5±3,2 <sup>c,d,e</sup>

<sup>1</sup> O símbolo HA-P corresponde ao uso do pseudocaulo (P) submetido à hidrólise ácida (HA). Os números seqüenciais em subscrito na identificação de cada um dos ensaios significam: concentração de ácido sulfúrico (0, 1 ou 2% m/m), temperatura (90, 100 ou 120 °C) e tempo de reação (15 ou 30 min).

<sup>2</sup> Refere-se à soma das concentrações de glicose, frutose e sacarose, principais açúcares solúveis determinados nas amostras analisadas. Os valores de AT separados por barra (/) referem-se à duplicata do ensaio para um mesmo pseudocaulo.

<sup>3</sup> Letras iguais nos resultados iguais a letras de cada ensaio, demonstram médias sem diferença significativa pelo método de Tukey, com nível de significância de 5% (ANOVA).

As diferentes concentrações em AT observadas entre os brancos (ensaio HA-P<sub>0,amb,0</sub>; Tabela 10) das Séries 1 e 2 foram decorrentes das prováveis diferenças nas características físico-químicas existentes nas amostras dos pseudocauls empregados. Essas amostras foram colhidas em diferentes datas, de diferentes pseudocauls e sem

preocupação com idade da planta e da parte do vegetal em que foram retiradas (parte superior, mediana ou inferior do pseudocaule).

Conforme pode ser observado na Tabela 10, na Série 1 de ensaios, os maiores rendimentos em açúcares totais foram obtidos com a hidrólise ácida conduzida nas condições operacionais de temperatura mais drástica e com maior tempo de reação (Ensaio HA-P<sub>1,120,30</sub> e HA-P<sub>2,120,30</sub>). Como nessa primeira série, em função da grande quantidade de frascos empregados, os ensaios foram realizados sem duplicata, não é possível afirmar, entre as condições testadas, qual a que realmente proporcionou maior formação de açúcares (AT).

A partir da segunda série de ensaios (Série 2), realizada apenas nas condições de maior severidade de temperatura (120 °C), pode-se observar que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os rendimentos obtidos nos ensaios empregando ácido sulfúrico 1% e 2%, independentemente do tempo de reação (15 ou 30 min). O rendimento máximo alcançado nesses experimentos foi de 28,5% sendo que o rendimento médio geral foi de 24,1±4,2.

Considerando apenas o teor de celulose contido na mistura (44 % da base seca, conforme Tabela 9) e considerando o rendimento teórico de 1,11 g glicose/g celulose, conforme Fingerut (2006), o rendimento máximo possível para a hidrólise total em relação à massa seca do substrato seria de 48,84%.

Com base nessa análise, pode-se afirmar que a eficiência do processo de conversão da biomassa vegetal de pseudocaule da bananeira em açúcares totais através unicamente da hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ou 2%, 120 °C, 15 ou 30 min foi de 49 %.

O rendimento médio geral em AT alcançado neste trabalho ( $R = 24,1 \pm 4,2\%$ ) foi superior ao valor divulgado por Silva (2009),  $R = 15,2 \pm 0,7\%$ , quando esse utilizou a hidrólise enzimática (sacarificação enzimática) sem pré-tratamento químico como processo de despolimerização da celulose contida em pseudocaule de bananeira (100 g ms L<sup>-1</sup>), previamente seco e moído. No entanto, ao submeter o substrato à hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% m/v, 120 °C, 10 min, antes da sacarificação enzimática, o autor obteve rendimento na conversão de celulose em glicose de 32,3±0,7%. Ao adicionar a deslignificação alcalina (NaOH 1% m/v, 100°C, 1 h) como pré-tratamento após a hidrólise ácida o rendimento foi aumentado para 61,0±0,2%. Como o autor, após cada pré-tratamento lavou a massa sólida restante a fim de eliminar resíduos químicos

que pudessem interferir na operação subsequente, o mesmo considerou o pré-tratamento com ácido bastante severo, pois resultou na perda de celulose por solubilização de 29,6%. Com a deslignificação alcalina a perda no teor de celulose foi de 1,2%. Essas perdas foram calculadas sempre com base na quantidade inicial do produto antes de cada um dos tratamentos.

Empregando outro tipo de biomassa lignocelulósicas (bagaço de cana-de-açúcar) como fonte de açúcares, Gurgel (2010) obteve rendimento máximo em glicose de 70,2% ao hidrolisar (HCl 0,1%, 190 °C, 22 min) o bagaço da cana-de-açúcar previamente deslignificado. Sarrouth *et al.* (2007) investigaram a hidrólise ácida desse mesmo substrato com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70%, 50 °C, 60 min e obtiveram 88% de rendimento em açúcares. Já, Silva (2009) com o uso da hidrólise enzimática precedida de pré-tratamento hidrotérmico (195 °C, 10 min) e deslignificação alcalina, alcançou rendimento de 89,2%.

Conforme Hamelinck (2005), para processos de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído o rendimento em glicose pode chegar a valores da ordem de 50%, enquanto que, para processos com ácido concentrado utilizando de 30% a 70% de ácido sulfúrico é possível se obter rendimentos de até 90%.

É importante ressaltar aqui que os conceitos de rendimento utilizados por cada um dos autores mencionados anteriormente podem ter sido diferentes e portanto, os seus valores calculados de forma diferente da utilizada neste trabalho. Por exemplo, resgatando o trabalho desenvolvido por Silva (2009), o qual fez parte da dissertação de mestrado do autor apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, foi possível identificar que os valores de rendimento estimados pelo autor são, na verdade, correspondentes aos valores de eficiência calculados neste trabalho (Equação 3). Assim, especificamente para o caso de comparação com Silva (2009) e utilizando o valor de eficiência de 49% no lugar do rendimento médio geral de 24,1% (Tabela 10), pode-se verificar que as diferenças percentuais entre os “rendimentos” máximos dos processos avaliados reduzem significativamente.

Mesmo assim, fica aqui evidenciada a necessidade de novos estudos para se ter uma maior clareza em relação à potencialidade do uso exclusivo da hidrólise ácida como processo de despolimerização do pseudocaule. Para tanto, precisaria ser investigada a possibilidade de se aumentar o rendimento da conversão de celulose obtido até então. A construção da cinética da produção de glicose em função do

tempo de reação empregando períodos de tempo bem mais longo do que o utilizado neste trabalho (30 min) pode ser uma boa alternativa para isto.

É possível evidenciar também que com o tipo de tratamento aplicado até então, a concentração máxima de açúcares fermentescíveis obtido no caldo tratado (AT = 6,13 g L<sup>-1</sup>) é muito baixa, principalmente se comparado com o processo industrial da produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar, o qual, segundo Dias (2008) usa em torno de 120 g L<sup>-1</sup> de sacarose na fermentação.

Numa primeira tentativa para aumentar a concentração de açúcares hidrolisados sem, contudo, ainda, alterar o processo hidrolítico empregado até o momento, foi efetuada a hidrólise do substrato com o dobro da concentração daquela utilizada anteriormente. Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 11- Concentração de açúcares totais (AT) e respectivos valores de rendimento em base seca (R) obtidos na hidrólise ácida de 23,50 g ms L<sup>-1</sup> (500 g mu L<sup>-1</sup>) de dois pseudocaules (Séries 1 e 2) da bananeira *Musa cavendishii*, sem a remoção do seu caldo natural.

Ensaio *	Série 1		Série 2	
	AT** (g L <sup>-1</sup> )	R (%)	AT** (g L <sup>-1</sup> )	R (%)
HA-P <sub>0,amb,0</sub> <sup>(a)***</sup>	10,75±0,35	-	11,35±0,28	-
HA-P <sub>1,120,30</sub> <sup>(b)</sup>	11,95±0,21	5,1±0,6 <sup>a</sup>	12,18±0,12	4,3±0,4 <sup>b</sup>

\* O símbolo HA-P corresponde ao uso do pseudocaulo (P) submetido à hidrólise ácida (HA). Os números seqüenciais em subscrito na identificação de cada um dos ensaios significam: concentração de ácido sulfúrico (0 ou 1% m/m), temperatura (ambiente ou 120 °C) e tempo de reação (0 ou 30 min).

\*\* Refere-se à soma das concentrações de glicose, frutose e sacarose, açúcares solúveis de maiores concentrações nas amostras analisadas. Traços de outros açúcares como arabinose e xilose foram detectados, porém não foram somados em AT.

\*\*\* Letras iguais nos resultados iguais a letras de cada ensaio, demonstram médias sem diferença significativa pelo método de Tukey, com nível de significância de 5% (ANOVA).

O rendimento médio entre as duas séries de ensaios foi de 4,7%. Esse valor foi 5,1 vezes menor do que o rendimento médio obtido (24,1%) com 50% da massa de substrato.

A eficiência da conversão de celulose em AT alcançada no tratamento de 23,50 g ms L<sup>-1</sup> de resíduo, conforme Equação 4, foi de apenas 7% enquanto que a alcançada com 11,75 g ms L<sup>-1</sup> de resíduo foi de 49%.

Conforme Rodrigues (2007), a cinética da reação de hidrólise ácida pode ser afetada pelo aumento da concentração de substrato tanto em função do aumento da resistência à transferência de massa tanto do catalisador (ácido) até o interior da partícula sólida, como dos açúcares formados até o seio da fase líquida.

Explicação semelhante foi dada também por Gómez (1985). De acordo com o autor, o aumento da concentração de lignocelulósicos na reação de hidrólise pode alterar a suscetibilidade da celulose ao catalisador, a qual é dependente da característica estrutural da biomassa e do conseqüente grau de inchamento da fibra vegetal com a água disponível na mistura reacional.

Portanto, nas condições operacionais avaliadas até o momento, utilizando apenas a hidrólise ácida como processo de despolimerização, dobrar a concentração do substrato *in natura* visando aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis no caldo hidrolisado não é recomendado.

Considerando que a deslignificação prévia do pseudocaule com soluções diluídas de hidróxido de sódio pode favorecer o acesso do ácido à celulose, conforme demonstrou Silva (2009), novos experimentos, com 23,50 g ms L<sup>-1</sup> de substrato foram realizados.

A partir deste entendimento, procurou-se extrair primeiramente o suco (caldo natural) do pseudocaule para preservar os açúcares solúveis naturalmente contidos neste líquido (ANEXO II) e, em seguida, lavar o material sólido residual com água corrente para, só então, realizar os testes de hidrólise ácida. O resíduo sólido continuou sendo utilizado na forma úmida e triturado após extração do suco e a quantidade de substrato a ser empregado continuou sendo calculada em base seca do material. Conseqüentemente, a quantidade teórica de celulose empregada no experimento subseqüente permaneceu a mesma do ensaio anterior.

### **5.2.2 Hidrólise ácida com deslignificação prévia**

A Tabela 12 apresenta os valores médios em AT e correspondentes valores de rendimento e eficiência obtidos na hidrólise ácida do pseudocaule isento de caldo, com e sem tratamento prévio com NaOH 1% ou 3% m/m. A concentração de resíduo

foi de 23,50 g ms L<sup>-1</sup> (500 g mu L<sup>-1</sup>) e a hidrólise ácida foi conduzida a 120 °C empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% m/m e tempo de reação de 30 min.

Tabela 12 – Valores médios de concentração de açúcares totais (AT), rendimento em base seca (R) e eficiência (ε) obtidos na hidrólise ácida de 23,50 g ms L<sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira *Musa Cavendishii* sem o caldo natural (fase líquida).

Ensaio*	AT** (g L <sup>-1</sup> )	R (%)	ε*** (%)	Observação
branco	0,05/0,08	0,3±0,1	0,6±0,2	Resíduo sólido não tratado
HA-P <sub>1,120,30</sub>	0,33/0,27	1,3±0,2	2,6±0,4	Sem pré-tratamento com NaOH
D <sub>1</sub> HA-P <sub>1,120,30</sub>	1,90/1,96	8,2±0,2	16,8±0,3	Pré-tratamento com NaOH 1%
D <sub>3</sub> HA-P <sub>1,120,30</sub>	2,45/2,67	10,9±0,7	22,3±1,4	Pré-tratamento com NaOH 3%

\* O símbolo HA-P corresponde ao uso da hidrólise ácida na despolimerização do pseudocaule. A adição da letra D na identificação do ensaio representa o uso de tratamento prévio do pseudocaule com NaOH antes da hidrólise ácida. Os números seqüenciais em subscrito na identificação de cada um dos ensaios representam: após a letra D, concentração de NaOH (1 ou 3 % m/m); após as letras HA-P, as condições operacionais utilizadas na hidrólise ácida (concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1% m/m, temperatura de 120 °C e tempo de reação de 30 min).

\*\* Os valores de AT separados por barra (/) representam as médias analíticas de 2 séries de ensaios com amostras de pseudocaule colhidos no campo em dias diferentes.

\*\*\* Considerado como base de cálculo o rendimento teórico de 48,84% (0,4884 g AT/g de massa seca do substrato).

A baixa concentração de AT (0,05 e 0,08 g L<sup>-1</sup>) observada na amostra não tratada (branco) comprovou a remoção dos açúcares solúveis contidos naturalmente no pseudocaule (Anexo III) após as operações de extração do seu suco (esmagamento do pseudocaule) e lavagem do resíduo sólido. Com isto, foi possível garantir que a obtenção de AT oriunda do substrato foi agora devida, somente, aos tratamentos de despolimerização realizados.

Conforme pode ser observado na Tabela 12, o uso do tratamento prévio do resíduo sólido com NaOH (Ensaio D<sub>1</sub>HA-P<sub>1,120,30</sub> e D<sub>3</sub>HA-P<sub>1,120,30</sub>) proporcionou aumento em AT de até 10 vezes em comparação ao resíduo hidrolisado sem esse tipo de tratamento (Ensaio HA-P<sub>1,120,15</sub>), comprovando assim a contribuição positiva desse pré-tratamento na obtenção de maior quantidade de açúcares fermentescíveis solúveis.

Com isto, houve um incremento de mesma proporção no rendimento e eficiência do processo.

No entanto, o rendimento máximo alcançado em AT ( $R = 10,9 \pm 0,7\%$ , Ensaio  $D_3HA_{1,120,15}$ ) continua inferior ao rendimento máximo estimado para o caso do uso da metade da quantidade de pseudocaule ( $R = 28,5 \pm 3,2\%$ , Tabela 10, Ensaio  $HA-P_{2,120,30}$ ), sem deslignificação alcalina. Fica novamente evidenciado que buscar o aumento de AT através do aumento da concentração inicial de pseudocaule *in natura* na mistura não é uma alternativa recomendada, mesmo alterando o processo de despolimerização da biomassa.

A secagem e a moagem do substrato antes dos processos de pré-tratamento químico parece ser uma boa opção. Utilizando o pseudocaule moído após secagem natural ao sol até umidade inferior a 10%, Silva (2009) conseguiu hidrolisar  $100 \text{ g ms L}^{-1}$  de substrato e obteve no caldo hidrolisado  $74,4 \text{ g L}^{-1}$  de glicose.

A escolha da rota utilizada neste trabalho, baseada na idéia do uso da biomassa lignocelulósica em seu estado natural para o aproveitamento total dos açúcares fermentescíveis, tanto aqueles contidos naturalmente no caldo do pseudocaule úmido como os gerados durante os tratamentos de despolimerização, induziu ao tratamento do resíduo diferentemente daquele empregado por Silva (2009).

Além disto, é importante ressaltar que ao pensar em produção em larga escala, devido a grande quantidade de pseudocaule a ser empregado (1 t de resíduo úmido para a obtenção teórica máxima de 12,7 L de etanol, conforme estimado anteriormente, pág. 59) a secagem natural do substrato pode se tornar inviável e o uso de secadores industriais uma necessidade premente. Esse tipo de pré-tratamento consome grande quantidade de energia e somente uma análise econômica de todo o processo pode indicar qual a melhor rota para viabilizar a produção de etanol de 2ª geração.

### **5.2. 3 Hidrólise enzimática**

A partir dos resultados obtidos com os experimentos envolvendo a hidrólise ácida do pseudocaule da bananeira, a menor concentração de substrato

testada ( $11,75 \text{ g ms L}^{-1}$ ) foi selecionada e utilizada nestes ensaios com hidrólise enzimática (HE).

Mesmo tendo sido constatado nos ensaios anteriores (Tabela 12) que o uso de NaOH 3% (ensaio  $D_3\text{HA-P}_{1,120,15}$ ) proporcionou um rendimento em AT 33% superior ao valor obtido com NaOH 1% (ensaio  $D_1\text{HA-P}_{1,120,15}$ ) foi utilizada a menor concentração de base para a deslignificação com a intenção de se reduzir o teor de álcali no resíduo líquido gerado.

Três diferentes rotas de operação foram avaliadas: (1) uso da HE como único processo de despolimerização (Ensaio HE-P), (2) uso da HE precedida de hidrólise ácida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, 120 °C, 30 min (Ensaio HAHE-P) e (3) uso da HE com deslignificação prévia do substrato por NaOH 1% m/m (Ensaio  $D_1\text{HE-P}$ ). A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 13 – Concentrações de açúcares totais (AT) obtidos na despolimerização de  $11,75 \text{ g ms L}^{-1}$  de pseudocaule da bananeira por hidrólise enzimática e respectivos valores de rendimento (R) e eficiência ( $\epsilon$ ) do processo hidrolítico.

Ensaio*	t	AT	R	$\epsilon$
	(h)	(g/L)	(%)	(%)
HE-P	0	0,55/0,07		
	24	0,91/1,08	3,9±2,6	3,2±1,4
HAHE-P	0	0,79/0,42		
	24	5,23/5,39	26,9±2,1	55,1±4,3
$D_1\text{HE-P}$	0	0,31/0,85		
	24	7,33/6,49	36,2±5,6	74,1±11,4

\* Ensaio HE-P: hidrólise enzimática sem tratamentos prévios de hidrólise ácida e deslignificação; Ensaio HAHE-P: hidrólise enzimática com hidrólise ácida prévia ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, 120 °C, 30 min), sem deslignificação; Ensaio  $D_1\text{HE-P}$ : hidrólise enzimática sem hidrólise ácida, com deslignificação prévia empregando NaOH 1%.

Conforme pode ser observado na Tabela 13, com emprego da hidrólise ácida do pseudocaule antes da HE foi possível obter o rendimento de 26,9±2,1% em AT, sendo quase sete vezes maior do que o rendimento alcançado com o uso apenas da HE (R = 3,9%).



No entanto, em comparação ao valor médio obtido na despolimerização do substrato apenas com a hidrólise ácida ( $AT_{\text{médio}} = 24,1 \pm 4,2 \text{ g L}^{-1}$ , Tabela 10) pode-se verificar que o uso combinado da hidrólise ácida com a enzimática (Ensaio HAHE-P, Tabela 13) não proporcionou ganho significativo ( $p < 0,05$ ) no rendimento em AT. A provável permanência da lignina no substrato submetido à hidrólise enzimática pode ter contribuído para este resultado.

De acordo com Sun e Cheng (2002), para a hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos, o pré-tratamento dos materiais para remoção tanto da hemicelulose por hidrólise ácida como da lignina por hidrólise alcalina têm o propósito de reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material. Com isto, maior eficiência da hidrólise enzimática pode ser esperada ao se comparar o seu uso com o substrato *in natura*, sem pré-tratamento.

Com a substituição da hidrólise ácida no pré-tratamento do substrato pela hidrólise alcalina (Ensaio D<sub>1</sub>HE-P) foi possível aumentar a eficiência da conversão do substrato em AT de 55,1 para 74,1%. Este valor foi superior ao alcançado por Silva (2009) ao hidrolisar enzimaticamente o pseudocaulo de bananeira deslignificado e obter  $61,0 \pm 0,2\%$  de conversão de celulose em glicose. O autor utilizou a enzima celulase comercial Celluclast 1.5 L ( $15 \text{ FPU (g MS)}^{-1}$ ) suplementada com  $\beta$ -glicosidade Novozym 188 ( $10 \text{ UI (g MS)}^{-1}$ ) e como pré-tratamento, a hidrólise ácida seguida de hidrólise alcalina (NaOH 1% m/v, 100 °C, 1h). Após cada um desses pré-tratamentos o autor lavou o material sólido residual para somente então submetê-lo ao processo seguinte. Com essas lavagens podem ter ocorrido significativas perdas de açúcares solúveis, reduzindo assim o seu rendimento. Essa perda não ocorreu neste trabalho, pois nos ensaios HAHE-P e D<sub>1</sub>HE-P (Tabela 13) o resíduo sólido foi lavado somente no início dos experimentos.

A ausência de lavagem após a deslignificação realizada precisa também ser mais bem avaliada, pois, em função do pH alcalino ter sido reduzido para 5,5 (pH da reação da hidrólise enzimática) com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a concentração salina teórica no caldo final para fermentação seria da ordem de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de NaSO<sub>4</sub>. Essa quantidade de sal na mistura hidrolisada poderá provocar inibição do processo fermentativo subsequente.

### **5.3 Ensaio de fermentação**

Para melhor entendimento dos resultados e discussões feitas neste tópico, convém deixar claro que nos ensaios de fermentação empregando o pseudocaule de bananeira tratado apenas com ácido sulfúrico, sem qualquer outro tipo de tratamento químico (Ensaio EP1) o caldo de fermentação foi formado tanto com a polpa do substrato hidrolisado (parte sólida do pseudocaule) como também com o seu suco (parte líquida). No Ensaio EP2, o suco da bananeira foi removido antes do pseudocaule ser submetido à deslignificação e hidrólise ácida.

Com o objetivo de verificar a fermentabilidade do suco da bananeira, este líquido foi conduzido à fermentação em biorreator de bancada (Ensaio FS).

#### **5.3.1 Fermentações em frascos Erlenmeyer - Ensaio E**

Os resultados obtidos nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL estão apresentados na Figura 10.

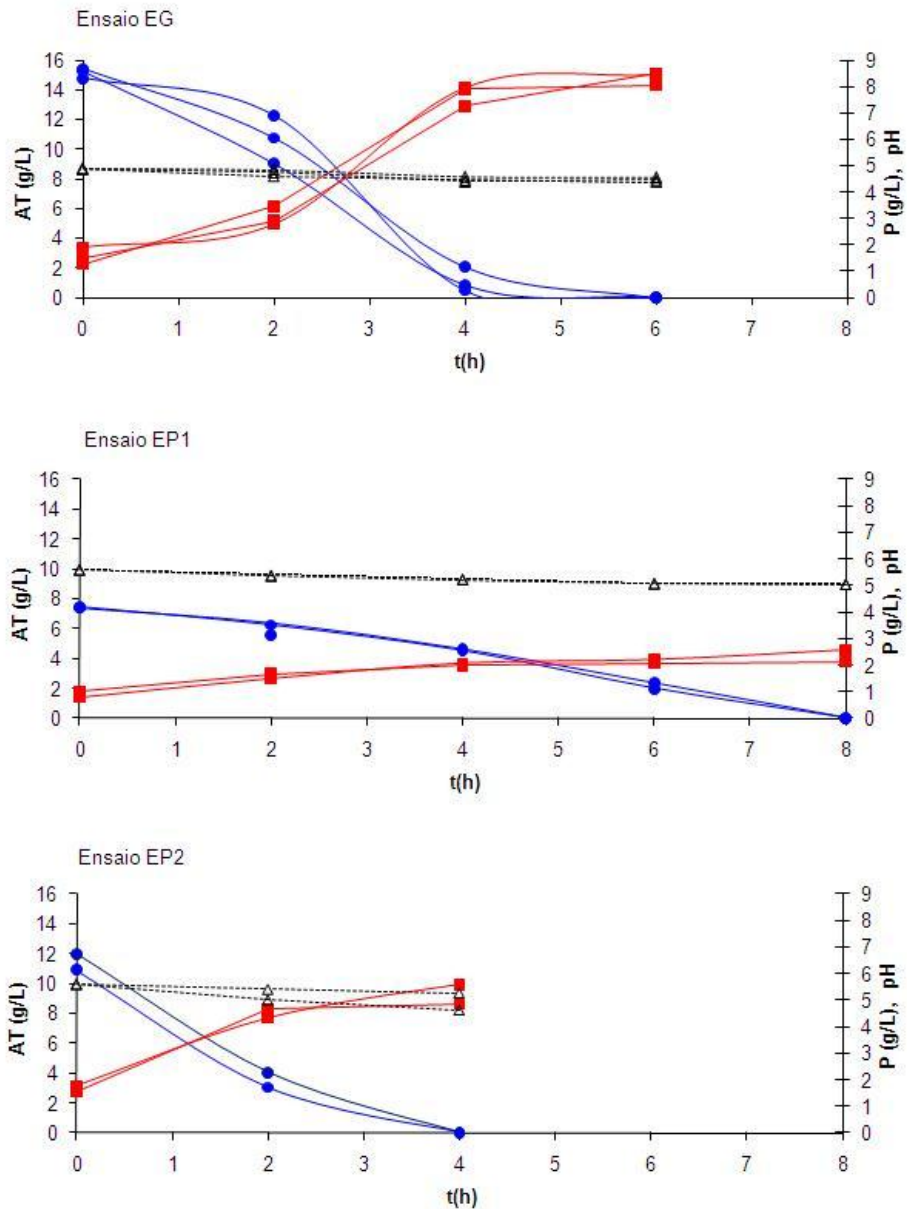


Figura 10 - Cinéticas do consumo de açúcares fermentescíveis (● AT), produção de etanol (■ P) e valor de pH (Δ pH) observadas na fermentação por *Saccharomyces cerevisia* empregando diferentes tipos de substrato: Ensaio EG - glicose (ensaio padrão), Ensaio EP1 - 11,75 g ms L<sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* submetido à despolimerização com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 120 °C, 30 min, sem pré-tratamento químico com NaOH, Ensaio EP2 - 23,50 g ms L<sup>-1</sup> de pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* submetido à despolimerização com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 120 °C, 30 min, com pré-tratamento químico com NaOH 1%.

Conforme pode ser observado na Figura 10, o açúcar solúvel, definido como AT, foi totalmente metabolizado pelo microrganismo empregado nos três ensaios de fermentações realizados (EG, EP-1 e EP-2). Conseqüentemente, pode-se afirmar que em nenhum dos experimentos houve limitação do processo fermentativo por falta de nutrientes.

Nas condições experimentais avaliadas, não foi possível identificar a existência de inibição do processo fermentativo. Em todos os ensaios, o valor do pH permaneceu praticamente constante e dentro da faixa de pH indicada como a ideal para esse tipo de fermentação (pH de 4 a 6).

Pode-se perceber no Ensaio EP-2 a existência de uma maior velocidade global no consumo de açúcares totais ( $\Delta_{AT}/\Delta t = 2,73 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) quando comparada ao Ensaio EP-1 ( $\Delta_{AT}/\Delta t = 0,93 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). A remoção da lignina do pseudocaule pré-tratado com NaOH, seguida de sua lavagem, pode ter contribuído para isso. Além disto, no Ensaio EP-2 houve uma maior concentração de etanol no início do processo fermentativo ( $P=1,53 \text{ g L}^{-1}$ ) em comparação a EP-1 ( $P=0,99 \text{ g L}^{-1}$ ) o que pode significar condições fisiológicas diferentes dos microrganismos proveniente do inóculo. Convém deixar claro que esses ensaios foram realizados em meses diferentes e, portanto, foram utilizadas leveduras de diferentes ciclos de manutenção. Novos estudos precisariam ser realizados para melhor entendimento destes resultados.

A partir da Figura 10 foram estimados os valores de rendimento, produtividade e eficiência do processo fermentativo, apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Rendimentos em etanol ( $Y_{P/AT}$ ), produtividade ( $Q_P$ ) e eficiência do processo de fermentação ( $\epsilon$ ) observadas na fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* em meios de cultivo contendo glicose (Ensaio EG, ensaio padrão) ou pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* com diferentes concentrações do resíduo (Ensaio EP-1: 11,75 g ms L<sup>-1</sup>; Ensaio EP-2: 23,50 g ms L<sup>-1</sup>) e submetidos à despolimerização com ácido sulfúrico sem e com deslignificação prévia, respectivamente.

Parâmetro	Ensaio*		
	EG <sup>a</sup>	EP1 <sup>b</sup>	EP2 <sup>c</sup>
$Y_{P/AT}$ (g g <sup>-1</sup> )	0,449 ± 0,001	0,19 ± 0,06	0,31 ± 0,01
$Q_P$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	1,14 ± 0,03	0,18 ± 0,06	0,90 ± 0,09
$\epsilon$ (%)	87,9 ± 1,9	38,3 ± 12,0	61,0 ± 2,1

\* Letras iguais nos resultados iguais a letras de cada ensaio, demonstram médias sem diferença significativa pelo método de Tukey, com nível de significância de 5% (ANOVA)

Os valores de rendimento, produtividade e eficiência do ensaio padrão EG foram iguais aos obtidos recentemente por Schulz (2010), utilizando o mesmo tipo de processo fermentativo e o mesmo microrganismo.

Com a substituição da glicose (Ensaio EG) por pseudocaule hidrolisado com ácido sulfúrico, sem a deslignificação prévia com hidróxido de sódio (Ensaio EP1), todos os parâmetros produtivos foram notadamente reduzidos. No entanto, ao submeter previamente o pseudocaule à deslignificação (Ensaio EP2) houve um incremento da ordem de 63% em  $Y_{P/AT}$ , 400% em  $Q_P$  e de 59% em  $\epsilon$ , comparativamente à EP1 e, com isto, uma menor diferença em relação ao ensaio EG.

Mesmo com a observação da possibilidade do uso de microrganismos de diferentes estados fisiológicos, feita anteriormente na discussão da cinética do processo fermentação, o emprego da deslignificação e lavagem prévia do substrato antes da hidrólise ácida parece favorecer além do processo hidrolítico, também o processo fermentativo. No entanto, conforme já mencionado, novos estudos precisam ser realizados para melhor entendimento destes resultados.

### 5.3.2 Fermentações em biorreator de bancada - Ensaio F

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos durante a fermentação do caldo puro do pseudocaule da bananeira, extraído antes da deslignificação e hidrólise. Para a fermentação foram adicionados ao caldo os mesmos nutrientes empregados nos ensaios anteriores, conforme descrito no item 4.2.2.

Tabela 15 – Tempo final de fermentação ( $t_f$ ), concentração inicial de açúcares totais ( $AT_0$ ), concentrações inicial ( $P_0$ ) e final ( $P_f$ ) de etanol e parâmetros produtivos de rendimento ( $Y_{P/AT}$ ), produtividade ( $Q_P$ ) e eficiência ( $\epsilon$ ) obtidos na fermentação do caldo puro do pseudocaule da bananeira por *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator de bancada.

Ensaio*	$t_f^{**}$ (h)	$AT_0$ (g L <sup>-1</sup> )	$P_0$ (g L <sup>-1</sup> )	$P_f$ (g L <sup>-1</sup> )	$Y_{P/AT}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_P$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ (%)
FC-a	4	18,9	1,59	8,77	0,38	1,79	74,4
FC-b	4	19,1	1,45	8,57	0,37	1,78	72,4
Média e desvio padrão					0,37±0,01	1,78±0,01	73,4±1,4

\* O ensaio FC-b refere-se a duplicata do ensaio FC-a realizado com o mesmo substrato conservado por congelamento.

\*\*  $t_f$  – tempo de fermentação para  $AT = 0$

O uso do caldo extraído do pseudocaule da bananeira *M. cavendishii* como substrato de fermentação possibilitou a sua assimilação completa pelo microrganismo fermentativo. Os valores médios de rendimento (0,37 g g<sup>-1</sup>), produtividade (1,78 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e eficiência (73,4%) do processo foram semelhantes aqueles estimados para a glicose (Ensaio EG, Tabela 14) comprovando assim a potencialidade do uso desse caldo (suco) na obtenção de etanol.

Recomenda-se, portanto, a continuidade desses estudos visando, assim como para o caso do uso do pseudocaule como substrato, aumentar a concentração inicial de açúcares fermentescíveis para aumentar a concentração do produto no caldo fermentado. O uso de evaporadores para elevar previamente a concentração de AT no

suco do pseudocaule, antes de se montar o caldo de fermentação, pode ser uma alternativa bastante interessante para avaliação futura.

Outro estudo que pode ser desenvolvido é a contribuição do retorno desse suco (concentrado ou não) ao caldo de fermentação obtido com a despolimerização da celulose (parte sólida do pseudocaule).

### 5.3.3 Comparando com a fermentação alcoólica de outras biomassas

A Tabela 16 mostra valores de rendimento e produtividade obtidos na fermentação alcoólica de diferentes tipos de substratos lignocelulósicos.

Tabela 16 – Valores de rendimento e produtividade em etanol, obtidos em fermentações com diferentes tipos de substratos.

Fonte de carbono	$Y_{P/AT}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_P$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Referência
cana-de-açúcar	0,43	3,4	Ribeiro e Horii, 1999
bagaço de maçã	0,44	0,51	Nogueira <i>et al.</i> , 2005
farelo de trigo	0,38	1,92	Palmarola-Adrados <i>et al.</i> , 2005
cavacos de madeira	0,4	0,67	Sassner <i>et al.</i> , 2006
farelo de mandioca	0,39	-	Ferreira <i>et al.</i> , 2006
polpa de banana	0,48	3,04	Schulz (2010)
cascas de banana	0,34	1,32	Schulz (2010)
Pseudocaule	0,31	0,90	Este trabalho (Tabela 14)
suco de pseudocaule	0,37	1,78	Este trabalho (Tabela 15)

Conforme pode ser observado na Tabela 16, o uso do pseudocaule, previamente deslignificado com NaOH 1% e hidrolisado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, 120 °C, 30 min, proporcionou rendimento em etanol ( $Y_{P/AT}$ ) semelhante às outras fermentações utilizando outro tipo de substrato.

A produtividade em etanol ( $Q_P$ ) obtida na fermentação do pseudocaule foi superior aos valores alcançados com o uso do bagaço de maçã (NOGUEIRA *et al.*, 2005) e com cavacos de madeira (SASSNER *et al.*, 2006). Entretanto, não se pode esquecer a observação já feita anteriormente: a concentração inicial de açúcares no meio de fermentação ( $AT_0 \approx 12 \text{ g L}^{-1}$ ) utilizando o pseudocaule como substrato foi muito baixa. Como ficou claro que há a necessidade de se aumentar essa concentração visando aumentar a concentração do etanol no caldo fermentado e com isto não impactar no gasto operacional para a extração do produto, os valores de produtividade aqui obtidos poderão ser significativamente afetados, tanto pela maior concentração inicial de substrato como pela formação de maior quantidade de metabólicos, incluindo o etanol.

Mesmas considerações podem ser feitas em relação ao uso do suco do pseudocaule como substrato da fermentação alcoólica.



## CONCLUSÕES

O pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* apresenta potencial para ser utilizado como substrato da fermentação alcoólica. Tomando como base de cálculo 1 t de massa seca do resíduo (21,28 t de massa úmida) a existência na sua composição química de 44% de celulose (em base seca) pode permitir a obtenção estequiométrica teórica de 488,4 kg de glicose e de 249,6 kg de etanol (320 L de etanol).

O uso da deslignificação prévia do pseudocaule com NaOH proporcionou maior eficiência no processo subsequente de despolimerização da celulose, independentemente desta ter sido feita com ácido sulfúrico (hidrólise ácida) ou com enzimas (hidrólise enzimática).

Nas condições experimentais avaliadas, com a hidrólise enzimática da celulose foi possível obter eficiência de 74,1% na conversão da celulose em glicose, valor este 3 vezes maior do que o valor obtido com a hidrólise ácida. No entanto, a quantidade exagerada de enzimas utilizadas ao mesmo tempo para esta hidrólise (5 diferentes tipos de enzimas) precisa ser reavaliada e a sua otimização alcançada. Quanto menor o gasto com insumos menor o custo da produção de etanol de 2ª geração.

A fermentação do pseudocaule após hidrólise ácida possibilitou alcançar valores de rendimento semelhantes aos valores obtidos por outros autores utilizando outras biomassas como substrato de fermentação. Porém, em função da baixa concentração inicial de açúcar utilizada no meio de cultivo proveniente do pseudocaule, fica evidente a necessidade de maximizar essa variável para aumentar a concentração de etanol no caldo fermentado. Do ponto de vista industrial, baixas concentrações de produtos acarretam em custos elevados na fase posterior de extração e purificação da substância de interesse.

O caldo natural (suco) da bananeira, por possuir em sua composição de 10 a 20 g L<sup>-1</sup> de açúcares fermentescíveis e por possibilitar uma alta eficiência do processo de conversão desses açúcares em etanol ( $\epsilon = 73,4 \pm 1,4 \%$ ), passa a ser um novo foco

de estudo na busca do sucesso de produção de etanol a partir do pseudocaule de bananeira. O seu aproveitamento como substrato, tanto de forma isolada como combinada com a celulose hidrolisada devem ser mais bem estudado.

## SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

- ✓ Aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis no caldo hidrolisado avaliando o uso de diferentes métodos para o incremento da concentração de massa seca do substrato no meio reacional de hidrólise. O uso de secagem prévia do pseudocaule é uma boa alternativa a ser avaliada.
- ✓ Estabelecer o tempo ideal de reação da hidrólise ácida utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%, 120 °C e substrato previamente deslignificado com NaOH 1%, 120 °C, 15 min para aumentar a eficiência do processo.
- ✓ Aperfeiçoar o uso de enzimas na hidrólise enzimática do pseudocaule previamente deslignificado, buscando a redução do número e da quantidade utilizada.
- ✓ Buscar processo de concentração do suco da bananeira para aumentar a sua potencialidade de uso como substrato da fermentação alcoólica, tanto na sua forma isolada como combinada com o pseudocaule hidrolisado.
- ✓ Avaliar a contribuição do uso combinado do caldo hidrolisado de pseudocaule com outros resíduos da bananicultura (polpa e cascas de frutos rejeitados para comercialização e cascas resultantes da industrialização da polpa) no incremento da concentração inicial de açúcar no caldo de fermentação.
- ✓ Efetuar o balanço de massa e de energia e fazer a análise econômica do processo após a sua otimização (maximização do rendimento, produtividade e eficiência).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A.J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 6-10, 2005.
- ARAÚJO, J. R., WALDMAN, W., DEPAOLI, M. Thermal properties of high density polyethylene composites with natural fibres: Coupling agent effect. *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, p. 1770-1775, 2008
- BADHAN, A.K.; Chadha, B.S; Kaur, J.; Saini, H.S; Bhat, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504-510, 2007.
- BARDIAYA, N. SOMAYAJI, D. and KHANNA, S., Biomethanation of banana peel and pineapple waste. *Bioresource Technology*, v.58, p.73-76, 1996.
- BANANACATARINENSE (20011). Disponível em: [www.bananacatarinense.com.br](http://www.bananacatarinense.com.br), acesso em: 05/2011
- BAUDEL, H.M., Pré Tratamento e Hidrólise. In: Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para produção de etanol, III, 2007, São Paulo.
- BEZERRA, L.J.D. et al. **Estudo bromatológico da bananeira (*Musa spp.*) e sua utilização na alimentação de bovinos.** Agronline, 2002. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agrociencia/artigo/37>>. Acesso em: 18 set. 2008.
- BRASIL. Balanço Nacional da cana-de-açúcar e Agroenergia. Brasília, 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em: 08/2009
- BRASIL. Produção brasileira de Álcool.. Brasília, 2008. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em: ago. de 2009.
- BRASILAGRO 2011, Disponível em: <http://www.brasilagro.com.br/index.php?noticias/detalhes/11/39094>. Acesso em: 05/2011
- BAKRY, F.; CARREL, F.; CARUANA, M. L.; COTE, F. X.; JENNY, C.; TEZENAS, D. H. Les Bananiers. Amelioration des Plantes Tropicales, CIRAD-ORSTOM, p. 109– 139, 1997.

- CARA, C., RUIZ, E., OLIVA, J.M., SÁEZ, F., CASTRO, E., Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification . *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1869-1876, 2008.
- CENTRO VIRTUAL DE DESENVOLVIMENTO DE COMPÓSITOS BIODEGRADÁVEIS, 2010. Disponível em: [www.cvnaturplas.dnsalias.com](http://www.cvnaturplas.dnsalias.com)
- CEPA - Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>> Acesso em: ago. 2011
- CHANDEL, A.K; KAPOOR, R.K; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1947-1950, 2007.
- CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 84, 2000.
- CORDEIRO, N. *et al.*, Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. *Industrial Crops and Products* v.19, p. 147-154, 2004.
- CTBE – Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol. Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br>> Acesso em set. 2009
- DAWSON, L., BOOPATHY, R., Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production, *Bioresource Technology*, v.98, p.1695–1699, 2007.
- DEKKER, R.F.H. Biodegradation of the hemicelluloses. In: Higuchi, T. (Ed.) *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Tokyo: Academic Press, p. 505-533, 1985.
- DEL CAMPO, I., ALEGRÍA, I., ZAZPE, M., ECHEVERRÍA, M., ECHEVERRÍA, I. Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for biotethanol production. *Industrial Crops and Products*, v.24, p.214-221, 2006.
- DIAS, M.O.S., Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço, 2008. 253 f. Tese (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- DIPARDO, J. Outlook for Biomass Ethanol Production and Demand. *Energy Information Administration/DOE*, Washington, DC
- EERE – Energy Efficiency and Renewable Energy (USDOE). Disponível em: <[www1.eere.energy.gov/biomass/](http://www1.eere.energy.gov/biomass/)>. Acesso em ago. 2009
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: março 2011.

- FINGUERUT, J., Caracterização do Material Lignocelulósico. In: Workshop de Hidrólise de Bagaço e Palha de Cana para Produção de Etanol, 2006, São Paulo.
- FIORAVANÇO, J.C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. *Informações econômicas*, SP, v.33, n.10 p. 15-22, 2003
- GADEN JR., E.C.. Fermentation Process Kinetics. *Jo. Bioch. Microb. Techn. Engineering*, v.1, p. 413-429, 1959.
- GONZÁLEZ, A.; GARCÍA, O.L.; VILLAMIL, G.. Pasta de alto rendimento a partir de bagaço de cana. *O Papel*, São Paulo, v.14, p.19-25, 1993.
- GRAF, A; KOEHLER, T. Oregon cellulose-ethanol study: An evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstocks. Oregon Office of Energy, 2000.
- GRANT, J., Manual sobre la fabricacion de pulpa y papel. Mexico: Compañia Editorial Continental S.A., 1966. Cap.2, p.35-89: Materias-primas fibrosas:Obtención de pulpas.
- GRAY, K.A; ZHAO.L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.10 p.141-146, 2006.
- GUIMARÃES, J.L. *et al.*, Characterization of banana, sugarcane bagasse and spong gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops Products*. (2009)
- GURGEL, L.V.A, Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol. 315p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2010.
- HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v.28, p. 384-410, 2005.
- HAMMOND, J.B., EGG, R., DIGGINS, D., COBLE, C.G., Alcohol from bananas. *Bioresource Technology*, v.56, p.125-130, 1996.
- HERNÁNDEZ, J.A.; Lignina organosolv de *Eucalyptus dunnii* maiden, alternativa para a síntese de adesivos de poliuretano para madeira. 83p. Tese (Doutorado) - Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias / Universidade Federal do Paraná, 2007.
- HIROCE, R. O aproveitamento do pseudocaule. *O Estado de São Paulo*, 19 mar. 1972. Suplemento Agrícola 877, p.11

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: agosto de 2011.
- JARMAN, C.G.; MYKOLUK, S.; KENNEDY, L.; CANNING, A.J. Banana fibre: a review of its properties and small-scale extraction and processing. *Tropical Science*, London, v.19, n.4, p. 173-185, 1997.
- JAYARAMAN, K., Manufacturing sisal-polypropylene composites with minimum fibre degradation', *Composites Science and Technology*, v. 63, p. 367-374, 2003.
- KAAR, W.E., GUTIERREZ, C.V., KINOSHITA, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v.14, p. 277- 287, 1998.
- 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.
- LYND, L.R.; ELANDER, R.T.; WYMAN, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.57/58, p.741-761, 1996.
- LYND, L.R, VAN ZYL, W.H., MCBRIDE, J.E., LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, v.16, p. 577-583, 2005.
- LORA, E.E.S. In: *Prevenção e controle da poluição nos setores energético, industrial e de transporte*, 2ª Ed., Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2002
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em ago. 2009
- MARTÍN, C.; MARCET,;ALMAZÁN, O.; JONSSON, L.J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, v.98, p. 1767-1773,2007.
- MCT - MINISTÉRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Disponível em: <[www.mct.gov.br](http://www.mct.gov.br)> Acesso em: set. 2009
- MEDEIROS, L. A. Xilanases de *Penicillium chrysogenum*: produção, purificação, caracterização e aplicação no pré-branqueamento de polpa celulósica de

- pseudocaule de bananeira frutífera, 2007. 124 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, 2007.
- MEDINA, J.C. Plantas fibrosas da flora mundial. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1959. 913f.
- MENDES, J. Desenvolvimento de um composto biodegradável para isolamento térmico. Dissertação de Doutorado. PDCEM/UFRN,2002.
- MENDGEN, K.; Deising, H.; *New Phytol.* **1993**, *124*, 193.
- MONSALVE, J. F.; PEREZ, V. I. M. ; COLORADO, A. A. R. **Producción de etanol a partir de La cáscara de banana y almidón de yuca.** *Dyna*, ano 73, n° 150, p. 21-27, 2006.
- MOSIER, N.; WYMAN, C; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.96, p.673-686, 2005.
- 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](http://www.portalexame.abril.com.br/static/aberto/complementos/870/nastari_presentation.pdf) Acesso em agosto de 2009
- OGEDA, T. L. ; PETRI, D. F. S. . Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova* (Impresso), v. 33, p. 1549-1558, 2010.
- OLIVEIRA, L., COREDIRO N., EVTUGNIN, E.V., TORRES, I.C., SILVESTRE A.J.D., Chemical composition of different morphological parts from “Dwarf Cavendish” banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. *Industrial Crops and Products*, v.26, p. 163-172, 2007.
- OLIVEIRA, F.M.V., Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana, 98 f, Tese (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I:inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24, 2000.
- PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTĚBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. **Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran.** *Bioresource Technology*, n. 96, p.843–850, 2005.



- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ H.; DOMINGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*. V. 66p 25-40, 1998.
- PATEL, R.J., ANGADIYAVAR, C.S., SRINIVASA, Y.. Non-wood fiber plants for paper making: a review. In: SEAQUIST, A.J.; COBB, E.C. (Comp.). *Nonwood plant fiber pulping*. Atlanta, TAPPI Press, 1985. p.77-90. (Progress Report, 15).
- Portal São Francisco - Disponível em: <[www.portalsaofrancisco.com.br](http://www.portalsaofrancisco.com.br)> Acesso em: ago. 2009.
- RAMOS, L. P., Pitarelo, A. P., Silva, T. A., Efeito do ácido fosfórico sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar e sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. In: *Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*, 2008, Guadalajara.
- RFA - Renewable Fuels Association, Ethanol industry statistics. Washington, DC, 2007. Disponível em [www.ethanolrfa.org/industry/statistics/](http://www.ethanolrfa.org/industry/statistics/). Acesso em Agosto de 2009
- RODRIGUES, F. A. *Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana*. Campinas, 2007. (Dissertação de Mestrado, UNICAMP).
- ROSILLO-CALLE, F.; CORTEZ, L. A. B. A review of the brazilian ethanol programme. *Biomass and Bioenergy*, v. 14, p.p 115-124, 1997.
- ROSSELL, C.E.V., Fermentação do Hidrolisado. In: *Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para produção de etanol*, III, 2007, São Paulo.
- ROSSELL, C.E.V., OLIVÉRIO, J.L. Produção de álcool a partir do bagaço: o processo DHR-Dedini Hidrólise Rápida. Março de 2004.
- ROWELL, R.M., HAN, J.S., Characterization and factors affecting fiber properties. In: Frollini, E., Leão, A.L., Mattoso, L.H.C., *Natural Polymers and Agrofibers Composites*. USP/UNESP and Embrapa, São Carlos, Brasil p. 115-134, 2000.
- SAITO, I. M.; CABELLO, C. **Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca**. *Revista Energia na Agricultura*, v. 21, n.3, p. 34-44, Botucatu, 2006.
- SÁNCHEZ, P. M. G. Alternativas de cogeração na indústria sucro-alcooleira – Estudo de caso, 2003. 120 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

- SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270–5295, 2008.
- SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p. 756-762, 2006.
- SARROUH, B.F.; SILVA, S.S.; SANTOS, D.T.; CONVERTI, A. technical/economical evaluation of sugarcane bagasse hydrolysis for bioethanol production. *Chemical Engineering Technology*, v. 30, p.270-275, 2007.
- SATYANARAYANA, K.G., GUIMARÃES, J.L. WYPYCH, F., 2007. Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I. Source production, morphology, properties and applications. *Composite: Part. A* p. 1694-1709.
- SASSNER, P., MARTENSSON, C.G., GALBE, M., ZACCHI, G. Steam pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated *Salix* for the production of bioethanol, *Bioresource Technology*, 2007
- SEABRA, J. E. A. Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil, 2008. 274 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- SCHULZ, M.A. Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: Polpa e Cascas de Banana. 2010. 100p. Tese (Mestrado em Engenharia de processos) – Universidade da região de Joinville, Joinville, 2010.
- SILVA, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. 116p. Tese (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.
- SILVA, L.A.O. Utilização do pseudocaule da bananeira para produção de celulose e papel. 1998. 90p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- SILVA, R., HARAGUCHI, S. K., MUNIZ, E. C. and RUBIRA, A. F.. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Química Nova*, vol.32, n.3, p. 661-671, 2009.

- SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomassa and Bioenergy*, v.24, p.475-486, 2003.
- SOFFNER, M.L.A.P., NOLASCO, A.M., MILAN, M. Mechanical extraction of banana fiber – *Musa cavendishii*, nanicao variety. In: International Symposium on Natural Polymers and Composites, 2., Atibaia, 1998. Proceedings. São Carlos: EMBRAPA, 1998, p.189-190.
- SOFFNER, M.L.A.P. Produção de polpa celulósica a partir de engajo de bananeira, 2001. 56 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 2001.
- SOLOMON, B.D., BARNES, J.R., HALVORSEN, K.E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, p.416-425, 2007.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v.83, p. 1-11, 2002.
- TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**. v. 2, p. 472-499, 2007.
- ÚNICA - União da Industria de Cana-de-Açucar, Na rota do etanol de segunda geração. Disponível em:<  
<http://www.unica.com.br/opiniao/show.asp?msgCode=%7BFED59F0E-CB38-4D61-B0A5-D6A9C7B2C59D%7D>> Acesso em ago. 2009
- VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forage. *Journal of Animal Science*, 26(1):119-128, 1967.
- WOOLEY, R.; RUTH, M.; SHEEHAN, J.; IBSEN, K.; MAJDESKI, H.; GALVEZ, A. Lignocellulosic biomass to ethanol – Process prehydrolysis and enzymatic hydrolysis – Current and futuristic scenarios. Report TP-580-26157, NREL, Golden, Colorado, USA;1999.
- WYMAN, C.E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, 2007.
- ZHANG, P., WHISTLER, R. L., BEMILLER, J. N., e HAMAKER, B. R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility – a review. *Carbohydrate Polymers*. v. 59, p. 443–458, 2005.

- YAT, S. C., BERGER, A., SHONNARD, D.R., Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass, *Bioresource Technology*, v.99, p.3855–3863, 2008.
- Yu, Y.; Lou, X.; Wu, H.; Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods, *Energy Fuels*, v.22, p. 46-60, 2008.

## ANEXO I

**Tabela 16** – Atividade enzimática e densidade ( $\rho$ ) das enzimas fornecidas pela Novozymes® e faixas de pH, temperatura (T) e dose recomendadas pela empresa.

Enzima	Atividade <sup>1</sup>	$\rho$ <sup>2</sup> (g/mL)	pH	T (°C)	Dose <sup>3</sup> (% m/ms)
NS50013 Celulase- complexo	700 EGU/g (~ 70 FPU/g)	1,2	4,5-6,5	45-50	2-6
NS50010 $\beta$ -glucosidase	250 CBU/g	1,2	2,5-6,5	45-70	0,2-0,6
NS50012 Complexo enzimático	100 FBG/g (~ 13700 PGU/g)	1,2	4,5-6,0	25-55	0,05-0,4
NS50030 Xilanase	500 FXU/g	1,1	4,5-6,0	35-55	0,1-0,5
NS22002 Hemicelulase	45 FBG/g (~ 470 FXU/g)	1,2	5,0-6,5	40-60	0,4-2

<sup>(1)</sup> CBU = Unidades de Celobiase, EGU = Unidades de Endo-Glucanase, FBG = Unidades de  $\beta$ -Glucanase, FPU = Unidades em Papel Filtro, FXU = Unidades de Xilanase Fúngica, PGU = Unidades de Poligalacturonase.

<sup>(2)</sup> Valores aproximados de densidade.

<sup>(3)</sup> Dosagem requerida é fortemente dependente do tipo de substrato, dos pré-tratamentos e das condições operacionais empregadas.

CBU – uma unidade de celobiase é a quantidade de enzima necessária para produzir 2  $\mu$ mol de glicose por minuto nas condições padrões empregando celobiose como substrato.

EGU – unidade padrão empregada pela Novozymes para determinar a atividade da enzima Endo-glucanase.

FBG – uma unidade de FBG é a quantidade de enzimas que produz 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, sob condições padrões estabelecidas. A atividade é determinada de forma relativa à uma enzima padrão.

FPU – 0,185 FPU é a quantidade de atividade enzimática que, quando empregada de acordo com o ensaio padrão para FPU, produzirá 2,0 mg de glicose (referência de acordo com o fornecedor da enzima: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/4689.pdf>).

FXU – atividade de endoxilanase em FXU (do inglês: Farvet Xylan Unit) é determinada de acordo com método padrão empregada pela Novozymes para FXU.

PGU – atividade de poligalacturonase medida de acordo com método padrão da Novozymes.

## ANEXO II

**Ensaio HA-P:** Caldo hidrolisado obtido a partir do tratamento do pseudocaule com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sem deslignificação prévia. Exemplo de planilha de resultados obtidos na análise cromatográfica.

Condições operacionais			Produtos da hidrólise ácida (g/L)						
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)	T (°C)	t (min)	Glicose	Frutose	Sacarose	Manose	5-HMF	Outros compostos	
0	90	15	0,36	1,07	0,00	0	0	mono,inulina e galactose	
		30	0,46	0,45	0,00	0	0		
	100	15	1,35	1,02	0,35	0	0	mono,inulina	
		30	0,55	0,63	0,06	0	0	mono,inulina	
	120	15	0,75	0,77	0,00	0	0		
		30	0,37	0,27	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
	1	90		0,35	0,56	0,00	0	0	mono,inulina, arabinose, maltose
			15						
30			0,60	0,45	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
100		15	1,62	0,95	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
		30	0,66	0,46	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
120		15	3,34	0,51	0,00	0	0	xilose e arabinose	
		30	2,67	0,12	0,00	0	0	xilose e arabinose	
2		90	15	0,41	0,53	0,02	0	0	mono,inulina e arabinose
	30		0,60	0,18	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
	100	15	1,25	0,56	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
		30	1,63	0,29	0,00	0	0	mono,inulina e arabinose	
	120	15	3,31	0,04	0,00	0	0	xilose e arabinose	
		30	4,91	0,35	0,00	0	0	xilose e arabinose	
	<i>in natura</i>		-	0,20	1,09	0,00	0	0	

## ANEXO II

Tabela 17- Concentração de sacarose (Scr), glicose (Glc), frutose (Frt) e açúcares totais (AT) contidos no pseudocaule úmido ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) da bananeira *Musa cavendishii* após trituração em solução aquosa.

Amostras*	Concentração de açúcares ( $\text{g.L}^{-1}$ )			
	Scr	Glc	Frt	AT
1	3,25±0,22	5,14±0,21	2,35±0,30	10,75±0,35
2	3,34±0,32	5,27±0,02	2,98±0,22	11,35±0,28

\* As amostras 1 e 2 referem-se ao material coletado no campo em diferentes dias e de diferentes bananeiras.

\*\* Os valores de AT referem-se a somatória dos açúcares Scr, Glc e Frt.

### ANEXO III

Tabela 18 - Concentração de sacarose (Scr), glicose (Glc), frutose (Frt) e açúcares totais (AT) contidos no caldo puro extraído do pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii* por esmagamento.

Amostras*	Açúcares solúveis (g L <sup>-1</sup> )			
	Scr	Glc	Frt	AT**
1	3,39 ± 0,23	5,40 ± 0,22	2,48 ± 0,32	11,3 ± 0,4
2	4,53 ± 0,34	7,53 ± 0,25	4,87 ± 0,23	16,9 ± 0,5

\* As amostras 1 e 2 referem-se ao material coletado no campo em diferentes dias e de diferentes bananeiras.

\*\* Os valores de AT referem-se a somatória dos açúcares Scr, Glc e Frt.