

**SIMONE ANDREA HOPFNER**

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR DIFERENTES ESPÉCIES DE MICRO-  
ORGANISMOS A PARTIR DE MOSTOS DE CASCAS DE BANANA (FRESCAS  
OU SACARIFICADAS) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES  
REDUTORES**

**JOINVILLE – SC**

**2015**

**SIMONE ANDREA HOPFNER**

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR DIFERENTES ESPÉCIES DE MICRO-  
ORGANISMOS A PARTIR DE MOSTOS DE CASCAS DE BANANA (FRESCAS  
OU SACARIFICADAS) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES  
REDUTORES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Engenharia de Processos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville – Univille.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Ozair Souza.

**JOINVILLE – SC**

**2015**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

H792p Hopfner, Simone Andrea  
Produção de Etanol por diferentes espécies de micro-organismos a partir de mostos de cascas de banana (frescas ou sacarificadas) com diferentes concentrações de açúcares redutores / Simone Andrea Hopfner; Orientador Dr. Ozair Souza – Joinville: UNIVILLE, 2015.

103 f. : il. ; 30 cm

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

1. Energia da biomassa. 2. Resíduos agrícolas – Fontes alternativas de energia. 3. Biocombustíveis - Etanol. I. Souza, Ozair II. Título.

CDD 662.88

## Termo de Aprovação

**“Produção de etanol por diferentes espécies de micro-organismos a partir de mostos de cascas de banana (frescas ou sacarificadas) com diferentes concentrações de açúcares redutores”**

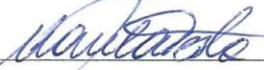
por

Simone Andrea Hopfner

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

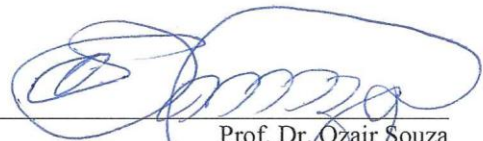


Prof. Dr. Ozair Souza  
Orientador (UNIVILLE)



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

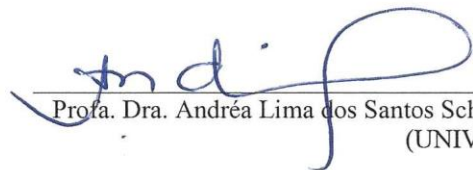
**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. Ozair Souza  
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha  
(CNPEN)



Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider  
(UNIVILLE)

Joinville, 31 de março de 2015.

*A fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se veem. (Hebreus, 11:1)*

## DEDICATÓRIA

*A Deus, pela sabedoria, força, coragem, persistência e fé.*

*Ao meu esposo, Henrique, pelo amor, apoio, compreensão, paciência e companheirismo.*

*Aos meus pais, Mafalda e Rodolfo, pelo amor incondicional e por não medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos e por ter me dado a oportunidade de estudar, para que um dia, assim como eles, eu vença na vida.*

*A minha irmã, Scheila, por sempre ter acreditado em mim.*

*A Cactos Ambiental, em nome de meu sogro e minha sogra, Carlos e Eulivia, por todo o apoio, e tempo disponibilizado para a realização deste trabalho.*

*A todos que contribuíram, trazendo leveza e a essa árdua conquista.*

## AGRADECIMENTOS

👍 A Deus, em sua infinita sabedoria, por ter concedido a benção de vivenciar este mestrado, proporcionando a luz na minha vida, com fé, força, coragem, sabedoria, ânimo e persistência, pois, conforme diz a sua palavra “*Bem-aventurados aqueles que confiam no Senhor*”.

👍 Ao meu esposo Henrique Fleith Comitti, pessoa essencial na minha vida, por ter estado ao meu lado em todos os momentos, sempre dando força e me encorajando a buscar meus objetivos, no mundo, não existe palavras suficientes para agradecê-lo pelo simples fato de estar junto comigo! Te Amo!

👍 Ao professor, Doutor Ozair Souza, primeiramente por ter aceitado me orientar, por toda a ajuda dada neste trabalho, pelas suas horas incansáveis de correção, pelo seu perfeccionismo, o meu muito obrigado!


👍 Ao meu pai e minha mãe, Rodolfo e Mafalda, por até hoje terem me apoiado em todas as minhas decisões, pela força dada durante esta jornada, quando muitas vezes pensava em desistir, e minha mãe sempre dizia que eu era capaz, essa força quero e vou carregar para a minha vida, vocês são meus exemplos de persistência, coragem e de realização de objetivos.


👍 A minha amada irmã, Scheila Cristina e ao Assis, por sempre terem acreditado em mim. Vocês são meus exemplos!


👍 A minha querida sogra Eulivia e ao meu querido sogro Carlos por toda a força e apoio dado durante esta jornada, por sempre terem acreditado em mim, pelas palavras de coragem, por serem meu exemplo de pessoas de sucesso, batalhadoras, determinadas, inteligentes, e acima de tudo, pessoas de uma dignidade que não há como medir, se o mundo tivesse mais pessoas como vocês, tenho a certeza que teríamos um mundo muito melhor.


👍 A empresa Cactos Ambiental, primeiramente por ter me dado a oportunidade de emprego, e por todo o tempo disponibilizado para a realização deste trabalho. Em nome de toda a equipe da Cactos, muito obrigado por toda a ajuda e força durante esta etapa.

👍 A Francine Schmoeller, Luana Priscila Just, Claudia Hack, Aline Scheller, Mahara Melo e Ana Carolina Fanton o por toda a ajuda dada durante este trabalho.

 Aos meus colegas de laboratório, Professora Milena e Elias, por toda a ajuda e conhecimento fornecido durante esta jornada, muito obrigada!

 A Professora Mara Lobo Fontan, por ter me aceitado para o estágio de docência, muito obrigada por esta oportunidade, pois foi fundamental para meu crescimento profissional.

 As minhas lindas amigas Ana Claudia, Daiane e Tatiane, amigas estas que tenho certeza que são minhas verdadeiras amigas.

 A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES pela bolsa de estudo.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT .....	17
INTRODUÇÃO .....	18
1. OBJETIVOS.....	20
<b>1.1 Objetivo geral</b> .....	20
<b>1.2 Objetivos específicos</b> .....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
<b>2.1 Matriz energética brasileira</b> .....	21
1.1.1 Biomassa para energia .....	23
1.1.2 Biocombustíveis.....	24
1.1.3 O etanol como biocombustível.....	25
<b>2.2 Composição dos resíduos lignocelulósicos</b> .....	31
2.2.1 Resíduos lignocelulósicos utilizados na produção de bioetanol.....	32
2.2.1.1 Resíduos da bananicultura .....	34
2.2.2 Tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol 2G .....	37
<b>2.3 Produção de bioetanol por fermentação</b> .....	41
2.3.1 Leveduras da fermentação alcoólica .....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
<b>3.1 Biomassa</b> .....	45
<b>3.2 Micro-organismos e manutenção</b> .....	45
<b>3.3 Ensaio de fermentação</b> .....	46
<b>3.4 Composição dos meios de fermentação</b> .....	49
3.4.1 Preparação do meio sintético .....	49
3.4.2 Preparação do meio complexo com cascas de banana .....	50
3.4.2.1 Caldo de Cascas Frescas (CF).....	50
3.4.2.2 Caldo de Cascas Secas (CS) .....	50
3.4.3 Pré-inóculo e padronização do inóculo.....	51
<b>3.5 Métodos Analíticos</b> .....	51
3.5.1 Determinação da concentração de açúcares redutores .....	52

<b>3.6</b>	<b>Construção dos gráficos de cinética do consumo de substrato e formação do produto .....</b>	<b>53</b>
<b>3.7</b>	<b>Cálculo dos parâmetros cinéticos de fermentação.....</b>	<b>54</b>
<b>3.8</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção de micro-organismos .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Fermentação de cascas frescas e sacarificadas de banana madura ....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Matriz energética brasileira .....	21
Figura 2: Matriz energética mundial. ....	22
Figura 3: Comparação do uso de energia renovável em âmbito mundial. ....	22
Figura 4: Evolução dos biocombustíveis no Brasil. ....	25
Figura 5: Evolução do teor alcoólico ao final da fermentação. ....	27
Figura 6: Evolução do rendimento fermentativos. ....	27
Figura 7: Evolução do tempo de fermentação. ....	27
Figura 8: Processamento de etanol de primeira geração. ....	29
Figura 9: Processo de bioetanol de segunda geração. ....	29
Figura 10: Faixa de custos de produção de etanol e da gasolina no ano de 2005 e projetados para o ano de 2030. ....	30
Figura 11: Produção de banana no estado de Santa Catarina. ....	35
Figura 12: Fluxograma esquemático dos ensaios de fermentação. ....	47
Figura 13: Modelo da cinética de consumo do substrato (●) e formação de produto (▲) para a determinação do tempo final de fermentação ( $t_f$ ) e concentrações iniciais e finais de açúcares redutores ( $AR_0$ e $AR_f$ ) e etanol ( $P_0$ e $P_f$ ). ....	54
Figura 14: Cinética do consumo de açúcares redutores (● AR) e produção de etanol (▲ P) por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26603 na fermentação de glicose (a), xilose (b) e glicose + xilose (c). ....	56
Figura 15: Cinética do consumo de açúcares redutores (● AR) e produção de etanol (▲ P) por <i>Pachysolen tannophilus</i> ATCC 32691 na fermentação de glicose (a), xilose (b) e glicose + xilose (c). ....	57
Figura 16: Cinética do consumo de açúcares redutores (● AR) e produção de etanol (▲ P) por <i>Scheffersomyces stipitis</i> ATCC 58376 na fermentação de glicose (a), xilose (b) e glicose + xilose (c). ....	58
Figura 17: Rendimento ( $Y_{P/S}$ ) da fermentação de meio sintético contendo glicose (G), xilose (X) e glicose + xilose (GX) para <i>S.cerevisiae</i> ATCC 26603 (sc), <i>P. tannophilus</i> ATCC 32691 (pt) e <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 (ps). ....	62
Figura 18: Produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) da fermentação de meio sintético contendo glicose (G), xilose (X) e glicose + xilose (GX) por <i>S.cerevisiae</i> ATCC 26603 (sc), <i>P. tannophilus</i> ATCC 32691 (pt) e <i>S. stipitis</i> ATCC 58376 (ps). ....	63

- Figura 19: Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) por *S. cerevisiae* (1) e *P. tannophilus* (2) na fermentação de mosto de cascas frescas de banana sem concentração prévia de AR (a), AR concentrado até 50 g/L (b) e AR concentrado até 100 g/L (c).....68
- Figura 20: Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) por *S. cerevisiae* (1) e *P. tannophilus* (2) na fermentação de mosto de cascas secas e sacarificadas de banana madura, sem concentração prévia de AR (a), com AR concentrado até 50 g/L (b) e AR concentrado até 100 g/L (c).....69
- Figura 21: Rendimento ( $Y_{P/S}$ ) da fermentação de meio de cascas de banana frescas (CF) e sacarificadas (CS), nas diferentes concentrações iniciais de açúcares (20,50 e 100 g/L) por *S.cerevisiae* ATCC 26603 (Sc), *P. tannophilus* ATCC 32691 (Pt). .....72
- Figura 22: Produtividade ( $Q_P$ ) da fermentação de meio de cascas de banana frescas (CF) e sacarificadas (CS), nas diferentes concentrações iniciais de açúcares (20,50 e 100 g/L) por *S.cerevisiae* ATCC 26603 (Sc), *P. tannophilus* ATCC 32691 (Pt). .....74
- Figura 23: Rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_P$ ) estimados na fermentação de mosto proveniente de cascas de banana frescas (CF) e sacarificadas (CS), nas diferentes concentrações iniciais de açúcares (20,50 e 100 g/L) por *S.cerevisiae* ATCC 26603.....76
- Figura 24: Análise de Cromatografia líquida dos padrões dos açúcares sacarose, glicose, frutose e xilose. .... 100
- Figura 25: Análise de Cromatografia líquida da amostra de  $t_r$  de *S. cerevisiae* de cascas frescas na concentração de 100 g/L; ..... 104
- Figura 26: Análise de Cromatografia líquida da amostra de  $t_r$  de *P. tannophilus* de cascas frescas na concentração de 100 g/L; ..... 105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de biomassas lignocelulósicas em base de massa seca.....	32
Tabela 2: Biomassas lignocelulósicas e principais pré-tratamentos empregados para a produção de bioetanol.....	33
Tabela 3: Vantagens e desvantagens do processo de hidrólise ácida diluída e concentrada.....	39
Tabela 4: Condições operacionais indicadas como ideais para o pré-tratamento de diferentes tipos de biomassa por ácido sulfúrico diluído. ....	40
Tabela 5: Fatores que afetam a fermentação.....	42
Tabela 6: Composição do meio de cultivo para manutenção dos micro-organismos. ....	46
Tabela 7: Composição do mosto de fermentação proveniente de cascas frescas (CF) e sacarificadas (CS) de banana madura nas diferentes concentrações de açúcares avaliadas (20, 50 e 100 g/L).....	66
Tabela 8: Valores de produtividade em bioetanol, obtidos com diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i> empregando diferentes tipos de substratos.....	77

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2G	Etanol de segunda geração
AFEX	<i>Ammonia fiber explosion</i>
ANP	Agencia Nacional do Petróleo
AR	Concentração de açúcares redutores
AR <sub>f</sub>	Concentração de açúcares redutores no final da fermentação
AR <sub>0</sub>	Concentração de açúcares redutores no início da fermentação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C5	Cinco carbonos
C6	Seis carbonos
CF <sub>100, Sc</sub>	Cascas concentradas a 100 g/L com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CF <sub>50, Pt</sub>	Cascas concentradas a 50 g/L com <i>Pachysolen tannophilus</i>
CF <sub>50, Sc</sub>	Cascas concentradas a 50 g/L com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CF <sub>50, Pt</sub>	Cascas concentradas a 100 g/L com <i>Pachysolen tannophilus</i>
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
CEPA	Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola
CF <sub>20, Pt</sub>	Cascas frescas com <i>Pachysolen tannophilus</i>
CF <sub>20, Sc</sub>	Cascas frescas com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CS <sub>50, Pt</sub>	Cascas hidrolisadas concentradas a 50 g/L com <i>Pachysolen tannophilus</i>
CS <sub>50, Sc</sub>	Cascas hidrolisadas concentradas a 50 g/L com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CS <sub>100, Pt</sub>	Cascas hidrolisadas concentradas a 100 g/L com <i>Pachysolen tannophilus</i>
CS <sub>100, Sc</sub>	Cascas hidrolisadas concentradas a 100 g/L com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CS <sub>Pt</sub>	Cascas hidrolisadas com <i>Pachysolen tannophilus</i>
CS <sub>Sc</sub>	Cascas hidrolisadas com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DNS	Ácido 3-5 dinitro salicílico
EMP	<i>Embden-Meyerhof-Parmas</i>
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
G <sub>PS</sub>	Glicose com <i>Scheffersomyces stipitis</i>
G <sub>PT</sub>	Glicose com <i>Pachysolen tannophilus</i>
G <sub>SC</sub>	Glicose com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
LHW	<i>Liquid hot wate</i>
m	Massa
m <sub>u</sub>	Massa úmida
m <sub>s</sub>	Massa seca
P <sub>f</sub>	Concentração de etanol no final da fermentação
P <sub>0</sub>	Concentração de etanol no início do processo fermentativo

Q <sub>P</sub>	Produtividade volumétrica em etanol
SSF	Sacarificação e fermentação simultânea
T	Temperatura
t	Tempo de fermentação
t <sub>f</sub>	Tempo final de fermentação
WO	<i>Wet oxidation</i>
XG <sub>Ps</sub>	Glicose e Xilose com <i>Scheffersomyces stipitis</i>
XG <sub>Pt</sub>	Glicose e Xilose com <i>Pachysolen tannophilus</i>
XG <sub>Sc</sub>	Glicose e Xilose com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
X <sub>Ps</sub>	Xilose com <i>Scheffersomyces stipitis</i>
X <sub>Pt</sub>	Xilose com <i>Pachysolen tannophilus</i>
X <sub>Sc</sub>	Xilose com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Y <sub>P/S</sub>	Fator de conversão de substrato em produto (Rendimento em etanol)

## RESUMO

A preocupação com o consumo crescente de combustíveis, aliada à escassez de matérias primas e à poluição ambiental, faz com que se busque energias alternativas para produção de biocombustíveis. A demanda por processos mais limpos e ambientalmente corretos se expande a cada ano, valorizando o mercado dos biocombustíveis. Além dos biocombustíveis serem fontes alternativas de energia e oriundas de recursos renováveis, o seu uso contribui para a redução dos impactos causados pelos combustíveis fósseis ao meio ambiente. O uso de biomassa vegetal, principalmente os resíduos gerados na agricultura e nas agroindústrias, têm-se mostrado uma alternativa bastante atraente para a produção de biocombustíveis, principalmente para a combustão e para a obtenção de etanol ou biogás. O processo de fermentação alcoólica já é bem conhecido e está consolidado. No entanto, o tipo ideal de tratamento a que deve ser submetida a biomassa para a sua fermentação, ainda se constitui um grande desafio econômico. A busca por processos capazes de promover um bom rendimento na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis, a baixo custo de produção, tem sido o foco de vários estudos na área. Neste trabalho buscou-se o estabelecimento das condições ideais da produção de etanol a partir de cascas de banana, um resíduo agroindustrial gerado em grandes quantidades no estado de Santa Catarina. Diferentes formas de obtenção do caldo de fermentação (de cascas frescas e de cascas secas, moídas e sacarificadas), com diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores (20, 50 e 100 g/L) foram avaliadas. Para a fermentação foram comparados os micro-organismos *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 e *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) ATCC 58376. Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de volume de trabalho, sob agitação constante de  $100 \text{ min}^{-1}$ . Até 48 h de fermentação, verificou-se que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os rendimentos em etanol ( $Y_{P/S}$ ) obtidos pelas diferentes espécies de micro-organismos, independentemente do tipo de mosto e do valor de  $AR_0$  utilizados. A média geral de  $Y_{P/S}$  foi de  $0,44 \pm 0,01 \text{ g/g}$ . O maior acúmulo de produto ( $P_f = 32,4 \text{ g/L}$ ) foi alcançado com mosto de cascas frescas e  $AR_0 = 100 \text{ g/L}$ , após 24 h de fermentação, resultando numa produtividade volumétrica em etanol ( $Q_P$ ) de  $1,31 \pm 0,01 \text{ g/(L.h)}$ . Esse valor foi 3,4 vezes maior do que o maior valor de  $Q_P$  ( $0,38 \pm 0,03 \text{ g/(L.h)}$ ) obtido na fermentação de mosto com  $AR_0 = 20 \text{ g/L}$  (cascas frescas). Ao utilizar 50 g/L de  $AR_0$  a produtividade máxima foi de  $1,13 \pm 0,07 \text{ g/(L.h)}$ . Além de proporcionar maior produtividade, a possibilidade do emprego de alta concentração de substrato da biomassa fresca (*in natura*), sem a necessidade da sua secagem e moagem prévias utilizadas na sacarificação, torna esse processo bastante atraente.

Palavras-chave: bioetanol, biomassa, resíduos agrícolas, fonte alternativa de energia



## ABSTRACT

Concern with the growing consumption of fuels, added to the scarcity of raw materials and environmental pollution, has led to the search for alternatives for biofuel production. The demand for cleaner and more environmentally friendly processes is growing each year, giving value to the biofuel market. In addition to biofuels being alternative sources of energy and coming from renewable resources, their impact on the environment is much less than that of fossil fuels. The use of vegetal biomass, mainly the waste generated in agriculture and agroindustry, has shown to be a very attractive alternative for the production of biofuels, especially for fuel and for obtaining ethanol and biogas. The alcoholic fermentation process has long been recognized and is well consolidated. However, the ideal type of treatment to which the biomass should be submitted for its fermentation, still poses a great economic challenge. The search for processes able to provide a good yield in the conversion of biomass into fermentable sugars at a low production cost has been the focus of many studies in the area. This study aims to establish the ideal ethanol production conditions using banana peel, an agroindustrial waste produced in large quantities in the state of Santa Catarina. Different ways of obtaining the fermentation broth (from fresh and dried peels, ground and saccharified), with different initial concentrations of reducing sugars (20, 50 and 100 g/L) were evaluated. For the fermentation, the *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) ATCC 58376 micro-organisms were compared. The assays were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of work volume, under  $100 \text{ min}^{-1}$  constant shaking. At 48 h fermentation, no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the obtained ethanol yield values ( $Y_{P/S}$ ) was observed, among the different species of microorganisms, regardless of the type of must and  $AR_0$  value used. The  $Y_{P/S}$  general average was  $0.44 \pm 0.01 \text{ g/g}$ . The greatest product accumulation ( $P_f = 32,4 \text{ g/L}$ ) was reached with fresh peel must and  $AR_0 = 100 \text{ g/L}$ , after 24 h of fermentation, resulting in a volumetric productivity in ethanol ( $Q_P$ ) of  $1.31 \pm 0.01 \text{ g/(L.h)}$ . This value was 3.4 greater than the  $Q_P$  value ( $0.38 \pm 0.03 \text{ g/(L.h)}$ ) obtained in must fermentation with  $AR_0 = 20 \text{ g/L}$  (fresh peel). On using 50 g/L of  $AR_0$  maximum productivity was  $1.13 \pm 0.07 \text{ g/(L.h)}$ . In addition to providing higher productivity, the possibility of using a higher concentration of fresh biomass (*in natura*) substrate, without requiring prior drying and milling used in saccharification, makes the process extremely attractive.

Key words: bioethanol, biomass, agricultural wastes, alternative energy source

## INTRODUÇÃO

A principal fonte de energia da sociedade moderna tem sido a energia química acumulada nos diferentes combustíveis fósseis (petróleo, carvão, gás natural, etc.); os quais, ao serem consumidos, respondem pela maior parte da nossa poluição ambiental.

A atual preocupação com o consumo crescente de energia aliada à poluição ambiental tem incentivado cada vez mais a busca por fontes alternativas de energia. Diferentes fontes como a solar, a hídrica e a de biomassa associados a novas tecnologias de geração de energia têm sido propostas para melhorar o nível de vida da população e reduzir os seus efeitos nocivos sobre o meio ambiente.

A obtenção de energia a partir de biomassas já é feita pelo homem desde o início da civilização pela queima de madeiras mas, há pouco mais de um século, começou a perder a sua liderança histórica para a energia de fontes fósseis.

Do ponto de vista da ecologia, biomassa é constituída pelo material produzido por todos os seres vivos (animais, vegetais, fungos e protistas) em seus diferentes processos naturais, isto é, a matéria orgânica viva. Em geração de energia, o termo biomassa abrange toda a matéria orgânica capaz de produzir energia. Recentemente, com o surgimento do conceito de fontes renováveis, alguns autores têm restringido a definição de biomassa como qualquer material derivado da vida vegetal e que seja renovável em um período de tempo inferior a 100 anos.

A utilização da energia da biomassa é de fundamental importância no desenvolvimento de novas alternativas energéticas. Sua matéria-prima já é empregada na fabricação de vários biocombustíveis como bio-óleo e o BTL (*Biomass-to-Liquids*) provenientes de processos térmicos, o biodiesel por síntese química e o biogás e bioetanol por fermentação.

Segundo Cortez (2008), a principal fonte para gerar energia da biomassa está nos resíduos, principalmente os de origem vegetal. Esses resíduos são normalmente produzidos no campo, resultantes das atividades da colheita dos produtos agrícolas, e são constituídos basicamente de palha, folhas e caules além de alimentos rejeitados para comercialização.

No Estado de Santa Catarina, a produção anual de banana é 649.9 ton (CEPA, 2015) e é uma das culturas agrícolas que mais geram resíduos. Conforme Souza *et al.* (2012), para cada tonelada de banana colhida cerca de quatro toneladas

de resíduos vegetais são geradas e a maioria deles permanecem no campo. O aproveitamento energético de toda essa biomassa vem sendo estudada pela Universidade da Região de Joinville desde 2008 empregando os processos de combustão, pirólise, fermentação metânica (biogás) e fermentação alcoólica. Neste trabalho utilizou-se as cascas de banana madura como matéria-prima para a produção de etanol.

A grande maioria dos processos de fermentação alcoólica a partir de cascas de banana propostos na literatura fizeram uso da secagem e moagem da biomassa seguido de hidrólise ácida e sacarificação enzimática. No entanto, a partir de um extenso estudo sobre a hidrólise ácida e sacarificação do resíduo sobre a produção de açúcares fermentáveis, Schulz (2010) obteve apenas 3% a mais no rendimento em açúcar quando comparado ao uso desse substrato sem quaisquer tratamentos. Diante disso, o autor formulou uma hipótese de que o uso das cascas frescas, sem hidrólise ácida ou enzimática; apenas submetendo-as à trituração e cozimento em meio aquoso para solubilização dos açúcares livres, seria o mais indicado para a produção de etanol, se comparado com a sua sacarificação. Entretanto, devido à baixa concentração de etanol obtida no meio após fermentação desse mosto, o autor deixou claro a necessidade de novos estudos para aumentar o acúmulo desse produto visando reduzir os custos da etapa subsequente de extração e purificação do produto. Uma nova hipótese, não confirmada naquele momento, foi levantada pelo autor: o uso do farelo de cascas secas em substituição às cascas frescas poderia contribuir com o aumento da eficiência do processo de sacarificação, com consequente aumento da concentração de açúcares fermentescíveis e da produção de etanol.

Este trabalho buscou avaliar essas duas hipóteses, de forma a aumentar a produção de etanol sem, contudo, reduzir o rendimento e a produtividade do processo. Para isto, foram comparadas as fermentações de mostos provenientes de cascas frescas e de cascas secas, moídas e sacarificadas, empregando altas concentrações iniciais de açúcares redutores (concentração por evaporação). Além disto, avaliou-se o uso de diferentes espécies de micro-organismos.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Maximizar a produção de etanol empregando cascas de banana como substrato.

### 1.2 Objetivos específicos

Estabelecer as cinéticas de consumo de substrato e de produção de etanol para as diferentes espécies de leveduras avaliadas (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 e *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis* ATCC 58376)) em meio de cultura sintético e indicar as de maior potencial para a fermentação alcoólica empregando mosto com altas concentrações iniciais de açúcares redutores;

Avaliar os micro-organismos indicados na etapa anterior na fermentação de mostos de cascas frescas (*in natura*) de banana e de cascas sacarificadas empregando diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores (verificação da hipótese formulada por Schulz (2010));

Comparar os parâmetros rendimento e produtividade em etanol entre os diferentes tipos de substratos (cascas frescas e cascas sacarificadas) e em diferentes concentrações de açúcares redutores iniciais (20, 50 e 100 g/L) e indicar, dentro das condições operacionais avaliadas, o de maior potencial para a produção de bioetanol.

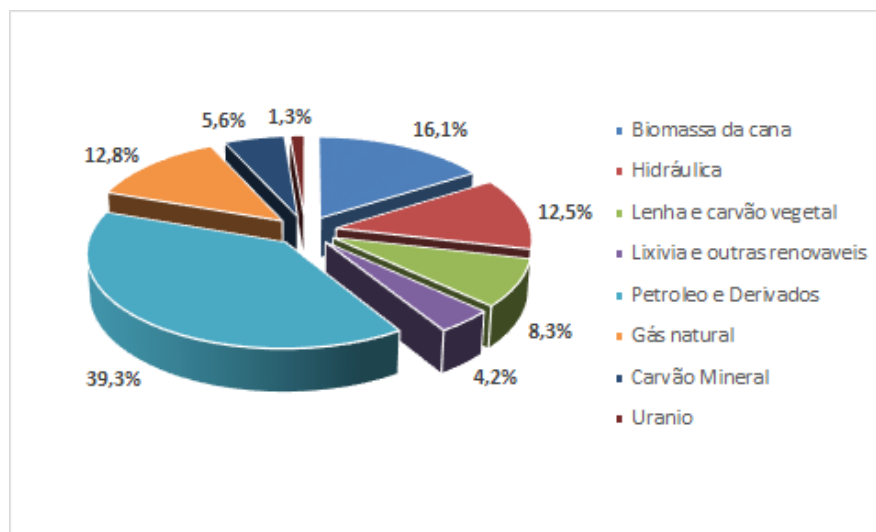
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Matriz energética brasileira

A matriz energética brasileira está dividida em dois grandes grupos: energia proveniente de fontes fósseis que correspondem a 59% da energia consumida no país (EPE, 2014), e a energia de fontes alternativas. A maioria das fontes de energia alternativa são renováveis, o que significa que, ao contrário dos combustíveis fósseis, elas não são susceptíveis de se esgotar.

No Brasil, as fontes renováveis de energia representam 41,0% da matriz energética. Desses, 12,5% correspondem à energia hidráulica e 28,6%, à energia de biomassa (EPE, 2014), o que torna a matriz energética de origem predominantemente renovável (Figura 1).

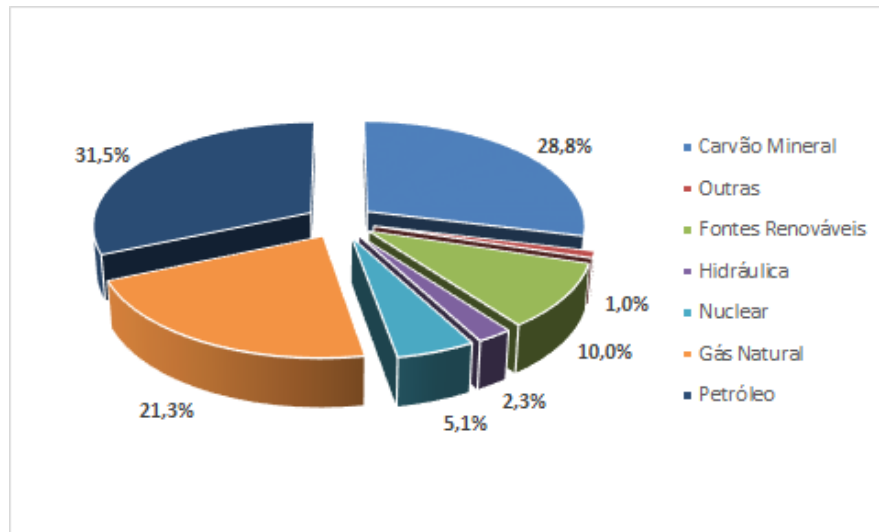
Figura 1: Matriz energética brasileira



Fonte: Relatório de Balanço Energético Brasileiro, Empresa de Pesquisa Energética (2014).

Em comparação com a matriz energética mundial (Figura 2), grande parte da energia utilizada é proveniente de recursos não renováveis, o que torna a matriz energética brasileira bastante limpa.

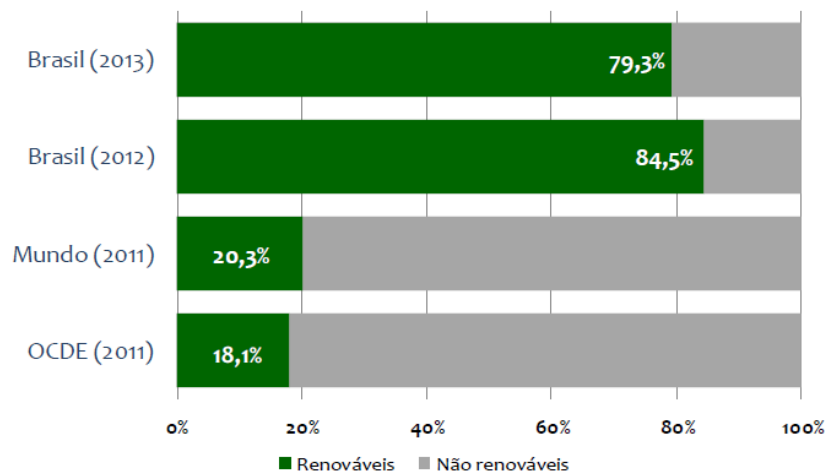
Figura 2: Matriz energética mundial.



Fonte: Relatório de Balanço Energético Brasileiro, Empresa de Pesquisa Energética (2014).

Em 2013, o Brasil teve participação significativa em âmbito mundial referente às energias renováveis, alcançando um percentual de utilização de fontes alternativas de 79,3%, em contrapartida a energia renovável a nível mundial em 2011 empregou apenas 20,3% destas fontes limpas (Figura 3).

Figura 3: Comparação do uso de energia renovável em âmbito mundial.



Fonte: Relatório de Balanço Energético Brasileiro, Empresa de Pesquisa Energética (2014).

Tolmaskim (2012), em seus estudos sobre as perspectivas e planejamento do setor energético brasileiro, aborda que a matriz energética brasileira continuará a ser

exemplo para o mundo nos próximos anos, pois já possui forte participação das fontes renováveis de energia (hidráulica, eólica, etanol, biomassa, entre outros), da qual conta com uma predominância ainda maior dessas fontes dentro de um prazo de dez anos.

Ainda, o Brasil, por possuir condições naturais e geográficas favoráveis à produção de biomassa, pode assumir posição de destaque no cenário mundial na produção e no uso como recurso energético, pois a situação geográfica, faz com que o país receba uma intensa radiação solar ao longo do ano, o que é uma fonte de energia fundamental para a produção de biomassa, quer seja para alimentação ou para fins agroindustriais. Outro aspecto importante é que o Brasil possui uma grande quantidade de terra agricultável, com boas características de solo e condições climáticas favoráveis, fazendo com que a geração de biomassa seja ainda maior (MMA, 2014).

#### 1.1.1 Biomassa para energia

Biomassa é qualquer matéria orgânica que possa ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica. De acordo com a sua origem, pode ser: florestal (madeira), agrícola (soja, arroz e cana-de-açúcar, entre outros) e rejeitos urbanos e industriais (sólidos ou líquidos, como o lixo). Os derivados obtidos dependem tanto da matéria prima utilizada (cujo potencial energético varia de tipo para tipo) quanto da tecnologia de processamento para obtenção dos energéticos (ANEEL, 2008).

Existe um grande número de tecnologias de conversão energética da biomassa, adequadas para aplicações e pequena e grande escalas. Elas incluem gaseificação, métodos de produção de calor e eletricidade (cogeração), recuperação de energia de resíduos sólidos urbanos e gás de aterros (etanol e biodiesel). O recente interesse na energia de biomassa tem dado ênfase em aplicações que produzem combustíveis líquidos para o setor de transportes (biocombustíveis) (GOLDEMBERG, 2009).

A biomassa lignocelulósica é referida como a segunda geração dos biocombustíveis, cujo processamento é uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento (BASTOS, 2007).

### 1.1.2 Biocombustíveis

Entende-se como biocombustíveis todos os combustíveis produzidos a partir de biomassas. Segundo Gradet (2009), os biocombustíveis, considerados como uma fonte alternativa e renovável de energia, podem contribuir positivamente para o enfrentamento de desafios globais em várias dimensões, como o desenvolvimento sustentável, a segurança energética, as alterações do clima e o desenvolvimento de zonas rurais.

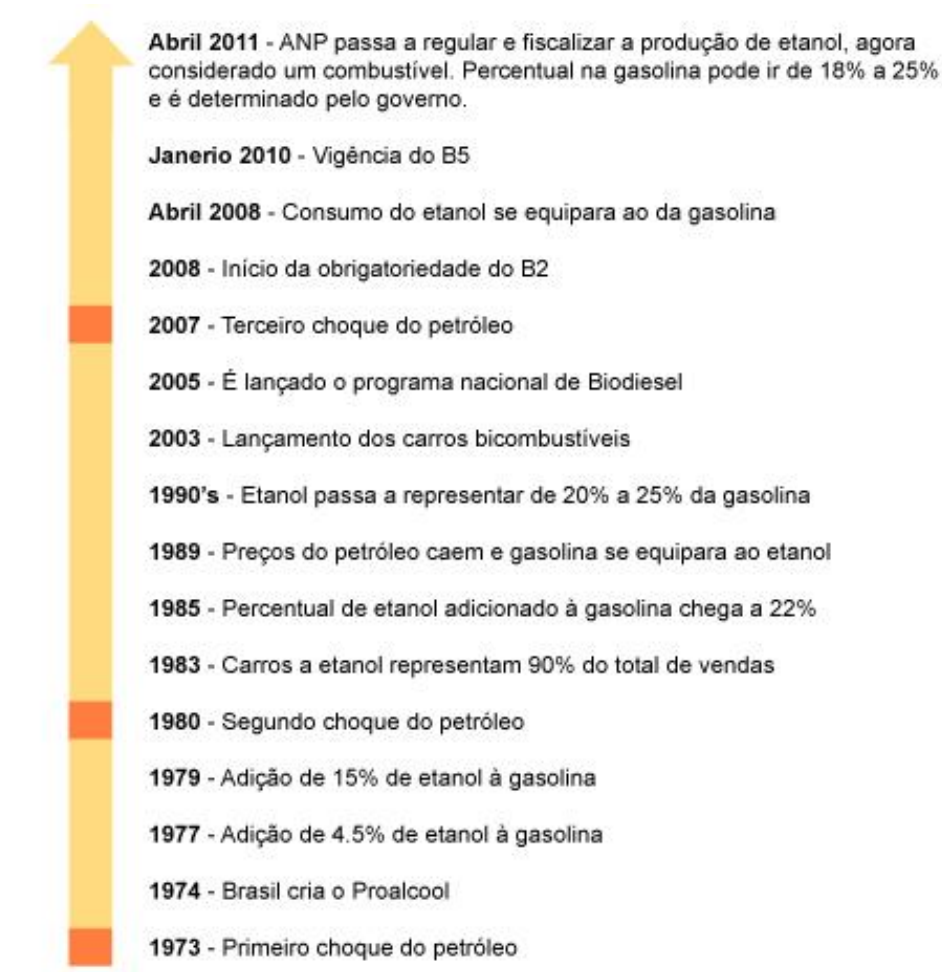
A problemática dos biocombustíveis tem ocupado o centro das atenções nacionais e internacionais em razão do aumento excessivo do preço do petróleo e da discussão mundial sobre a diminuição das emissões de CO<sub>2</sub> e consequente diminuição do efeito estufa pelo uso de energias renováveis (KOHLHEEP, 2010).

As crises mundiais de petróleo nos anos de 1973, 1980 e 2007 (Figura 4) foram os principais fatos históricos que impulsionaram o desenvolvimento das tecnologias brasileiras de produção de biocombustíveis. Desde então, o Brasil foi o pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, onde alcançou uma posição almejada por muitos países que buscam fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo (ANP, 2014).

Os mais recentes desenvolvimentos no setor de biocombustíveis, com base no exemplo da produção do etanol e biodiesel, mostram que o Brasil passa por um processo abrangente de transformação, conduzindo não somente a enormes consequências econômicas, mas também na política interna levando às mudanças sociais, socioculturais e ecológicas (KOHLHEEP, 2010).



Figura 4: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.



Fonte: Agência Nacional do Petróleo, 2014.

### 1.1.3 O etanol como biocombustível

O etanol ou álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ), é produzido desde os tempos antigos pela fermentação e ainda hoje, grande parte do etanol industrial é obtido pelo mesmo processo, embora também possa ser produzido a partir de eteno, derivado do petróleo (BASTOS, 2007).

Em 2005, a produção mundial de etanol era cerca de 58 bilhões de litros, dos quais 70% eram produzidos no Brasil e nos Estado Unidos. Cerca de 90% deste produto é derivado da fermentação de sacarose ou amido. De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2014), nos últimos três anos, a produção anual brasileira de etanol foi de aproximadamente 28 milhões de litros.

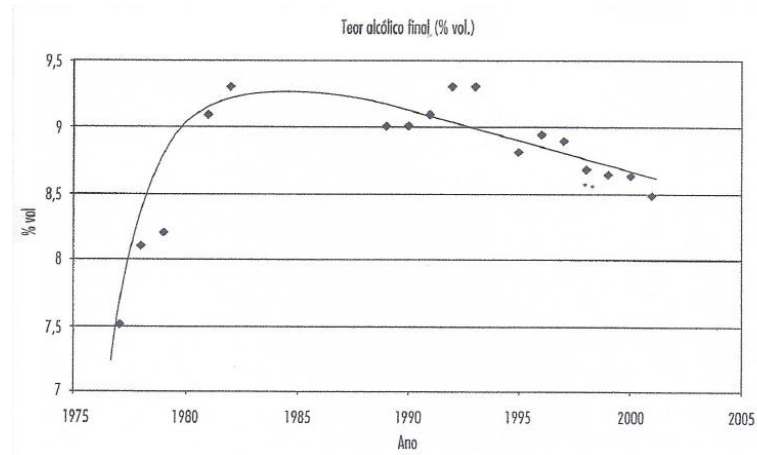
A matéria-prima mais utilizada no Brasil para produção de etanol tem sido a sacarose de cana-de-açúcar. No mundo todo se usam também matérias-primas

amiláceas como milho, trigo, cevada, mandioca, arroz, etc. Embora o amido seja um polissacarídeo da glicose, tem, no processo industrial, a desvantagem de ter de ser hidrolisado previamente no seu monômero, pois a imensa maioria dos organismos industrialmente usados na fermentação alcoólica não consegue converter significativamente o amido em álcool (FIGUERUT *et al.*, 2008). De acordo com os autores, embora o açúcar seja o componente mais importante na composição de uma matéria-prima a ser usada no processo industrial de fermentação, vários outros parâmetros têm de ser levados em conta, tais como:

- Teor de água, ou seja, a concentração de açúcares (valores de 14% a 23% são ótimos para o processo brasileiro atual);
- Composição de açúcares, ou seja, quais tipos de açúcares estão presentes e em que proporção (a presença de um só tipo em geral minimiza a inibição de um açúcar sobre outro);
- Teor de macro e micronutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo, magnésio, zinco e manganês. O teor total de sais (como os de potássio, sódio ou cálcio) tem um limite superior também (devido ao efeito deletério do aumento da pressão osmótica). Fatores de crescimento, como vitaminas, têm de estar presentes em concentrações mínimas;
- pH e poder tamponante do substrato a ser utilizado;
- Teor de sólidos insolúveis (indesejável na maioria dos casos);
- Presença de compostos tóxicos ou inibidores da fermentação alcoólica; entre outros.

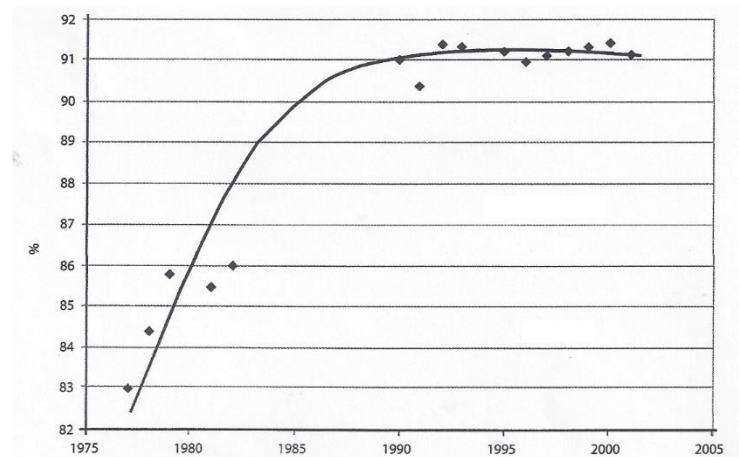
O processo fermentativo de matéria-primas ricas em açúcares tem evoluído muito, conforme pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7.

Figura 5: Evolução do teor alcoólico ao final da fermentação.



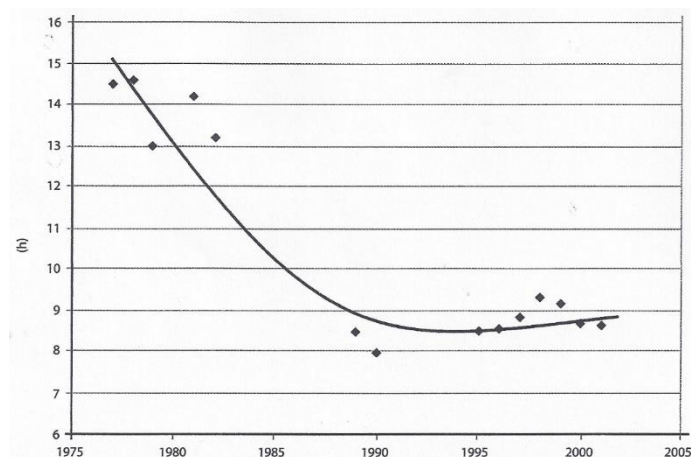
Fonte: Finguerut *et al.*, 2008.

Figura 6: Evolução do rendimento fermentativos.



Fonte: Finguerut *et al.*, 2008.

Figura 7: Evolução do tempo de fermentação.



Fonte: Finguerut *et al.*, 2008.

Verifica-se, portanto, que houve ganhos significativos em todos os aspectos, embora alguns índices, como o teor alcoólico final (Figura 5), apresentem uma tendência de redução em vista do uso de maior proporção de outros substratos, além do caldo de cana-de-açúcar, como é o caso do uso do melaço, um sub-produto da indústria açucareira. Os outros índices como eficiência alcoólica (ou rendimento fermentativo estequiométrico, (Figura 6) e tempo de fermentação (Figura 7) parecem ter atingido o seu valor limite, correspondendo à maturidade do processo.

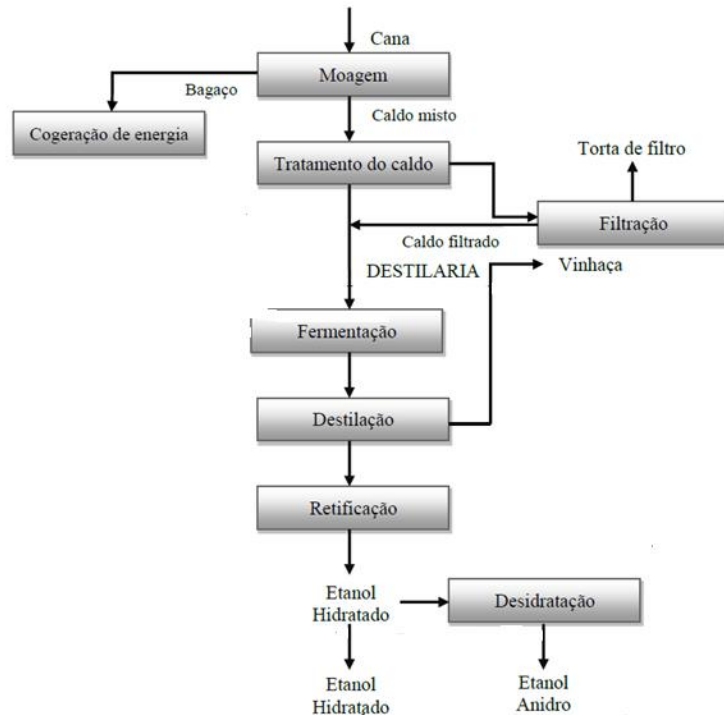
Outro importante parâmetro de produção observado tem sido a produtividade do processo. As indústrias brasileiras têm utilizado o conceito de produtividade agroindustrial em etanol, a qual engloba a produtividade da cana no campo e a produtividade industrial na obtenção do etanol.

De acordo com Goldemberg (2010), de uma amostragem de 116 usinas localizadas na região Centro-Sul de São Paulo, a produtividade agroindustrial máxima alcançada tem sido de 8.000 a 8.500 litros de etanol por hectare de solo cultivado. Palácio *et al.* (2012) mostram a evolução desta produtividade no Brasil de 1975 a 2008 (2.100 a 6.800 L/ha) juntamente com o crescimento da produtividade industrial de 47 a 78 litros de etanol por tonelada de cana processada.

Além do uso da sacarose de cana-de-açúcar como principal substrato da fermentação alcoólica no Brasil, muitas pesquisas vêm sendo feitas para viabilizar o uso de outras matérias-primas como fonte de açúcares fermentescíveis. Resíduos vegetais como a palha e o bagaço de cana-de-açúcar têm sido avaliadas com o objetivo de baixar os custos da produção do combustível e viabilizar a produção de maior quantidade de etanol com menor área plantada.

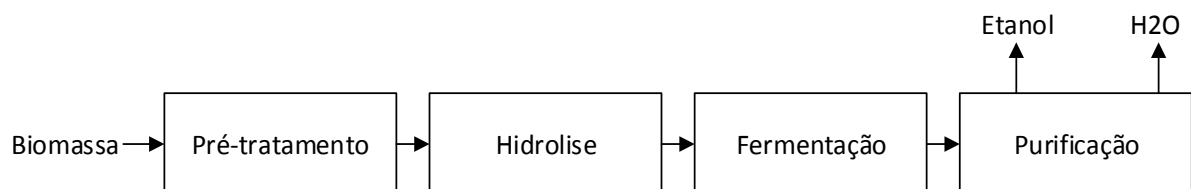
Enquanto as tecnologias de primeira geração para a produção de etanol estão baseadas na fermentação alcoólica dos carboidratos (principalmente sacarose e amido) presentes na matéria-prima, para a produção do etanol de segunda geração, ou bioetanol, faz-se necessário a hidrólise prévia (sacarificação) dos polissacarídeos celulose e hemicelulose presentes na parede celular dos vegetais. Os processos de produção do etanol de primeira e de segunda geração estão resumidos na Figura 8 e 9.

Figura 8: Processamento de etanol de primeira geração.



Fonte: Adaptado de Cortez (2008).

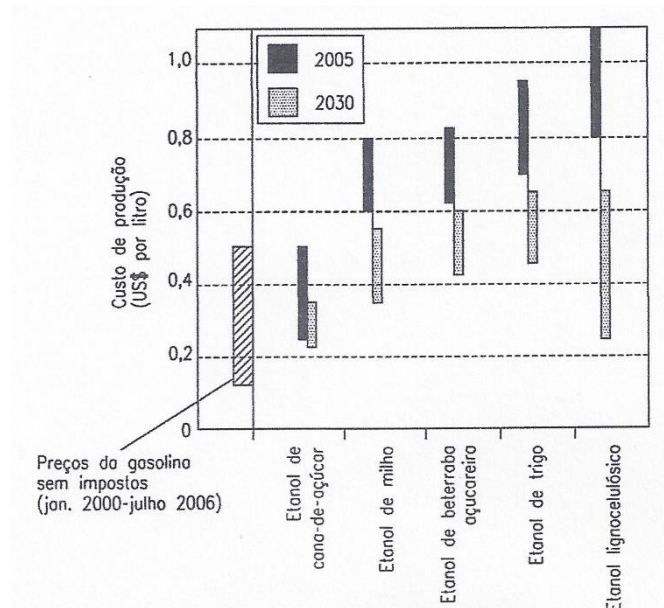
Figura 9: Processo de bioetanol de segunda geração.



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

Até 2012, segundo Palácio *et al.* (2012), a obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos não era, ainda, viável economicamente em escala industrial. O autor indicou, naquele momento, que a solução desse problema nos próximos anos, estaria na determinação de uma melhor opção para disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado. Para ilustrar a comparação entre os custos de produção do etanol com os da gasolina, o autor, apresentou a Figura 10.

Figura 10: Faixa de custos de produção de etanol e da gasolina no ano de 2005 e projetados para o ano de 2030



Fonte: Palácio *et al.* (2012).

Seminário apresentado no Rio de Janeiro pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Social - BNDS, em abril de 2015, mostrou que há, atualmente, no mundo, oito grandes projetos em desenvolvimento para produção de etanol 2G em escala industrial, totalizando uma produção mundial prevista de 635 milhões de litros por ano.

Nos Estados Unidos destacam-se os Projetos POET-DSM e Abengoa com uma produção individual de 95 milhões de litros e o Projeto Dupont com previsão para 115 milhões de litros, todos a partir de biomassa residual da cultura do milho.

Na China, também a partir de resíduos do milho, está em desenvolvimento o Projeto Shandong com uma produção anual de 65 milhões de litros.

O Projeto M&G, em execução na Itália, prevê uma produção de 80 milhões de litros de etanol a partir da cana-do-reino (*Arundo donax*).

No Brasil, três instalações industriais preveem o uso de resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar para uma produção nacional de 185 milhões de litros. Duas dessas unidades fazem uso da palha e do bagaço de cana como biomassa: o Projeto Granbio, instalado em São Miguel dos Campos, Alagoas, com capacidade para a produção de 80 milhões de litros e o Projeto Abengoa (mesmo nome do projeto nos EUA), em Pirassununga, São Paulo, com previsão de 65 milhões

de litros. A terceira unidade, denominada de Projeto Raízen, está localizada em Piracicaba, São Paulo, e deverá produzir 40 milhões de litros de etanol 2G empregando apenas o bagaço de cana-de-açúcar.

## 2.2 Composição dos resíduos lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos representam a maior fonte de carbono e, portanto, energia renovável da terra. Entretanto, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são acumulados, anualmente, decorrentes da produção agrícola e beneficiamento de cereais, dentre inúmeras outras transformações operadas com esses recursos naturais (MICHEL, 2007).

A biomassa lignocelulósica é composta basicamente de carboidrato (celulose e hemicelulose), lignina e uma pequena parte constituída por extrativos, ácidos, sais e minerais. A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares fermentados para produção de bioetanol (HAMELINCK *et al*, 2005).

A celulose é um polímero linear de glicose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4. Essas ligações glicosídicas conferem uma alta rigidez e ordenação na estrutura, criando regiões cristalinas, as quais são responsáveis pela insolubilidade e pouca reatividade da celulose (LEMOS, 2001).

A hemicelulose consta em pequenas cadeias altamente ramificadas de vários açúcares, principalmente a xilose (uma pentose ou açúcar C<sub>5</sub>), arabinose (C<sub>5</sub>), galactose (C<sub>6</sub>), glicose (C<sub>6</sub>) e manose (C<sub>6</sub>). Ela também contém pequenas quantidades de compostos diferentes dos açúcares, como os do grupo acetil, o que a torna relativamente fácil de hidrolisar devido a sua natureza amorfa e ramificada (HAMELINCK *et al.*, 2005)

A lignina está associada com a celulose e a hemicelulose na composição de matérias lignocelulósicas. A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano que podem conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes no grupo fenil (SILVA *et al*, 2009).

Santos *et al* (2012a), em seus estudos buscou a composição química de vários tipos de biomassa celulósica, onde abordou que geralmente a biomassa contém 35-

50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, e 10-15% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Essa composição química varia conforme o tipo da biomassa, como mostrado na Tabela 1.

Dependendo das suas características físicas e propriedades físico-químicas, a biomassa pode ser empregada como substrato de fermentação mediante uma sequência de operações unitárias específicas a sua natureza. A partir da disponibilização da biomassa na área de processos, o material poderá passar por pré-tratamentos físicos para a redução do teor de umidade (secagem) e tamanho da partícula (trituração e/ou moagem); deslignificação, sacarificação; filtração; concentração de açúcares (evaporação); destoxificação; fermentação; extração e purificação do etanol.

Tabela 1: Composição química de biomassas lignocelulósicas em base de massa seca.

<b>Biomassa Lignocelulósica</b>	<b>% Celulose</b>	<b>% Hemicelulose</b>	<b>% Lignina</b>
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: Santos *et al.*, (2012a).

### 2.2.1 Resíduos lignocelulósicos utilizados na produção de bioetanol

Muitas pesquisas vêm sendo feitas para viabilizar o uso de resíduos lignocelulósicos como matéria-prima para a produção de bioetanol, também denominado de etanol de segunda geração, ou simplesmente etanol 2G.



De acordo com Nunes *et al.* (2013), o Brasil possui diversas fontes alternativas para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos, dentre os quais destacam-se: palha de cana-de-açúcar, bagaço da cana, palha de trigo, palha de arroz e pseudocaule da bananeira. A palha e bagaço da cana, contém um teor celulósico em média de 39% e 43%, respectivamente, estimando assim um potencial de produção de etanol em torno de 88 e 101 bilhões de litros. Já os resíduos da cultura do arroz e trigo com potencial de 1,15 e 2,37 bilhões de litros, e o pseudocaule da bananeira, possui o maior teor de celulose, apresenta um potencial de aproximadamente 17 bilhões de litros de etanol.

Estudos apontam a viabilidade técnica e o sucesso do uso de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol. Na Tabela 2 estão identificados alguns trabalhos realizados no Brasil com diferentes resíduos previamente hidrolisados para a produção de etanol 2G.

Tabela 2: Biomassas lignocelulósicas e principais pré-tratamentos empregados para a produção de bioetanol.

<b>Biomassa</b>	<b>Obtenção do açúcar</b>	<b>Autor</b>
Palha e casca de arroz	Moídas e peneiradas com hidrólise ácida e hidrólise enzimática	FURLAN, 2009
Polpa e cascas de banana	Hidrólise ácida e hidrólise enzimática com diferentes concentrações de massa úmida inicial	SCHULZ, 2010
Pseudocaule da bananeira	Hidrólise ácida sem pré tratamento químico de deslignificação, hidrólise ácida com deslignificação prévia, hidrólise enzimática precedida de hidrólise ácida e hidrólise enzimática com deslignificação prévia.	GONÇALVES FILHO, 2011
Resíduos de algodão	Moídas, hidrólise alcalina, sacarificação, hidrólise enzimática	GUEDES, 2012
Resíduos da cana-de-açúcar e celulose	Secas, moídas, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática	SANTOS, 2012b
Cascas de banana	<i>In natura</i> e secas/moídas, após a hidrólise ácida e hidrólise enzimática.	FERREIRA, 2013b

Fonte: o autor, (2014).

Embora a biomassa lignocelulósica venha sendo considerada como a matéria-prima mais promissora durante muito tempo, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo de aquisição, a produção comercial de etanol 2G não se implementou

ainda devido ao seu alto custo global. Segundo Perdices *et al.* (2012), o custo de produção do etanol lignocelulósico depende grandemente da escala de produção e do tipo de hidrólise utilizada, os quais podem representar mais de 40% do custo total do processo.

Buckeridge *et al.* (2010), reforçam a importância dos custos associados principalmente à conversão da biomassa em açúcares fermentáveis e destacam que para se obter níveis aceitáveis de comercialização do etanol 2G (<US\$ 0,36/kg) será necessária a redução dos mesmos. Segundo os autores, um dos reagentes mais utilizados nessa etapa do processo tem sido o ácido sulfúrico, o qual contribui significativamente pelo alto custo do produto final (cerca de US\$ 0,80/kg) quando comparado à produção de etanol de amido (US\$ 0,35/kg) e da cana-de-açúcar (US\$ 0,27/kg).

#### 2.2.1.1 Resíduos da bananicultura

A banana é a segunda fruta mais consumida no planeta, com 11,4 kg/habitante/ano, perdendo apenas para a laranja, com 12,2 kg/habitante/ano. A sua produção mundial em 2012 foi de 106,5 milhões de toneladas (FAO, 2014).

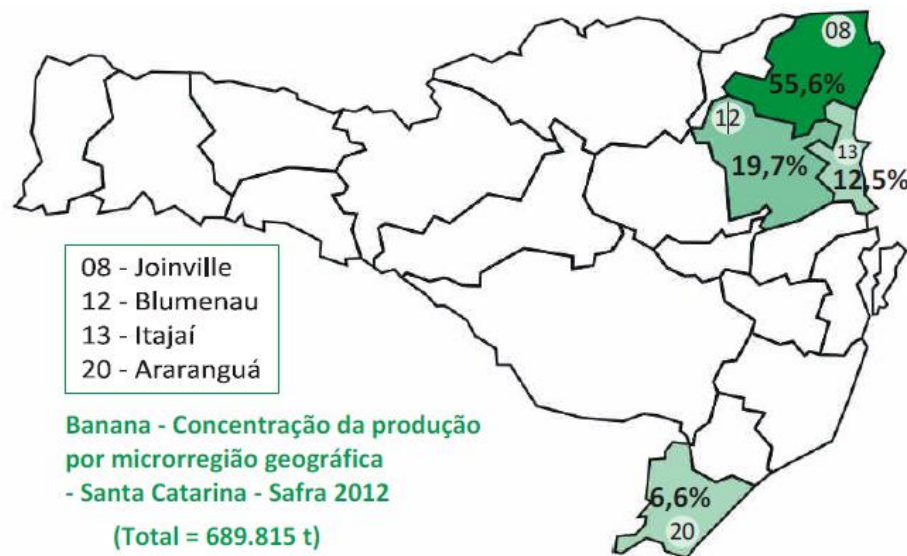
De acordo com o Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola do governo do Estado de Santa Catarina (CEPA, 2013), dentre as frutas “in natura” comercializadas nos principais centros consumidores mundiais, a banana apresenta o maior movimento financeiro, seguida pela uva, maçã e laranja. A bananicultura tem se expandido bastante na maioria dos países nas três últimas décadas, passando de 35 milhões de toneladas na safra 1978 para 107 milhões de toneladas na safra 2011. Isso foi possível graças ao uso mais intensivo de tecnologia, proporcionando melhores produtividades. A Índia lidera a produção de banana no ranking mundial, sendo responsável por 28,1%. A China, com 10,1%, vem em segundo lugar; seguida pelas Filipinas, com 8,6%; Equador, com 7,0%; Brasil, com 6,9% (7,3 milhões de toneladas/ano) e Indonésia, com 5,8%.

No Brasil, a banana é cultivada na maioria dos estados brasileiros. As condições de clima (temperatura, umidade relativa, precipitação e insolação) favorecem que a produção seja distribuída durante todo o ano, atendendo de forma regular as necessidades de consumo. Santa Catarina destaca-se no cenário nacional como o terceiro maior produtor de banana (689,8 mil toneladas/ano). São cerca de seis mil produtores que se dedicam a essa atividade. O Litoral Norte do Estado

concentra 85% da produção estadual, onde predominam os cultivares Nanica e Nanicão, componentes do tipo Caturra. Já no Litoral Sul, que representa cerca de 9% da produção, os cultivares mais usados são a Enxerto e a Branca de Santa Catarina, componentes do tipo Prata também conhecidos como Branca em alguns Estados da Federação (CEPA, 2013).

As microrregiões catarinenses que possuem a maior concentração da produção de bananas são Joinville (383,5 mil toneladas), Blumenau (135,9 mil toneladas), Itajaí (86,2 mil toneladas) e Araranguá (45,5 mil toneladas), conforme mostra a Figura 11.

Figura 11: Produção de banana no estado de Santa Catarina.



Fonte: Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola, (2013).

Os municípios com maior produção na safra de 2012 foram Corupá (20%), Luiz Alves (19%), Massaranduba (9%), Jacinto Machado (7%) e Jaraguá do Sul (6%). A soma da produção destes municípios é responsável por 61% da produção estadual, ou seja, 403 mil toneladas (CEPA, 2013).

Segundo Souza *et al.* (2010), para cada tonelada de banana colhida em torno de quatro toneladas de resíduos agroindustriais são gerados (fruta integral rejeitada para consumo humano, cascas de banana, engaço, folhas e pseudocaule da bananeira). Considerando apenas a microrregião de Joinville é possível estimar, uma produção anual de mais de 1,5 milhões de toneladas de biomassa disponível para produção de biocombustível.

Esse tipo de produção torna-se um processo bastante atraente pois, além de permitir a criação de uma fonte alternativa e renovável de energia e de contribuir com a redução de resíduos no meio ambiente, a geração de energia pode agregar valor à matriz produtiva da fruta reduzindo, assim, o risco de perdas provocadas por sua comercialização (SOUZA *et al.*,2012)

Especificamente para as cascas de banana, vários estudos têm sido realizados para avaliar a sua potencialidade como substrato da fermentação alcoólica, incluindo a caracterização do resíduo e avaliação de diferentes formas de tratamento e fermentação da biomassa.

Mohapatra (2010) estimou a sua composição (em base úmida) como: 83,5% umidade, 1,8% proteínas, 2,4% glicose, 6,2% frutose, 2,6% sacarose, 1,2% amido e 8,4% celulose, além de traços de vários minerais inorgânicos.

Velásques-Arredondo *et al* (2010) apresentam como características: 89,1% de umidade e a seguinte composição (em base seca): 13,2% de celulose, 14,8% de hemicelulose, 14% de lignina e 39,9% de amido. Como não foram detectados açúcares nas cascas e a concentração de amido é relativamente alta, acredita-se que, apesar dos autores não terem mencionados, trata-se, aqui, de cascas de banana verde.

Souza *et al* (2012), caracterizaram as cascas de banana madura *Musa cavendishii*, popularmente conhecida na região sul do Brasil como banana nanica, e determinaram (em base úmida): 88,6% umidade, 2,0% lignina, 2,2% celulose, 0,1% sacarose, 1,1% glicose e 1,1% frutose.

Monsalve *et al.* (2006), avaliou a produção de etanol de cascas de banana previamente secas, moídas e tratadas por ácido e atingiu uma concentração de açúcares redutores de 20 g/L no caldo hidrolisado e de 7,92 g/L de etanol no mosto fermentado.

Sharma *et al.* (2007) realizou a fermentação e sacarificação de cascas de banana otimizando os parâmetros de fermentação para produção de etanol, e alcançou valores máximos de concentração, rendimento e eficiência em etanol de 26,84 g/L, 0,426 g/g e 83,52%, respectivamente.

Schulz (2010) realizou estudos de pré-tratamento ácido de 250 g/L (em massa úmida) de cascas frescas de banana madura combinado, ou não, com hidrólise enzimática e obteve um caldo com concentração máxima de açúcares redutores (AR) da ordem de 8 g/L para o caso de hidrólise ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2%, 120 °C, 15 min)

combinada com a enzimática (celulase NS22086, Xilanase NS22083,  $\beta$ -glucosidade NS 22118, Complexo enzimático NS22119, Hemicelulase NS22035, glucoamilase NS22035, pH 5,5, tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 M, 45 °C, 24 h). Ao comparar esse resultado com o valor máximo de AR (7 g/L) no caldo sem pré-tratamento ácido ou sacarificação (hidrólise ácida seguida de hidrólise enzimática), o autor estimou um ganho percentual aproximado de 14,3% em AR ao aplicar a sacarificação. Diante disto, foi indicado o uso desse resíduo na sua forma fresca, apenas com a necessidade prévia de cozimento da biomassa em água (no mínimo, 15 min) para a extração dos açúcares livres. Ao avaliar a influência da concentração de biomassa nesse tipo de tratamento o autor recomendou o uso de 400 g de cascas frescas e 200 mL de água, onde alcançou 25,37 g/L de açúcares redutores totais.

Em estudo recente, Ferreira (2013b) sacarificou cascas de banana *in natura* (não-secas) e previamente secas (2,5% m/m, 121 °C, 15 min) e ao fermentar o caldo destoxificado (AR = 26,5 g/L e 41,8 g/L, respectivamente) por *Zymomonas mobilis* alcançou concentração máxima de 87,7 g/L em etanol.

Esses estudos comprovam a potencialidade do uso das cascas de banana como substrato da fermentação alcoólica, porém, ainda merecem novos estudos para definir a necessidade, ou não, de sua sacarificação para a produção de bioetanol.

### 2.2.2 Tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de etanol 2G

De acordo com Mood *et al.* (2013), a biomassa lignocelulósica formar uma intrincada estrutura recalcitrante para decomposição devido a sua rigidez provocada pela associação entre lignina, celulose e hemicelulose. Uma das melhores estratégias apontadas para converter este tipo de biomassa em açúcares fermentáveis tem sido a sacarificação enzimática devido ao seu baixo consumo de energia e baixa poluição; mas, o maior problema tem sido a baixa acessibilidade da celulose provocada pela lignina. A quebra da lignina com uma maior exposição da celulose tem sido um dos maiores desafios para converter materiais lignocelulósicos em biocombustíveis.

Perdices *et al.*, (2012), destacam a importância de pré-tratamentos físico e/ou químicos da biomassa para remover a lignina bem como, também, a hemicelulose antes da obtenção da glicose pela sacarificação enzimática. Busca-se com o pré-tratamento o aumento da porosidade dos materiais e a redução da cristalinidade do polímero, tornando-o mais acessível ao ataque das enzimas celulolíticas.

Dentre os diferentes tipos de pré-tratamentos há os que visam, especificamente, a redução do tamanho e aumento da área superficial das partículas sólidas (trituração, picagem e moagem) e aqueles com objetivo de reduzir a cristalinidade (Ogeda *et al* (2010)) ou a recalcitrância (Lorencini, 2013) do material (hidrólise ácida, hidrólise alcalina, *organosolv*, ozonólise, explosão de vapor, explosão de amônia (*ammonia fiber explosion – AFEX*), explosão de CO<sub>2</sub>, água superaquecida (*liquid hot water – LHW*), oxidação química (*wet oxidation – WO*) e radiação por micro-ondas).

A hidrólise ácida têm sido o método de pré-tratamento mais utilizado até o momento para reduzir a cristalinidade da biomassa lignocelulósica (MOOD *et al.*, 2013).

#### 2.2.2.1 Hidrolise ácida

A hidrólise ácida é utilizada no pré-tratamento da biomassa tanto diretamente para a quebra da hemicelulose e celulose em seus respectivos e principais monômeros xilose e glicose, como para proporcionar um tratamento inicial para posterior hidrólise enzimática desses polímeros.

Ácidos diluídos e concentrados têm sido empregados, mas o uso na forma concentrada é apontado como não-atraente por ser tóxico, corrosivo, perigoso e por requerer equipamentos de alto custo de aquisição (TELEBNIA *et al.*, 2010).

De acordo com Singh *et al.* (2015), vários ácidos utilizados no tratamento de diferentes biomassas têm sido reportados na literatura incluindo o ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido peracético e ácido oxálico. Entre todos estes, a abordagem mais amplamente explorada e testada está baseada no uso do ácido sulfúrico diluído em função do produto ser altamente reativo e estar comercialmente disponível para aplicações industriais com um dos menores custos de aquisição.

Perdices *et al.* (2012) descreve na Tabela 3 as principais características das hidrólises com ácidos diluídos e concentrados.

Tabela 3: Vantagens e desvantagens do processo de hidrólise ácida diluída e concentrada.

	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Hidrolise ácida diluída</b>	<p>É um processo rápido;</p> <p>No primeiro estágio de hidrólise, a fração de hemicelulose é convertida em açúcares e outros coprodutos através da utilização de ácido diluído e vapor.</p> <p>A temperatura do processo é 130-190°C e tempo de residência de 10 -30 min;</p> <p>O segundo estágio é realizado com ácido diluído e vapor e a temperatura entre 190-265°C, com tempo de residência de segundos.</p> <p>As soluções açucaradas são tratadas com hidróxido de cálcio e as vezes com pequena adição de sulfato de sódio antes da fermentação. Este tratamento neutraliza os hidrolisados e remove substâncias inibidoras.</p>	<p>Na maioria dos processos não é possível atingir rendimentos de açúcares superiores a 50%;</p> <p>Ocorre duas reações: a primeira é a hidrólise de celulose para glicose e a segunda transforma açúcares em substâncias químicas;</p> <p>Assim que ocorre a hidrólise, as moléculas degradam para furfural;</p> <p>A degradação da glicose conduz baixa eficiência, como produz o furfural, o que acarreta em produtos que são tóxicos aos micro-organismo;</p>
<b>Hidrolise Ácida concentrada</b>	<p>A hidrólise ocorre em um só estágio, a baixa temperatura, geralmente abaixo de 35°C e com tempos de residência entre 5 e 60 min;</p> <p>Não é necessário trabalhar sob pressões elevadas;</p> <p>Neste processo pode-se obter uma alta recuperação de açúcares, cerca de 90%;</p>	<p>A matéria prima deve ser submetida a secagem, a fim de evitar a diluição do ácido no estágio da hidrólise;</p> <p>É um processo relativamente lento, sendo também necessário um sistema de recuperação de ácido para que seja rentável;</p> <p>Se o ácido não for recuperável, deve utilizar grandes quantidade de cal para neutralizar ácido antes da fermentação;</p> <p>No processo de neutralização geram grandes quantidade de sulfato de cálcio, cuja eliminação gera altos custos.</p>

Fonte: Perdices *et al.* (2012)

A combinação de diferentes concentrações de ácido sulfúrico diluído, temperatura e tempo de reação no pré-tratamento de várias biomassas lignocelulósicas avaliadas por diferentes autores é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Condições operacionais indicadas como ideais para o pré-tratamento de diferentes tipos de biomassa por ácido sulfúrico diluído.

Biomassa	Concentração do ácido (m/m)	T (°C)	Tempo (min)	Referência
Palha de trigo	0,5%	180	15	Saha <i>et al.</i> (2005)
Palha de milho	2%	120	43	Lu <i>et al.</i> (2007)
Casca de banana	1%	120	30	Schulz (2010)
	2%	120	15	Schulz (2010)
Palha de arroz	1%	180	1-5	Hsu <i>et al.</i> (2010)
Gramma	1,2%	140	30	Redding <i>et al.</i> (2011)
Palha de arroz	1%	120	15	Belal (2013)
Casca de banana	2,5%	121	15	Ferreira (2013)b
Pseudocaule de bananeira	1%	120	30	Gonçalves Filho <i>et al.</i> (2013)
	2%	120	15	Souza <i>et al.</i> (2014)

Fonte: o autor (2014).

#### 2.2.2.2 Hidrólise enzimática

A conversão enzimática da celulose em glicose é catalisada por um grupo de enzimas denominadas celulasas, as quais rompem as ligações glicosídicas das microfibrilas de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (Santos, 2012b, *apud* Dillon, 2004).

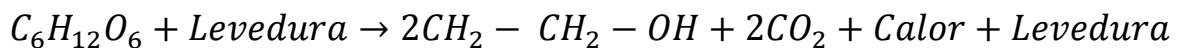
O processo de hidrólise enzimática apresenta vantagens associadas a obtenção de rendimentos superiores a 0,85 g glicose/g celulose (77,3% do rendimento teórico: 1,1 g/g), sob temperatura de 40 – 50°C e pressão atmosférica (MACEDO, 2007).

Ao contrário da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática é conduzida sob condições brandas, podendo atingir rendimentos próximos a 100 % do teórico. A ação das enzimas é específica pelo substrato, evitando a geração de compostos secundários que podem inibir a etapa de fermentação. No entanto, o uso de enzimas requer um maior tempo para que ocorra a hidrólise. Alguns dos fatores que podem afetar a sacarificação enzimática incluem o tipo de substrato, a atividade celulolítica, a temperatura, o tempo e o pH de reação (HAHN-HÂGERDAL *et al.*, 2006).



### 2.3 Produção de bioetanol por fermentação

A fermentação alcoólica consiste na conversão da glicose em etanol, pela ação de micro-organismos específicos, principalmente leveduras. Esta transformação acontece através de uma complexa sequência de reações que podem ser expressas do ponto de vista estequiométrico e de maneira global, pela seguinte reação química (MOURA *et al*, 2012):



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 g etanol/g glicose. 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).

A fermentação é a via mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil devido ao grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes que fornecem açúcares passíveis de fermentação microbiana (Lima *et al*, 2001).

Lima *et al* (2001) descreve na Tabela 5 os diversos fatores químicos, físicos e microbiológicos que afetam a fermentação.

Tabela 5: Fatores que afetam a fermentação.

<b>Fatores</b>	<b>Características</b>
Agentes de fermentação	Cada linhagem de micro-organismo tem suas características próprias, afetadas, pelas condições em que o processo fermentativo se desenvolve.
Nutrientes minerais e orgânicos	Os micro-organismos exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar- que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas, como tiamina e ácido pantotênico, também são necessárias. O meio deve fornecer, ainda, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco entre outros elementos em quantidades diminutivas.
Temperatura	As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C.
pH	As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo a mais utilizada de 4 a 5 para o caso do uso de <i>S. cerevisiae</i> .
Inibidores de fermentação	O processo fermentativo pode ser inibido não somente pelo produto, como o etanol e ácidos orgânicos, mas também, por diferentes substâncias que podem estar presentes nos mostos. Minerais como potássio e cálcio, em quantidades excessivas podem acarretar efeitos negativos às leveduras.
Concentração de açúcares	Elevadores teores de açúcar acarretam estresse osmótica da levedura, entretanto dependendo do processo de fermentação uma faixa de concentração é considerada ideal.
Concentração de inóculo	O elevado teor de micro-organismos exige maior energia para manutenção, ou seja, maior consumo de açúcar, que tem por consequência a maior competitividade pelos nutrientes do meio.
Contaminação bacteriana	Altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, a qual compromete a fermentação alcoólica.
Antissépticos	O uso de antissépticos são favoráveis ao desenvolvimento das leveduras e desfavorável a outros micro-organismo. Muitos agem inibindo bactérias e fungos.
Antibióticos	Os antibióticos possuem o mesmo efeito dos antissépticos, fazendo com que as fermentações sejam mais puras e regulares.

### 2.3.1 Leveduras da fermentação alcoólica

As leveduras são agentes biológicos ativos responsáveis pela fermentação alcoólica e podem ser definidas como fungos especializados, monocelulares, aclorofilados, heterotróficos, unicelulares e eucarióticos (FURLAN, 2009).

As exigências nutricionais de micro-organismos situam-se entre aqueles que se desenvolvem em substratos mais simples, constituídos por fontes de carbonos e

sais minerais, entretanto há alguns que exigem meios mais complexos (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

As leveduras são conhecidas como “as produtoras de etanol”, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, devido a sua boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros inibidores e a capacidade de crescer rapidamente sob condições anaeróbicas que são caracteristicamente estabelecidas durante a fermentação em larga escala (KNAUF & KRAUS, 2006).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica de leveduras é a glicólise (rota Embden-Meyerhof-Parnas ou EMP), através da qual uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas (MADIGAN *et al.*, 2000).

O gênero *Saccharomyces* constitui um grupo de leveduras de vasto conhecimento humano, sendo o representante mais conhecido deste grupo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a qual é amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica e na de panificação, bem como na produção de vinhos, etanol e outros (FERREIRA, 2013)a.

*S. cerevisiae* é o micro-organismo mais utilizado na produção industrial de bioetanol, porém, apenas a partir da sacarose e seus monômeros de glicose e frutose. De acordo com Pereira (2010), *S. cerevisiae* não fermenta pentoses.

Quanto à fermentação das pentoses, poucos micro-organismos possuem capacidade de transformá-las em etanol, entretanto três espécies de leveduras foram identificadas como as de maior potencial para a fermentação alcoólica de pentose: *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, com desempenho muito limitado devido o metabolismo das pentoses exigir uma presença mínima de oxigênio, o que deve ser rigorosamente controlado (ROSSELL, 2006).

Segundo Van Vleest e Jeffries (2009) a levedura *S. stipitis* apresenta um conjunto de características fisiológicas que a torna muito interessante para a bionconversão de açúcares em etanol. Além de apresentar capacidade de fermentar xilose, esta levedura é capaz de fermentar outros açúcares como glicose, manose, galactose e celobiose, fazendo com que tenha potencial aplicação em processos de fermentação para a produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos ou através de sacarificação e fermentação simultânea (processo SSF).

Dentre as leveduras que fermentam xilose, *S. stipitis* é a espécie mais promissoras para a aplicação industrial, pois é capaz de converter xilose e quase

todos os açúcares presentes em hidrolisado lignocelulósicos a etanol, com fatores de conversão de 0,3 – 0,44 g/g de substrato (STAMBUCK *et al.*, 2008)

Apesar da *P.stipitis* ser considerada a de maior capacidade fermentativa de xilose, em relação a outros micro-organismos, esta espécie tem um baixo consumo de açúcar comparado ao da *S. cerevisiae* e requer condições microaerófilas para produção de etanol (AGBOGBO & COWARD KELLY, 2008).

Ainda, na fermentação utilizando *S. stipitis* existem vários fatores que podem influenciar a bioconversão de açúcares em etanol como a temperatura, pH, oxigenação, adição de nutrientes e concentração inicial de substrato e de inóculo (GARCIA, 2012)

A levedura, *P. tannophilus* foi a primeira levedura identificada com capacidade significativa para converter xilose em etanol, e nesta identificação constatou-se que esse micro-organismo pode fermentar todos os açúcares comuns, exceto L-arabinose (SLININGER *et al.*, 1987).

Em fermentações utilizando *P. tannophilus*, a oxigenação pode influenciar significativamente a produção e consumo de etanol pois, podem ocorrer perdas significativas de etanol em condições aeróbias resultados do metabolismo quando o açúcar presente é a xilose (KIIPER, 2009),

Para *P. tannophilus*, o pH 6,0 é indicado como o ideal para altas produtividades em relação à fermentação alcoólica enquanto que a temperatura é de 30 °C, segundo Converti (2001).

Normalmente, a eficiência fermentativa do micro-organismo em temperaturas acima de 40 °C é muito baixa devido ao aumento da fluidez da membrana provocada pela alteração da composição de ácidos graxos presentes na membrana plasmática (BREISHA, 2010).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Biomassa

Cascas de banana madura da espécie *Musa cavendishii*, popularmente conhecida na região sul do Brasil como banana nanica, foram utilizadas como biomassa para a fermentação alcoólica. O resíduo foi doado pela empresa Tipikus Alimentos situada na microrregião de Joinville, município de Garuva, nordeste de Santa Catarina.

#### 3.2 Micro-organismos e manutenção

Foram avaliados, como micro-organismo da fermentação alcoólica, culturas puras das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCT 0293 (ATCC 26603), *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) CCT 2617 (ATCC 58376) e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 (ATCC 32691); todas adquiridas junto à Fundação André Tosello, São Paulo.

A manutenção das cepas foi realizada através do cultivo de superfície em placas de Petri empregando meio sólido (20 g/L de Agar-ágar) e incubação a 30 °C durante 24 h, seguido de armazenagem em geladeira a 4°C. No máximo, a cada quinze dias, as culturas foram reativadas através da re-inoculação da cultura em novas placas de Petri contendo o mesmo tipo de meio de manutenção.

Para cada um dos micro-organismos foram utilizados os nutrientes recomendados pela Fundação André Tosello, conforme mostrado na Tabela 6.

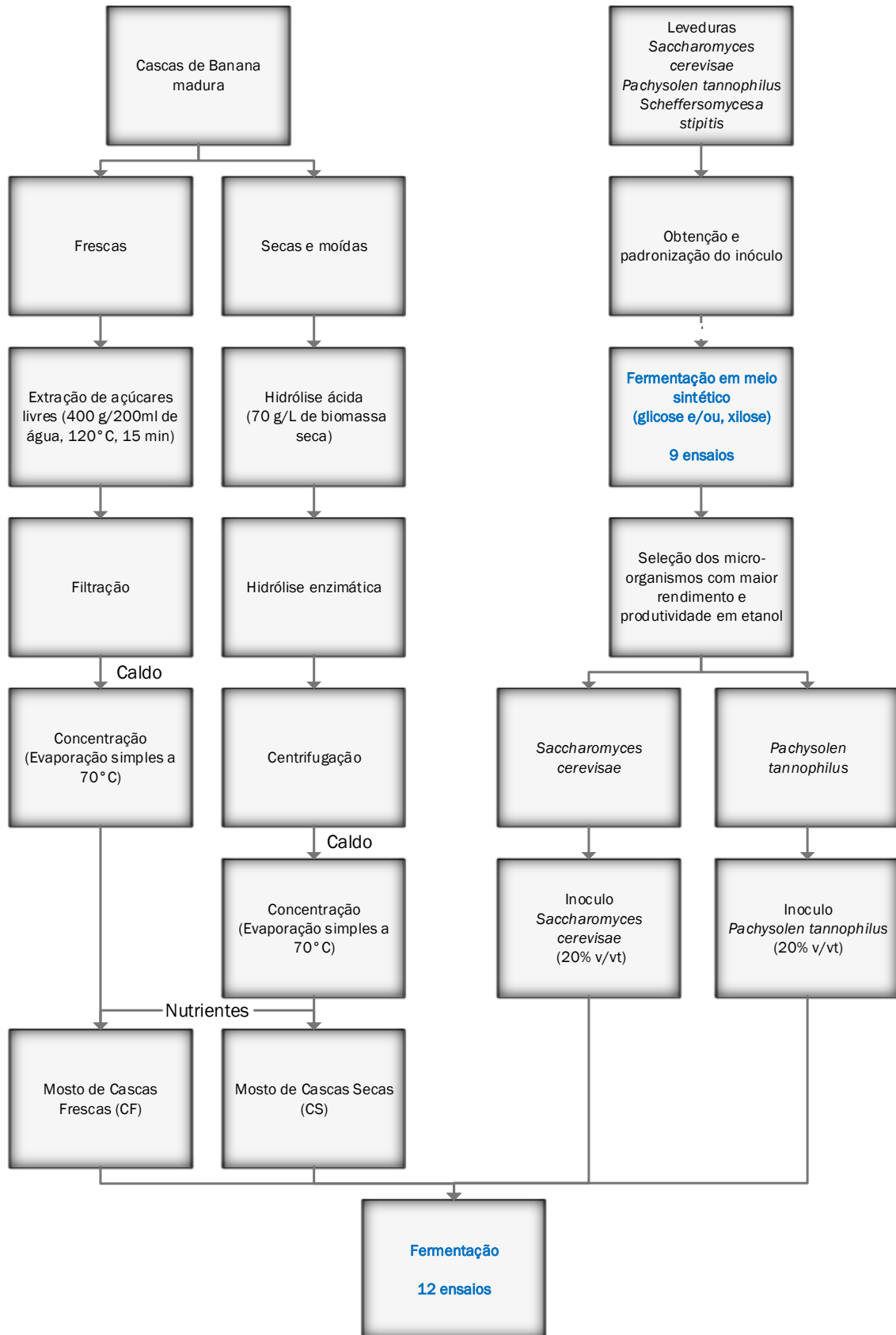
Tabela 6: Composição do meio de cultivo para manutenção dos micro-organismos.

Nutrientes	Concentração (g/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. stipitis</i>	<i>P.tannophilus</i>
Glicose	20,0	20,0	20,0
Extrato de levedura	3,0	3,0	3,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	-	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0	-	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,1	-	0,1
CaCl <sub>2</sub>	0,1	-	0,1
Peptona	-	5,0	-
Extrato de malte	-	3,0	-

### 3.3 Ensaio de fermentação

Foram desenvolvidos no laboratório de Biotecnologia I da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE empregando frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de volume de trabalho (80 mL de mosto e 20 mL de inóculo). Vinte e um ensaios de fermentação (Figura 12), com diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores ( $AR_0$ ), foram realizados; todos, no mínimo, com uma replicata. Os ensaios foram conduzidos a 30 °C com frequência de agitação de 100 min<sup>-1</sup> utilizando como incubadora agitador orbital (*shaker*) da LOGEN.

Figura 12: Fluxograma esquemático dos ensaios de fermentação.



Fonte: o autor (2015).

Nos nove primeiros ensaios, o objetivo foi selecionar os micro-organismos de maior capacidade de produção em etanol. Nessa primeira etapa foi utilizado meio sintético (item 3.4.1) contendo glicose e/ou xilose como principal fonte de carbono. Em cada conjunto de três ensaios, cada um dos ensaios recebeu como inóculo uma diferente espécie de micro-organismo.

Nos demais ensaios (12 ensaios), buscou-se avaliar a produção de etanol pelos micro-organismos selecionados empregando meio complexo composto por cascas de banana.

Cada ensaio de fermentação foi composto por doze frascos de Erlenmeyer para possibilitar a retirada periódica de amostras para quantificação da concentração de açúcar redutor (AR) e etanol (P), conforme item 3.5.

A identificação de cada um dos ensaios foi a seguinte:

- (1) Ensaios com meio sintético contendo 100 g/L de glicose como principal fonte de carbono. Três ensaios:
  - Ensaio G<sub>Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio G<sub>Ps</sub> com *S. stipitis*.
  - Ensaio G<sub>Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (2) Ensaios com meio sintético contendo 100 g/L de xilose como principal fonte de carbono. Três ensaios:
  - Ensaio X<sub>Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio X<sub>Ps</sub> com *S. stipitis*.
  - Ensaio X<sub>Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (3) Ensaios com meio sintético contendo 50 g/L de xilose e 50 g/L de glicose como principais fontes de carbono. Três ensaios:
  - Ensaio XG<sub>Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio XG<sub>Ps</sub> com *P. stipitis*.
  - Ensaio XG<sub>Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (4) Ensaios com cascas frescas de bananas maduras (sem sacarificação), sem concentração prévia do mosto (AR<sub>0</sub> = 20 g/L). Dois ensaios:
  - Ensaio CF<sub>20,Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio CF<sub>20,Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (5) Ensaios com cascas frescas de bananas maduras (sem sacarificação), com concentração prévia do mosto (AR<sub>0</sub> = 50 g/L). Dois ensaios:



- Ensaio CF<sub>50,Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio CF<sub>50,Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (6) Ensaio com cascas frescas de bananas maduras (sem sacarificação), com concentração prévia do mosto (AR<sub>0</sub> = 100 g/L). Dois ensaios:
- Ensaio CF<sub>100,Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio CF<sub>100,Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (7) Ensaio com cascas de bananas maduras previamente secas, moídas e sacarificadas, sem concentração prévia do mosto (AR<sub>0</sub> = 20 g/L). Dois ensaios
- Ensaio CS<sub>20,Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio CS<sub>20,Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (8) Ensaio com cascas de bananas maduras previamente secas, moídas e sacarificadas, com concentração prévia do mosto (AR<sub>0</sub> = 50 g/L). Dois ensaios:
- Ensaio CS<sub>50,Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio CS<sub>50,Pt</sub> com *P. tannophilus*.
- (9) Ensaio com cascas de bananas maduras previamente secas, moídas e sacarificadas, com concentração prévia do mosto (AR<sub>0</sub> = 100 g/L). Dois ensaios:
- Ensaio CS<sub>100,Sc</sub> com *S. cerevisiae*.
  - Ensaio CS<sub>100,Pt</sub> com *P. tannophilus*.

### 3.4 Composição dos meios de fermentação

Exceto para o tipo e concentração da fonte de carbono, todos os mostos foram adicionados, especificamente para cada espécie de micro-organismo, das mesmas concentrações de nutrientes utilizadas na composição dos meios de manutenção (Tabela 6).

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a vapor a 121 °C durante 15 min precedido do acerto do pH para 4,5 no caso da fermentação com *S. cerevisiae*; 5,5 para *S. stipitis* e 6,0 para *P. tannophilus*.

#### 3.4.1 Preparação do meio sintético

A fonte de carbono (glicose, xilose e xilose-glicose) juntamente com todos os demais nutrientes específicos a cada um dos micro-organismos avaliados foram diluídos em água destilada sob agitação constante e, após acerto do pH, distribuídos

em frascos Erlenmeyer (80 mL por frasco) e esterilizados. Após resfriarem até temperatura ambiente foram inoculados e incubados.

### 3.4.2 Preparação do meio complexo com cascas de banana

#### 3.4.2.1 Caldo de Cascas Frescas (CF)

Inicialmente as cascas frescas de banana madura foram cortadas em pedaços quadrados com cerca de 2-3 cm de aresta e então moída em liquidificador doméstico empregando a relação de 400 g de massa úmida de biomassa por 200 ml de água destilada (615,39 g/L de biomassa úmida, equivalente à 70,15 g/L de biomassa seca) até obter uma mistura homogênea. Em seguida, conforme sugerido por Schulz (2010), a mistura foi aquecida em autoclave (120 °C/15 min) para solubilização dos açúcares livres e após filtração em tecido de algodão foi armazenada em congelador para posterior utilização.

O caldo armazenado, após descongelamento em banho-maria a 60-70 °C, foi utilizado na forma não-concentrada ( $AR_0 \approx 20$  g/L, Ensaio CF<sub>20</sub>) ou concentrada ( $AR_0 \approx 50$  g/L, Ensaio CF<sub>50</sub> e  $AR_0 \approx 100$  g/L, Ensaio CF<sub>100</sub>).

Para concentração, foi utilizado concentrador tipo banho-maria equipado com aquecedor elétrico e agitador de haste. A temperatura de evaporação foi controlada entre 60 a 70 °C até concentração desejada (2,5 vezes para obter CF<sub>50</sub> e 5 vezes para CF<sub>100</sub>).

#### 3.4.2.2 Caldo de Cascas Secas (CS)

Pedaços quadrados de cascas frescas de 2 a 3 cm de aresta foram secas em estufa na temperatura de 60 °C durante 24 h, seguido de moagem em moinho de facas da marca Solab – SL-32 até granulometria maior que 30 mesh.

O pó foi submetido ao pré-tratamento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% m/m<sub>s</sub>; 120 °C, 15 min) utilizando concentração de 70 g/L de massa seca de biomassa (m<sub>s</sub>) seguido de hidrólise enzimática (sacarificação).

A concentração de ácido, temperatura e tempo de reação da hidrólise ácida foram definidas com base nos trabalhos de Schulz (2010) e Souza *et al.* (2014).

Para a sacarificação utilizou-se enzimas Celulase NS50013 e Hemicelulase NS22002, cedidas pela Novozymes Latin America Ltda, nas proporções enzimas/m<sub>s</sub> recomendadas pela empresa (6% m/m<sub>s</sub> para celulase e 2% m/m<sub>s</sub> para hemicelulase),

A hidrólise enzimática foi conduzida em meio contendo tampão citrato de sódio/ácido acético 0,1 M, pH 5,5; 45 °C, frequência de agitação de 70 min<sup>-1</sup>, durante 24 h, conforme Gonçalves Filho (2011).

Após sacarificação, o caldo foi filtrado a vácuo e armazenado em congelador para posterior fermentação.

### 3.4.3 Pré-inóculo e padronização do inóculo

Como pré-inóculo foi empregada suspensão microbiana proveniente de cultivo líquido em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de meio de manutenção (Tabela 3.A). A cultura líquida foi iniciada com suspensão aquosa (5 mL) contendo micro-organismos raspados de uma placa de Petri mantido em geladeira (idade da cultura inferior a 15 dias). Os frascos foram incubados em agitador orbital, *Shaker Incubating* da LOGEN a 30 °C, 100 min<sup>-1</sup>, durante 24 h.

A padronização do inóculo teve como objetivo iniciar as fermentações nas mesmas concentrações iniciais de micro-organismos ( $X_0 \approx 6,5$  g/L de massa seca de células).

Para tanto, foram construídas curvas de calibração de absorbância em função da massa seca (Anexo 1) e através delas estabelecidas as relações de volume de pré-inóculo e volume de água a adicionar para obter a concentração adequada de micro-organismo para a inoculação. Apenas para *S. cerevisiae* foi necessário adicionar água pura no pré-inóculo para obter o valor padronizado de  $X_0$  no meio de fermentação.

## 3.5 Métodos Analíticos

Periodicamente (a cada três horas até 6 h de fermentação e a cada seis horas a partir desse ponto) foram retiradas duas amostras de cada fermentação (cada frasco de fermentação foi considerado uma amostra) para determinação da concentração de açúcares redutores (AR) e de etanol (P). Todas as análises foram feitas em duplicata.

Inicialmente, 35 mL de cada amostra foi centrifugado a 3500 rpm, 17 °C durante 10 min empregando centrífuga Excelsa 4 – Modelo 280-R com rotor de diâmetro 14 polegadas (força centrífuga de 2938 g). Em seguida, o sobrenadante foi vertido em micro tubos de ensaios, lacrados com tampa de rosca e congelados até realização das análises.

### 3.5.1 Determinação da concentração de açúcares redutores

Foi utilizado o método colorimétrico do ácido dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959): 500 µl de amostra previamente diluída em água destilada foi adicionada de 500 µl DNS e aquecida em banho-maria a 100 °C durante 5 min. Em seguida a mistura foi rapidamente resfriada em banho de gelo e após adição de 5 ml de água destilada foi colocada em cubeta de acrílico para leitura de absorbância em espectrofotômetro LKB – Biochrom – Novaspec II no comprimento de onda de 540 nm.

Para o cálculo da concentração de açúcares redutores (AR) foi utilizada a Equação 1 resultante da curva de calibração utilizando glicose como padrão (Anexo 2).

$$AR = \frac{Abs + 0,0141}{0,6311} \quad (1)$$

### 3.5.2 Determinação de açúcares por cromatografia líquida

Para a determinação de açúcares foi empregado o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando cromatógrafo Merck Hitachi D-7000 IF equipado com detector de índice de refração Merck RI-71 e Coluna Ca SugarPak – Waters 30 cm. O eluente empregado foi água ultrapura (água Milli-Q) com fluxo de 0,5 ml/mi, e a temperatura foi de 80°C

Antes das amostras serem encaminhadas para análise de cromatografia, foi realizado o ajuste do pH com carbonato de bário, após as amostras foram centrifugadas a 3800 rpm, 17 °C durante 20 min empregando centrífuga Excelsa 4 – Modelo 280-R com rotor de diâmetro 14 polegadas (força centrífuga de 2938 g), após o sobrenadante foi filtrado em filtro HV em PE com membrana ou rapore 0,45U de poro, 13 mm de diâmetro.

A concentração de açúcares presentes na amostra foi realizada a partir de uma curva de calibração padrão (Anexo 05), com os açúcares (sacarose, glicose, xilose e frutose) já conhecidos.

### 3.5.3 Etanol

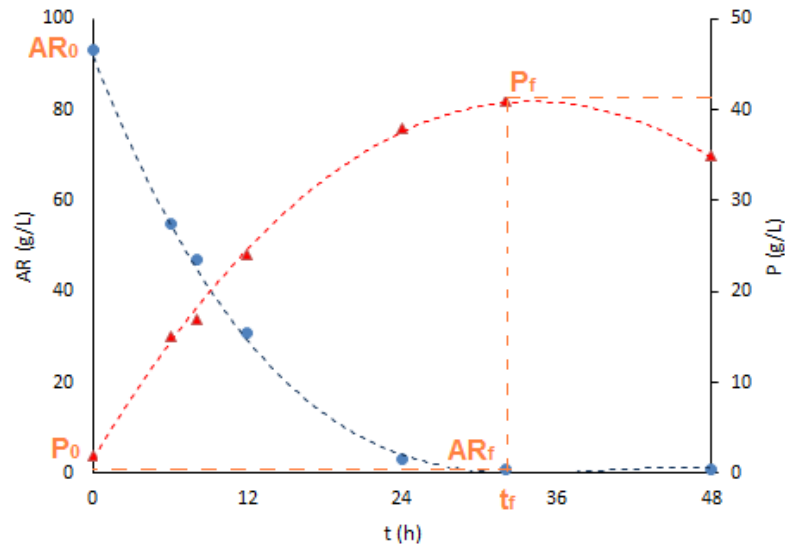
Amostras previamente armazenadas em congelador foram descongeladas em banho-maria a 60 °C e analisadas em cromatógrafo gasoso Agilent - Modelo 6890 equipado com detector de FID (*Flame Ionization detector*) e coluna HP1- *Crosslinked Methyl Siloxane* (50 m x 0,32mm x 1,05 µm). Como gás de arraste foi empregado gás He com alto grau de pureza.

A concentração de etanol (P) foi calculada pelo equipamento a partir de uma curva de calibração (Anexo 3) construída com padrões contendo o produto nas concentrações de (em g/L): 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0.

### **3.6 Construção dos gráficos de cinética do consumo de substrato e formação do produto**

Conhecendo-se os valores das concentrações de AR e P ao longo do tempo de fermentação (t) foram construídos os gráficos de cinética para cada um dos 21 ensaios realizados. As curvas ajustadas (ajuste polinomial de 4ª ou de 5ª ordem) foram traçadas pelo programa Excel empregando valores médios de cada uma das variáveis (AR e P) calculados a partir das duplicatas de ensaios e duplicatas de análises. Através da leitura de cada uma dessas curvas foram retirados os respectivos valores de AR e P no início (AR<sub>0</sub> e P<sub>0</sub>) e no final (AR<sub>f</sub> e P<sub>f</sub>) da fermentação. Entende-se como final de fermentação (t<sub>f</sub>) o tempo em horas necessário para o processo atingir o início da fase de acúmulo de P ( $dP/dt = 0$ ) no caldo fermentado, conforme pode ser visto no exemplo dado na Figura 13.

Figura 13: Modelo da cinética de consumo do substrato (●) e formação de produto (▲) para a determinação do tempo final de fermentação ( $t_f$ ) e concentrações iniciais e finais de açúcares redutores ( $AR_0$  e  $AR_f$ ) e etanol ( $P_0$  e  $P_f$ ).



### 3.7 Cálculo dos parâmetros cinéticos de fermentação

Os cálculos dos fatores de conversão de açúcares redutores em etanol e produtividade volumétrica, foram calculados conforme as Equações 2 e 3.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{AR_0 - AR_f} \quad (2)$$

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (3)$$

Onde,

$Y_{P/S}$  – fator de conversão de substrato em produto ou rendimento em etanol (g/g)

$Q_P$  – produtividade volumétrica em etanol (g/L.h)

$AR_0$  – concentração inicial de açúcares redutores (g/L)

$AR_f$  – concentração final de açúcares redutores (g/L)

$P_0$  – concentração inicial de produto (g/L)

$P_f$  – concentração final de produto (g/L)

$t_f$  – tempo final de fermentação (h)

### **3.8 Análises estatísticas**

Os valores de  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  relativos a cada um dos ensaios de fermentação foram analisados pelo método ANOVA com teste de Tukey para  $p < 0,05$  empregando o programa computacional Origin 7.5.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Seleção de micro-organismos**

Para a seleção da(s) espécie(s) de levedura(s) com maior potencial para a produção de etanol e sua posterior utilização como inóculo na fermentação da biomassa em avaliação (cascas de banana), foram comparados os parâmetros cinéticos de rendimento e produtividade volumétrica em etanol. Para isto foram inicialmente construídos os gráficos cinéticos de consumo de açúcares redutores (AR) e formação de etanol (P) dos ensaios de fermentação com meio sintético. A variação de AR e de P em função do tempo de fermentação com o uso da glicose como principal substrato, xilose e uma mistura glicose/xilose contendo 50% m/m de cada um dos carboidratos são apresentados nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente.

Figura 14: Cinética do consumo de açúcares redutores (● AR) e produção de etanol (▲ P) por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603 na fermentação de glicose (a), xilose (b) e glicose + xilose (c).

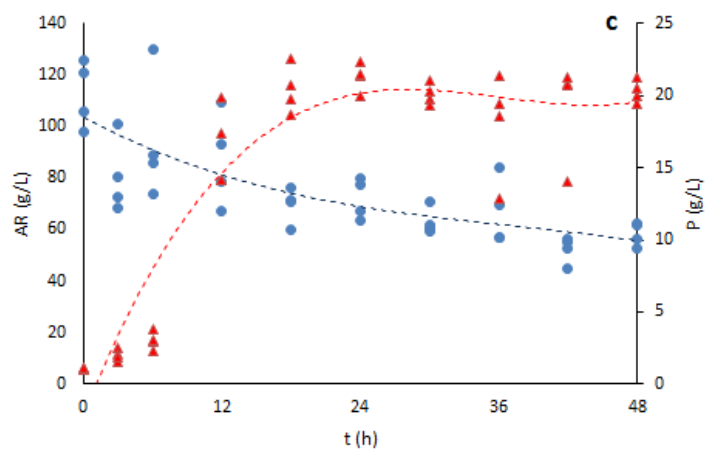
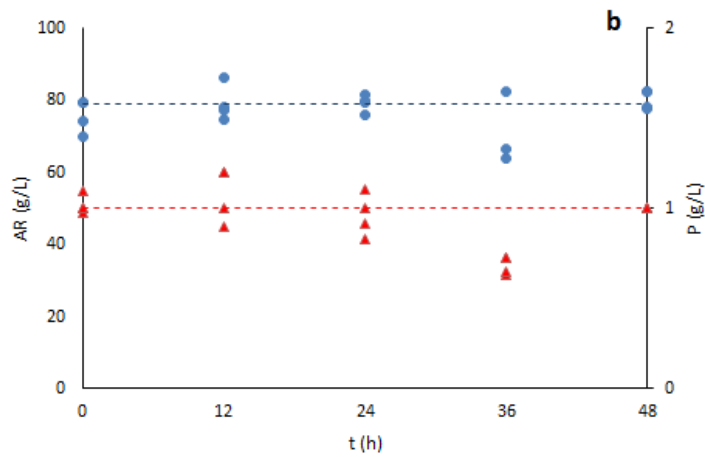
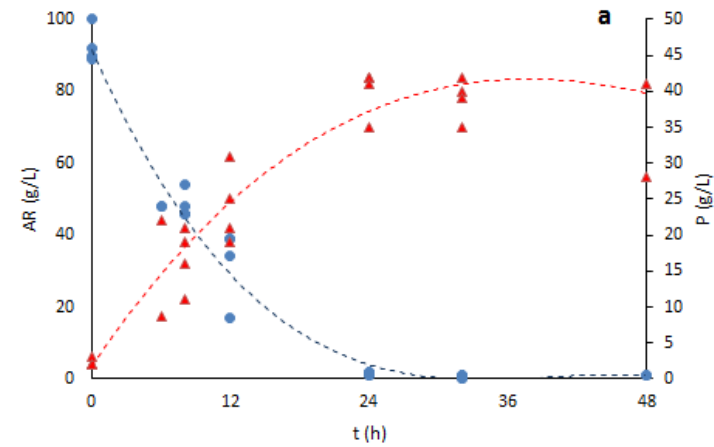




Figura 15: Cinética do consumo de açúcares redutores (● AR) e produção de etanol (▲ P) por *Pacchysolen tannophilus* ATCC 32691 na fermentação de glicose (a), xilose (b) e glicose + xilose (c).

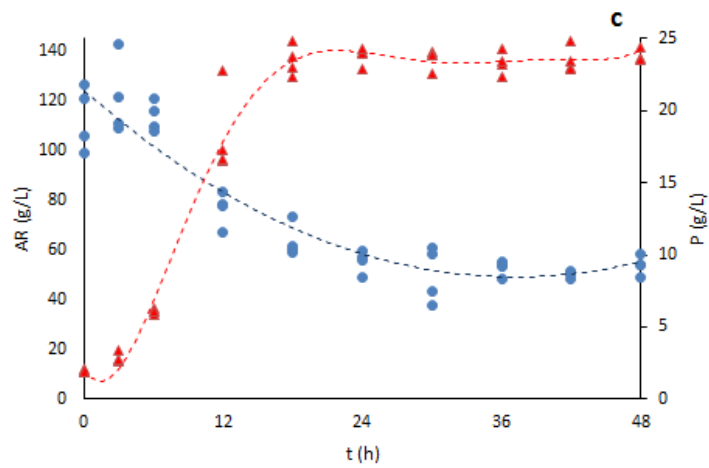
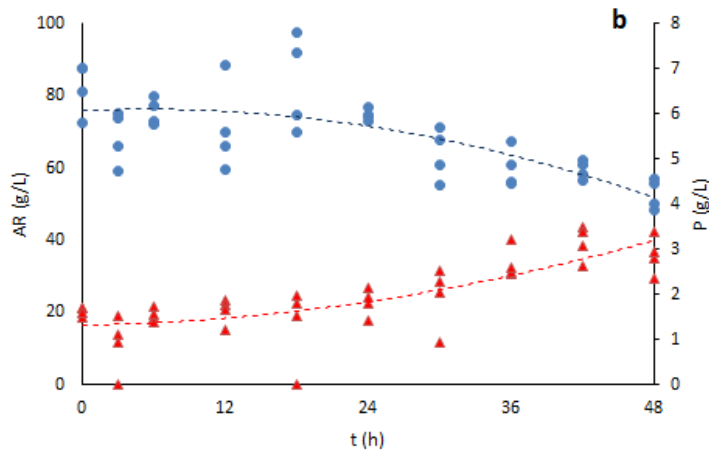
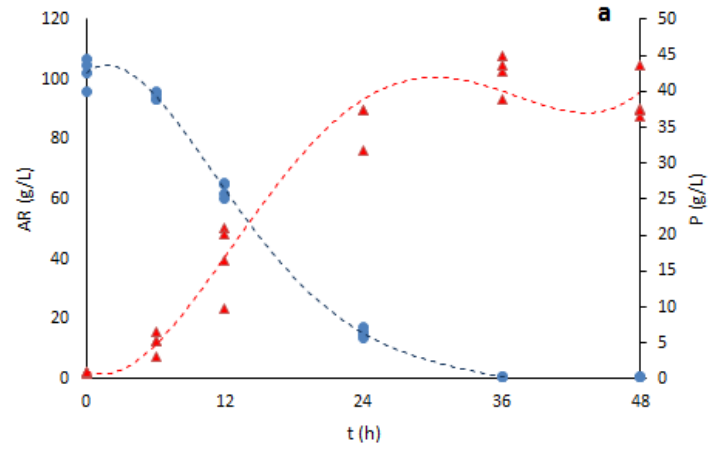
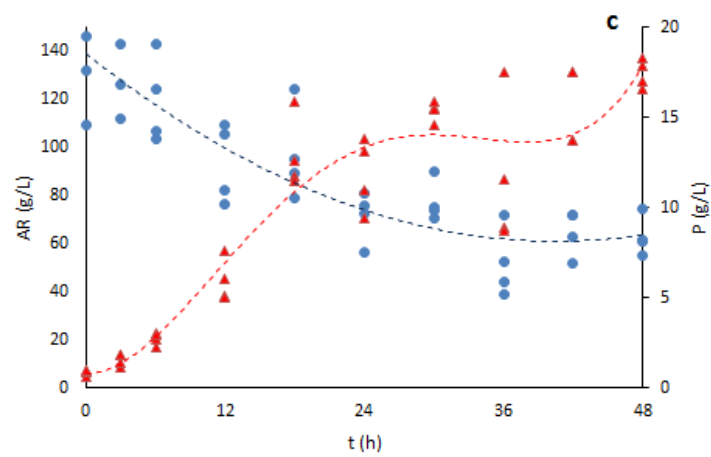
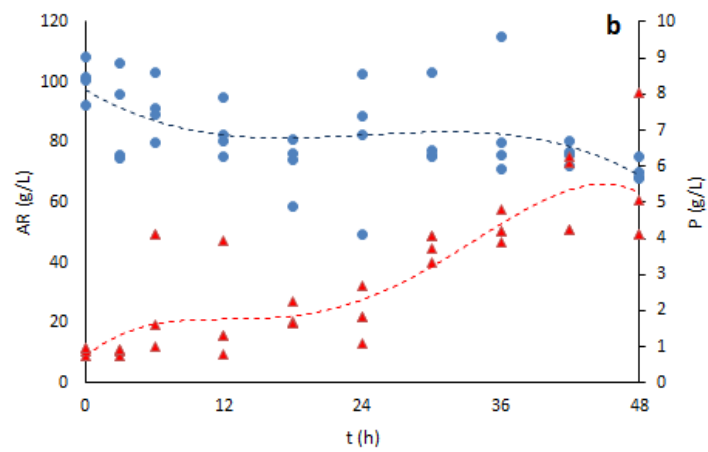
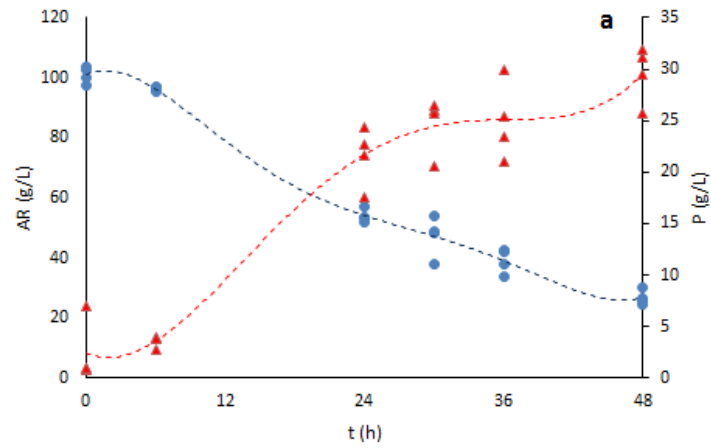


Figura 16: Cinética do consumo de açúcares redutores (● AR) e produção de etanol (▲ P) por *Scheffersomyces stipitis* ATCC 58376 na fermentação de glicose (a), xilose (b) e glicose + xilose (c).



Conforme pode ser observado na Figura 14a a glicose foi totalmente consumida pela cepa *S. cerevisiae* ATCC 26603 até 24 h de fermentação com uma produção acumulada de etanol da ordem de 40 g/L.

Em estudo recente, Furlani (2014) utilizou duas cepas de *S. cerevisiae* e relatou dois resultados diferentes com o uso da glicose. O primeiro deles, com *S. cerevisiae* isolada de fermento comercial Fleishmann®, utilizou 180 g/L de glicose e obteve 64,4 g/L de etanol. No outro estudo, com *S. cerevisiae* PE-2, uma cepa isolada das usinas de etanol do Brasil conforme Basso *et al.* (2008), obteve 68 g/L de etanol a partir de mosto contendo 160 g /L de glicose. Os tempos finais de fermentação para ambos os casos foram de 6 h, bem menor do observado neste trabalho (24 h). Isto ocorreu em virtude da autora ter iniciado os processos fermentativos com 20 g/L de massa seca de inóculo, enquanto que, neste trabalho, a concentração de inóculo (6,0 g/L) foi 3,3 vezes menor.

No processo de fermentação utilizando somente a xilose (Figura 14b) não foi observado o consumo do substrato por *S. cerevisiae* e, conseqüentemente, a formação de produto, conforme já indicado por outros autores (PEREIRA, 2010; COSTA, 2011; SANTOS *et al.*, 2010).

O consumo de AR por *S. cerevisiae* ATCC 26603 para o caso da mistura proporcional de glicose e xilose (50:50 em massa) mostrado na Figura 14c foi da ordem de 50% da sua concentração inicial (100-120 g/L). Esse comportamento corrobora com o observado no uso da xilose como única fonte de carbono, ou seja, *Saccharomyces cerevisiae* selvagem (sem manipulação genética) não consome pentoses (MORAES, 2012).

*P. tannophilus* ATCC 32691 apresentou comportamento semelhante à *S. cerevisiae* no consumo de glicose (Figura 15a), ou seja, o substrato foi totalmente consumido com uma produção média de 38 g/L de etanol. No entanto, foi necessário 50% a mais no tempo de fermentação (36 h) para exaurir toda a concentração inicial de AR.

Para o caso do uso de apenas xilose como AR (Figura 15b), até 48 h de processo, foi possível observar apenas um pequeno consumo do substrato (35,7% de AR<sub>0</sub>) com uma baixa produção de etanol (P = 3,2 g/L). Segundo Slininger *et al* (1982) e Cheng *et al* (2008), *Pachysolen* consome xilose; no entanto, de acordo com Moraes (2012) a velocidade de consumo desse substrato depende da disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio de cultivo.

Watson *et al* (1985), ao cultivar *P. tannophilus* NRRL Y- 2460 em meio com  $AR_0 = 10$  g/L de xilose e aeração de 1,18 mmol/(L.h) observaram o consumo total do açúcar somente com 100 h de cultivo, com uma concentração final de etanol ( $P_f = 2,2$  g/L) semelhante à alcançada neste trabalho sem aeração (Figura 15b).

Essa baixa velocidade do consumo de xilose refletiu no comportamento cinético da fermentação com glicose + xilose (Figura 15c). Observa-se que com  $t = 18$  h, em torno de 50% de  $AR_0$  já havia sido consumido pelo micro-organismo e, a partir desse ponto, onde supõe-se iniciar o consumo da xilose, a velocidade decai significativamente e o acúmulo do produto no meio praticamente cessa.

Resultados semelhantes foram observados por Zhao *et al.* (2008). Os autores utilizaram glicose e xilose em processo batelada e avaliaram o comportamento de *P. tannophilus* 1771 (cepa do *China National Research Institute of Food & Fermentation Industries*) em diferentes composições do substrato: glicose 20 g/L; xilose 20 g/L; mistura de  $\frac{3}{4}$  de glicose (15 g/L) e  $\frac{1}{4}$  de xilose (5 g/L); mistura contendo 50% de glicose (10 g/L) e 50% de xilose (50 g/L); mistura de  $\frac{1}{4}$  de glicose (5 g/L) e  $\frac{3}{4}$  de xilose (15 g/L). Na primeira condição o substrato foi totalmente consumido após 12 h de fermentação com produção de 7 g/L de etanol. No caso da xilose como único substrato foram necessárias 60 h para o seu consumo total com produção de 2,2 g/L de etanol. O acúmulo máximo de etanol (2,7 g/L) nesse caso foi em  $t = 48$  h, quando  $AR$  era de aproximadamente 2 g/L. Ao compor o mosto com as misturas de glicose e xilose, o tempo final de fermentação ( $t_f$ ) foi diretamente proporcional a quantidade de glicose no meio de fermentação, ou seja, 12 h para o caso de glicose  $\frac{3}{4}$  e 48 h para o caso de 50% e xilose  $\frac{3}{4}$ . A concentração máxima em etanol foi obtida com glicose  $\frac{3}{4}$  ( $P = 6$  g/L).

Na fermentação de *S. stipitis* ATCC 58376 utilizando como único substrato 100 g/L de glicose (Figura 16a), é possível constatar que a velocidade de consumo de  $AR$  foi menor do que o ocorrido com *P. tannophilus* ATCC 32691 (Figura 15a). Com  $t = 48$  h, *S. stipitis* consumiu 73,4 % de  $AR_0$  enquanto que *P. tannophilus* em  $t = 36$  h já havia consumido toda a glicose inicialmente presente no meio ( $AR_0 = 100$  g/L). A concentração de etanol em  $t = 48$  h para *S. stipitis* foi em torno de 30 g/L.

Cho *et al.* (2010), analisaram a produção de etanol por *S. stipitis* KCCM 12009 utilizando, entre outros substratos, 58 g/L de glicose. O micro-organismo consumiu toda a glicose em 36 h, o que indica uma velocidade global de consumo do substrato (1,67 g/L.h) semelhante à que pode ser estimada para este trabalho (1,56 g/L.h). A

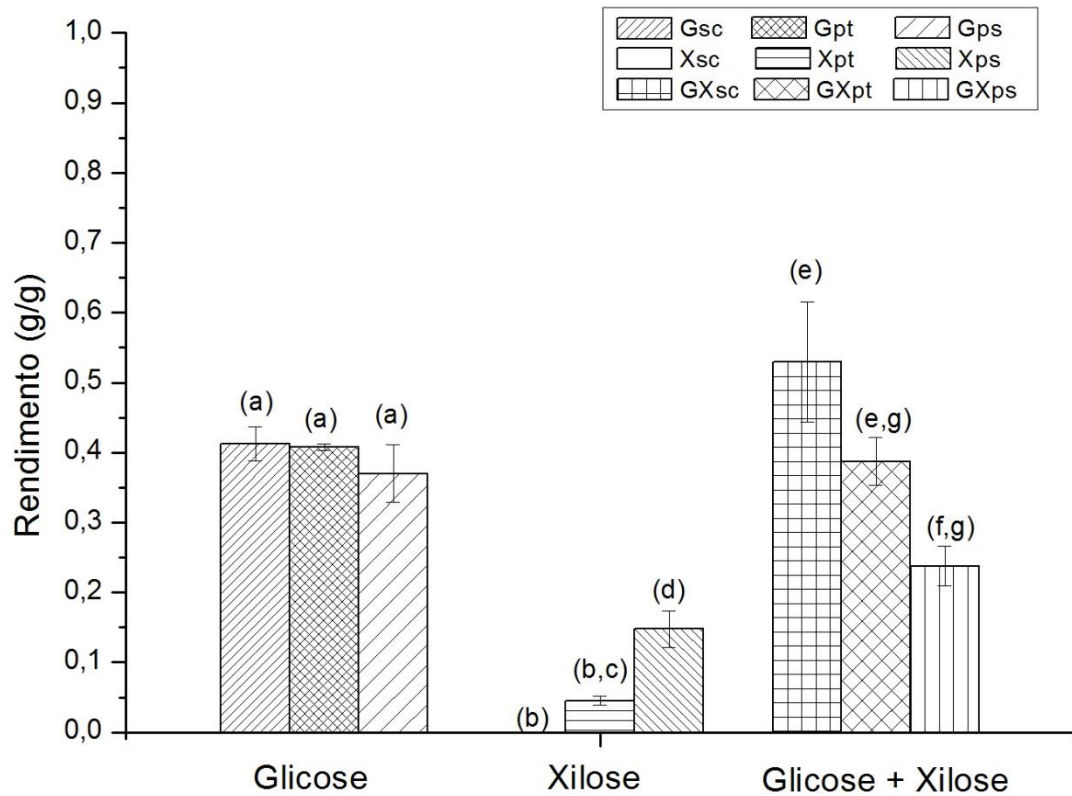
diferença entre as fermentações foi o pH: 6,0 e 5,5, respectivamente e a quantidade de inoculo adicionada ao meio.

*Scheffersomyces stipitis* ATCC 58376, assim como *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, consumiu parcialmente a xilose quando este foi utilizado como único açúcar no mosto (Figura 16b) ou em composição com a glicose (Figura 16c). Para o caso do uso somente de xilose com *S. stipitis* o acúmulo de etanol no meio foi de aproximadamente 5 g/L com um consumo em torno de 30% de  $AR_0$  até 48 h de fermentação.

Silva *et al* (2009b) estudaram o consumo de substrato e formação de produto por *S. stipitis* NRRL Y-7124 (ATCC 58376) em meio composto por xilose (90 g/L), glicose (15 g/L) e arabinose (15 g/L) e obtiveram um acúmulo máximo de etanol de cerca de 27 g/L somente quando t chegou a 84 h de fermentação, confirmando assim, a baixa velocidade de metabolismo da cepa em relação à alta concentração de açúcar.

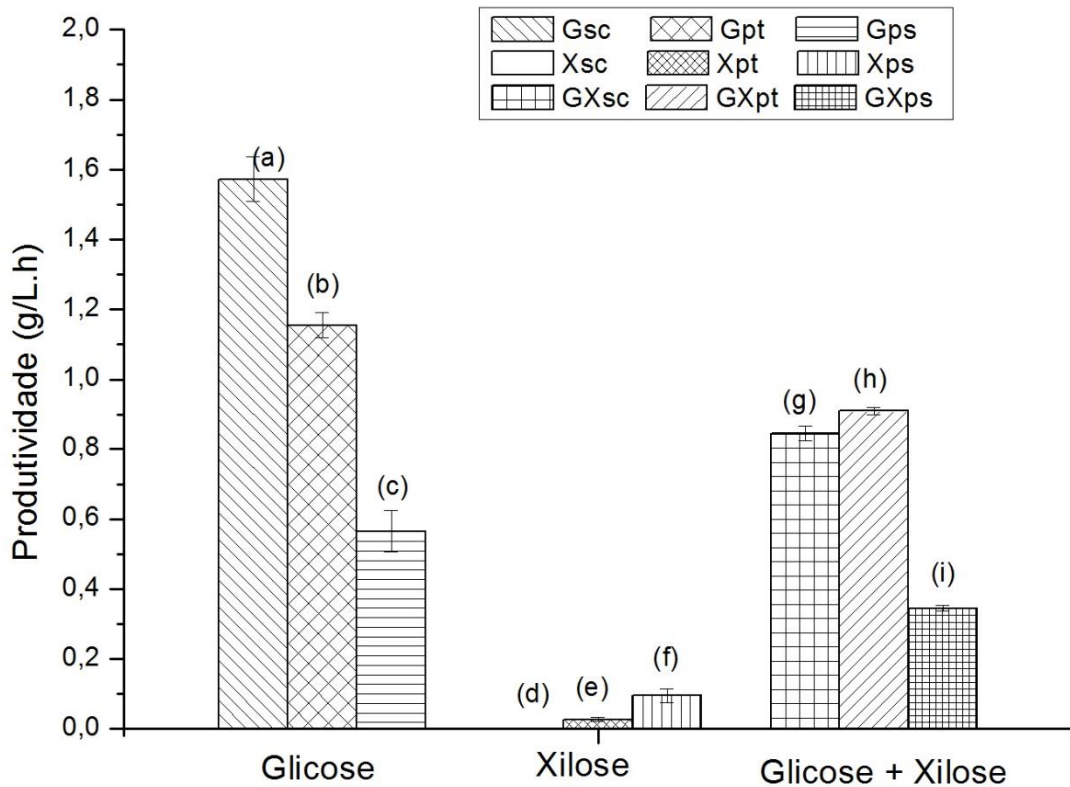
A partir do comportamento cinético de cada um dos micro-organismos avaliados na fermentação de meios sintéticos (Figuras 14 a 16), retirou-se os valores das concentrações de açúcar e etanol no início ( $AR_0$  e  $P_0$ ) e no final ( $AR_f$  e  $P_f$ ) do cultivo, conforme descrito no item 3.6 e e calculou-se os valores de rendimento, ( $Y_{P/S}$ , Equação 2) e produtividade volumétrica ( $Q_P$ , Equação 3) para cada um dos ensaios realizados. As Figuras 17 e 18 apresentam esses valores médios com os respectivos desvios padrão, conforme Tabela 3.A do Anexo 3.

Figura 17: Rendimento ( $Y_{P/S}$ ) da fermentação de meio sintético contendo glicose (G), xilose (X) e glicose + xilose (GX) para *S.cerevisiae* ATCC 26603 (sc), *P. tannophilus* ATCC 32691 (pt) e *S. stipits* ATCC 58376 (ps).



Letras iguais numa mesma concentração de açúcar, significam que não há diferença significativa entre os valores de  $Y_{P/S}$  de acordo com o teste de Tukey para  $p < 0,05$

Figura 18: Produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) da fermentação de meio sintético contendo glicose (G), xilose (X) e glicose + xilose (GX) por *S.cerevisiae* ATCC 26603 (sc), *P. tannophilus* ATCC 32691 (pt) e *S. stipitis* ATCC 58376 (ps).



Letras iguais numa mesma concentração de açúcar, significam que não há diferença significativa entre os valores de  $Y_{P/S}$  de acordo com o teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

Conforme pode ser observado na Figura 17 não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores médios de  $Y_{P/S}$  na fermentação de glicose pelos três micro-organismos avaliados. Para o caso da xilose, conforme discutido anteriormente, *S. cerevisiae* não produziu etanol ( $Y_{P/S} = 0$ ). Ao utilizar *P. stipitis* como inoculo estimou-se rendimento de  $0,15 \pm 0,05$ , o qual foi três vezes maior do que  $Y_{P/S}$  para *P. tannophilus* ( $Y_{P/S} = 0,05 \pm 0,01$ ). Ao misturar-se glicose com xilose na proporção de massa 50:50 (ensaios GX), *S. cerevisiae* proporcionou o maior rendimento em etanol ( $Y_{P/S} = 0,53 \pm 0,17$ ), mesmo não sendo consumidora de xilose. Esse valor foi, aproximadamente, 36% maior do que  $Y_{P/S}$  obtido com *P. tannophilus* ( $Y_{P/S} = 0,39 \pm 0,07$ ) e 2,2 vezes maior de que  $Y_{P/S}$  de *P. stipitis* ( $Y_{P/S} = 0,24 \pm 0,06$ ).

Ribeiro & Horri (1999), realizaram ensaios de fermentação com caldo de cana-de-açúcar comparando a produção de etanol por três diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, uma delas flocculante, como a deste trabalho. Os autores obtiveram uma produção final de etanol de 54,51 ml/L ( $\approx$  43 g/L considerando massa específica do etanol a 20 °C igual a 0,789 g/L) a partir de uma concentração inicial de açúcar próximo a 100 g/L. Essa diferença no acúmulo de etanol (35,6% maior do que o obtido nos ensaios com cascas frescas de banana deste trabalho) pode ter ocorrido em função dos autores terem utilizado uma linhagem de levedura industrial, previamente selecionada pela indústria e já adaptada ao tipo de substrato empregado.

Valores de  $Y_{P/S}$  iguais a 0,13; 0,19; 0,23; 0,26 e 0,32 g/g foram observados por ZHAO *et al* (2008) nos seus estudos com *P. tannophilus* empregando misturas de glicose e xilose nas proporções mássicas de 100% de xilose;  $\frac{1}{4}$  de glicose e  $\frac{3}{4}$  de xilose;  $\frac{1}{2}$  de glicose e  $\frac{1}{2}$  de xilose;  $\frac{3}{4}$  de glicose e  $\frac{1}{4}$  de xilose; 100% de glicose, respectivamente. Os respectivos tempos de fermentações empregados (em h) foram de 60, 48, 48, 36 e 12.

Em relação à *Pichia stipitis*, Silva *et al.* (2009) cultivaram a linhagem NRRL Y-7124 em meio composto por xilose (90 g/L), glicose (15 g/L) e arabinose (15 g/L) e obtiveram  $Y_{P/S}$  máximo de 0,32 g/g.

Cabral *et al* (2011) reavaliaram a produção de etanol dessa mesma cepa em meio com mesma concentração de arabinose (15 g/L) porém, com menores concentrações de xilose (30 g/L) e glicose (3 g/L), em diferentes valores de pH, e alcançaram rendimento máximo ainda maior ( $Y_{P/S} = 0,40$  g/g) do que o obtido por Silva *et al.* (2009). Ambos os rendimentos relatados foram bem superior ao obtido neste trabalho ( $Y_{P/S} = 0,15$  g/g, Figura 17, Ensaio Xps). Além desses autores empregarem maior frequência de agitação (200 a 250  $\text{min}^{-1}$ ) do que a empregada neste trabalho (100  $\text{min}^{-1}$ ), conduziram o cultivo até exaustão de todo o substrato. Além disto, Silva *et al.* (2009) fizeram uso de aeração ( $K_{La} = 4,9$   $\text{h}^{-1}$ , 0,25 vvm). Convém deixar claro que a linhagem NRRL Y-7124 é a mesma da utilizada neste trabalho (ATCC 58376) e é identificada pela Fundação André Tosello, fornecedora da cepa, com número CCT 2617.

Na análise técnica de um processo fermentativo qualquer, além de se conhecer o parâmetro de rendimento que indica o aproveitamento do substrato na geração do produto de interesse, deve-se “olhar”, também, para a produtividade do processo, cujo



cálculo inclui o tempo de processo gasto para alcançar a concentração do produto desejado.

Na Figura 18 estão apresentados os valores de produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) estimados nos experimentos realizados neste trabalho. Os maiores valores de produtividade específicos a cada micro-organismo avaliado foram de  $1,57 \pm 0,13$  g/(L.h) para *S. cerevisiae* em meio com glicose 100 g/L,  $0,91 \pm 0,02$  g/(L.h) para *P. tannophilus* com a mistura glicose:xilose (50:50) e  $0,10 \pm 0,04$  g/(L.h) para *P. stipitis* em meio com xilose 100 g/L.

Nos trabalhos citados anteriormente (Furlani, 2014; Zhao *et al*, 2008 e Cho *et al*. 2010) é possível estimar valores máximos de  $Q_P$  da ordem de 10,73 g/(L.h) para *Saccharomyces* com o uso de glicose como substrato (Furlani, 2014) e de 1,24 g/(L.h) para *Pachysolen* em meio contendo glicose (Zhao *et al* 2008) e 1,67 g/(L.h) para *Pichia* empregando 60 g/L de glicose (Cho *et al*, 2010).

Considerando os valores de  $Y_{P/S}$  (Figura 17) e  $Q_P$  (Figura 18) alcançados com meio sintético rico em glicose, dos três micro-organismos testados, *S. cerevisiae* ATCC 26603 foi o que apresentou maior potencial para a produção de etanol, seguido por *P. tannophilus* ATCC 32691 e *S. stipitis* ATCC 58376. Para o caso de meio contendo apenas xilose, sem glicose, o micro-organismo indicado seria *S. stipitis* enquanto que para meio contendo glicose e xilose, tanto *S. cerevisiae* como *P. tannophilus* apresentaram mesmo rendimento; no entanto, *P. tannophilus* possibilitou maior produtividade.

Sabe-se que dependendo do tipo de biomassa empregada e do método de tratamento a que esse material foi submetido para a obtenção de açúcares fermentescíveis pode-se obter caldos de fermentação ricos em glicose com proporções variadas de xilose.

Exemplos disso, são os trabalhos realizados por Oliveira *et al* (2014), que realiza estudos, utilizando como substrato palha de cana de açúcar em um meio hidrolisado rico em glicose, através de pré-tratamento de deslignificação e hidrólise enzimática. Os autores concluíram que foi possível converter a palha de cana em um hidrolisado rico em glicose pelos processos de tratamento adotados, e que os tempos de permanência e temperatura mais elevadas podem promover uma melhor solubilização da hemicelulose e fragmentação lignina.

Especificamente para as cascas de banana utilizadas como biomassa neste trabalho, devido ao problema de ordem técnica, só foi possível investigar a

composição dos caldos de fermentação, tanto em relação à biomassa fresca quanto à sacarificada, na etapa final da seleção de micro-organismos. Através de análise cromatográfica (Tabela 7) foi possível identificar uma baixa concentração de xilose no caldo de fermentação, independentemente do tipo de tratamento ao qual a biomassa foi submetida. Este fato pode, aqui, representar a ausência da necessidade do uso de micro-organismos consumidores de xilose.

A partir da Tabela 7 é possível constatar que o uso de cascas frescas (70 g/L em massa seca) possibilitou a obtenção de um caldo com concentração de açúcares fermentescíveis (sacarose + glicose + frutose) de 18,0 g/L; valor este muito próximo ao obtido na concentração de açúcares resultante da sacarificação de mesma quantidade de biomassa. Este fato não corrobora com parte da hipótese formulada por Schulz (2010) que sugeriu o uso da sacarificação do farelo de cascas secas para aumentar a concentração de açúcares no mosto e assim, aumentar o acúmulo de etanol no meio fermentado.

Tabela 7: Composição do mosto de fermentação proveniente de cascas frescas (CF) e sacarificadas (CS) de banana madura nas diferentes concentrações de açúcares avaliadas (20, 50 e 100 g/L).

Tratamento	Concentração de açúcar (g/L)			
	Sacarose	Glicose	Xilose	Frutose
CF <sub>20</sub>	0,23 ±0,00	8,72 ±0,06	0	9,06 ±0,03
CF <sub>50</sub>	1,57±1,75	18,43±0,81	0	17,96±1,18
CF <sub>100</sub>	7,34	41,01±1,38	0	43,57±2,01
CS <sub>20</sub>	3,13±0,39	10,92	0,06	9,67
CS <sub>50</sub>	1,90	19,95±2,76	0,15	14,27±2,40
CS <sub>100</sub>	1,85±0,49	32,29±1,71	0	27,13

No entanto, convém lembrar que a etapa da seleção dos micro-organismos foi realizada com o objetivo de indicar, de uma forma geral, as cepas com maior potencial para consumo de açúcares de biomassas, independentemente do tipo de resíduo lignocelulósico empregado. Assim, mesmo no caso de cascas de banana, optou-se por manter a avaliação de *S. cerevisiae* ATCC 26603 e *P. tannophilus* ATCC 32691

na fermentação, visto que ambas as cepas apresentaram maiores valores de rendimento ( $0,44\pm 0,01$  e  $0,42\pm 0,01$  g/g) e produtividade em etanol ( $1,63\pm 0,01$  e  $1,20\pm 0,02$  g/(L.h)), respectivamente.

#### **4.2 Fermentação de cascas frescas e sacarificadas de banana madura**

Após as etapas de obtenção do caldo de fermentação a partir da solubilização a quente de cascas frescas (item 3.4.2.1) ou da sacarificação das cascas secas (item 3.4.2.2), realizou-se as fermentações desses meios empregando diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores.

Na Figura 19 estão mostrados o comportamento cinético dos micro-organismos *S. cerevisiae* ATCC 26603 e *P. tannophilus* ATCC 32691 com caldo de cascas frescas e na Figura 20, o comportamento com caldo de cascas secas e sacarificadas.

Figura 19: Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) por *S. cerevisiae* (1) e *P. tannophilus* (2) na fermentação de mosto de cascas frescas de banana sem concentração prévia de AR (a), AR concentrado até 50 g/L (b) e AR concentrado até 100 g/L (c).

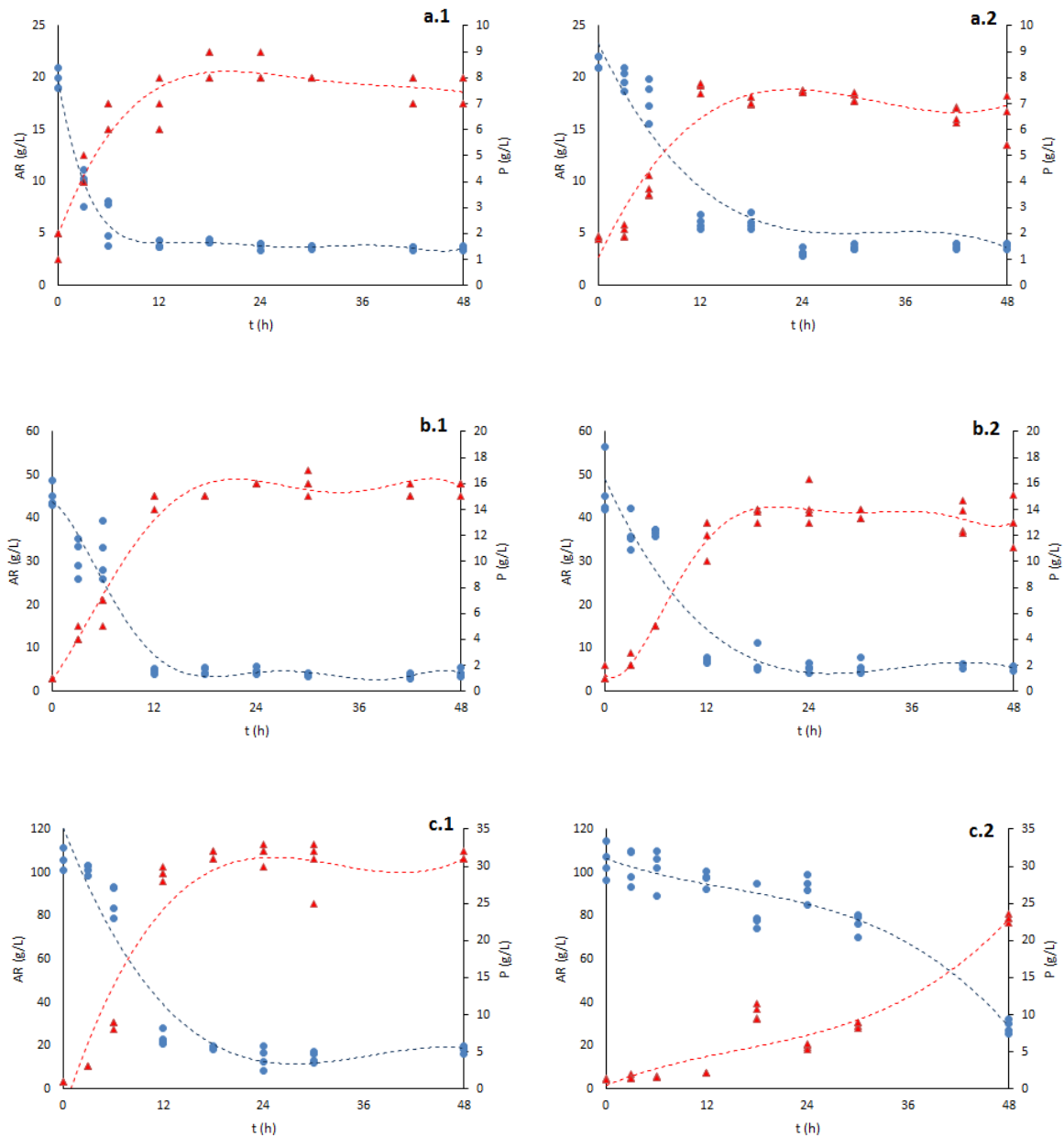
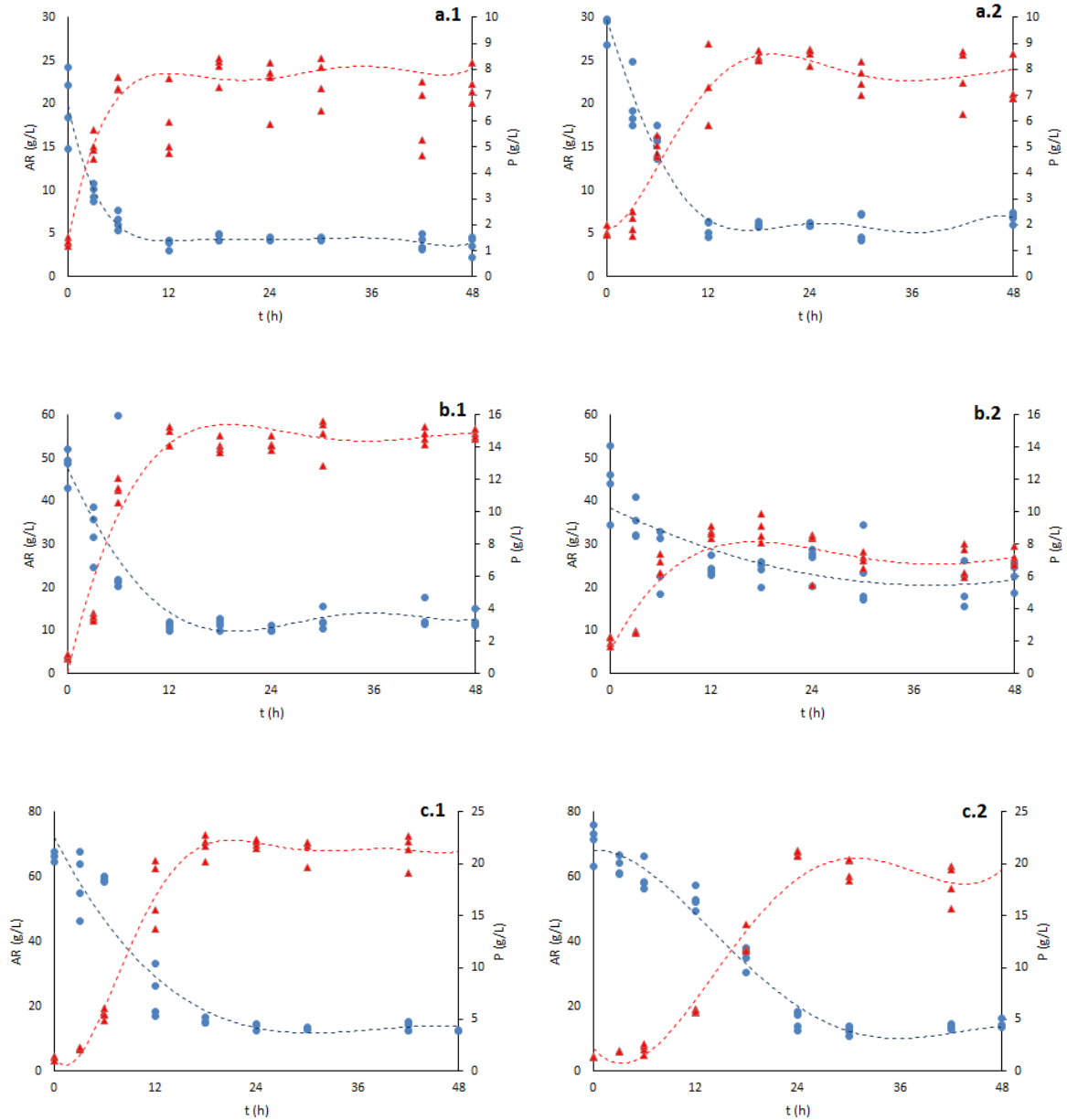


Figura 20: Cinética do consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) por *S. cerevisiae* (1) e *P. tannophilus* (2) na fermentação de mosto de cascas secas e sacarificadas de banana madura, sem concentração prévia de AR (a), com AR concentrado até 50 g/L (b) e AR concentrado até 100 g/L (c).



Observando os resultados com mosto de cascas frescas de banana (Figura 19) é possível visualizar que houve uma pequena diferença no acúmulo de etanol no meio de fermentação entre os micro-organismos testados. O valor máximo dessa diferença (37,8%) ocorreu no meio com maior AR inicial ( $AR_0 \approx 100$  g/L) onde o valor médio de  $P_f$  foi de 31,7 g/L para *S. cerevisiae* (Figura 19-c1) e 23,0 g/L para *P. tannophilus* (Figura 19-c2).

Em nenhum dos experimentos (Figura 19) houve o consumo total de  $AR_0$  como no caso da glicose (Figura 14). Como utilizou-se método colorimétrico do DNS para análise das amostras ao longo do tempo de fermentação, buscou-se a identificação desse composto residual através de análises cromatográfica posteriores apenas das amostras correspondentes aos tempos inicial e final de fermentação, de ambos os micro-organismos. Como o método cromatográfico foi desenvolvido para quantificar apenas os açúcares sacarose, glicose, frutose e xilose (Anexo 5), foi possível identificar no caso de *S. cerevisiae* resíduos de sacarose, xilose e traços de frutose (Anexo 6); e para o caso de *P. tannophilus*, com maiores valores de AR residual do que o ocorrido com *Saccharomyces*, principalmente para  $AR_0 = 100$  g/L (Figura 19-c2), encontrou-se frutose, sacarose e glicose (Anexo 7). Esse fato pode ter ocorrido em função de algum tipo de inibidor natural presente nessa biomassa em seu estado natural (cascas frescas), não identificado neste trabalho.

Ao empregar mosto proveniente de pó de cascas secas de banana submetidas à sacarificação (Figura 20), o consumo de  $AR_0$  e acúmulo de P pelas duas leveduras testadas, para valores de  $AR_0 \approx 20$  g/L foram semelhantes aos verificados no mosto de cascas frescas de banana (Figura 19). O mesmo ocorreu com  $AR_0$  em torno de 50 g/L e 100 g/L para *S. cerevisiae* (Figuras 19-b1 e 19-c1, respectivamente).

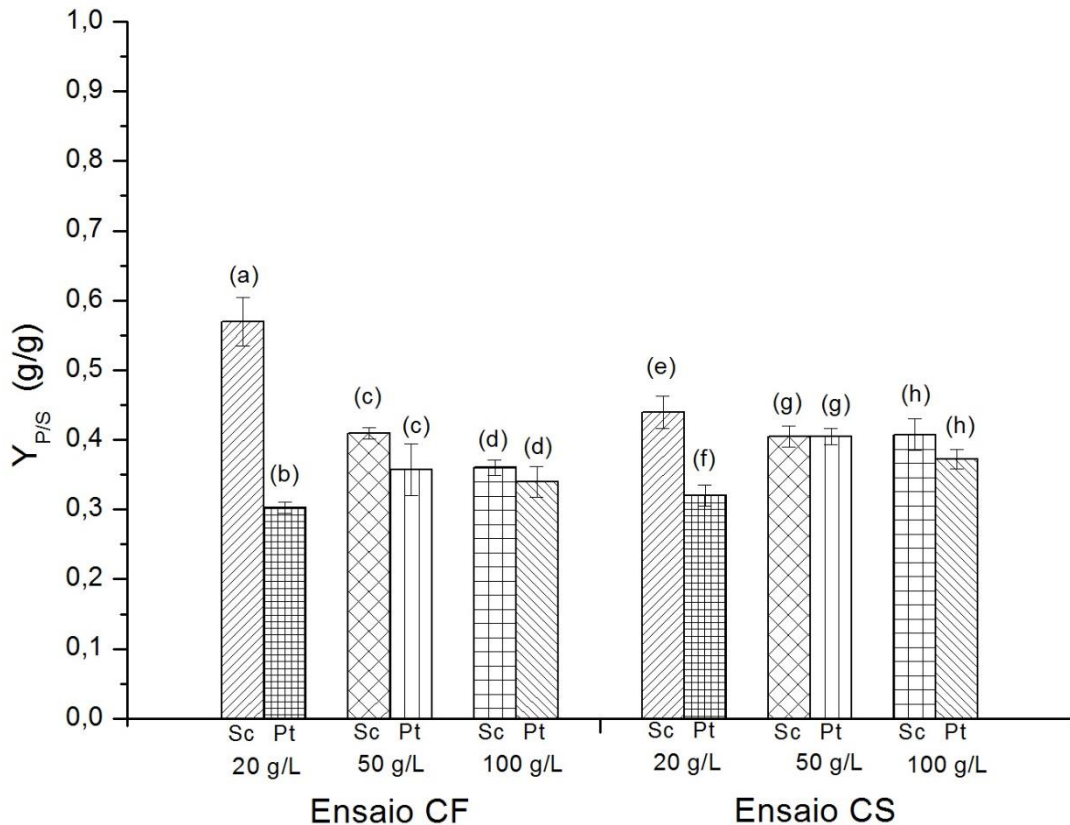
No entanto, quando  $AR_0$  foi elevado para 50 g/L na fermentação com *P. tannophilus* (Figura 20-b2), apenas 42% do açúcar inicialmente presente no mosto foi consumido, o que representou a metade da porcentagem do consumo de  $AR_0$  pelo micro-organismo se comparado com os ensaios com cascas frescas (84,1%). Entretanto, essa diferença entre os consumos de açúcar provenientes de cascas frescas e de cascas sacarificadas, inverteu-se quando o caldo foi submetido a um maior tempo de aquecimento para incremento de  $AR_0$ . No caso de cascas frescas 100 g/L (Anexo 4, Tabela 4.A, Ensaio  $CF_{100,Pt}$ ) o consumo médio foi de 68,8% enquanto que para cascas secas e sacarificadas (Anexo 4, Tabela 4.A, Ensaio  $CS_{100,Pt}$ ) essa porcentagem foi de 81,6%.

A necessidade de um maior tempo de evaporação para concentrar o caldo sacarificado de 20 até 100 g/L ( $t \approx 8$  h), em comparação à concentração de 20 para 50 g/L ( $t \approx 3,5$  h), pode ter contribuído para uma maior dextoxificação do meio. O aquecimento favorece a redução ou, até mesmo, a eliminação dos inibidores como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural pela evaporação. De acordo com Brethauer & Wymann (2010); Jönsson *et al* (2013); Costa et al (2013) e Roviero (2013), esses compostos normalmente se encontram presentes em caldos provenientes de biomassas sacarificadas. Essa hipótese está sendo avaliada em outros trabalhos em desenvolvimento pelo grupo de pesquisa empregando como biomassa o pseudocaule de bananeira.

Também, foi observado um comportamento diferenciado de *P. tannophilus* no mosto de cascas sacarificadas com  $AR_0 \approx 50$  g/L, em comparação à mesma concentração no mosto de cascas frescas, que refletiu no acúmulo médio de etanol no meio ( $P_f = 7,7$  g/L), o qual foi 41% menor.

A contribuição do acúmulo de etanol sobre o rendimento do processo com cascas de banana madura pode ser vista na Figura 21 (cascas frescas e sacarificadas); para ambos os micro-organismos, nas diferentes concentrações iniciais de açúcar.

Figura 21: Rendimento ( $Y_{P/S}$ ) da fermentação de meio de cascas de banana frescas (CF) e sacarificadas (CS), nas diferentes concentrações iniciais de açúcares (20,50 e 100 g/L) por *S.cerevisiae* ATCC 26603 (Sc), *P. tannophilus* ATCC 32691 (Pt).



Letras iguais numa mesma concentração de açúcar, significam que não há diferença significativa entre os valores de  $Y_{P/S}$  de acordo com o teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

A partir da leitura da Figura 21 é possível verificar que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de  $Y_{P/S}$  para as duas leveduras empregadas como inóculo, exceto quando o mosto fermentado possuía  $AR_0$  em torno de 20 g/L (Ensaio CF, identificados como  $CF_{20,Sc}/CF_{20,Pt}$  e  $CS_{20,Sc}/CS_{20,Pt}$  no Anexo 4, Tabela 4.A). O rendimento médio em etanol nessa concentração de açúcar para cascas frescas com *S. cerevisiae* ( $Y_{P/S, \text{médio}} = 0,56 \pm 0,05$  g/g) foi 86% maior do que o valor estimado para o mesmo tipo de biomassa empregando *P. tannophilus* ( $Y_{P/S, \text{médio}} = 0,30 \pm 0,01$  g/g). Entretanto, cabe ressaltar que esse alto rendimento observado com *S. cerevisiae* ultrapassou o rendimento máximo teórico da conversão estequiométrica da glicose para etanol que é de 0,511 g/g, conforme Finguerut (2008). Novos testes



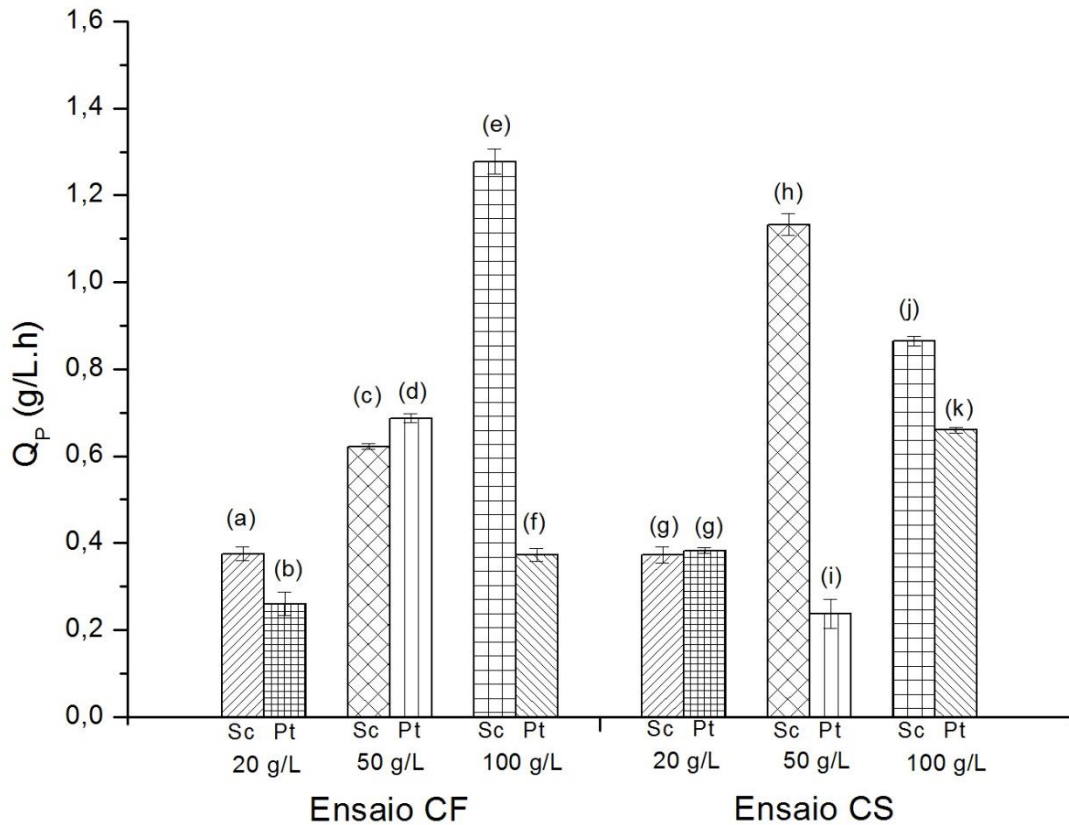
nessas mesmas condições de fermentação precisariam ser realizados para melhor avaliação deste fato.

Para cascas sacarificadas (Ensaio CS), essa diferença percentual reduziu para 37,5%, ou seja, para *S. cerevisiae* o valor médio do rendimento foi de  $0,44 \pm 0,02$  g/g enquanto que, para *P. tannophilus*,  $Y_{P/S, \text{m\u00e9dio}}$  foi de  $0,32 \pm 0,03$  g/g.

Schulz (2010) e Souza *et al.* (2012) utilizaram mosto sacarificado de cascas de banana madura (sem secagem pr\u00e9via) e alcan\u00e7aram rendimento m\u00e1ximo em etanol da ordem de 0,34 g/g ao utilizar mosto com 7,5 g/L de a\u00e7\u00facares totais (sacarose + glicose + frutose) e uma linhagem n\u00e3o-floculante de *S. cerevisiae* como in\u00f3culo.

A produtividade volum\u00e9trica ( $Q_P$ ) referente aos ensaios com mosto de cascas de banana madura (frescas e sacarificadas), nas diferentes concentra\u00e7\u00f5es iniciais de a\u00e7\u00facar para os dois micro-organismos, pode ser visto na Figura 22.

Figura 22: Produtividade ( $Q_P$ ) da fermentação de meio de cascas de banana frescas (CF) e sacarificadas (CS), nas diferentes concentrações iniciais de açúcares (20,50 e 100 g/L) por *S.cerevisiae* ATCC 26603 (Sc), *P. tannophilus* ATCC 32691 (Pt).



Letras iguais numa mesma concentração de açúcar, significam que não há diferença significativa entre os valores de  $Q_P$  estimados de acordo com o teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

Em relação à produtividade volumétrica em etanol (Figura 22), verifica-se que, assim como ocorreu com o uso de meio sintético contendo apenas a glicose como substrato, o maior valor de  $Q_P$  foi sempre para *S.cerevisiae* ATCC 26603 em comparação à *P. tannophilus* ATCC 32691, na maioria dos experimentos realizados. Apenas na fermentação de mosto contendo  $AR_0 \approx 50$  g/L (Ensaio CF), houve uma pequena diferença significativa ao nível de 95,5% de segurança (teste de Tukey) positiva para *P. tannophilus* ( $Q_P, \text{médio} = 0,685 \pm 0,07$  g/(L.h)) em relação à *S.cerevisiae* ( $Q_P, \text{médio} = 0,625 \pm 0,07$  g/(L.h)). Na fermentação de cascas sacarificadas (Ensaio CS) para  $AR_0 \approx 20$  g/L não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois micro-organismos.

O comportamento de *S.cerevisiae* nas diferentes condições de fermentação experimentadas, tanto em relação ao tipo de tratamento da biomassa para obtenção do mosto (extração a quente do açúcar de cascas frescas ou sacarificação de cascas secas) quanto à concentração inicial de açúcares redutores, pode ser visto na Figura 23.

Verifica-se a partir da Figura 23 que somente houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de  $Y_{P/S}$  nos diferentes tipos de tratamento (CF e CS) quando foi empregado  $AR_0 \approx 20$  g/L.

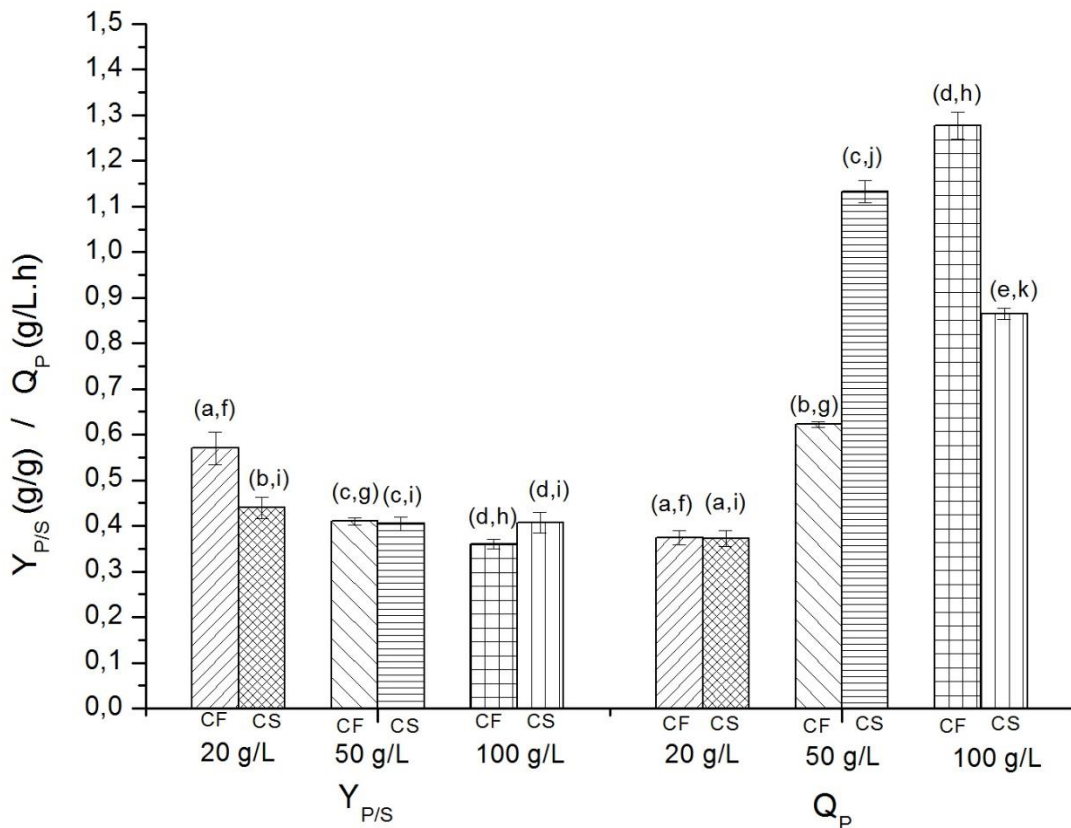
Ao comparar as diferentes concentrações iniciais de açúcar (20, 50 e 100 g/L) para um mesmo tipo de tratamento, pode-se constatar a existência de um maior valor de  $Y_{P/S}$  na condição CF para  $AR_0 \approx 20$  g/L; enquanto que na condição CS não houve diferença significativa nesse parâmetro, independentemente do valor de  $AR_0$ .

Para  $Q_P$ , houve diferença significativa entre todos os ensaios conduzidos a partir das diferentes condições experimentais avaliadas, exceto no ensaio a  $AR_0 \approx 20$  g/L. O maior valor em  $Q_P$  ( $1,31 \pm 0,01$  g/(L.h)) foi alcançado em CF com  $AR_0 \approx 100$  g/L e o menor valor ( $0,35 \pm 0,04$  g/(L.h)) na condição CS,  $AR_0 \approx 20$  g/L, conforme Tabela 4.A do Anexo 4.

O valor de  $Q_P$  com CF e  $AR_0 \approx 100$  g/L foi aproximadamente 16% maior do que  $Q_P$  com CS, na mesma concentração de açúcar inicial. Para a condição de CF e  $AR_0 \approx 50$  g/L ( $0,63 \pm 0,01$  g/(L.h)) essa diferença aumenta para 108%.

Diante do exposto, indica-se a fermentação de mosto proveniente de cascas frescas com extração dos açúcares livres por solubilização a quente, seguido de concentração desses açúcares até, aproximadamente,  $AR_0 = 100$  g/L, confirmando assim, a recomendação feita por Schulz (2010).

Figura 23: Rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_P$ ) estimados na fermentação de mosto proveniente de cascas de banana frescas (CF) e sacarificadas (CS), nas diferentes concentrações iniciais de açúcares (20,50 e 100 g/L) por *S.cerevisiae* ATCC 26603.



Letras iguais numa mesma concentração de açúcar (a, b, c, d, e), significam que não há diferença significativa (Teste de Tukey para  $p < 0,05$ ) entre os valores de  $Y_{P/S}$  ou entre os valores de  $Q_P$  estimados para os dois tipos de tratamentos prévios da biomassa (CF e CS).

Letras iguais entre as diferentes concentrações de açúcar em CF ( f, g, h), significam que não há diferença significativa entre os valores de  $Y_{P/S}$  ou entre os valores de  $Q_P$ .

Letras iguais entre as diferentes concentrações de açúcar em CS (i, j, k), significam que não há diferença significativa entre os valores de  $Y_{P/S}$  ou entre os valores de  $Q_P$ .

Ao comparar o maior valor de  $Q_P$  obtidos com o uso de *S. cerevisiae* ATCC 26603 com aqueles relatados por outros autores (Tabela 08) é possível verificar que, as cascas frescas de banana possuem uma alta produtividade comparada aos outros tipos de substrato, ainda, vale destacar que Souza *et al* (2012) também obteve uma

produtividade semelhante a deste trabalho, utilizando cascas frescas de banana, entretanto o micro-organismo utilizado foi o fermento de *S.cerevisiae* comercial.

Tabela 8: Valores de produtividade em bioetanol, obtidos com diferentes linhagens de *S. cerevisiae* empregando diferentes tipos de substratos.

Fonte de carbono	Hidrolise ácida	Hidrólise enzimática	Q <sub>P</sub> (g/Lh)	Referencia
Cana de açúcar	Não	Não	3,40	Ribeiro & Horri (1999)*
Farelo de trigo	Sim	Sim	1,92	Palmarola-Adrados et al (2005)
Cascas de banana e resíduos de tangerina	Não	Sim	0,426	Sharma <i>et al</i> (2007)
Polpa de banana	Sim	Não	3,04	Souza <i>et al</i> (2012)
Cascas de banana	Sm	Não	1,32	
Bagaço de malte	Sim	Sim	0,46	Lima <i>et al</i> 2013
Cascas de banana	Não	Não	1,31	Este trabalho*
Casca de banana	Sim	Sim	0,89	

\*Linhagem floculante

Portanto, confirma-se a potencialidade do uso dessa cepa para a fermentação alcoólica de açúcares provenientes de cascas de banana madura. É importante lembrar que trata-se do aproveitamento de um resíduo disponível na região, durante praticamente o ano todo, nas indústrias de beneficiamento da banana. Outro ponto importante a ser considerado em relação ao micro-organismos indicado, é que trata-se de uma cepa floculante. Conseqüentemente, melhor aproveitamento dessa característica pode ser obtido em sistemas contínuos, principalmente em relação à separação das células do mosto fermentado e, caso se deseje, em relação à recirculação do micro-organismo.

## 5. CONCLUSÕES

Ao empregar meio sintético contendo 100 g/L de glicose como substrato nas condições ideais de fermentação (pH e temperatura) para cada um dos micro-organismos avaliados (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Pacchysolen tannophilus* ATCC 32691, *Scheffersomyces stipitis* ATCC 58376) a espécie *S. cerevisiae* foi a que possibilitou um maior acúmulo de etanol no meio fermentado ( $P_f = 41,8$  g/L) com menor tempo de fermentação ( $t_f = 24$  h). Consequentemente, proporcionou maior valor médio de produtividade volumétrica em etanol ( $Q_P = 1,63$  g/(L.h)), seguido por *P. tannophilus* com  $Q_P = 1,20$  g/(L.h) e *S. stipitis* ( $Q_P = 0,62$  g/(L.h)). Portanto, *Saccharomyces* e *Pacchysolen* foram consideradas as de maior potencial para o estudo da produção de etanol a partir de meio complexo proveniente de cascas de banana.

O uso da operação de evaporação para aumentar a concentração de açúcares redutores inicialmente presentes no caldo de cascas de banana madura ( $AR_0 \approx 20$  g/L) para valores de até 100 g/L, possibilitou incrementar a concentração de etanol no mosto fermentado de 7,5 g/L para valores acima de 31 g/L, para o caso do uso de cascas frescas (*in natura*) e *S. cerevisiae*; e para 23 g/L com *P. tannophilus*.

Comparando o uso do mosto proveniente de cascas frescas com o de cascas secas e moídas, verificou-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em rendimento em etanol entre os dois micro-organismos selecionados, apenas no caso do uso de mosto contendo  $AR_0 = 20$  g/L, onde  $Y_{P/S}$  para *S. cerevisiae* foi em torno de 60% maior do que  $Y_{P/S}$  para *P. tannophilus*. Nas demais fermentações, com  $AR_0 = 50-100$  g/L, o valor médio geral de  $Y_{P/S}$  foi de  $0,38 \pm 0,04$  g/g.

Em relação à produtividade volumétrica, o maior valor ( $Q_P = 1,31 \pm 0,04$  g/(L.h)), foi obtido com *S. cerevisiae* ao empregar cascas frescas e  $AR_0 = 100$  g/L como substrato. Esse valor foi 34,35% superior ao maior valor obtido para o mesmo micro-organismos ( $Q_P = 0,87$  g/(L.h)) com cascas sacarificadas e mesma concentração de  $AR_0$ . Para *P. tannophilus*, o maior valor de  $Q_P$  (0,69 g/(L.h)) foi alcançado na fermentação de mosto de cascas frescas contendo 50 g/L de açúcares redutores.

Como, os mostos de cascas de banana, sacarificada ou não, apresentaram concentrações muito baixas de xilose (concentração máxima em torno de 0,1 g/L) recomenda-se o emprego de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol. Como mosto de fermentação indica-se o uso do caldo de cascas frescas previamente solubilizado a quente (120 °C, 15 min), filtrado e evaporado até obtenção de uma concentração inicial de açúcares redutores da ordem de 100 g/L.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

- Realizar a fermentação de mostos de cascas frescas de banana com concentrações de açúcares redutores maiores que 100 g/L e avaliar a sua influência sobre o rendimento e produtividade em etanol.
- Fazer balanço de massa e de energia e realizar análise econômica do processo de obtenção do etanol a partir de mosto de cascas frescas de banana para num cenário de ampliação de escalas.
- Realizar um estudo focado nos novos tipos de resíduos gerados no processo de produção do bioetanol, desde o pré-tratamento da biomassa até a etapa de extração e purificação do produto (não realizada neste trabalho). O reaproveitamento desses novos resíduos como compostagem ou na geração de energia (biogás, combustão ou pirólise), seriam boas opções para reduzir o seu impacto no meio ambiente (aplicação dos conceitos de biorrefinaria, sustentabilidade, química verde e resíduo zero).



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBOGDO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipites*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1515-1524, Abr. 2008.
- ANEEL. AGENCIA NACIONAL DE ENERGIA ELETRICA. **Biomassa**. Atlas de Energia Elétrica do Brasil. 2008. Disponível em: [http://www.aneel.gov.br/arquivos/pdf/atlas\\_par2\\_cap4.pdf](http://www.aneel.gov.br/arquivos/pdf/atlas_par2_cap4.pdf). Acesso em 21 Nov.2014
- ANP. AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Biocombustíveis**. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?id=470>. Acesso em: 14 Jul. 2014.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1155-1163, 2008.
- BASTOS, V.D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p.5-38, Mar. 2007.
- BELAL, E.B. Bioethanol production from rice straw residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, 225-234, 2013.
- BREISHA, G. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass & Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1243-1249, 2010.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4862-4874, 2010.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Cortez, L. A. B. (Org), **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Ed. Blucher, 2010. p.365-380.
- CABRAL, J.C.A.; SILVA, J.P.A.; ROBERTO, I.C. Influência do pH na produção de etanol por *Pichia stipitis*. **Anais**. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação,13, Paraíba, 2011.
- CEPA – Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola, governo do estado de Santa Catarina. **Síntese Anual da agricultura de Santa Catarina – 2012-2013**.

Disponível em:  
[http://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepa/publicacoes/sintese\\_2013.pdf](http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/sintese_2013.pdf). Acesso em Set. 2014.

CEPA – Centro de Socioeconômica e Planejamento Agrícola, governo do estado de Santa Catarina. **Síntese Anual da agricultura de Santa Catarina – 2013-2014.**

Disponível em:  
[http://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_cepa/publicacoes/Sintese\\_2014.pdf](http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese_2014.pdf). Acesso em Abr. 2015.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105-109, 2008.

CHO, D.H.; SHIN, S.J.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y.H. Enhances ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*: **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4947-4951, 2010.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUES, J. M.; SILVA, S. S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 339–345, 2001.

CORTEZ, L.A.B.; JORDAN, R.A.; PÉREZ, J.M.M.; ROCHA, J.D. *Roadmap tecnológico para o etanol*. In: Cortez, L.A.B. (Org), **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, São Paulo, Ed. Blucher, p.919-935, 2008.

COSTA, D.A. **Caracterização de Leveduras Termotolerantes para Produção de Etanol Celulósico**. 2011. Dissertação. (Pós Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

COSTA, A.G.; PINHEIRO, F.G.C.; PINHEIRO, G.C.; SANTOS, A.B.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, n. 194, 2014

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. Dissertação (Desenvolvimento de Processos Químicos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional.** Disponível em: [http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2\\_-\\_BEN\\_\\_Ano\\_Base/1\\_-\\_BEN\\_Portugues\\_-\\_Inglxs\\_-\\_Completo.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2_-_BEN__Ano_Base/1_-_BEN_Portugues_-_Inglxs_-_Completo.pdf) Acesso: 20 Nov. 2014.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em 06 Set. 2014.

FERREIRA, C.M.A. **Avaliação da Torta de Dendê (*Elaeis guineenses*) para produção de Bioetanol de Segunda Geração.** 2013. Dissertação (Pós-Graduação em Química). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.a

FERREIRA, J. **Produção de Levana e Bioetanol utilizando Cascas de Banana por *Zymomonas mobilis*.** 2013. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2013.b

FIGUERUT, J.; MEIRELLES, A.J.; GUIRARDELLO, R.; COSTA, A.C. Fermentação, Hidrólise e Destilação. In: Cortez, E.E.S.; Lora, E.E.S.; Gómes, E.O. (Org), **Biomassa para Energia**, Campinas: Ed. UNICAMP, 2008, p.435-491.

FURLAN, V.J.M. **Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da Agroindústria do Arroz.** 2009. Dissertação (Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

FURLANI, J.M.S. **Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão.** 2014. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, área de conversão de biomassa). Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.** 2012. Tese (Pós – Graduação em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

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

GONÇALVES FILHO, L.C.; FISCHER, G.A.A.; SELLIN, N.; MARANGONI, C.; SOUZA, O. Hydrolysis of banana tree pseudostem and second-generation ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 2, n. 1A, p. 65-69, 2013.

GUEDES, F.F. **Inovação na produção de etanol de segunda geração pela sacarificação de resíduos de algodão provenientes da indústria têxtil.** 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Química). Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2012.

GRADET, E.T. Barreiras e Regulamentos Técnicos ao Comércio dos Biocombustíveis na União Européia. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, gorduras e Biodiesel, 6, 2009, Montes Claros. **Anais**. Montes Claros, INMETRO, 2009.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e Energia. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.3, 2009.

GOLDEMBERG, J. A estratégia de São Paulo para o etanol. In: Cortez, L. A. B. (Org), **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, São Paulo, Ed: Blucher, 2010, p.19-25

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSKUNG, M.F.; ZACCHI, G.L. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2006.

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

HSU, T-C.; GUO, G-L.; CHEN, W-H.; HWANG, W-S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4907–4913, 2010.

KNAUF, M.; KRAUS, K. Specific yeasts developed for modern ethanol production. **Sugar Industry**, v. 131, p. 753-758, 2006.

KIIPPER, P.G. **Estudo da pré-hidrolise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*. 2009** Dissertação (Microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, 2010.

JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, p. 6-16, 2013

LEMOS, J.L.S. **Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana**. 2001 Dissertação (Programa de Pós Graduação em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL. **Biotecnologia Industrial**. Volume III. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

LIMA, T.C.; ARAÚJO, I.O.; ANTUNES, J.G.; MATOS, C.J.G.; PEREIRA, C.S.S. Estudo da Produção de Bioetanol a partir do Bagaço de Malte. **Anais**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica, 10, 2013. Vassouras, COBEQ IC, 2013

LORENCI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**.2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LU, X. B.; ZHANG, Y. M.; YANG, J.; LIANG, Y. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 7, p. 938–944, 2007.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DA PECUÁRIA. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/atualizacao\\_20\\_01\\_2011/Producao\\_Etanol\\_Brasil\\_Total.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/atualizacao_20_01_2011/Producao_Etanol_Brasil_Total.pdf). Acesso em 22 Nov. 2014.

MACEDO, I.M. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21 n. 59, 2007.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Nutrition and metabolism. **Brock biology of microbiology**. 9th ed. NJ: Prentice-Hall, New York, 2000.

MICHEL, A.C.S. **Produção Biotecnológica de Xilitol e Etanol a partir de hidrolisado de casca de soja**. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biomassa**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/biomassa>. Acesso em: 21 Nov. 2014.

MOHAPATRA, D.; MISHRA, S.; SUTAR, N. Banana and its by-product utilisation: an overview. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 69. P. 323-329, 2010.

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

MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M. et al. Lignocellulose biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p. 77-93, 2013.

MORAES, D.C. **Seleção de Micro-organismos fermentadores de xylose em etanol a partir de diferentes variedades da casca de uvas**. 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciencia de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2012.

MOURA, A.G.; CASTILHO, E.F.; PALACIO, J.C.E.; RENO, M.L.G.; LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J.; OLMO, O.A.. Biocombustíveis de primeira geração – Bioetanol pela rota convencional. In: LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J.(Org). **Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, Ed: Interciência, 2012. p. 359-408.

NUNES, R.M.; GUARDA, E.A.; SERRA, J.C.V.; MARTINS, A.A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p.113-238, 2013.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.E.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v.33, n.7, 2010.

OLIVEIRA, L.R.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Combined process system for the production of bioetanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v.58, p. 1-7, 2014.

PALACIO, J.C.E.; LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J.; OLMO, O.A. Biocombustíveis, meio ambiente, tecnologia e segurança alimentar. In: Lora, E.E.S.; Venturini, O.J. (Org), **Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, Ed: Interciência., 2012. p. 2-42.

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

PERDICES, M.B.; ARCAYA, G.E.A.; COTAL, D.S.O.; MENDOZA, M.A.G.; NUNES, D.C.L. . Bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos pela rota da hidrólise. In: LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. **Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, Ed: Interciência., 2012. p. 535-585.

PEREIRA, F.C. **Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e pentoses em bioetanol por *Spathaspora arborariae***.2010. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Química).Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

REDDING, A.P.; WANG, Z.; KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, 1415–1424, 2011.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana: **Scientia Agrícola**, v.56, p.255-263, 1999.

ROSSELL, C. E. Fermentação do hidrolisado. **III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol**, São Paulo, dez. 2006.

ROVIERO, J.P. **Hidrolisado Hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar**. 2013. Dissertação (Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

SANTOS, J.R.A.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R. Comparação entre processos em SHF e e, SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n.4, p.904-908, 2010.

SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012a.

SANTOS, D.S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012b.

SCHULZ, M.A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana**. Dissertação de mestrado em engenharia de processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Ed: Edgard Blücher Ltda, vol.2, 2001.

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

SHARMA, N.; KALRA, K.L.; OBEROI, H.S.; BANSAL, S. Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by



simultaneous saccharification and fermentation. **Indian Journal Microbiology**, v. 17, p.310-316, 2007.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S.K.; MUNIZ, E.C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 661-671, 2009a.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Avaliação do Processo de Bioprodução de Etanol a partir de Xilose pela Levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em Reator de Bancada. **Anais**. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, Rio Grande do Norte, 2009b.

SINGH, J.; SUHAGB, M.; DHAKAC, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624–631, 2015.

SOUZA, O.; FEDERIZZI, M.; COELHO, B.; WAGNER, T.M.; WISBECK, E. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2010.

SOUZA, O.; SCHULZ, M.A.; FISCHER, G.A.A.; WAGNER, M.T.; SELLIN, N. Energia alternative de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 8, p. 915-921, 2012.

SOUZA, E.L.; LIEBL, G.F.; MARANGONI, C.; SELLIN, N.; MONTAGNOLI, M.S.; SOUZA, O. Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 271-276, 2014.

SLININGER, P. J; BOTHAST, R.J.; VAN CAUWENBERGE, JE. Conversion of D-Xylose to Ethanol by the Yeast *Pachysolen tannophilus*: **Biotechnology and Bioengineering**, v.XXIV, p. 371-384, 1982.

SLININGER, P. J; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.9, p. 5-15, 1987.

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; PARDO-FLOREZ, L.M.; MAIOR, A.M.S.; BON, E.P.S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

TELEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744–4753, 2010.

TOLMASKIM. Perspectivas e Planejamento do setor energético no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 26, p. 74, 2012.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VELÁSQUEZ-ARREDONDO, H.I.; RUIZ-COLORADO, A.A.; OLIVEIRA JUNIOR, S. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. **Energy**, v. 35, p. 3081-3087, 2010.

WATSON, N.E.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C.; LATEGAN, P.M. Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*: **Enzyme Microbiology Technology**, v.6, 1984.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*: **Biomass and Bioenergy**, v.32, p. 1156-1161, 2008.

**ANEXOS**

**Anexo 1****Curva de calibração para a padronização do inoculo**

Tabela 1.A: Valores de massa úmida e massa seca de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 23606, utilizando meio de S.c. após inoculação de 48h a 30°C.

<b>Amostra</b>	<b>Massa úmida (g)</b>	<b>Massa seca (g)</b>	<b>Massa celular (g/L)</b>
A	112,8116	1,0099	10,99
B	112,6971	1,0222	10,22
C	112,7518	0,9004	9,004

Tabela 1.B: Valores de absorbância de suspensões de *Scheffersomyces stipitis* ATCC 23606, utilizando meio de P.s. após inoculação de 48h a 30°C.

Diluição	Peso celular seco (g/L)	ABS
1:1	1,037	0,985
1:1,2	0,733	0,815
1:1,5	0,586	0,720
1:2	0,564	0,597
1:3	0,385	0,461
1:5	0,317	0,258
1:10	0,262	0,172

Figura 1.A: Curva de calibração da concentração celular utilizando *Scheffersomyces stipitis*, obtida das suspensões do caldo do inóculo a 570 nm, com pré-fermentação de 48h a 30°C.

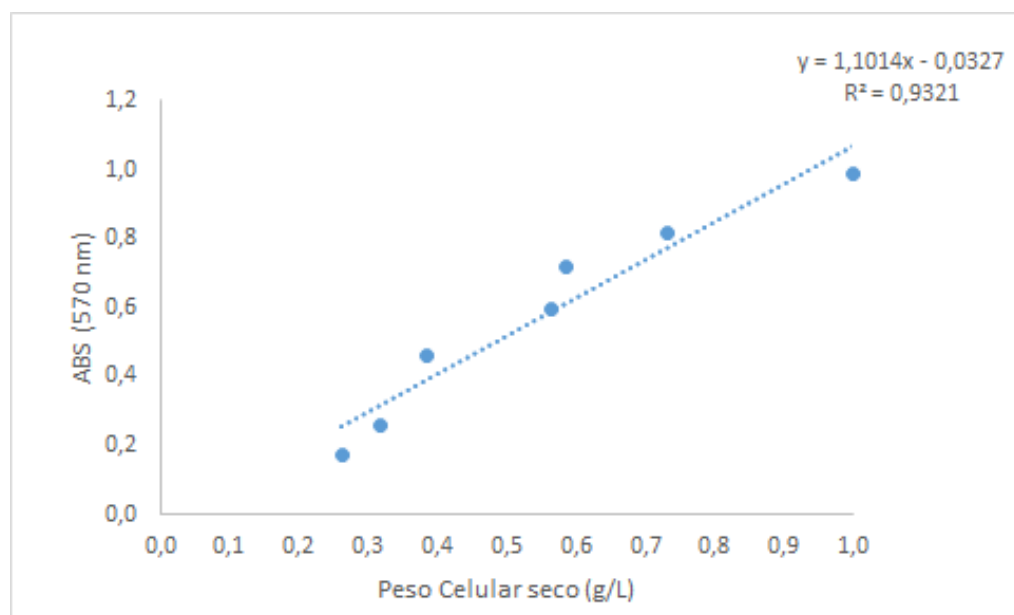
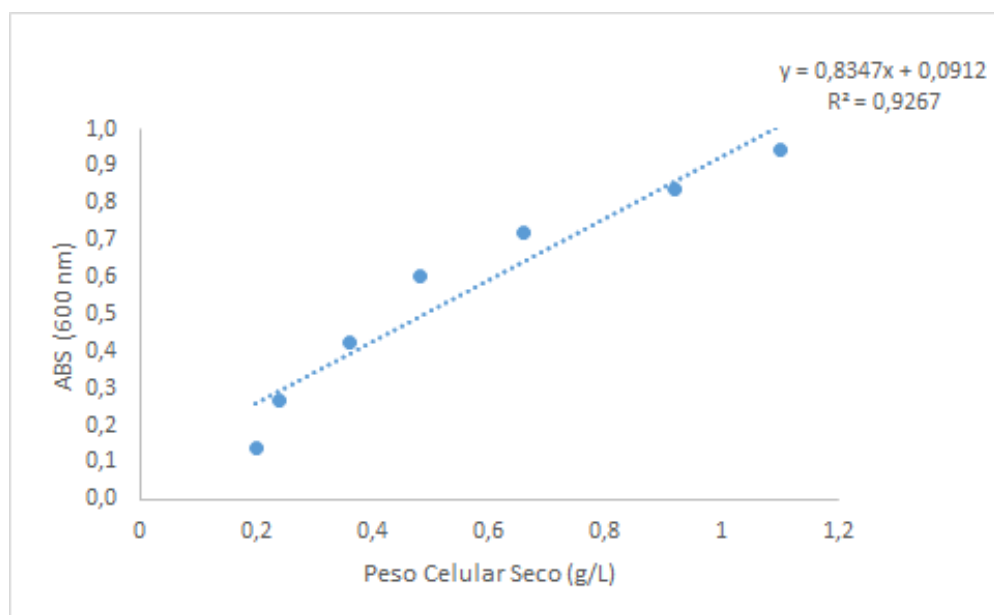


Tabela 1.C: Valores de absorvância de suspensões de *P.tannophilus* ATCC 23606, utilizando meio de P.t. após inoculação de 48h a 30°C.

Diluição	Peso celular seco (g/L)	ABS
1:1	1,1	0,969
1:1,2	0,92	0,822
1:1,5	0,66	0,716
1:2	0,48	0,530
1:3	0,36	0,380
1:5	0,24	0,283
1:10	0,2	0,140

Figura 1.B: Curva de calibração da concentração celular utilizando *P. tannophilus*, obtida das suspensões do caldo do inoculo a 570 nm, com pré-fermentação de 48h a 30°C.



## Anexo 2

### Curvas padrão para análises de açúcares pelo método DNS

Tabela 2.A: Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose para a confecção da curva de calibração pelo método DNS

Concentração (g/L)	Absorvância (nm)	Teste de Equação (g/L)
0	0	0
0,1	0,041	0,09
0,25	0,139	0,24
0,5	0,296	0,49
0,75	0,456	0,74
1	0,624	1,01

Figura 2.A: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose pelo método DNS.

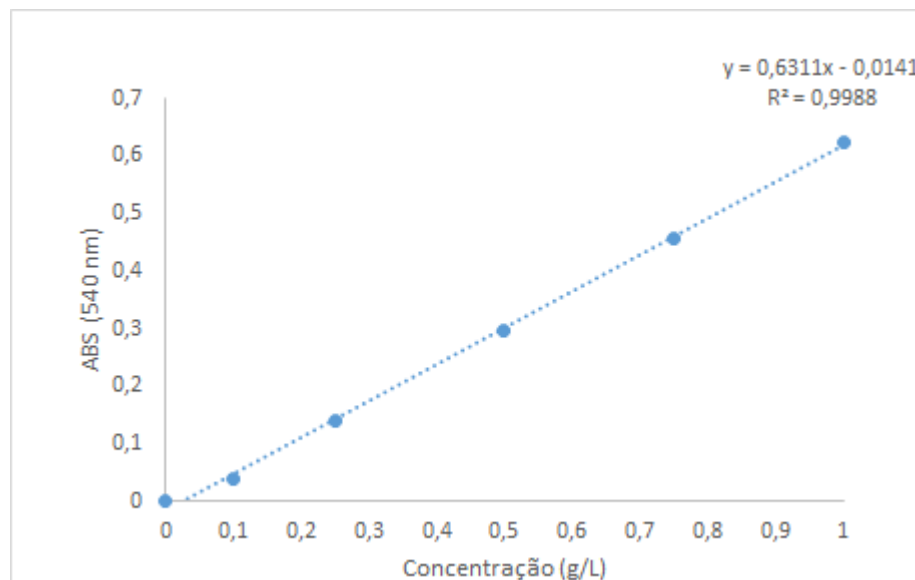


Tabela 2.B: Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de xilose para a confecção da curva de calibração pelo método DNS.

Concentração (g/L)	Absorvância (nm)	Teste de Equação (g/L)
0	0	0
0,1	0,05	0,09
0,25	0,151	0,24
0,5	0,321	0,50
0,75	0,482	0,74
1	0,665	1,01

Figura 2.B: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de xilose pelo método DNS.

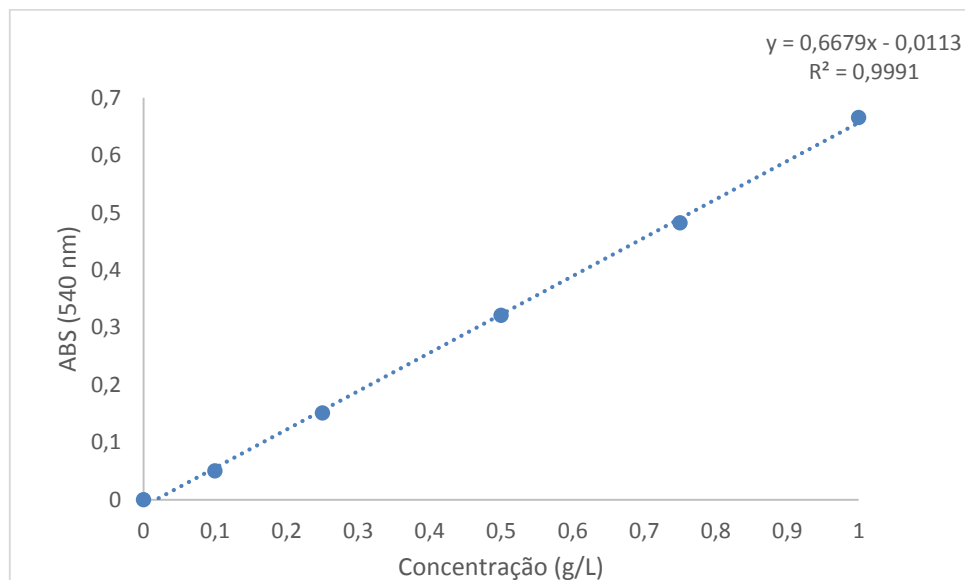
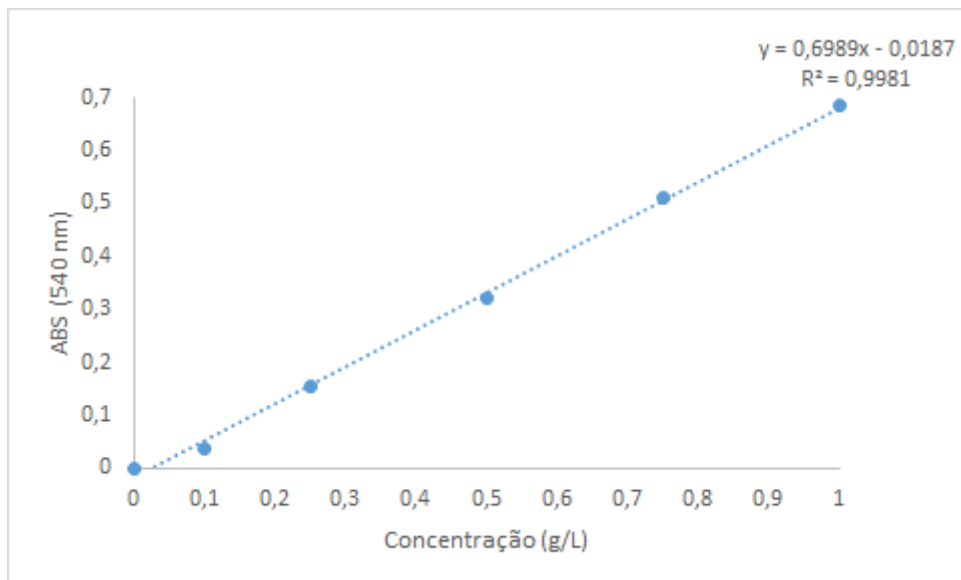




Tabela 2.C: Valores de absorbância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose mais xilose para a confecção da curva de calibração pelo método DNS.

Concentração (g/L)	Absorbância (nm)	Teste de Equação (g/L)
0	0	0
0,1	0,036	0,08
0,25	0,154	0,25
0,5	0,322	0,49
0,75	0,509	0,76
1	0,684	1,01

Figura 2.C: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose mais xilose pelo método DNS.



### Anexo 3- Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica empregando meios sintéticos.

Tabela 3.A: Valores médios das concentrações iniciais (o) e finais (f) de substrato (açúcares redutores, AR) e produto (etanol, P), tempo final de fermentação ( $t_f$ ), rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) obtidos na fermentação alcoólica de meio sintético contendo glicose (G) ou xilose (X) ou mistura de glicose e xilose (50:50, GX) pelos micro-organismos *S. cerevisiae* (Sc), *P. tannophilus* (Pt) e *S. stipitis* (Ps).

Ensaio*		$t_f$ (h)	AR <sub>o</sub> (g/L)	AR <sub>f</sub> (g/L)	P <sub>o</sub> (g/L)	P <sub>f</sub> (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/L.h)
G <sub>Sc</sub>	A	24	90,70	1,13	2,58	41,82	0,44±0,01	1,63±0,01
	B	24	95,10	1,14	1,87	38,11	0,39±0,07	1,51±0,40
G <sub>Ps</sub>	A	48	101,30	25,65	3,85	28,41	0,32±0,09	0,51±0,17
	B	48	100,70	28,01	0,95	30,73	0,41±0,07	0,62±0,03
G <sub>Pt</sub>	A	36	100,26	0,58	0,93	40,91	0,40±0	1,11±0,08
	B	36	104,42	0,73	0,92	44,13	0,42±0,01	1,20±0,02
X <sub>Sc</sub>	A	48	79,00	79,00	1,00	1,00	0	0
	B	48	79,00	79,00	1,00	1,00	0	0
X <sub>Ps</sub>	A	48	104,93	71,47	0,80	6,55	0,17±0,06	0,12±0,04
	B	48	96,39	69,22	0,94	4,11	0,12±0,03	0,07±0
X <sub>Pt</sub>	A	48	87,50	53,60	1,71	3,09	0,04±0,02	0,03±0,01
	B	48	76,90	52,05	1,55	2,65	0,05±0,01	0,02±0,01
XG <sub>Sc</sub>	A	24	112,22	71,79	1,08	21,40	0,51±0,10	0,85±0
	B	24	113,66	72,22	1,03	21,14	0,54±0,28	0,84±0,07
XG <sub>Ps</sub>	A	48	120,86	58,05	0,81	17,24	0,27±0,07	0,34±0,02
	B	48	150,01	68,21	0,91	17,66	0,21±0,02	0,35±0,02
XG <sub>Pt</sub>	A	24	112,65	52,25	1,90	24,00	0,38±0,09	0,92±0
	B	24	113,55	58,25	2,00	23,58	0,40±0,07	0,90±0,03

\* Os valores relativos às letras A e B de cada um dos ensaios apresentados correspondem aos valores médios calculados entre duas amostras.

#### Anexo 4 - Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica empregando mosto de cascas de banana madura.

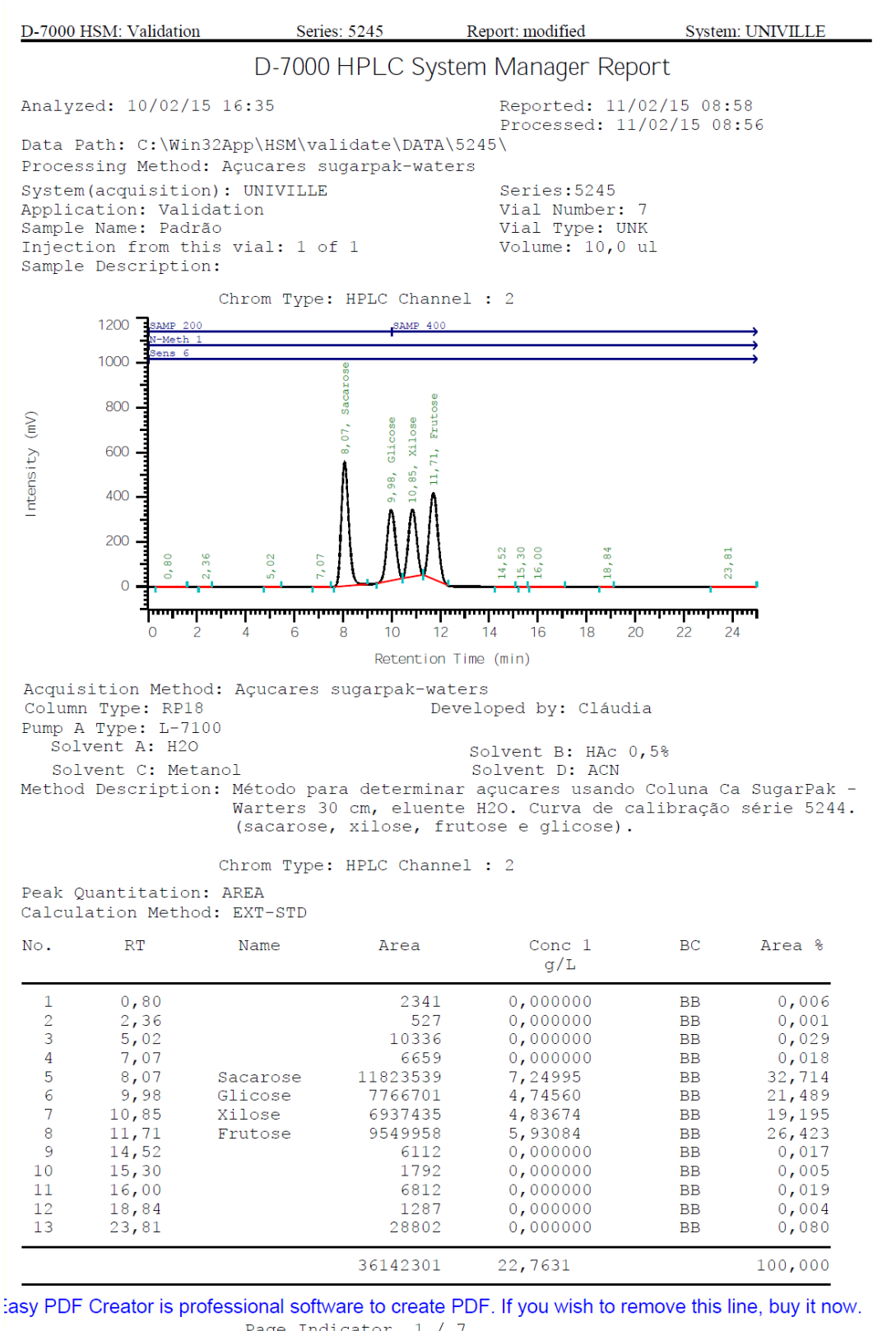
Tabela 4.A Valores médios das concentrações iniciais (o) e finais (f) de açúcares redutores (AR) e etanol (P), tempo final de fermentação ( $t_f$ ), rendimento ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) obtidos na fermentação alcoólica de mosto de cascas frescas de banana madura (CF) ou de cascas secas sacarificadas (CS), empregando concentrações iniciais de açúcar de 20 g/L (20), 50 g/L (50) e 100 g/L (100) pelos micro-organismos *S. cerevisiae* (Sc) e *P. tannophylus* (Pt).

Ensaio		$t_f$ (h)	AR <sub>o</sub> (g/L)	AR <sub>f</sub> (g/L)	P <sub>o</sub> (g/L)	P <sub>f</sub> (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/L.h)
CF <sub>20,Sc</sub>	A	18	15,98	4,47	1,67	8,56	0,60±0,04	0,38±0,03
	B	18	17,06	4,61	1,39	7,98	0,53±0,10	0,37±0,04
CF <sub>20,Pt</sub>	A	24	22,64	3,32	1,78	7,47	0,30±0,02	0,24±0,00
	B	24	21,64	3,75	1,91	7,49	0,31±0,02	0,23±0,00
CF <sub>50,Sc</sub>	A	24	42,96	5,32	1,19	16,24	0,40±0,01	0,63±0,01
	B	24	39,67	4,47	1,12	15,89	0,42±0,02	0,62±0,01
CF <sub>50,Pt</sub>	A	18	45,39	5,33	1,48	13,81	0,32±0,09	0,68±0,03
	B	18	39,95	8,19	1,46	13,82	0,40±0,07	0,69±0,00
CF <sub>100,Sc</sub>	A	24	98,62	13,91	0,98	32,34	0,37±0,03	1,31±0,01
	B	24	101,55	14,98	1,02	31,06	0,35±0,01	1,25±0,09
CF <sub>100,Pt</sub>	A	48	92,18	31,72	1,41	22,72	0,36±0,05	0,44±0,01
	B	48	94,40	26,50	1,27	23,32	0,33±0,05	0,46±0,01
CS <sub>20,Sc</sub>	A	18	15,63	4,39	1,40	7,70	0,45	0,35±0,04
	B	18	21,63	5,04	1,26	8,36	0,43±0,03	0,39±0,00
CS <sub>20,Pt</sub>	A	18	26,07	5,90	1,56	8,43	0,34±0,03	0,38±0,00
	B	18	29,36	6,26	1,66	8,53	0,30±0,02	0,38±0,02
CS <sub>50,Sc</sub>	A	12	46,46	10,90	0,95	14,56	0,38±0,01	1,13±0,05
	B	12	42,10	10,33	1,14	14,72	0,43±0,01	1,13±0,07
CS <sub>50,Pt</sub>	A	24	39,35	23,73	2,25	7,01	0,49±0,49	0,20±0,09
	B	24	49,63	28,34	1,78	8,42	0,32±0,07	0,28±0,01
CS <sub>100,Sc</sub>	A	12	46,46	10,90	0,95	14,56	0,38±0,01	0,84±0,01
	B	24	68,35	12,77	1,01	22,25	0,39±0,07	0,89±0,00
CS <sub>100,Pt</sub>	A	30	62,35	11,12	1,37	20,81	0,38±0,04	0,65±0,00
	B	30	67,21	12,76	1,30	21,27	0,37±0,02	0,67±0,00

\* Os valores relativos às letras A e B de cada um dos ensaios apresentados correspondem aos valores médios calculados entre duas amostras.

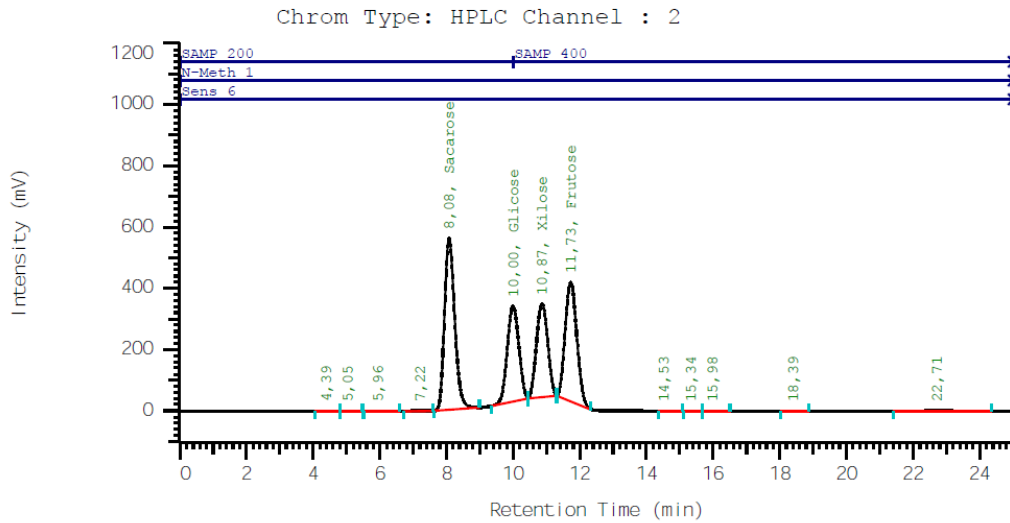
**Anexo 05 – Análise de Cromatografia líquida**

Figura 24: Análise de Cromatografia líquida dos padrões dos açúcares sacarose, glicose, frutose e xilose.



D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 10/02/15 19:37 Reported: 11/02/15 09:09  
 Processed: 11/02/15 09:09  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5245\  
 Processing Method: Açucares sugarpak-waters  
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5245  
 Application: Validation Vial Number: 14  
 Sample Name: Padrão Vial Type: UNK  
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul  
 Sample Description:



Acquisition Method: Açucares sugarpak-waters  
 Column Type: RP18 Developed by: Cláudia  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: H2O Solvent B: HAC 0,5%  
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN  
 Method Description: Método para determinar açucares usando Coluna Ca SugarPak - Warters 30 cm, eluente H2O. Curva de calibração série 5244. (sacarose, xilose, frutose e glicose).

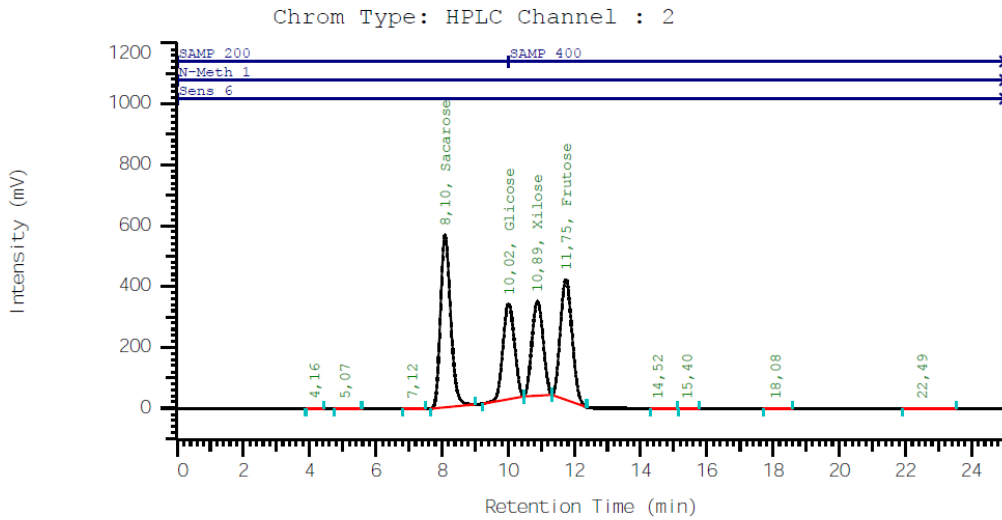
Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC	Area %
1	4,39		5058	0,000000	BB	0,014
2	5,05		10045	0,000000	BB	0,028
3	5,96		19202	0,000000	BB	0,053
4	7,22		29193	0,000000	BB	0,080
5	8,08	Sacarose	11966438	7,33758	BB	32,814
6	10,00	Glicose	7603032	4,64560	BB	20,848
7	10,87	Xilose	7134425	4,97408	BB	19,564
8	11,73	Frutose	9582956	5,95133	BB	26,278
9	14,53		4382	0,000000	BB	0,012
10	15,34		2583	0,000000	BB	0,007
11	15,98		2411	0,000000	BB	0,007
12	18,39		6000	0,000000	BB	0,016
13	22,71		102303	0,000000	BB	0,281
			36468028	22,9086		100,000

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 10/02/15 22:39 Reported: 11/02/15 09:19  
 Processed: 11/02/15 09:18  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5245\  
 Processing Method: Açucares sugarpak-waters  
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5245  
 Application: Validation Vial Number: 21  
 Sample Name: Padrão Vial Type: UNK  
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul  
 Sample Description:



Acquisition Method: Açucares sugarpak-waters  
 Column Type: RP18 Developed by: Cláudia  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: H2O Solvent B: HAC 0,5%  
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN  
 Method Description: Método para determinar açucares usando Coluna Ca SugarPak -  
 Warters 30 cm, eluente H2O. Curva de calibração série 5244.  
 (sacarose, xilose, frutose e glicose).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

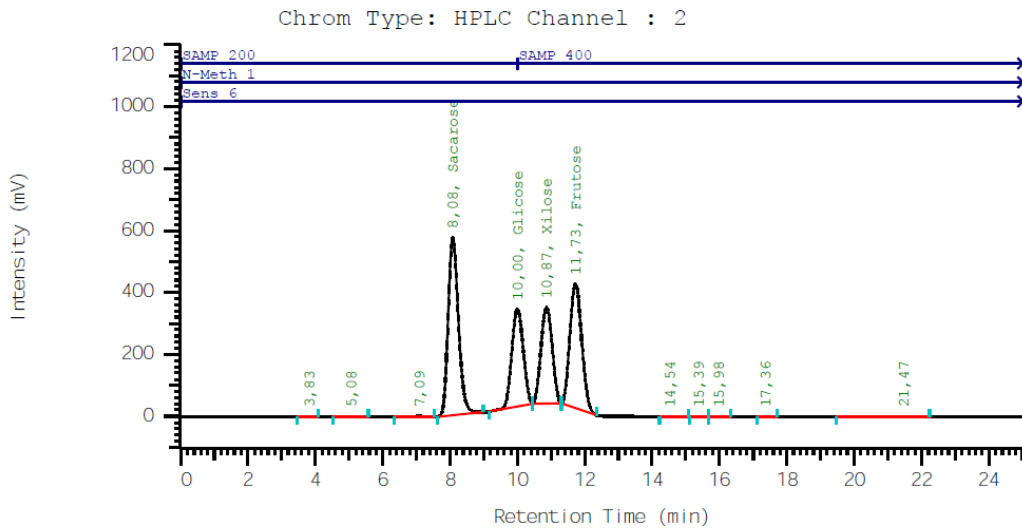
Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC	Area %
1	4,16		3561	0,000000	BB	0,010
2	5,07		16633	0,000000	BB	0,045
3	7,12		6761	0,000000	BB	0,018
4	8,10	Sacarose	12163036	7,45813	BB	33,034
5	10,02	Glicose	7589199	4,63715	BB	20,611
6	10,89	Xilose	7232817	5,04267	BB	19,644
7	11,75	Frutose	9774679	6,07039	BB	26,547
8	14,52		6793	0,000000	BB	0,018
9	15,40		2004	0,000000	BB	0,005
10	18,08		4715	0,000000	BB	0,013
11	22,49		20019	0,000000	BB	0,054
			36820217	23,2083		100,000

Peak rejection level: 500

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/02/15 01:41 Reported: 11/02/15 09:24  
 Processed: 11/02/15 09:24  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5245\  
 Processing Method: Açucares sugarpak-waters  
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5245  
 Application: Validation Vial Number: 28  
 Sample Name: Padrão Vial Type: UNK  
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul  
 Sample Description:



Acquisition Method: Açucares sugarpak-waters  
 Column Type: RP18 Developed by: Cláudia  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: H2O Solvent B: HAc 0,5%  
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN  
 Method Description: Método para determinar açucares usando Coluna Ca SugarPak -  
 Warters 30 cm, eluente H2O. Curva de calibração série 5244.  
 (sacarose, xilose, frutose e glicose).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC	Area %
1	3,83		1779	0,000000	BB	0,005
2	5,08		27461	0,000000	BB	0,074
3	7,09		16370	0,000000	BB	0,044
4	8,08	Sacarose	12226785	7,49722	BB	33,059
5	10,00	Glicose	7503887	4,58502	BB	20,289
6	10,87	Xilose	7223006	5,03583	BB	19,530
7	11,73	Frutose	9937617	6,17158	BB	26,869
8	14,54		7709	0,000000	BB	0,021
9	15,39		2251	0,000000	BB	0,006
10	15,98		1210	0,000000	BB	0,003
11	17,36		1949	0,000000	BB	0,005
12	21,47		34788	0,000000	BB	0,094
			36984812	23,2897		100,000

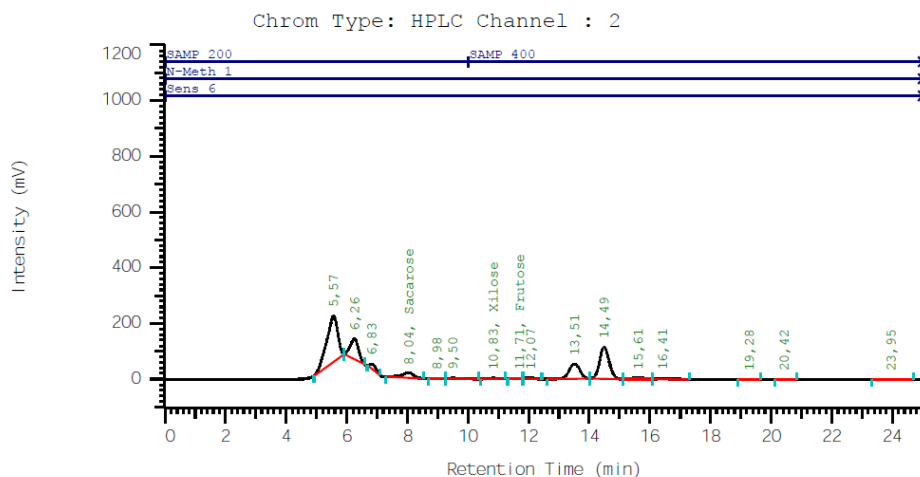
## Anexo 06 – Análise de Cromatografia líquida

Figura 25: Análise de Cromatografia líquida da amostra de *t<sub>r</sub>* de *S. cerevisiae* de cascas frescas na concentração de 100 g/L;

D-7000 HSM: Validation Series: 5245 Report: modified System: UNIVILLE

### D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 10/02/15 16:09 Reported: 11/02/15 08:56  
 Processed: 11/02/15 08:55  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5245\  
 Processing Method: Açucares sugarpak-waters  
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5245  
 Application: Validation Vial Number: 6  
 Sample Name: A6 Vial Type: UNK  
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul  
 Sample Description:



Acquisition Method: Açucares sugarpak-waters  
 Column Type: RP18 Developed by: Cláudia  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: H2O Solvent B: HAC 0,5%  
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN  
 Method Description: Método para determinar açucares usando Coluna Ca SugarPak - Warters 30 cm, eluente H2O. Curva de calibração série 5244. (sacarose, xilose, frutose e glicose).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC	Area %
1	5,57		4128016	0,000000	BB	39,480
2	6,26		1416379	0,000000	BB	13,546
3	6,83		263687	0,000000	BB	2,522
4	8,04	Sacarose	492578	0,302039	BB	4,711
5	8,98		11321	0,000000	BB	0,108
6	9,50		35190	0,000000	BB	0,337
7	10,83	Xilose	43730	0,0304884	BB	0,418
8	11,71	Frutose	6582	0,00408813	BB	0,063
9	12,07		41174	0,000000	BB	0,394
10	13,51		1316086	0,000000	BB	12,587
11	14,49		2482051	0,000000	BB	23,738
12	15,61		131647	0,000000	BB	1,259
13	16,41		65025	0,000000	BB	0,622
14	19,28		3531	0,000000	BB	0,034
15	20,42		4590	0,000000	BB	0,044
16	23,95		14248	0,000000	BB	0,136



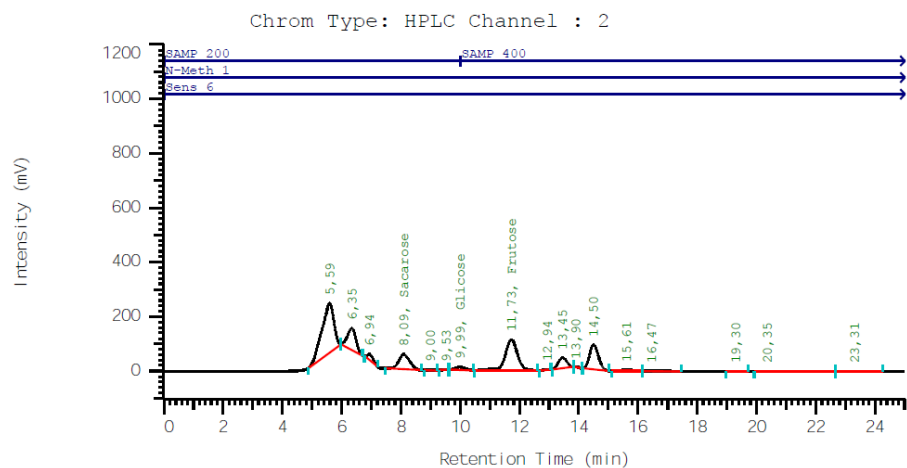
## Anexo 07 – Análise de Cromatografia líquida

Figura 26: Análise de Cromatografia líquida da amostra de *P. tannophilus* de cascas frescas na concentração de 100 g/L;

D-7000 HSM: Validation Series: 5245 Report: modified System: UNIVILLE

### D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 10/02/15 18:45 Reported: 11/02/15 09:07  
 Processed: 11/02/15 09:06  
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5245\  
 Processing Method: Açúcares sugarpak-waters  
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5245  
 Application: Validation Vial Number: 12  
 Sample Name: All Vial Type: UNK  
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 10,0 ul  
 Sample Description:



Acquisition Method: Açúcares sugarpak-waters  
 Column Type: RP18 Developed by: Cláudia  
 Pump A Type: L-7100  
 Solvent A: H2O Solvent B: HAc 0,5%  
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN  
 Method Description: Método para determinar açúcares usando Coluna Ca SugarPak -  
 Warters 30 cm, eluente H2O. Curva de calibração série 5244.  
 (sacarose, xilose, frutose e glicose).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA  
 Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC	Area %
1	5,59		5065041	0,000000	BB	34,022
2	6,35		1615781	0,000000	BB	10,853
3	6,94		313418	0,000000	BB	2,105
4	8,09	Sacarose	1412146	0,865900	BB	9,485
5	9,00		7070	0,000000	BB	0,047
6	9,53		8758	0,000000	BB	0,059
7	9,99	Glicose	264640	0,161701	BB	1,778
8	11,73	Frutose	3342116	2,07556	BB	22,449
9	12,94		24361	0,000000	BB	0,164
10	13,45		739014	0,000000	BB	4,964
11	13,90		22009	0,000000	BB	0,148
12	14,50		1858202	0,000000	BB	12,482
13	15,61		130772	0,000000	BB	0,878
14	16,47		36193	0,000000	BB	0,243
15	19,30		5848	0,000000	BB	0,039
16	20,35		14771	0,000000	BB	0,099