

ISADORA FERREIRA DA SILVA

**POTENCIAL DO PSEUDOCAULE DE BANANEIRA (CULTIVAR PRATA ANÃ)
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586p
2016

Silva, Isadora Ferreira da, 1985-
Potencial do pseudocaule de bananeira (cultivar prata anã)
para a produção de etanol de segunda geração / Isadora Ferreira
da Silva. – Viçosa, MG, 2016.
xiii, 121f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: José Humberto de Queiróz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Energia - Fontes alternativas. 2. Alcool como
combustível. 3. Etanol. 4. Biomassa vegetal. 5. Hidrólise.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

ISADORA FERREIRA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO
PSEUDOCAULE DE BANANEIRA COMO MATÉRIA-PRIMA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de novembro de 2016

Prof. Fernando Almeida Santos
(Coorientador)

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Wilton Soares Cardoso

Dr^a. Larisse Aparecida Ribas Batalha

Prof. José Humberto de Queiroz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Humberto de Queiroz pela oportunidade, confiança e pelos valiosos ensinamentos durante a realização deste trabalho

Ao professor Jorge Luiz Colodette e laboratório de Celulose e Papel pelo profissionalismo e por disponibilizar o seu laboratório para realização de parte desse estudo

Ao professor Fernando Santos pelas sugestões e colaboração nos experimentos realizados

Aos colegas de laboratório pelo apoio e amizade em especial à Nati Bretas pela dedicação, companheirismo e principalmente pela grande ajuda na execução dos experimentos. Muito obrigada!

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao secretário Eduardo pela atenção, paciência e ajuda na solução de problemas burocráticos

Às amigas Nati e Delma pela convivência e amizade

À Sabrina pelo apoio e estímulo nos momentos de dificuldades

À Mila por me acolher em sua casa, pelo apoio e valiosa amizade

À Lu pela ajuda nos experimentos de pré-tratamento e principalmente pela sua amizade e momentos de descontração durante minha estadia em Norwich

Ao Biorefinery Centre por todo o suporte dado e por proporcionar um ambiente de trabalho caloroso e acolhedor. Em especial aos colegas Sam, Ian e Adam pela colaboração, paciência e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e experiências

Ao Dr. Keith Waldron pela valiosa contribuição dada ao longo deste trabalho

Aos funcionários do Laboratório de Papel e Celulose em especial à Carolina Jardim pelo auxílio nas análises cromatográficas e pelas sugestões pertinentes como membro da banca de qualificação

Ao professor Marlon Cristian Toledo Pereira por ceder todo o pseudocaulo de bananeira utilizado neste estudo

À Novozymes Latin America LTDA por ceder gentilmente as enzimas utilizadas nesse trabalho

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado sanduiche e à FAPEMIG pelo apoio financeiro

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade concedida

À Universidade Federal de Viçosa.

Sumário

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
Introdução Geral.....	1
CAPÍTULO 1 - Etapa de Pré-tratamento do pseudocaule de bananeira utilizando micro-ondas.....	3
Os experimentos descritos nesse capítulo foram realizados no <i>Biorefinery Centre</i> do <i>Institute of Food Research</i> (IFR) em Norwich - Reino Unido, sob supervisão do Dr. Keith W. Waldron.	3
1. Objetivo Geral	3
1.1 Objetivos Específicos	3
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Etanol combustível	3
2.2 Biomassa Lignocelulósica	6
2.2.1 Celulose	8
2.2.2 Hemiceluloses	10
2.2.3 Lignina.....	11
2.3 Cultura da Banana	14
2.4 Processos para produção de etanol de segunda geração	16
2.4.1 Pré-tratamento	16
2.4.1.1 Pré-tratamento Hidrotérmico	19
2.4.1.2 Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio (NaOH)	20
2.4.2 Hidrólise da Biomassa.....	21
2.4.3 Fermentação Alcoólica	24
3. Material e Métodos	28
3.1 Matéria-prima	28

3.2 Pré-tratamento	28
3.2.1 Cálculo do Fator de Severidade	29
3.3 Determinação da matéria seca dos pré-tratados.....	30
3.4 Quantificação dos Carboidratos	30
3.5 Micro-organismo.....	31
3.5.1 Manutenção da levedura	31
3.5.2 Preparação do Inóculo	32
3.5.3 Quantificação celular	32
3.6 Hidrólise enzimática e SSF	33
3.6.1 Hidrólise enzimática e SSF em microtubos de 1 mL	33
3.6.2 Hidrólise enzimática e SSF em tubos de 20 mL.....	33
3.7 Métodos Analíticos	34
3.7.1 Determinação dos açúcares e etanol	34
3.7.2 Quantificação dos licores e águas de lavagens provenientes dos pré-tratamentos	35
4. Resultados e Discussões	35
4.1 Pré-tratamento Hidrotérmico do Pseudocaule de Bananeira	35
4.1.1 Quantificação dos licores e águas de lavagens	38
4.1.2 Hidrólise enzimática	41
4.1.3 Sacarificação e Fermentação Simultânea	43
4.2 Pré-tratamento com NaOH.....	45
4.2.1 Quantificação dos licores e águas de lavagens	47
4.2.2 Hidrólise enzimática	50
4.3 Hidrólise enzimática e Fermentação e Sacarificação Simultânea	53
4.4 Balanço geral dos processos testados	57
5. Conclusões.....	59
6. Referências	59

Apêndice	77
CAPITULO 2 - Pré-tratamento do pseudocaule de bananeira utilizando reator Parr	98
Os experimentos descritos nesse capítulo foram realizados no laboratório de Celulose e Papel localizado na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa.	98
Artigo - Otimização do pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira visando a produção de etanol de segunda geração	98
Conclusão Geral.....	121

Lista de Figuras

Figura 1 - Evolução do Licenciamento de carros flex-fuel.....	4
Figura 2 - Evolução da produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil.	5
Figura 3 - Representação estrutural da Biomassa Lignocelulósica.....	7
Figura 4 - Polímero de Celulose com as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.	9
Figura 5 - Estrutura da celulose destacando as regiões amorfas e cristalinas.....	9
Figura 6 - Componentes da fração de hemiceluloses.	11
Figura 7 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina.	12
Figura 8 - Fração de uma molécula de lignina.	13
Figura 9 - Bananeira.....	14
Figura 10 - Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.	17
Figura 11 - Produtos e subprodutos do processo de pré-tratamento da biomassa...	19
Figura 12 - Um esquema atual simplificado da degradação enzimática da celulose, envolvendo EG, CBHs, β -glicosidase, CDH, AA9, monooxigenases	23
Figura 13 - Técnicas de produção do etanol de segunda geração.....	26
Figura 14 - Conversão enzimática de amostras do pseudocaule de bananeira <i>in natura</i> e após pré-tratamento hidrotérmico. Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste t a 95 % de probabilidade.	42
Figura 15 - Rendimentos de etanol após SSF em amostras de pseudocaule de bananeira <i>in natura</i> e após pré-tratamento hidrotérmico. Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste t a 95 % de probabilidade.....	44
Figura 16 - Conversão enzimática de amostras do pseudocaule de bananeira não tratada (NT) e após pré-tratamento com hidróxido de sódio.	52
Figura 17 - Superfície Resposta para a concentração de glicose (g/L) em função das variáveis temperatura (°C) e concentração de NaOH (%) do pré-tratamento alcalino.	52
Figura 18 - Conversão enzimática nas temperaturas de 50 °C e 25 °C de amostras pré-tratadas e não tratadas (NT) do pseudocaule de bananeira. A: pré-tratado com hidróxido de sódio; H: pré-tratado hidrotérmico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5 %.	54
Figura 19 - Rendimento de etanol após SSF nas temperaturas de 25 °C e 37 °C de amostras de pseudocaule de bananeira não tratado (NT) e submetidos a pré-	

tratamentos com hidróxido de sódio e hidrotérmico. A: pré-tratado com hidróxido de sódio; H: pré-tratado hidrotérmico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5 %.....	56
Figura 20 - Rendimento de etanol a partir de pseudocaule de bananeira não tratado e após pré-tratamento hidrotérmico e hidróxido de sódio.	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição de alguns materiais lignocelulósicos.	8
Tabela 2 - Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para produção de etanol (Mood et al., 2013; Taherzadeh & Karimi, 2008; Teixeira et al., 2014; Sindhu et al., 2016).	18
Tabela 3 - Comparação dos diferentes processos fermentativos para etanol de segunda geração (Harun et al., 2011).	27
Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para as variáveis independentes avaliadas no pré-tratamento com NaOH.	29
Tabela 5 - Composição do meio de cultura para manutenção da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 2826.	32
Tabela 6 - Rendimentos de recuperação do pseudocaule de bananeira após pré-tratamento hidrotérmico e o fator de severidade de cada condição de pré-tratamento.	36
Tabela 7 - Composição dos açúcares da fração sólida do pseudocaule de bananeira <i>in natura</i> e após pré-tratamento hidrotérmico.	37
Tabela 8 - Composição dos licores obtidos de amostras de pseudocaule de bananeira após pré-tratamento hidrotérmico.	39
Tabela 9 - Composição das lavagens dos sólidos pseudocaule de bananeira após pré-tratamento hidrotérmico.	41
Tabela 10 - Rendimento e composição de carboidratos da fração sólida <i>in natura</i> e pré-tratada com NaOH sob diferentes condições.	45
Tabela 11 - Composição dos licores obtidos de amostras de pseudocaule de bananeira após pré-tratamento com NaOH.	47
Tabela 12 - Composição das lavagens dos sólidos pseudocaule de bananeira submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio.	49
Tabela 13 - DCCR para as variáveis independentes avaliadas em função da resposta concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática.	50
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose (g/L) de pré-tratados com hidróxido de sódio.	51

RESUMO

SILVA, Isadora Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Potencial do pseudocaule de bananeira (cultivar Prata anã) para a produção de etanol de segunda geração.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Jorge Luiz Colodette e Fernando Almeida Santos.

Nas últimas décadas, tem-se observado um crescente interesse nas biomassas residuais de composição lignocelulósica para produção de energia, destacando-se o etanol de segunda geração. Entre a biomassa lignocelulósica disponível se encontra os resíduos provenientes da bananicultura, cultura importante nas regiões tropicais e subtropicais. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou estudar o potencial do pseudocaule de bananeira (Prata Anã) para a produção do etanol de segunda geração. No primeiro capítulo do trabalho foram realizados pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino utilizando micro-ondas. O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado sob diferentes temperaturas (130 °C a 210 °C). O pré-tratamento alcalino foi realizado de acordo com um delineamento composto central, cujas variáveis estudadas foram: temperatura (190 °C - 210 °C) e concentração de hidróxido de sódio (0,5 % - 1,5 %, m/v). A eficiência dos pré-tratamentos foi verificada através da comparação de análises químicas dos materiais in natura e pré-tratados e da conversão de celulose em glicose por hidrólise enzimática, além de sacarificação e fermentação simultânea de alguns pré-tratados. As variáveis temperatura e concentração de NaOH apresentaram efeitos lineares significativos. Como melhores resultados dessa etapa, foram obtidos 77 % de conversão enzimática para o pré-tratado hidrotérmico (210 °C, 40 minutos), 78,3 % para o alcalino (190 °C, 0,5 % NaOH) e 56 % para material não tratado. Em relação aos resultados de SSF, foram obtidos rendimentos de etanol de 86,5 % para pré-tratado hidrotérmico, 85,3 % para alcalino e 70,5 % para o material não tratado. Esses ensaios de hidrólise enzimática e SSF foram realizadas em tubos de 20 mL, utilizando 2,5 % (p/v) de concentração de sólidos, 50 FPU/g de Cellic Ctec 2, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826, por 120 dias sob 120 rpm de agitação, sendo que a hidrólise foi realizada a 25 °C e SSF à 37 °C. No segundo capítulo foi realizado um pré-tratamento hidrotérmico utilizando reator Parr de 18 litros, sendo as condições determinadas por delineamento composto central: temperatura (170 °C - 210 °C), tempo de reação (10 min - 20 min) e razão sólido/líquido (1/10 - 1/15). Os efeitos lineares das variáveis foram significativas, além do efeito quadrático da variável razão sólido/líquido. A hidrólise

enzimática foi realizada à 50 °C, por 72 horas, utilizando enzima Cellic Ctec (5,4 %, p/p) com 8 % (p/v) de sólidos. O pré-tratamento hidrotérmico em reator Parr mostrou-se eficiente no aumento do rendimento de glicose após hidrólise enzimática, alcançando rendimento máximo de glicose de 98 % na condição do ensaio 6 (210 °C, 10 minutos, S/L de 1/15).

ABSTRACT

SILVA, Isadora Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Potential use of banana pseudostem for second-generation ethanol production.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-Advisers: Jorge Luiz Colodette and Fernando Almeida Santos.

In recent decades, there has been a growing interest in the residual biomass of lignocellulosic material for energy production, especially second-generation ethanol. Among the available lignocellulosic biomass are residues from banana cultivation, an important crop in tropical and subtropical regions. In this context, the present work aimed to study the production of second-generation ethanol using banana pseudostem as raw material. In the first chapter of this work, hydrothermal and alkaline pretreatments were carried out for 10 minutes of reaction time using a microwave. The hydrothermal pretreatment was performed under different temperatures (130 °C to 210 °C). The alkaline pre-treatment was performed according to a central composite design, of which the studied variables were: temperature (190 °C - 210 °C) and sodium hydroxide concentration (0.5 % - 1.5 %, m/v). The efficiency of the pretreatments was verified by comparing chemical analyzes of the in natura and pretreated materials and their conversion of cellulose to glucose after enzymatic hydrolysis and their ethanol yield after simultaneous saccharification and fermentation. The variables NaOH concentration and temperature showed significant linear effects. As best results of this step, were obtained 77 % of enzymatic conversion using hydrothermal pretreated (210 °C, 40 minutes), 78.3 % using alkaline pretreated (190 °C, 0.5 % NaOH) and 56 % using the untreated material. Regarding SSF results, 86.5 % of ethanol yields were obtained using hydrothermal pretreated, 85.3 % using alkaline and 70.5 % using untreated material. These enzyme hydrolysis and SSF assays were performed in 20 mL tubes using 2.5 % (w/v) solid concentration, 50 FPU/g Cellic Ctec 2 and *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826 at 25 °C for 120 days under 120 rpm of stirring. The enzymatic hydrolysis was performed at 25 °C and SSF at 37 °C. In the second chapter, hydrothermal pretreatment was performed using 18 liters Parr reactor with the conditions determined by central composite design: temperature (170 °C - 210 °C), reaction time (10 min - 20 min) and solid/liquid ratio (1/10 - 1/15). The linear effects of the variables were significant, in addition to the quadratic effect of the

variable solid/liquid ratio. The enzymatic hydrolysis was performed at 50 °C for 72 hours using Cellic Ctec enzyme (5.4 %, w/w) and 8 % (w/v) solid. Hydrothermal pre-treatment in Parr reactor proved to be efficient in increasing glucose yield after enzymatic hydrolysis, achieving maximum glucose yield of 98 % under assay 6 condition (210 °C, 10 minutes, 1/15 S/L).

Introdução Geral

A limitação do fornecimento de combustíveis fósseis aliada às crescentes preocupações com a questão ambiental tem impulsionado o desenvolvimento de processos industriais a base de energia renovável (Li et al., 2012). Nesse sentido, os biocombustíveis surgem como uma alternativa promissora de recurso energético mundial.

O etanol atualmente representa cerca de 90 % do consumo total de biocombustíveis (IEA, 2014). A produção mundial de etanol atingiu 92 bilhões de litros em 2015 e deverá aumentar em 30 % até 2020. Brasil e EUA são considerados os maiores produtores, responsáveis por 28 % e 58 % da produção mundial, respectivamente (OECD/FAO 2013; RFA, 2015), produzidos a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas, como milho e cana-de-açúcar (Gupta & Verma, 2015). Apesar dos efeitos positivos relacionados à produção do etanol, existem muitas críticas em relação à possível expansão excessiva do cultivo, podendo resultar em ampliação da utilização de terras, o que implicaria em decréscimo das áreas agricultáveis para produção de alimentos (Arifin et al., 2014).

Assim, tem-se verificado um crescente interesse nas biomassas residuais de composição lignocelulósica para produção de energia, destacando-se neste caso o etanol de segunda geração e a construção de biorrefinarias integradas. Considerando o baixo custo e a grande disponibilidade deste tipo de matéria-prima no Brasil, torna-se uma opção bastante atraente a aplicação desse material como uma alternativa de energia renovável (Santos et al., 2012).

A aplicação biotecnológica dos materiais lignocelulósicos envolve a separação de seus componentes de acordo com as características do produto desejado (Liu et al., 2016). No caso da produção de etanol combustível, faz-se necessário desenvolver processos eficientes para disponibilizar monossacarídeos e a conversão destes em etanol com alta produtividade (Mulakhudair et al., 2016).

Para disponibilizar os açúcares fermentescíveis faz-se necessário submeter a biomassa à pré-tratamentos físico e/ou químicos antes de sua hidrólise para produção de etanol (Canam et al., 2013). A etapa de pré-tratamento é necessária para reduzir a cristalinidade da celulose, aumentar a porosidade da biomassa, melhorar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise. Para ser considerado eficaz, o pré-tratamento deve diminuir o grau de polimerização da celulose, de forma que se torne acessível ao processo de hidrólise, evitar formação de subprodutos

inibidores dos processos de hidrólise e fermentação e, principalmente, ser economicamente viável (Zhu et al., 2011; Zhang et al., 2016).

O pré-tratamento é visto como um dos gargalos na produção do etanol de segunda geração. É considerado uma das etapas mais caras do processo, além de influenciar fortemente as etapas seguintes, e por isso apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência do processo.

Entre a biomassa lignocelulósica disponível se encontra os resíduos provenientes da bananicultura, cultura importante nas regiões tropicais e subtropicais (Bridgwater, 2012). Devido à ampla disponibilidade do pseudocaule de bananeira, bem como a possibilidade de agregar valor a esse resíduo, propõe-se desenvolver um processo de aproveitamento do pseudocaule de bananeira para produção de etanol de segunda geração.

CAPÍTULO 1 - Etapa de Pré-tratamento do pseudocaule de bananeira utilizando micro-ondas

Os experimentos descritos nesse capítulo foram realizados no *Biorefinery Centre* do *Institute of Food Research* (IFR) em Norwich - Reino Unido, sob supervisão do Dr. Keith W. Waldron.

1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito dos pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino em micro-ondas na fração celulósica da biomassa do pseudocaule de bananeira submetido a hidrólise enzimática e sacarificação e fermentação simultânea

1.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar o pseudocaule de bananeira quanto a sua composição química;
- Submeter o pseudocaule de bananeira a pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino sob diferentes condições de temperatura e concentrações de NaOH;
- Avaliar os efeitos dos pré-tratamentos na composição dos monômeros de açúcar dos hidrolisados;
- Definir as condições de pré-tratamento mais adequadas visando maior digestibilidade enzimática do pseudocaule de bananeira;
- Realizar Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) nas melhores condições de pré-tratamento para produção de etanol;
- Avaliar a influência da temperatura nas etapas de hidrólise enzimática e SSF dos pré-tratados selecionados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Etanol combustível

O etanol é um composto orgânico com fórmula C_2H_6O , largamente utilizado como combustível na forma hidratada ou misturada à gasolina.

O etanol ganhou destaque no cenário brasileiro na década de 1970, diante da crise energética mundial, o que levou o país a criar o Programa Nacional do Álcool – Proálcool, que visava o desenvolvimento das técnicas de aperfeiçoamento dos insumos para produção de álcool etílico, diminuindo a dependência brasileira em relação ao petróleo (Andrade et al, 2009). Na primeira fase do Programa, o seu

principal objetivo consistia na produção de álcool anidro para a mistura com gasolina.

Esforços em pesquisa e desenvolvimento direcionados à fabricação de carros movidos exclusivamente a álcool resultaram na criação destes veículos em 1978. Devido à segunda crise do petróleo em 1979, o governo brasileiro decidiu aumentar o uso combustível do etanol, assinando acordos com fabricantes de automóvel e estimulando a construção de um grande número de destilarias autônomas. Desta forma, iniciou-se a produção em larga escala do etanol hidratado (EPE, 2008).

Em 2003, surge no mercado nacional o veículo *flex-fuel* ou bicombustível, cuja tecnologia permite o uso de álcool hidratado, desde 100 % de etanol hidratado até uma gasolina com 27 % de etanol anidro (Portal Brasil, 2015). Os veículos equipados com tecnologia *flex-fuel* dominam atualmente o mercado automobilístico brasileiro. Em 2016, aproximadamente 89 % dos carros licenciados possuem tecnologia *flex-fuel* (MME, 2016) (Figura 1).

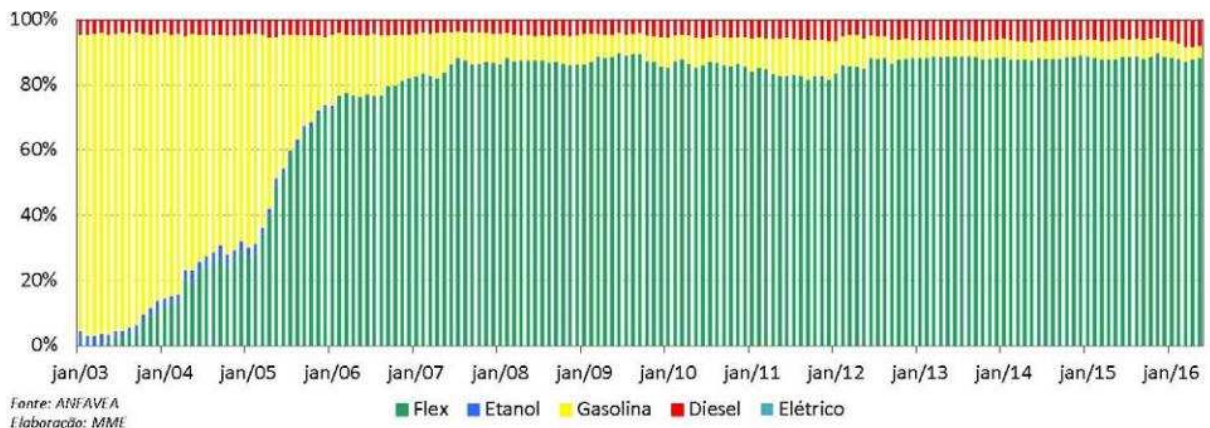


Figura 1 - Evolução do Licenciamento de carros flex-fuel (MME, 2016)

Devido ao aumento da demanda de etanol após desenvolvimento dos veículos *flex-fuel*, o Brasil demonstra crescente expansão na produção do etanol de primeira geração, produzido a partir da cana-de-açúcar (Figura 2). A produção brasileira de etanol esteve em crescente expansão, impulsionada pelo crescimento da produção de veículos.

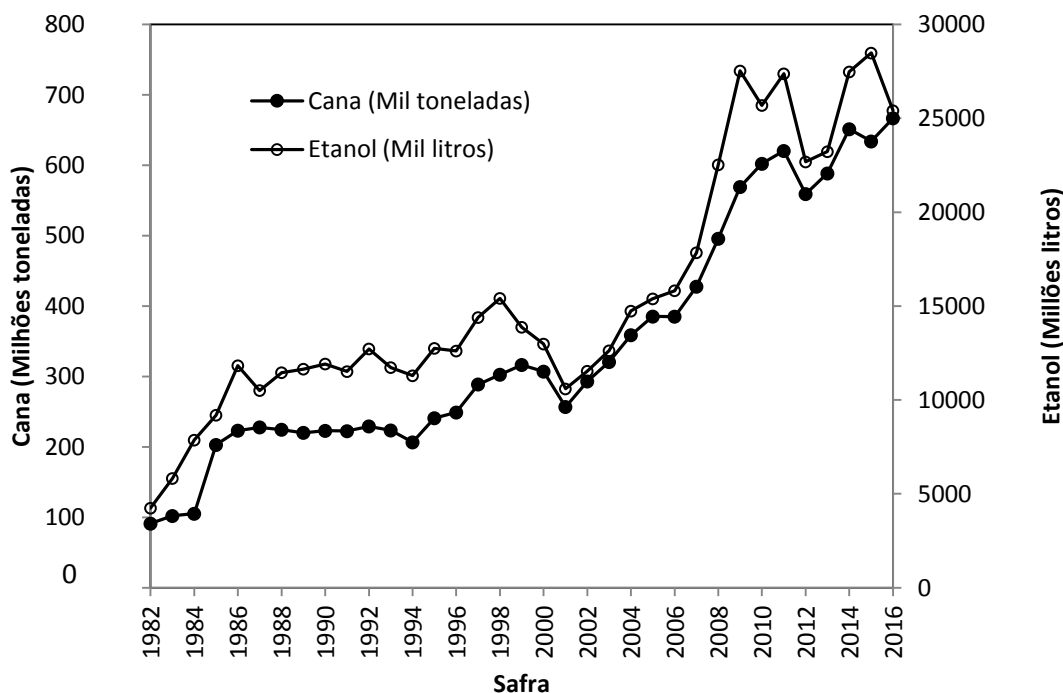


Figura 2 - Evolução da produção de cana-de-açúcar e etanol no Brasil (UNICA, 2016).

A produção global de etanol atingiu o pico em 2015 depois de uma queda em 2012 e 2013. Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de etanol, tendo produzido cerca de 57 bilhões de litros, seguido do Brasil com 27 bilhões de litros e Europa com 5,3 bilhões de litros produzidos. Juntos, os EUA e Brasil produzem 85 % do etanol do mundo. A grande maioria do etanol produzido nos Estados Unidos utiliza o milho como matéria-prima, enquanto que o Brasil utiliza a cana-de-açúcar (Renewable Fuels Association, 2016).

Para atender à crescente demanda de etanol de primeira geração no Brasil, a área de cultivo de cana-de-açúcar deverá ser expandida. Entretanto, para evitar essa expansão desmedida das áreas de cultivo, tem-se desenvolvido processos de produção de etanol de segunda geração. O etanol de segunda geração é originado de matérias-primas renováveis como as biomassas residuais de composição lignocelulósica. A produção de biocombustíveis tem a vantagem de promover a reciclagem de resíduos orgânicos, diminuindo a poluição ambiental (Yilmaz & Selim, 2013).

O Brasil encontra-se em uma posição favorável na produção de etanol devido à grande quantidade de resíduos gerados, possibilitando um mercado de biocombustíveis sem ampliação de área desmatada ou redução de área destinada à

produção de alimentos, além de possuir diversidade de matérias-primas em diferentes biomassas (Pacheco, 2011).

2.2 Biomassa Lignocelulósica

Biomassa é todo recurso renovável proveniente de matéria orgânica que pode ser processado para fornecer energia mais elaborada através de processos térmicos, biológicos, mecânicos ou físicos (Kan et al., 2016). Portanto, podem ser considerados exemplos de materiais renováveis os resíduos agrícolas, madeiras, resíduos urbanos e industriais (Tilman et al., 2009). O fornecimento de energia apresenta rotas diversificadas que vão desde a combustão para obtenção de energia térmica até processos físico-químicos e bioquímicos complexos para a obtenção de combustíveis líquidos e gasosos como os biocombustíveis (biodiesel e etanol) e biogás (Lela et al., 2016).

A biomassa lignocelulósica responde atualmente por 10 % da matriz energética mundial (OECD/IEA, 2014). O potencial estimado de disponibilidade anual de biomassa está previsto para ser tão elevada quanto $1,08 \times 10^{11}$ tep (toneladas equivalentes de petróleo), quase 10 vezes mais do que a energia atualmente necessária no mundo (Kan et al., 2016).

O Brasil por possuir condições naturais e geográficas favoráveis à produção de biomassa assume posição de destaque no cenário mundial na produção e uso de energias renováveis. Em 2015, a participação de renováveis na matriz energética brasileira manteve-se entre as maiores do mundo, com 41 %, enquanto que a média mundial esteve em torno de 14 % (Ministério das Minas e Energia, 2016).

A Biomassa lignocelulósica é composta basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, ainda que as suas proporções diferem segundo o tipo de tecido da planta e da parede celular. A Figura 3 representa a estrutura básica da biomassa lignocelulósica.

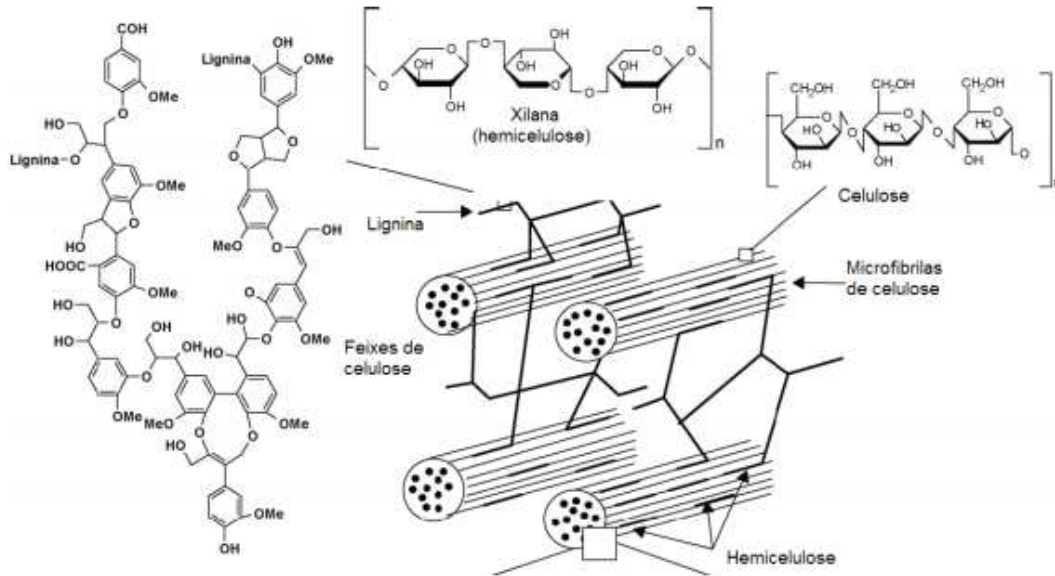


Figura 3 - Representação estrutural da Biomassa Lignocelulósica (Graminha et al, 2008).

As propriedades da biomassa lignocelulósica são o resultado da disposição dos seus principais componentes, celulose, hemicelulose e lignina (Tavares & Buckeridge, 2015). A celulose se mantém compactada e interage com a hemicelulose através de ligações de hidrogênio, enquanto que a lignina envolve ambas formando uma barreira física (Martínez-Sanz et al., 2015). Os componentes dos materiais lignocelulósicos são encontrados em quantidades diferentes em vegetais de diferentes origens (Anwar et al., 2014). A Tabela 1 lista a composição de alguns materiais lignocelulósicos, expressa em suas três principais frações.

Tabela 1 - Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

Material	Composição (%)			Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Bagaço de cana	40	29	23	Oliveira et al., 2013
Palha de cana	44	31	19	Santos et al., 2014
Palha de milho	32	17	13	Liu et al., 2013
Sabugo de milho	40	27	17	Du et al., 2015
Palha de trigo	32	17	21	Wang et al., 2014
Palha de arroz	39	23	21	Suriyachai et al., 2013
Casca de arroz	34	24	19	Soltani et al., 2015
Capim elefante	60	24	8	Minmunin et al., 2015
Palha de cevada	39	41	19	Oun & Rhim, 2016
Pseudocaulis de bananeira	52	10	11	Romero-Anaya et al., 2011.

O aproveitamento da biomassa é baseado em processos de conversão química e bioquímica de carboidratos presentes no material mediante uma separação de seus componentes principais. Entretanto, a complexidade das interligações das três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina), é o principal desafio na recuperação dos carboidratos. Desse modo, faz-se necessário conhecer as características dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica.

2.2.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de β -D-glicoses unidas por ligações β -1,4 glicosídicas. Sua estrutura composta por hidroxilas permite a ocorrência de ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares, além de interações de *van der Waals* entre as unidades de glicose, contribuindo para a formação de uma estrutura altamente cristalina com alto grau de rigidez (Figura 4) (Singh et al., 2014).

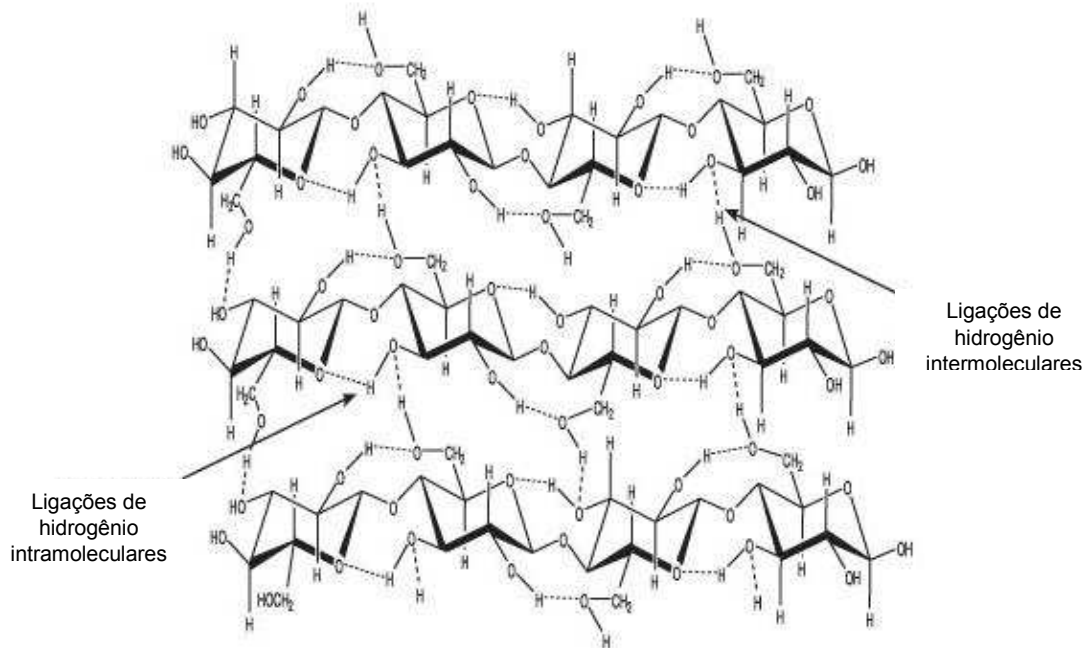


Figura 4 - Polímero de Celulose com as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Adaptado de Santos et al., 2012).

As cadeias de celulose consistem em regiões cristalinas e amorfas, cuja proporção varia de acordo com a origem. As propriedades físicas e sua reatividade, são fortemente influenciados pelo arranjo das moléculas de celulose. As estruturas cristalinas são mais organizadas, conferindo resistência e proteção à célula contra agentes externos, diferentemente das regiões amorfas, onde há menor organização e por isso são mais susceptíveis a degradação (Ciolacu et al., 2011). O grau de cristalinidade pode ser determinado através de técnicas de difração raio x, espectroscopia no infravermelho (Ruel et al., 2012). A Figura 5 mostra as regiões cristalinas e amorfas do polímero de celulose.

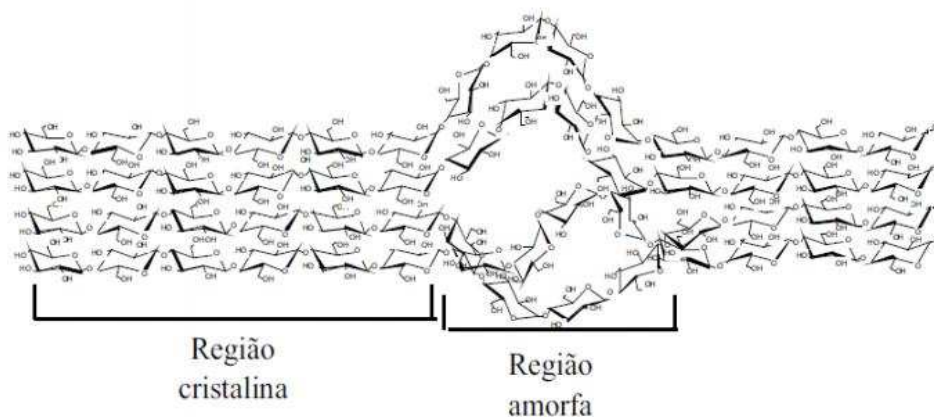


Figura 5 - Estrutura da celulose destacando as regiões amorfas e cristalinas (Sun & Cheng, 2002).

Além do índice de cristalinidade, a reatividade das cadeias de celulose são influenciadas por propriedades tais como o grau de polimerização, área superficial, tamanho de partícula, associação com componentes não-celulósicos, sendo que todos estes são determinantes no processo de hidrólise enzimática do material celulósico (Park et al., 2010).

2.2.2 Hemiceluloses

Hemiceluloses são uma classe heterogênea de polímeros que representam em geral 15-35 % da biomassa lignocelulósica. As unidades de açúcares consistem em cadeias ramificadas compostas por quatro grupos principais, tais como as pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose), ácidos hexourônicos (ácido galacturônico, ácido metilgalacturônico e ácido glicurônico) e desoxi-hexoses (fucose e ramnose) (Figura 6) (Gírio et al., 2010).

Xilana é o polissacarídeo mais comumente encontrado na estrutura das hemiceluloses composto de ligações β 1-4 de xilanopiranosil, α -4-O-metil-D-glicurônico e D-anidroxilose. Desse modo, as hemiceluloses formam um polímero ramificado constituído majoritariamente por açúcares de cinco carbonos, xilose e, em menor quantidade, açúcares de seis carbonos, como glicose associados à cadeia principal (Sun et al., 2004).

As unidades de açúcares são dispostas em diferentes proporções de acordo com a origem. As hemiceluloses se encontram normalmente ligada aos outros componentes da parede celular como celulose, proteínas e lignina através de ligações covalentes, de hidrogênio e por interações iônicas e hidrofóbicas (Peng et al., 2012).

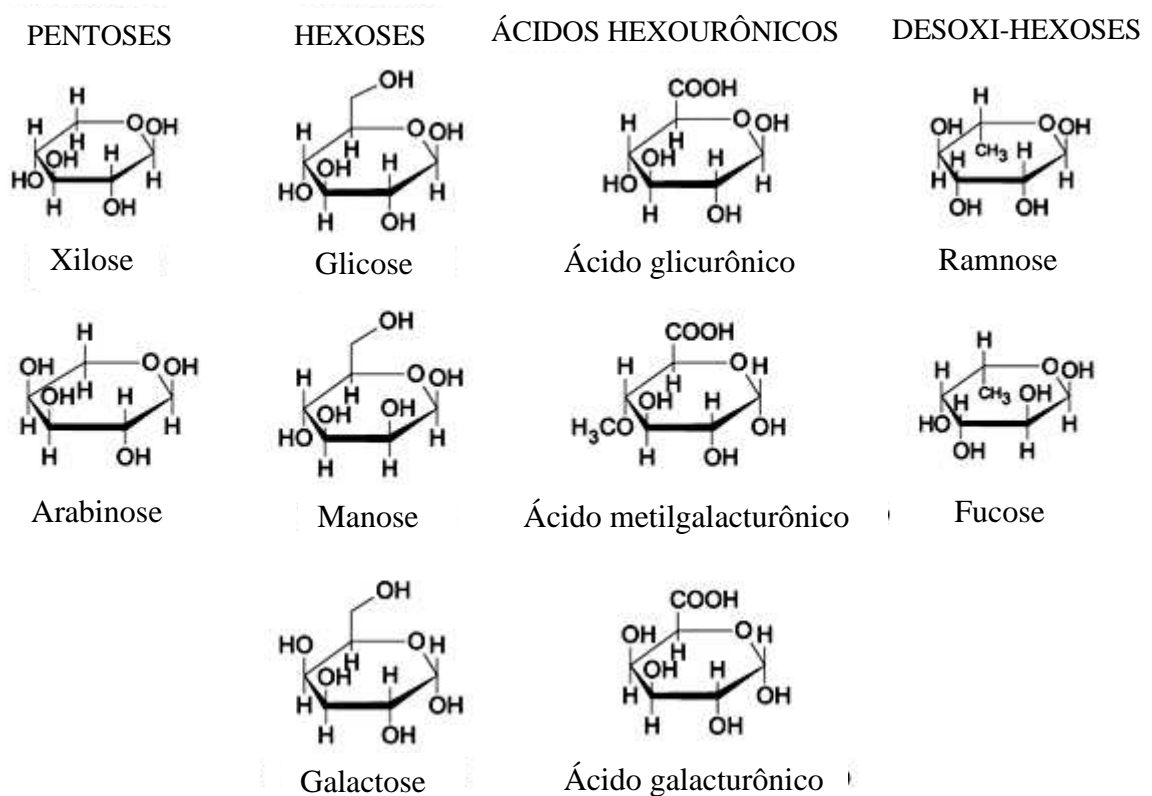


Figura 6 - Componentes da fração de hemiceluloses (Adaptado de Morais et al., 2005).

As hemiceluloses diferem da celulose principalmente por serem constituídas de diferentes unidades de açúcares, formando cadeias ramificadas. Possuem menor grau de polimerização e estrutura totalmente amorfa o que justifica ser menos resistente ao ataque de agentes químicos (Chen, 2014).

2.2.3 Lignina

A lignina é essencialmente um material estrutural que dá a rigidez e resistência às paredes celulares, representando 15-40 % em peso do material lignocelulósico. É considerado o biopolímero aromático mais abundante da natureza. A estrutura da lignina consiste em unidades de fenilpropano derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois, álcool-trans-p cumarínico, álcool trans coniferílico e álcool trans sinapílico (Figura 7) (Huijen et al., 2014; Zhang et al., 2013).

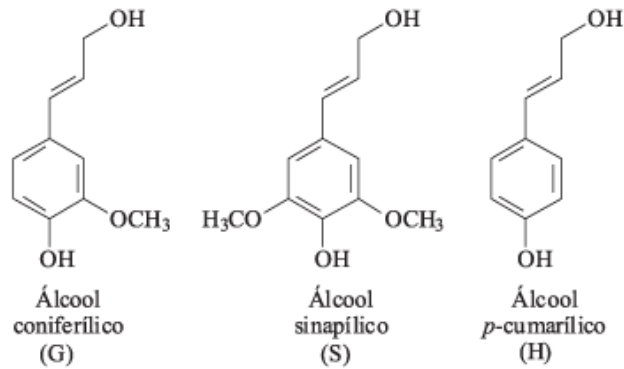


Figura 7 - Estrutura dos álcoois precursores da lignina (Barbosa et al., 2008).

A proporção dos precursores da lignina varia entre as diferentes espécies de plantas, bem como diferentes tipo de tecidos vegetais. Esses compostos aromáticos realizam uma variedade de ligações éter entre si. Diferentes tipos de ligações éter entre unidade de fenilpropano são responsáveis pela formação de estruturas tridimensionais tornando-a o componente mais resistente à degradação química e biológica que os carboidratos presentes na parede celular. A Figura 8 representa uma fração da porção de lignina. Devido à complexidade da lignina, sua estrutura ainda não é conhecida completamente (Ghaffar & Fan, 2013).

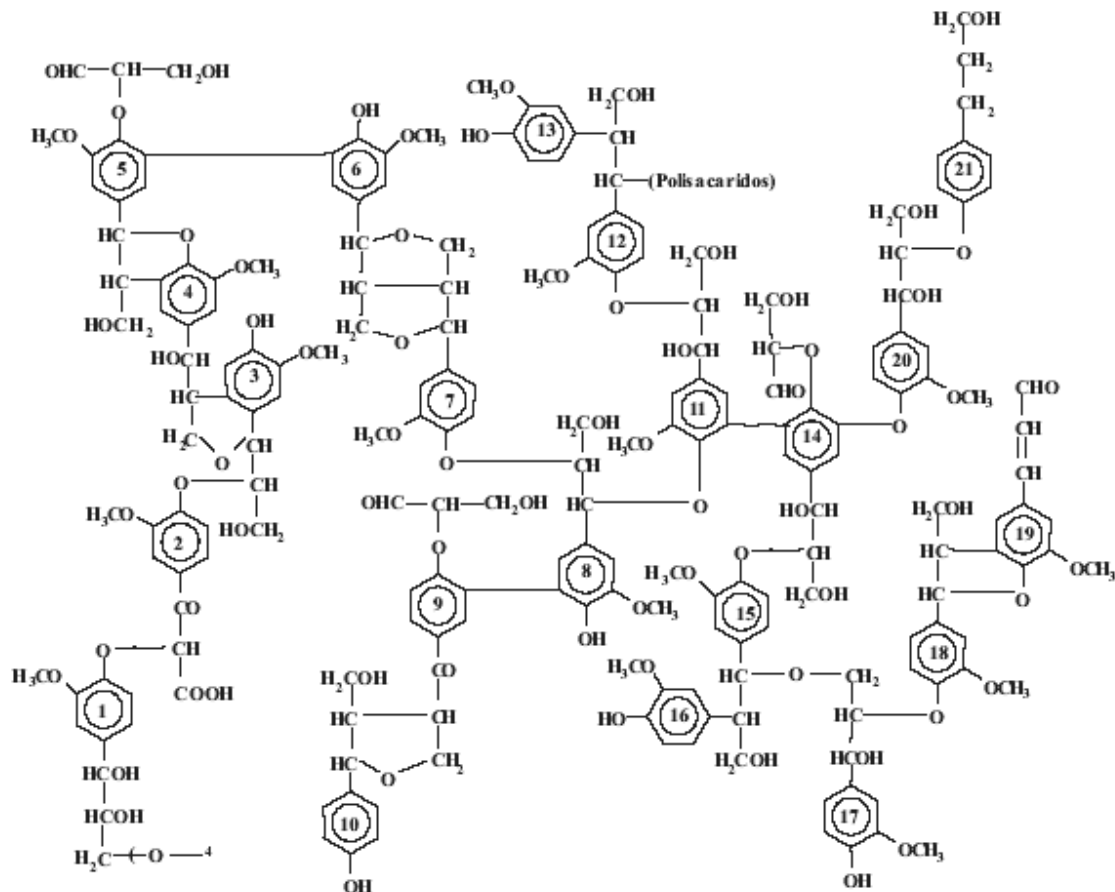


Figura 8 - Fração de uma molécula de lignina (Infante et al., 2007).

Além da composição química, fatores como comprimento da cadeia, número de ligações inter e intramoleculares e quantidade de extremidades fenólicas livres também influenciam na susceptibilidade da lignina a alterações químicas e, conseqüentemente, no desempenho para conversão de biomassa em aplicações biotecnológicas, como na produção de etanol de segunda geração (Vanholme et al., 2010).

O teor de lignina da biomassa é um parâmetro importante quando se visa a produção de etanol de segunda geração. Uma vez que a lignina serve como barreira física dificultando o acesso das enzimas aos carboidratos da parede celular, um menor teor de lignina pode representar um maior rendimento de etanol. Portanto, biomassas com baixo teor de lignina como pseudocaule de bananeira podem ser consideradas promissoras no aproveitamento para produção do etanol de segunda geração.

2.3 Cultura da Banana

As bananeiras são plantas da classe das *Monocotyledoneae*, família *Musaceae* gênero *Musa*, além do gênero *Ensete*, que produz as chamadas "falsas bananas". Originárias do sudeste asiático, são tipicamente tropicais, cujo bom desenvolvimento exige calor constante, elevada umidade e boa distribuição de chuvas. Devido à sua ampla adaptação, são cultivadas em quase todos os países tropicais. No Brasil, a bananeira é cultivada de norte a sul, envolvendo desde a faixa litorânea até os planaltos interioranos (Dantas & Filho, 2000). As principais cultivares de bananeiras do Brasil são: ouro, nanica, nanicão, grande naine, maçã, mysore, prata, pacovan, prata anã, terra, d'angola, figo (Lima et al., 2012).

Basicamente, a bananeira é constituída por raiz, rizoma, pseudocaule, bainha foliar, folhas e cacho (Figura 9). O cacho é composto pelas partes: engaço, ráquis, pencas de bananas e botão floral ou "coração". O pseudocaule, estrutura constituída pelas bainhas das folhas da bananeira, corresponde ao que é normalmente denominado caule ou tronco. Com o amadurecimento do cacho, toda a parte aérea inicia um processo de degeneração que culmina com a secagem total dos tecidos (Lima et al., 2012).



Figura 9 - Bananeira (Soffner, 2001).

O cultivo da banana está presente em todo território nacional, participando significativamente da economia de diversos estados brasileiros. De acordo com levantamentos do IBGE/LSPA, (2016) este ano, até o mês de julho, o Brasil produziu em torno de 7 milhões de toneladas. Minas Gerais produziu 795 mil toneladas de banana, em uma área de 47,4 mil hectares, o que equivale a 16.770 kg/ha, representando 11,4 % da produção brasileira. O estado é o terceiro maior produtor do país, atrás somente do estado da Bahia e São Paulo.

Tomando-se como exemplo a produção em Minas Gerais, pode-se verificar que a produção de bananas se concentra nas regiões Sul e nos perímetros irrigados da região Norte do estado.

A região Norte do estado lidera o ranking estadual de produção de bananas com um volume da ordem de 375 mil toneladas em bananais espalhados por 14,9 mil hectares. O município de Janaúba é o maior produtor do estado, com cerca de 61 mil toneladas de bananas produzidas em 2015 (IBGE/LSPA, 2015). A predominância de clima seco e o sistema de produção irrigada beneficiam o desenvolvimento da bananicultura na região e reduzem os custos de controle de doenças e pragas. Devido à alta produção de banana nessa região, uma grande quantidade de resíduos é gerada.

De acordo com Souza et al. (2014) para cada tonelada de banana colhida são gerados aproximadamente 4 toneladas de resíduos, incluindo a casca, folhas, pseudocaule e engaço do cacho. Em torno de 75 % desses resíduos é composto de pseudocaule de bananeira.

O pseudocaule de bananeira é constituído por superposições de folhas que nascem enroladas e se abrem paulatinamente. O meristema terminal deste talo produz, ainda jovem, folhas que possuem uma parte basal bem desenvolvida. Sucessivamente vão aparecendo folhas dispostas em forma helicoidal e em conjunto, formando o que recebe, com frequência, o nome de tronco da bananeira, mas na verdade não é mais que um falso tronco ou pseudocaule (Coelho et al., 2001). Em relação à composição química, o pseudocaule apresenta em torno de 11 % de lignina, 10 % de hemiceluloses e 52 % de celulose (Romero-Anaya et al., 2011). Além da grande quantidade de resíduos gerados pela bananeira, seu resíduo celulósico caracterizado pelo baixo teor de lignina e alto teor de celulose torna viável o seu aproveitamento na produção de etanol de segunda geração.

2.4 Processos para produção de etanol de segunda geração

O processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos consta de 3 etapas básicas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação.

2.4.1 Pré-tratamento

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica na produção do etanol de segunda geração requer etapa de pré-tratamento. A celulose apresenta estrutura bastante recalcitrante, difícil de ser desestruturada e convertida em monômeros de glicose e subsequente conversão dos mesmos, por micro-organismos, em etanol. Portanto, torna-se necessário a realização de pré-tratamento da biomassa de forma a aumentar a exposição das fibras de celulose para a ação de agentes hidrolíticos enzimáticos ou ácidos.

O pré-tratamento é uma etapa crucial no processo de produção do etanol, uma vez que é necessário para redução da cristalinidade da celulose, dissociação do complexo lignina-celulose, maximizando a recuperação dos açúcares. Entretanto, a etapa de pré-tratamento deve cumprir o maior número possível das seguintes condições: ser eficiente em termos de rendimento, seletivo, baixa produção de resíduos tóxicos, consumo reduzido de insumos químicos e resultar na recuperação da maioria dos componentes lignocelulósicos para o aproveitamento das frações separadas na produção de combustível e outros produtos de alto valor agregado (Agbor et al, 2011).

A Figura 10 apresenta um esquema do pré-tratamento da biomassa onde se observa a alteração da sua estrutura com aumento da área superficial da porção de celulose.

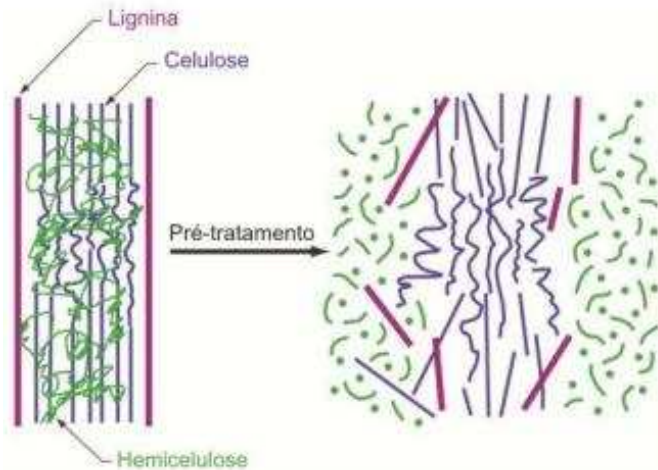


Figura 10 - Efeito do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica (Adaptado de Kondo et al., 1997).

A escolha do tipo de pré-tratamento é fundamental, pois esse processo influencia todas as etapas de processamento subsequentes, a eficiência e a economia do processo global no aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Existem diversos pré-tratamentos com diferentes efeitos e rendimentos e a escolha do mais adequado depende da biomassa empregada (Saddler & Kumar, 2013). Estes podem ser classificados em físicos, químicos, biológicos, além da combinação entre eles (Tabela 2).

Tabela 2 - Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para produção de etanol (Mood et al., 2013; Taherzadeh & Karimi, 2008; Teixeira et al., 2014; Sindhu et al., 2016).

Métodos	Pré-tratamento	Tipo de Alteração
Físicos/ Físico-químico	Moagem, micro-ondas, hidrotérmico, pirólise, extrusão, organosolve	Aumento da área de superfície, redução do grau de cristalinidade da celulose, remoção das hemiceluloses.
Químicos	Ácidos, alcalino, líquidos iônicos, ozonólise, amônia a vapor, SO ₂	Deslignificação, remoção das hemiceluloses com redução do grau de polimerização das porções de celulose
Biológicos	Fungos da podridão branca, fungos da podridão parda	Deslignificação, redução do grau de polimerização da celulose e hemiceluloses
Combinados	Alcalino e ácido, alcalino e líquidos iônicos, ácido diluído e explosão a vapor, fluido supercrítico e explosão a vapor, organosolve e biológico, ácido e micro-ondas, biológico e ácido diluído	Degradação das hemiceluloses, deslignificação, redução da cristalinidade da celulose

A etapa de pré-tratamento normalmente leva à formação de produtos como monômeros de pentoses e hexoses, ácidos orgânicos (principalmente ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico) e aldeídos furano (5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural). Após a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa, a lignina permanece como resíduo sólido, apesar de uma pequena parte ser degradada liberando compostos fenólicos entre outros compostos aromáticos (Jonsson et al., 2013) (Figura 12).

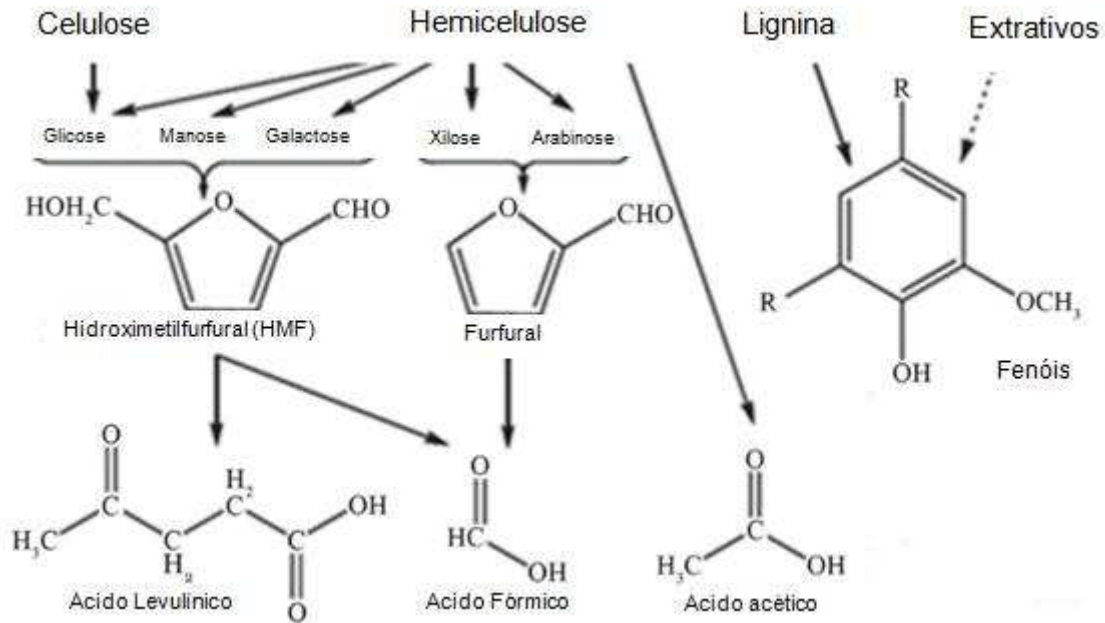


Figura 11 - Produtos e subprodutos do processo de pré-tratamento da biomassa (Adaptado de Reginatto & Antonio, 2015).

Estes compostos podem inibir o processo de fermentação interferindo nas funções celulares entre as quais a integridade da membrana plasmática, inibindo o crescimento das células, podendo até mesmo provocar a morte celular (Reginatto & Antonio, 2015). Os compostos fenólicos podem ainda interferir nas atividades das enzimas durante o processo de sacarificação (Kim et al., 2011).

2.4.1.1 Pré-tratamento Hidrotérmico

Um dos métodos de pré-tratamento mais promissores na desconstrução da biomassa lignocelulósica faz uso de condições hidrotérmicas, através do uso de água à temperatura e pressão elevadas, que provoca a hidrólise e degradação das hemiceluloses seguido por re-condensação da lignina (Donohoe et al., 2008).

Diferentemente do tratamento de explosão a vapor, o tratamento hidrotérmico não usa descompressão rápida e não emprega catalisadores ou produtos químicos. No entanto, assim como o tratamento ácido, causa a solubilização das hemiceluloses. Neste caso, os açúcares são removidos principalmente como oligossacarídeos e a formação dos inibidores como furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) é menor, dependendo das condições do processo. A remoção das

hemiceluloses também resulta na formação de ácido acético na fração líquida (Teixeira et al., 2014).

O pré-tratamento hidrotérmico possui a vantagem de não utilizar reagentes químicos poluentes, o que minimiza os impactos ambientais e reduz os custos além de resultar em um produto com alta digestibilidade enzimática, que são os principais benefícios para uma operação bem-sucedida em escala industrial (Ibbett et al., 2013).

Este tipo de pré-tratamento tem mostrado ser um método eficiente para tratamento de diferentes tipos de material lignocelulósico. Além disto, é referido como sendo capaz de solubilizar a maior parte das hemiceluloses da biomassa (> 80 %) aumentando, conseqüentemente, a digestibilidade da celulose (Mood et al., 2013).

Petrick et al. (2013) trataram a palha de trigo a 195 °C por 10 minutos seguida de hidrólise enzimática com carga enzimática de 15 FPU/g por 48 horas. Houve um aumento do rendimento de glicose da biomassa tratada de 93 % para 30 % da biomassa não tratada.

Saha et al. (2013) submeteram a palha de milho a pré-tratamento hidrotérmico à temperatura de 200 °C por 5 minutos e observaram um aumento da digestibilidade de 72 % da biomassa tratada para 28 % da biomassa não tratada.

O tratamento hidrotérmico é considerado uma técnica promissora como o primeiro passo no fracionamento e obtenção de produtos de alto valor agregado, de acordo com o conceito de biorrefinaria. Dependendo da condição operacional, esse tratamento pode causar diversos efeitos, incluindo a solubilização das hemiceluloses e a degradação/alteração da lignina. Devido a estes efeitos, os produtos obtidos são uma valiosa fonte de materiais para as indústrias química, farmacêutica, de alimentos e de energia (Ruiz et al., 2013).

2.4.1.2 Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio (NaOH)

Vários produtos químicos como ácidos, bases, álcoois, agentes oxidantes têm sido estudados como agentes no pré-tratamento da biomassa. Os pré-tratamentos alcalinos envolvem o uso de bases tais como amônia, hidróxidos de sódio, potássio, cálcio, amônio. Estes agentes são relativamente baratos, fáceis de manusear e degradam relativamente menos celulose e hemiceluloses (Heggset et al., 2016).

O principal efeito do tratamento alcalino é a remoção da lignina da biomassa reduzindo assim o impedimento estérico de enzimas hidrolíticas e melhorando a reatividade dos polissacarídeos na hidrólise (Teixeira et al., 2014). A eficácia do pré-tratamento alcalino é dependente da estrutura física e da composição química do substrato, bem como das condições de tratamento (Chen et al., 2013).

O Hidróxido de sódio é um dos catalisadores básicos mais fortes. Esta base forte ataca de forma eficaz a ligação entre lignina e hemiceluloses e, em particular, favorece a clivagem das ligações éster e carbono-carbono em moléculas de lignina (ácido ferúlico) (Kim et al., 2016).

Zhu et al. (2015) mostraram que a digestibilidade da biomassa aumentou cerca de 9 vezes em *Miscanthus* quando tratada com 0,2 M de NaOH à 180 °C durante 40 minutos. Além disso, a biomassa submetida ao pré-tratamento alcalino apresentou maior deslignificação (50,61 mg de lignina residual) em relação às biomassas pré-tratadas com 0,2 M de H₂SO₄ (117,8 mg de lignina residual) e submetida a pré-tratamento hidrotérmico (119,48 mg de lignina residual) nas mesmas condições (40 minutos, 180 °C).

Maryana et al. (2014) otimizaram as condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio utilizando bagaço de cana, obtendo como melhores condições de trabalho 1 N de NaOH à 100 °C durante 30 minutos, com aumento de percentual de celulose de 44,4 % (não tratado) para 62,3 %, e 60 % de deslignificação.

Gao et al. (2013) realizaram pré-tratamento de bagaço de cana utilizando 0,25 M de NaOH à 80 °C por 3 horas e obtiveram 78 % de deslignificação e um aumento de 40 % de conversão enzimática após sacarificação do material pré-tratado em relação ao não tratado.

Desse modo, o pré-tratamento alcalino utilizando hidróxido de sódio mostra ser eficaz na remoção da lignina da biomassa, promovendo o aumento dos rendimentos na etapa de hidrólise enzimática.

2.4.2 Hidrólise da Biomassa

A hidrólise pode ser realizada por meio de duas técnicas básicas: hidrólise com ácido ou hidrólise com enzima.

A hidrólise ácida pode ser realizada com ácido concentrado ou diluído. Técnica com ácido concentrado normalmente é feita a baixas temperaturas (cerca de 30 °C) e resulta em rendimentos altos tanto de hexoses quanto de pentoses (85-

90 % da teoria), causando apenas uma limitada quantidade de produtos de degradação de açúcares. Porém, o uso de grandes quantidades de ácido necessita de uma recuperação eficiente do mesmo. Além disto, requer o uso de equipamentos de material resistente devido à natureza corrosiva do ácido. O ácido diluído também pode ser usado, porém é necessário utilizar temperaturas mais altas (em torno de 180-230 °C) para que sejam alcançados altos rendimentos de glicose. Entretanto, altas temperaturas favorecem a degradação da celulose e hemiceluloses em produtos que podem inibir a etapa da fermentação (Ogeda & Petri, 2010; Huang & Fu, 2013).

A hidrólise enzimática requer uma etapa prévia de pré-tratamento de forma a aumentar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas aos biopolímeros. O processo enzimático é considerado mais vantajoso do que o uso de produtos químicos. As conversões enzimáticas permitem trabalhar em condições mais brandas além de possibilitar rendimentos mais próximos aos teóricos devido à alta especificidade das enzimas. Apesar destas vantagens, um grande desafio consiste em tornar o processo enzimático técnico e economicamente viável (Verardi et al., 2012). Apesar da redução significativa (20 vezes menor) nos custos de produção de enzimas relatadas pelas principais empresas produtoras de enzimas na última década, as enzimas ainda são responsáveis por pelo menos 15 % dos custos de produção do etanol de segunda geração (Várnai et al., 2013).

Muitos fatores podem influenciar na hidrólise enzimática da celulose em materiais lignocelulósicos: concentração de substrato, quantidade de lignina, cristalinidade da celulose, porosidade da fibra, grau de polimerização, conteúdo das hemiceluloses, composição e quantidade do coquetel enzimático (Alvira et al., 2010; Kadam et al., 2004).

A degradação completa da celulose é atribuída a ação sinérgica de três celulasas, sendo estas: endoglucanases (EGs, EC 3.2.1.4), exoglucanases (CBHs, EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). Endoglucanases atuam de forma aleatória nas ligações glicosídicas internas, na porção amorfa de celulose, liberando oligossacarídeos em vários graus de polimerização. Exoglucanases (celobiohidrolases, CBHs) são divididos em duas categorias: o Tipo I atua a partir da extremidade redutora da cadeia, enquanto as enzimas do tipo II atuam na extremidade não redutora da cadeia de celobiose (dímero de glicose). Beta-glicosidases hidrolisam a celobiose em moléculas de glicose (Juturu & Yu, 2014).

Estudos recentes apontam a participação das enzimas CBM33 e GH61 (monooxigenases líticas de polissacarídeo), além das CDH (celobiose desidrogenase) na degradação do polímero de celulose juntamente com as celulases (Figura 12) (Dimarogona et al., 2013). Essas enzimas são classificadas de "Atividades Auxiliares" (AA), uma nova categoria de enzimas criada no banco de dados do CAZy (www.cazy.org.br), que reúne as monooxigenases líticas de polissacarídeo e enzimas redox envolvidas na degradação de lignina (Dutta & Wu, 2014).

As enzimas CBM33 e GH61, atualmente classificadas de AA9 e AA10 respectivamente, ligam-se em regiões cristalinas do polímero de celulose, atuando por meio de mecanismo oxidativo, dependentes de íons bivalentes, oxigênio molecular e doadores de elétrons, levando à quebra de ligações glicosídicas e aumentando o acesso das celulases à biomassa (Corrêa et al., 2016).

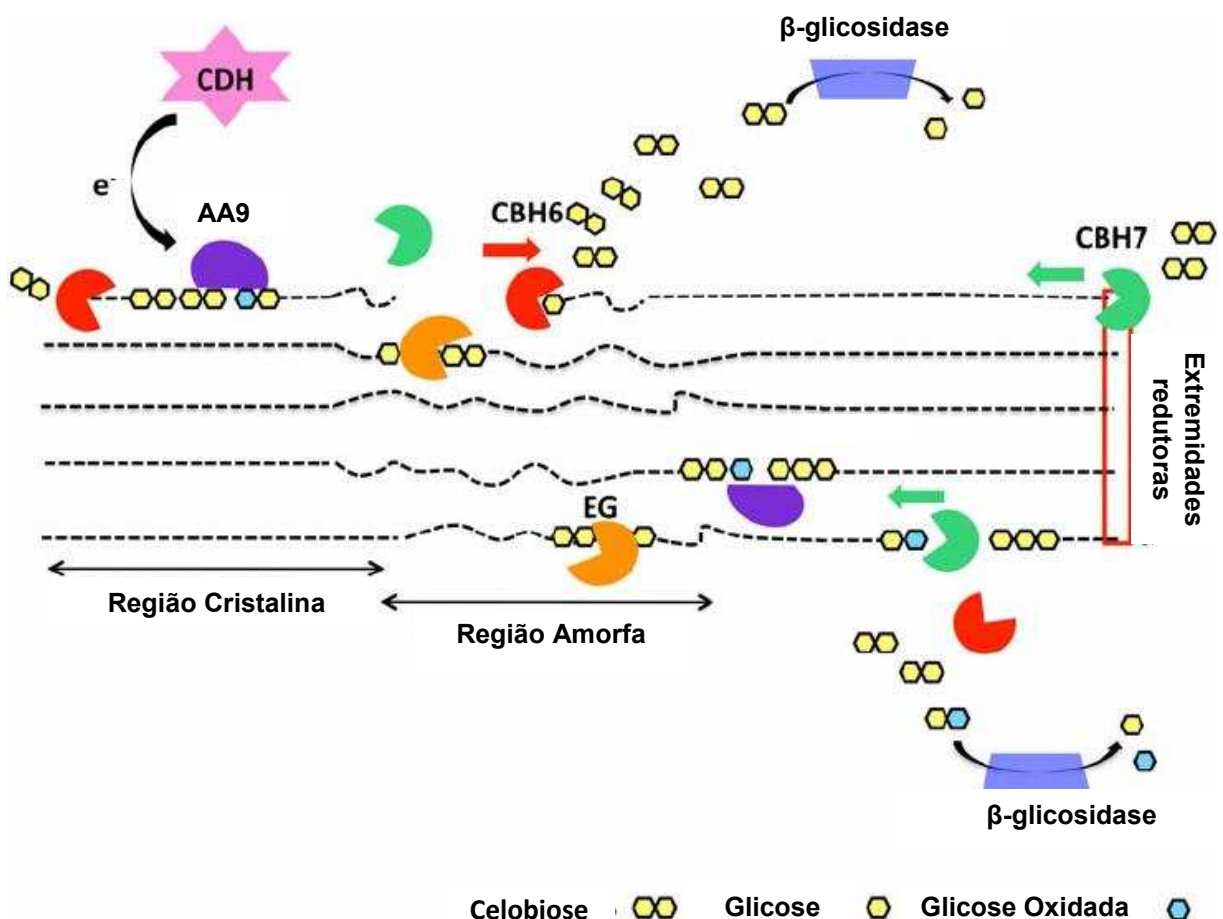


Figura 12 - Um esquema atual simplificado da degradação enzimática da celulose, envolvendo EG, CBHs, β -glicosidase, CDH, AA9, monooxigenases (Adaptado de Dimarogona et al., 2013).

Estruturalmente, as celulasas são compostas por um domínio catalítico (CD - *Catalytic domain*) que pode estar ligado a outros domínios modulares, incluindo os módulos de ligação à celulose (CBM - *Carbohydrate Binding Module*). Desse modo, em um dos domínios reside a atividade catalítica, no outro, a capacidade de ligação à celulose. O CBM tem papel principal de aumentar a concentração de enzimas na superfície do polissacarídeo, auxiliando a adsorção da enzima ao substrato, ainda que possa promover ligações improdutivas no substrato (Pakarinen et al., 2014). Os CBM aumentam a adsorção das CDs ao substrato, promovem o alinhamento das fibrilas de celulose para melhor ancoragem das CDs, modificando a estrutura do substrato para facilitar a hidrólise enzimática (Reyes-Ortiz et al., 2013).

As celulasas podem ser produzidas por uma grande variedade de micro-organismos mas apenas alguns produzem níveis elevados de celulasas extracelular capazes de solubilizar celulose cristalina (Behera & Ray et al., 2016). As celulasas são produzidas principalmente por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma Sp.* O *Trichoderma reesei* foi o primeiro fungo a ser utilizado na produção industrial de celulase, permanecendo ainda como a fonte mais utilizada. Este fungo produz duas exoglucanases, ao menos cinco endoglucanases e duas β -glicosidades. Já o fungo filamentoso *Aspergillus* é tido como melhor produtor de exo e endoglicosidades e é reconhecido pelas elevadas concentrações de β -glicosidades, o que representa uma vantagem no processo de sacarificação da biomassa (Rodríguez-Zuñiga et al., 2014). A combinação das enzimas produzidas varia entre as espécies do micro-organismo.

2.4.3 Fermentação Alcoólica

Após hidrólise enzimática, é necessária a etapa de fermentação que consiste em um processo biológico anaeróbico em que os açúcares liberados na hidrólise enzimática são convertidos a etanol por meio de ação microbiana. Essa etapa do processo pode ocorrer juntamente com sacarificação – Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), ou separadamente - Sacarificação e Fermentação em Separado (SHF).

O processo de sacarificação e fermentação em separado (SHF) é o método convencional que se baseia em duas etapas, em que a hidrólise e a fermentação ocorrem separadamente. Esta técnica permite que cada etapa (hidrólise e fermentação) ocorram em condições ótimas, geralmente com hidrólise a 50 °C,

enquanto que a temperatura ótima da fermentação se dá pelo micro-organismo produtor de etanol, geralmente *Saccharomyces cerevisiae*, em torno de 32 °C (Dahnum et al., 2015).

No processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), a hidrólise enzimática e a fermentação ocorrem em um mesmo reator. Esse método foi primeiramente apresentado por Gauss et al. 1976. Os autores afirmaram que o rendimento em glicose de uma hidrólise enzimática tradicional separada foi baixo, provavelmente pela inibição provocada pelos produtos finais, glicose e celobiose. Os autores, no entanto, mostram que no processo SSF foi obtido um rendimento mais elevado, o qual foi atribuído à remoção de glicose e celobiose a partir da fermentação e a conseqüente diminuição da inibição pelo produto final (Olofsson et al., 2008). A redução da inibição pelo produto final não é considerada a única vantagem do processo SSF. O processo SSF possui menor custo e tempo de processo, uma vez que não necessita de reatores para hidrólise e fermentação, utilizando apenas um reator para as duas etapas. Vários compostos inibidores da hidrólise enzimática, presentes em hidrolisados oriundos de pré-tratamento, podem ser consumidos durante a fermentação. Esta pode ser uma explicação provável por trás dos maiores rendimentos de etanol em processos SSF comparados com SHF (Tengborg et al., 2001).

No entanto, o processo apresenta algumas desvantagens em relação ao processo SHF, como, por exemplo, a necessidade de encontrar condições favoráveis (temperatura, pH) de condução do processo de hidrólise enzimática dentro da faixa ótima do micro-organismo fermentador, dificultando a otimização dos processos. Além disto, há a dificuldade de reciclar o micro-organismo fermentador e as enzimas (Ask et al., 2012).

Uma outra forma de processo tem sido estudada com o objetivo de diminuir as desvantagens do processo SSF, a sacarificação e fermentação semi-simultânea (SSSF). Este processo é dividido em duas fases: pré-hidrólise, em que se adiciona apenas substrato e enzima, incubados em condições ótimas de hidrólise por um curto período de tempo. Posteriormente, a temperatura é diminuída e são adicionadas leveduras, iniciando processo de SSF. A principal vantagem do processo SSF é a hidrólise nas condições ótimas das enzimas, o que possibilita o início da fermentação com uma concentração de açúcar superior ao inicial do processo SSF (Gonçalves et al., 2014).

Em todos os processos descritos anteriormente faz-se necessário a adição de enzimas para produção de etanol. O bioprocesso consolidado (CBP) é uma abordagem recente que combina a produção de enzimas, sacarificação e fermentação numa única etapa e realizado pelo mesmo micro-organismo. Para isto, é necessária a modificação de micro-organismos, tornando-os capazes de produzir enzimas celulases e hemicelulases além de realizar a fermentação alcoólica. A aplicação do CBP possui menores custos com aquisição e produção de enzimas, sendo uma das principais vantagens dessa técnica. Todavia, ainda não existem micro-organismos capazes de produzir enzimas e etanol em níveis desejáveis, embora já existam alguns micro-organismos capazes de realizar as duas funções (Hasunuma & Kondo, 2012).

A Figura 13 apresenta um resumo das técnicas de produção do etanol de segunda geração.

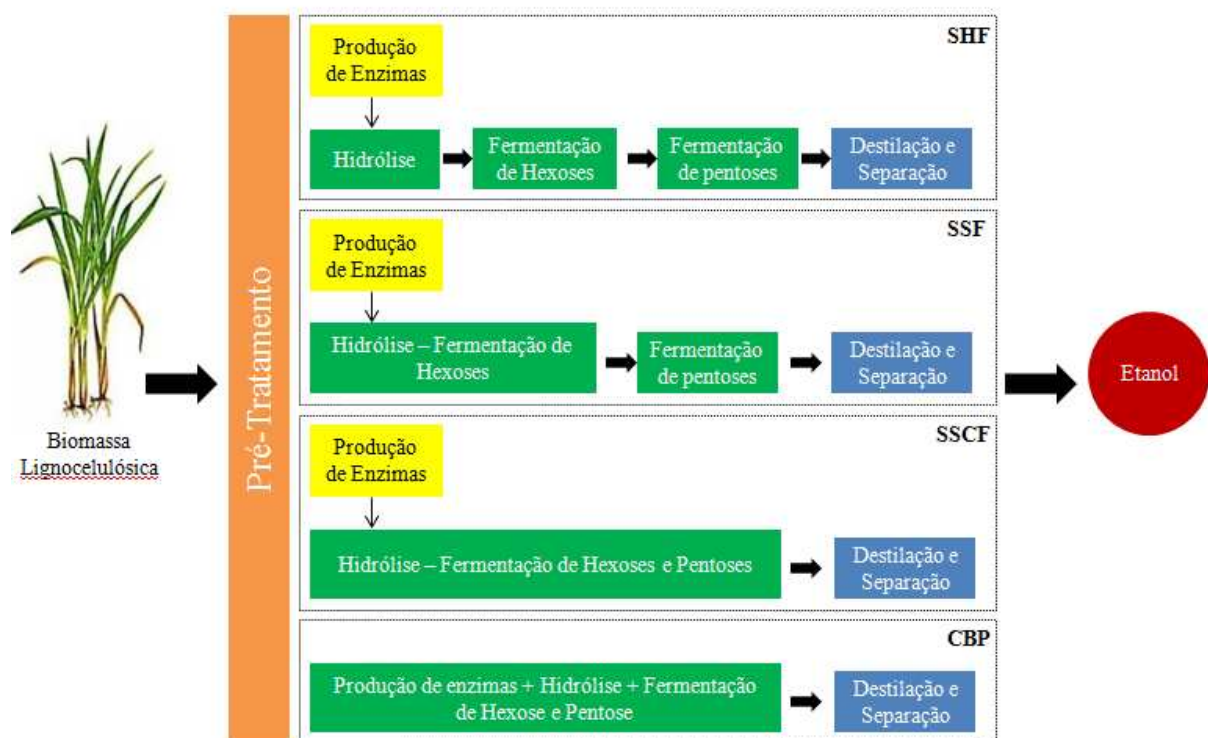


Figura 13 - Técnicas de produção do etanol de segunda geração (Adaptado de Devarapalli & Atiyeh, 2015).

A Tabela 3 apresenta comparação entre as diferentes técnicas de produção de etanol de segunda geração.

Tabela 3 - Comparação dos diferentes processos fermentativos para etanol de segunda geração (Harun et al., 2011).

Processos	Vantagens	Desvantagens
SHF	Hidrólise e Fermentação são realizadas nas condições ótimas	Efeito inibidor, contaminação
SSF	Menor carga enzimática, alto rendimento de etanol, menor efeito inibitório, menor contaminação	Hidrólise e fermentação não ocorrem nas condições ótimas, menor controle do processo
SSCF	Menor tempo, alto rendimento de etanol, menor risco de contaminação	Hidrólise e fermentação não ocorrem nas condições ótimas, maior carga enzimática
CBP	Custo benefício, energeticamente eficiente.	Falta de micro-organismos disponíveis, menor controle do processo

Independente da rota tecnológica, o principal desafio para produção do etanol de segunda geração envolve o custo de produção. Neste sentido, tornam-se necessários avanços em pesquisas no desenvolvimento de processos de pré-tratamento mais eficientes, melhoria dos coquetéis enzimáticos, avanços na área de engenharia genética na descoberta de novos micro-organismos para alcançar a produção de bioetanol sustentável.

Além disto, pesquisas com diferentes matérias-primas também são necessárias para a produção desse combustível, uma vez que o Brasil se destaca como um dos maiores produtores agrícolas do mundo e, em consequência disto, é capaz de gerar grandes quantidades de rejeitos e resíduos agroindustriais. A bananeira está entre as biomassas mais acessíveis. O aproveitamento do pseudocaule da banana pode servir como fonte alternativa e renovável de energia, além de contribuir com a redução de resíduos no meio ambiente, o que pode agregar valor à matriz produtiva da fruta e reduzir o risco de perdas provocado por sua comercialização.

3. Material e Métodos

3.1 Matéria-prima

O pseudocaule de bananeira utilizado nesse trabalho foi gentilmente fornecido pela UNIMONTES/Campus Janaúba, localizado no município de Janaúba-MG.

O pseudocaule de bananeira, obtido de bananeira cultivar Prata anã, foi colhido manualmente, cortado em pedaços menores, secos em temperatura ambiente até apresentarem umidade em torno de 15 %. Após o período de secagem, foram submetidos a um processo de moagem com objetivo de reduzir o tamanho das partículas, utilizando um desintegrador (moinho martelo) com peneira de 20 mesh. Em seguida os materiais foram armazenados em sacos plásticos, hermeticamente fechados, e armazenados a - 20 °C para evitar crescimento de micro-organismos.

3.2 Pré-tratamento

Os materiais moídos (20 mesh) foram enviados em sacos hermeticamente fechados para Institute of Food Research - IFR em Norwich, Reino Unido. Antes de efetuar os pré-tratamentos, as amostras de pseudocaule de bananeira foram moídas em moinho criogênico modelo Spex Modelo 6700 (Spex Industries, Inc., Edison, NJ).

Foram realizados pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino utilizando hidróxido de sódio. As variáveis avaliadas nessa etapa foram temperatura e concentração de NaOH, com o objetivo de obter maior teor de fração celulósica, extraíndo maior quantidade de interferentes (hemiceluloses e lignina).

No pré-tratamento hidrotérmico amostras de 0,75 g pseudocaule de bananeira moído foram tratadas com 14,25 mL de água milli-Q durante 10 minutos utilizando micro-ondas Biotage[®] Initiator nas seguintes temperaturas: 130 °C, 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C, 200 °C, 210 °C, 220 °C e 230 °C. Os ensaios de 220 °C e 230 °C não foram feitos nessas temperaturas e sim a 210 °C, levando-se em conta o fator de severidade de cada condição. Assim o ensaio de 220 °C por 10 minutos foi feito à 210 °C por 20 minutos por apresentarem mesmo fator de severidade. O mesmo foi realizado com o ensaio à 230 °C por 10 minutos, que possui mesmo fator de severidade da condição de 210 °C por 40 minutos.

Para o pré-tratamento com NaOH foi realizado um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) considerando 2 variáveis independentes em 2 níveis e com 4 repetições do ponto central. Foram utilizadas amostras de 0,75 g de pseudocaule de bananeira moído contendo 14,25 mL de soluções de NaOH em

concentrações pré-determinadas pelo planejamento. Os pré-tratamentos foram realizados em micro-ondas Biotage® Initiator.

A Tabela 4 apresenta os valores utilizados no planejamento experimental.

Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR para as variáveis independentes avaliadas no pré-tratamento com NaOH.

Variáveis	Níveis				
	-1,21	-1	0	+1	+1,21
Temperatura (°C)	182	190	210	230*	238*
% NaOH (p/v)	0,3	0,5	1,0	1,5	1,7

* Foram realizados à 210 °C, considerando fator de severidade.

Assim como no tratamento hidrotérmico, os ensaios nas temperaturas de 230 °C e 238 °C foram realizadas a 210 °C por 40 minutos e 60 minutos respectivamente, levando-se em conta o fator de severidade de cada condição.

Os valores de hidrólise enzimática do pré-tratamento alcalino com NaOH foram então utilizados para análise, visando a maximização da liberação de glicose. Nesta etapa foi utilizado o programa computacional Design-Expert 7.0.

Ao final de cada pré-tratamento, os frascos contendo meios reacionais (licor + biomassa tratada) foram centrifugados por 15 minutos a 2000 rpm para coleta dos licores. As biomassas pré-tratadas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL, completando o volume para 30 mL com água milli-Q. Os sólidos pré-tratados foram lavados 4 vezes, sendo o conteúdo final avolumado para 30 mL com água milli-Q e mantidos em freezer (-18 °C) para análise da matéria seca, quantificação dos carboidratos dos sólidos, além dos processos de hidrólise enzimática e SSF.

As lavagens foram coletadas juntamente com os licores e mantidos à -18 °C para análises posteriores.

3.2.1 Cálculo do Fator de Severidade

O índice de severidade permite avaliar o quão severo foi o pré-tratamento empregado no material vegetal através da relação entre temperatura de pré-tratamento e tempo de reação.

O fator de severidade foi calculado de acordo com a equação 1, conforme proposto por Overend et al, 1987.

$$\text{Fator de Severidade} = \text{Log}_{10} [t(\text{min}) \cdot \exp^{(T(^{\circ}\text{C})-100/14,75)}] \quad (1)$$

Onde t é o tempo de pré-tratamento e T é a temperatura empregada no processo.

3.3 Determinação da matéria seca dos pré-tratados

Foram transferidas 0,84 mL do conteúdo dos tubos Falcon (sólido pré-tratados + água Milli-Q) para microtubos de 1 mL previamente pesados. As placas contendo os tubos foram mantidas em liofilizador (Lyotrap LTE scientific Ltd., Reino Unido) até completa secagem dos sólidos. Em seguida, as placas foram transferidas para dessecador e após atingirem a temperatura ambiente, cada microtubo foi pesado, determinando-se assim a matéria seca das amostras.

3.4 Quantificação dos Carboidratos

A quantificação do teor de carboidratos (glicose, xilose, arabinose, galactose, manose, fucose) dos pré-tratados sólidos foram baseadas nos procedimentos padrões descritos por Renewable Energy Laboratory (NREL) (NREL, 2011).

Após realização das etapas de hidrólise enzimática e SSF, o restante do conteúdo dos tubos Falcon (pré-tratado sólido + água milli-Q) foi liofilizado até completa secagem dos sólidos.

Pesou-se aproximadamente 0,5 mg de cada amostra de pseudocaule de bananeira seco, em tubos de ensaio devidamente etiquetados. Adicionou-se 200 μL de H_2SO_4 (p/p) 72 % e duas esferas de vidro em cada tubo para agitação ocasional durante incubação de 3 horas em temperatura ambiente.

Depois de transcorrido o tempo da hidrólise ácida, foi adicionado 2,2 mL de água a cada tubo, seguida de agitação, resultando em uma concentração de H_2SO_4 de 1 M. Para completa hidrólise dos oligômeros, os tubos foram incubados a 100 °C por 2,5 horas e em seguida, foram adicionados 200 μL de solução de 2-deoxiglicose (padrão interno) 1,0 mg/mL.

Após serem centrifugados (3500 rpm por 3 min), foi transferido 1,0 ml de cada sobrenadante para outros tubos vazios devidamente identificados. Adicionou-se a esses tubos, 300 μL de solução NH_3 (p/p) 25 %, seguido de agitação. Adicionou-se 100 μL de NH_3 3 M contendo 150 mg/mL de NaBH_4 , seguido de 1 hora de incubação a 30 °C.

Após esse período, os tubos foram mantidos em gelo durante adição de 200 µL de ácido acético glacial e 450 µL de 1-metilimidazona e 3,0 mL de anidrido acético. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 30 °C. Transcorrido o tempo de incubação, adicionou-se 3,5 mL de água destilada e 3,0 mL de diclorometano. Após os tubos serem centrifugados (3000 rpm por 3 minutos), a fase orgânica foi transferida para novos tubos vazios e devidamente identificados. Adicionou-se 2,0 mL de diclorometano aos primeiros tubos, com objetivo de retirar toda a fase orgânica, transferindo-a para os novos tubos já contendo parte da fase orgânica.

Os tubos contendo fase orgânica foram incubados em fluxo laminar sob gás nitrogênio a 40 °C utilizando bloco digestor para evaporação do diclorometano.

Após evaporação completa do diclorometano, adicionou-se 1,0 mL de acetona e em seguida transferiu-se o conteúdo para vials para posterior análise dos monômeros de açúcares por Cromatografia Gasosa em um sistema PerkinElmer Autosystem XL GC (PerkinElmer, Seer Green, Bucks., UK) contendo coluna Rtx®-225 (Thames Restek UK Ltd, Saunderton, UK).

Foram preparadas curvas padrão de concentrações dos monômeros de açúcares (glicose, xilose, arabinose, manose, fucose, ramnose) (apêndice A). Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.5 Micro-organismo

Nos experimentos de avaliação da fermentabilidade do pseudocaule de bananeira, utilizou-se a estirpe da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826 (Coleção Nacional de Culturas de Leveduras, Norwich, Reino Unido).

3.5.1 Manutenção da levedura

As leveduras cultivadas foram mantidas em meio sólido inclinado (Tabela 5), durante 2 dias a 25 °C, e em seguida foram mantidas sob refrigeração (4 °C) (Elliston et al., 2013).

Tabela 5 - Composição do meio de cultura para manutenção da *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826.

Componente do meio de cultura	Concentração (%)
Glicose	1,0
Peptona	0,5
Extrato de levedura	0,3
Extrato de malte	0,3
Ágar	2,0

3.5.2 Preparação do Inóculo

A cultura estoque foi ativada através do repique do estoque em frascos contendo 10,0 mL de meio de cultura líquido base de nitrogênio para levedura (YNB), seguido de incubação a 25 °C por 3 dias.

Após esse período, os conteúdos dos frascos foram transferidos para tubo Falcon de 50 mL, sendo o frasco centrifugado a 2000 rpm por 3 minutos (Centrífuga 5810 R, Eppendorf Ltd., Stevenage, Reino Unido), o sobrenadante descartado e as células das leveduras ressuspensas utilizando 30 mL de meio YNB. Foi realizada uma nova centrifugação e descarte do sobrenadante, e ressuspensão das células utilizando 30 mL de meio YNB + tampão acetato de sódio pH 5,0. O conteúdo do tubo Falcon foi transferido para balão volumétrico 50 mL, completado volume com YNB + tampão. Uma amostra do inóculo foi coletada para posterior quantificação celular.

Todo o procedimento de preparo do pré-inóculo de fermentação foi realizado em ambiente estéril.

3.5.3 Quantificação celular

As células pré-cultivadas foram quantificadas utilizando um leitor de contagem de células (NucleoCounter® YC-100™, ChemoMetec, Allerød, Dinamarca) para identificação de células mortas e células totais.

A quantificação das células totais foi realizada pela leitura direta da solução do inóculo, sem diluir. A quantificação das células mortas foi realizada pela suspensão da 10 µL da solução do inóculo em 490 µL de tampão de lise e posterior leitura no leitor de contagem de células.

Para quantificar o total de células viáveis do cultivo, calculou-se a diferença entre o total de células totais e o total de células mortas.

3.6 Hidrólise enzimática e SSF

3.6.1 Hidrólise enzimática e SSF em microtubos de 1 mL

Para hidrólise enzimática e SSF foram utilizadas placas contendo 96 microtubos de 1 mL cada (Elliston et al., 2015).

No processo de hidrólise enzimática, cada microtubo continha 0,84 mL do conteúdo dos tubos Falcon (sólido pré-tratado + água Milli-Q) e meio YNB tamponado com acetato de sódio (pH 5,0) contendo celulasas comerciais Cellic Ctec 2 (Ctec 2, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) com carga enzimática de 50 FPU/g de sólido e 0,1 g/L de reagente Timerosal para evitar contaminação microbiana. A cada microtubo foram adicionadas duas esferas de vidro para facilitar agitação.

Em SSF cada microtubo continha 0,84 mL do conteúdo dos tubos Falcon (sólido pré-tratado + água Milli-Q) e meio YNB tamponado com acetato de sódio (pH 5,0) contendo celulasas comerciais Cellic Ctec 2 (Novozymes) com carga enzimática de 50 FPU/g de sólido e suspensão da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826.

As placas de hidrólise enzimática e SSF foram incubados em sala climatizada a 25 °C em shaker rotativo sob agitação de 120 rpm por 120 horas. Ao final da hidrólise e SSF, amostras de cada microtubo foram coletadas para quantificação de açúcares e etanol por HPLC.

3.6.2 Hidrólise enzimática e SSF em tubos de 20 mL

A análise dos resultados de hidrólise enzimática dos pré-tratados hidrotérmico e alcalino com NaOH permitiu selecionar as melhores condições de cada tipo de pré-tratamento considerando a quantidade de glicose liberada. Dessa forma a melhor condição de cada pré-tratamento foi submetida a hidrólise enzimática e SSF em maior escala (tubos de 20 mL) avaliando diferentes temperaturas de incubação.

Os experimentos foram realizados em frascos de 20 mL, em volume total de 10 mL sendo 9 mL de solução contendo pseudocaule de bananeira (pré-tratado e *in natura*) + 1 mL de solução contendo enzima, leveduras e meio de cultura YNB (SSF) ou enzima, meio YNB e Timerosal (hidrólise enzimática).

Os tubos para SSF foram submetidos a incubações em temperaturas de 25 °C e 37 °C e os tubos de hidrólise enzimática submetidos a temperaturas de 25 °C e 50 °C. A condução dos experimentos foi semelhante aos descritos no item 3.6.1 exceto a escala dos processos e temperaturas de incubação empregados. Ao final da hidrólise e SSF, amostras de cada tubo foram coletadas para quantificação de açúcares e etanol.

3.7 Métodos Analíticos

3.7.1 Determinação dos açúcares e etanol

As amostras coletadas de todos os experimentos foram filtradas em filtro de 0,22 µm e em seguida adicionados em vials devidamente selados e identificados. A determinação da concentração de glicose e etanol foi realizada por HPLC (LC Série 200, Perkin Elmer, vidente Green, Reino Unido) equipado com um detector de índice de refração, utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Reino Unido), coluna de guarda operando a 65 °C utilizando 5 mM H₂SO₄ como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL/min.

O rendimento da hidrólise enzimática foi determinado a partir da porção de celulose hidrolisada, representada pela concentração de glicose liberada após o processo de hidrólise enzimática, calculado de acordo com a seguinte fórmula (NREL, 2008) (equação 2):

$$\text{Conversão enzimática (\%)} = \frac{[\text{glicose}] \times 0,9}{\text{celulose (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo: glicose = concentração de glicose após hidrólise enzimática (g/L)

celulose = massa de celulose na biomassa (g)

Em relação ao rendimento de etanol, o cálculo foi realizado considerando que toda a porção de glicose dos materiais estariam disponíveis para conversão para fermentação, considerando que a partir de 1 g de glicose são geradas 0,511 g de etanol (coeficiente de Gay - Lussac) (equação 3).

$$\text{Rendimento de Etanol (\%)} = \frac{[\text{etanol}]}{[\text{glicose inicial}] \times 0,511} \times 100 \quad (3)$$

Sendo: etanol = concentração final de etanol (g/L)
glicose = concentração inicial de glicose (g/L)
0,511 = fator de conversão de glicose para etanol.

3.7.2 Quantificação dos licores e águas de lavagens provenientes dos pré-tratamentos

Os licores e águas de lavagens de cada condição de pré-tratamento foram coletados e filtrados em filtro de 0,22 μm e em seguida adicionados em vials devidamente selados e identificados.

Os licores foram analisados quanto ao teor de açúcares (glicose, xilose), furfurais (furfural e hidroximetilfurfural) e ácido acético utilizando HPLC equipado com detector de índice de refração e detector de arranjo de fotodiodos a 210 nm, coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, Reino Unido), coluna de guarda operando a 65 °C utilizando 5 mM H_2SO_4 como fase móvel, a uma vazão de 0,6 mL/min.

4. Resultados e Discussões

4.1 Pré-tratamento Hidrotérmico do Pseudocaule de Bananeira

O pré-tratamento hidrotérmico tem a função de reduzir a recalcitrância da biomassa vegetal utilizando calor e pressão para quebrar as ligações complexas entre lignina, celulose e hemiceluloses. O mecanismo principal envolve a remoção de hemiceluloses, expondo a fração remanescente de celulose, tornando-a mais acessível à digestão enzimática (Agbor et al., 2011). Amostras de pseudocaule de bananeira foram submetidas a pré-tratamento hidrotérmico ao longo de uma faixa de temperaturas de 130 °C a 210 °C. Na Tabela 6 estão dispostos os rendimentos de recuperação da fração insolúvel após o pré-tratamento hidrotérmico, bem como os valores do fator de severidade de cada condição realizada.

Tabela 6 - Rendimentos de recuperação do pseudocaule de bananeira após pré-tratamento hidrotérmico e o fator de severidade de cada condição de pré-tratamento.

Ensaio	Fator de severidade	Rendimento* (%)
130 °C / 10 min	1,88	75,49
150 °C / 10 min	2,47	73,81
160 °C / 10 min	2,77	72,65
170 °C / 10 min	3,06	71,49
180 °C / 10 min	3,36	70,15
190 °C / 10 min	3,65	67,80
200 °C / 10 min	3,94	61,49
210 °C / 10 min	4,24	61,89
210 °C / 20 min	4,53	61,18
210 °C / 40 min	4,84	57,20

* Rendimento em relação à fração sólida

Os rendimentos das reações de pré-tratamento hidrotérmico apresentaram faixa percentual de 57-75 %, sendo que os menores valores se referem aos maiores fatores de severidade. Fator de severidade é determinado pela temperatura e tempo de pré-tratamento. O aumento da temperatura e tempo de pré-tratamento favorece a solubilização dos componentes da biomassa, principalmente polissacarídeos não-celulósicos. A maior perda de sólido foi referente ao maior fator de severidade (4,84), aproximadamente 43 % dos componentes do pseudocaule foram solubilizados e removidos através das lavagens realizadas logo após o pré-tratamento. Já a condição que apresentou o maior rendimento foi obtido no fator de severidade de 1,88 (130 °C / 10 min) com 75,49 % de recuperação percentual de sólido (24,51 % dos componentes solubilizados). A Tabela 7 apresenta a composição dos açúcares dos sólidos *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico. Os percentuais de glicose foram multiplicados pelos respectivos rendimentos de reação para analisar as alterações na composição do pseudocaule de bananeira pré-tratado em relação ao material *in natura*.

Tabela 7 - Composição dos açúcares da fração sólida do pseudocaule de bananeira *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.

Ensaio	Carboidratos (p/p) % matéria seca							Rendimento (%)	Glicose* (%)
	Ram	Fuc	Arab	Xil	Man	Gal	Glic		
130 °C / 10 min	0,30	0,09	5,05	10,00	0,82	1,13	45,34	75,49	34,23
150 °C / 10 min	0,33	0,10	5,05	9,64	0,80	1,03	45,97	73,81	33,93
160 °C / 10 min	0,37	0,11	5,59	10,44	0,93	1,25	49,63	72,65	36,06
170 °C / 10 min	0,33	0,09	4,85	10,18	0,87	1,03	48,52	71,49	34,68
180 °C / 10 min	0,34	0,09	5,12	11,06	0,92	1,08	53,04	70,15	37,21
190 °C / 10 min	0,33	0,07	4,30	10,71	0,95	0,95	55,20	67,80	37,43
200 °C / 10 min	0,28	0,05	2,94	8,76	0,89	0,73	53,75	61,49	33,05
210 °C / 10 min	0,26	0,04	1,69	6,96	0,88	0,56	55,76	61,89	34,51
210 °C / 20 min	0,26	0,05	2,08	6,22	0,85	0,52	56,79	61,18	34,74
210 °C / 40 min	0,26	0,03	1,14	4,40	0,78	0,25	60,75	57,20	34,75
<i>In natura</i>	0,30	0,08	4,62	8,35	0,83	0,81	39,62	100,00	39,62

* Glicose: percentuais de glicose corrigidos pelos respectivos rendimentos. Cálculo do ensaio 130 °C / 10 min: $45,34 \times 0,7549 = 34,23$. Ram: Ramnose, Fuc: Fucose, Arab: Arabinose, Xil: Xilose, Man: Manose, Gal: Galactose, Glic: Glicose. Os valores foram calculados com os seguintes desvios-padrão: Ram: 0,06-0,00; Fuc: 0,03-0,00; Arab: 0,87-0,00; Xil: 0,89-0,19; Man: 0,08-0,00; Gal: 0,19-0,01; Glic: 2,99-0,01.

A análise da influência da variável temperatura sobre a porcentagem relativa dos monômeros de açúcar na fração sólida pré-tratada do pseudocaule de bananeira revelou que apenas o monossacarídeo manose não foi estatisticamente significativo ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). Vale ressaltar que a análise estatística mostrou que o modelo polinomial descreve melhor as porcentagens relativas dos monômeros em função da temperatura, com exceção da glicose que foi descrita por uma equação linear. Os gráficos e tabelas dos efeitos e coeficientes de regressão de cada monômero estão apresentados no apêndice B.

Os resultados da Tabela 7 mostraram que, independente da condição de pré-tratamento empregada, as porcentagens relativas de glicose foram maiores em relação ao percentual obtido para o material *in natura*. Este resultado pode ser atribuído, principalmente, à remoção de outros açúcares como fucose, arabinose e xilose após o pré-tratamento.

Pôde-se observar que a maior solubilização desses açúcares ocorreu no pré-tratamento a 210 °C por 40 minutos, tendo sido removidos em torno de 60 % de fucose, 75 % de arabinose e 47 % de xilose.

Foram encontradas pequenas porcentagens de manose (0,78-0,95 %), galactose (0,25-1,08 %), ramnose (0,26-0,37 %) e fucose (0,03-0,1 %) nos materiais sólidos, sendo que os menores valores foram detectados no maior fator de severidade (210 °C / 40 min). A presença desses açúcares (além de parte do conteúdo de arabinose) podem ser derivados de polímeros de pectina presentes no material vegetal (Martins et al., 2016).

Além da solubilização das hemiceluloses, a preservação da fração celulósica é outro fator importante relacionado à eficiência de tratamento, no que diz respeito à produção de etanol celulósico. Dentre as condições estudadas, o pré-tratamento a 210 °C por 40 minutos obteve a maior solubilização de xilose e arabinose, principais componentes das hemiceluloses, e maior porcentagem relativa de glicose no material, alcançado 61 % em relação a 39 % de glicose encontrados no material *in natura*. Entretanto, levando-se em consideração o rendimento dos sólidos pré-tratados, o ensaio realizado a 190 °C obteve o maior teor de glicose (37,43 %) dentre os demais materiais pré-tratados.

Silva et al. (2009) realizaram pré-tratamento do pseudocaule de bananeira utilizando 1 % (m/v) de H₂SO₄ à 120 °C por 10 minutos obtendo 55,8 % de celulose e 12 % de hemiceluloses em material pré-tratado em relação a 47 % de celulose e 17,3 % de hemicelulose obtidos do material não tratado. Ambye-Jensen et al. (2014) realizaram pré-tratamento hidrotérmico sobre *Grass silage* que resultou em um aumento de glicose de 25,2 % para 42,8 % e apenas 4 % de solubilização de xilose no pré-tratado hidrotérmico a 190 °C por 10 minutos, em relação ao material não tratado.

Assim, pode-se concluir que o rendimento dos sólidos pré-tratados, o aumento da concentração da glicose e a redução dos demais açúcares dependem da severidade das condições do pré-tratamento.

4.1.1 Quantificação dos licores e águas de lavagens

A Tabela 8 apresenta as concentrações e os desvios médios de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, xilose, arabinose e glicose após o pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira.

Tabela 8 - Composição dos licores obtidos de amostras de pseudocaule de bananeira após pré-tratamento hidrotérmico.

Ensaio	Licor (g/100 g de biomassa)					
	Furfural	HMF	Ácido Acético	Xilose	Glicose	Arabinose
130 °C / 10 min	0	0	0,53 ± 0,04	0,64 ± 0,08	0	0
150 °C / 10 min	0	0	0,65 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0	0
160 °C / 10 min	0	0	0,67 ± 0,05	0,41 ± 0,04	0	0
170 °C / 10 min	0	0	0,76 ± 0,01	0,34 ± 0,04	0	0,07 ± 0,00
180 °C / 10 min	0	0	0,86 ± 0,00	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,02	0,20 ± 0,03
190 °C / 10 min	0	0	0,94 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,18 ± 0,03	0,54 ± 0,00
200 °C / 10 min	0,05 ± 0,01	0	1,12 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,48 ± 0,17
210 °C / 10 min	0,08 ± 0,02	0	1,27 ± 0,27	0,16 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,29 ± 0,07
210 °C / 20 min	0,23 ± 0,02	0,03 ± 0,00	1,78 ± 0,33	0,20 ± 0,09	0,15 ± 0,07	0,21 ± 0,01
210 °C / 40 min	0,46 ± 0,05	0,07 ± 0,01	1,37 ± 0,10	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,02

HMF: Hidroximetilfurfural

A análise da influência da variável temperatura sobre a concentração dos monômeros de açúcar e furfurais na fração líquida (licor) proveniente do pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira revelou que apenas o monossacarídeo arabinose não foi estatisticamente significativo ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). O modelo polinomial foi mais adequado para descrever as concentrações de furfural, hidroximetilfurfural, glicose, xilose e ácido acético em função da temperatura. Os gráficos e tabelas de efeitos e coeficientes de regressão de cada monômero estão apresentados no apêndice B.

O pré-tratamento hidrotérmico promove a remoção da fração de hemicelulose das amostras em ambientes ácidos. Inicialmente ocorre a hidrólise dos polissacarídeos em oligo e monossacarídeos. Sob condições de pré-tratamento mais severas, hexoses e pentoses geradas durante o processo sofrem reações de desidratação com formação de inibidores, como furfural e hidroximetilfurfural. O ácido acético é formado a partir da hidrólise dos grupos acetil da fração de hemicelulose, podendo funcionar como um catalisador durante o pré-tratamento hidrotérmico (Jonsson & Martin, 2016).

Analisando a Tabela 8 é possível observar que a xilose foi o monossacarídeo predominante nos extratos aquosos pós hidrolisados, seguida de arabinose e glicose. A xilose e a arabinose presentes podem ser provenientes da hidrólise da hemicelulose, característica do pré-tratamento hidrotérmico.

A glicose apresentou as menores concentrações dentre os demais componentes do licor. Isso pode ser explicado pelo fato de que a fração celulósica é menos susceptível a hidrólise devido a sua estrutura cristalina, sendo necessária condições de pré-tratamento mais severas.

Observa-se que as concentrações de xilose e glicose diminuem à medida que aumenta a temperatura de pré-tratamento. Uma possível explicação seria a degradação desses açúcares com formação de ácidos orgânicos, além de furfural e hidroximetilfurfural, tendo em vista que esses últimos apenas são detectados a partir de 200 °C e 220 °C respectivamente. Min et al. (2015) submetem palha de trigo a tratamento hidrotérmico em dois estágios (120 °C por 30 minutos e 150 °C por 20 minutos) e encontraram maiores teores de furfurais (0,78 g/100 g biomassa), hidroximetilfurfurais (0,22 g/100 g) e ácido acético (1,83 g/100 g biomassa). Ibbett et al. (2014) obtiveram maior teor de furfural (1,8 g/100 g) após pré-tratamento hidrotérmico do farelo de trigo sob 3 % de H₂SO₄ a 170 °C por 10 minutos. Entretanto, concentrações de ácido acético foram considerados similares (1,6 g/100 g) ao maior valor apresentado na Tabela 8 (1,78 g/100 g).

Amostras das águas de lavagens dos sólidos pré-tratados também foram analisadas quanto aos teores de açúcares e inibidores. Após o pré-tratamento hidrotérmico, os sólidos foram lavados quatro vezes utilizando o mesmo volume de água (30 mL). Não foram detectados açúcares e inibidores em amostras provenientes da terceira e quarta lavagens dos sólidos. A Tabela 9 apresenta as concentrações de ácido acético, xilose e arabinose presentes nas águas da primeira e segunda lavagens dos sólidos pelo processo hidrotérmico.

Tabela 9 - Composição das lavagens dos sólidos pseudocaule de bananeira após pré-tratamento hidrotérmico.

Ensaio	Água de lavagem (g/100 g de biomassa)				
	1° Lavagem			2° Lavagem	
	Ácido Acético	Xilose	Arabinose	Xilose	Arabinose
130 °C / 10 min	0,04 ± 0,00	0,52 ± 0,08	0,00	0,12 ± 0,00	0,00
150 °C / 10 min	0,20 ± 0,04	0,40 ± 0,12	0,00	0,08 ± 0,00	0,00
160 °C / 10 min	0,12 ± 0,04	0,28 ± 0,04	0,00	0,08 ± 0,00	0,00
170 °C / 10 min	0,24 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,00	0,00
180 °C / 10 min	0,40 ± 0,04	0,00	0,14 ± 0,04	0,00	0,00
190 °C / 10 min	0,56 ± 0,08	0,00	0,40 ± 0,00	0,00	0,08 ± 0,00
200 °C / 10 min	0,76 ± 0,12	0,20 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,00	0,12 ± 0,00
210 °C / 10 min	0,64 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,04	0,00	0,12 ± 0,00
210 °C / 20 min	0,64 ± 0,00	0,16 ± 0,04	0,04 ± 0,00	0,00	0,00
210 °C / 40 min	0,64 ± 0,04	0,12 ± 0,00	0,00	0,00	0,00

A análise da influência da variável temperatura sobre a concentração dos monômeros de açúcar e ácido acético nas águas de lavagem provenientes do pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira revelou que o monossacarídeo arabinose da primeira e segunda lavagens não foi estatisticamente significativo ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). O modelo polinomial foi utilizado para descrever as concentrações de xilose (1° e 2° lavagens) e ácido acético. Os gráficos e tabelas de efeitos e coeficientes de regressão de cada monômero estão apresentados no apêndice B.

Como esperado, as concentrações de ácido acético e açúcares foram diminuindo à medida que foram realizadas as lavagens, até que não fosse detectada a presença desses constituintes nas amostras de lavagens subsequentes. Na primeira lavagem já não foram detectadas a presença de glicose e furfurais (furfural e hidroximetilfurfural). Na segunda lavagem não foi detectado ácido acético.

4.1.2 Hidrólise enzimática

Nesta etapa do trabalho foi realizada a hidrólise enzimática dos pré-tratados hidrotérmicos com objetivo de comparar o potencial dos materiais como fonte de glicose para produção de etanol. Para isso foram realizadas hidrólise enzimática de

cada condição do pré-tratamento hidrotérmico, utilizando tubos de 1 mL contendo 0,84 mL de meio reacional em cada (sólidos + enzimas), utilizando 2,5 % (p/v) de sólidos, 50 FPU/g de biomassa, sendo as placas contendo os tubos incubadas a 25 °C, sob agitação de 120 rpm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os valores das médias de conversão enzimática em amostras de pseudocaule *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico foram avaliadas segundo método de comparação de médias (teste t). A avaliação foi realizada comparando-se cada um dos valores de conversão enzimática entre si. A Figura 14 apresenta os dados de hidrólise enzimática de amostras de pseudocaule de bananeira *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.

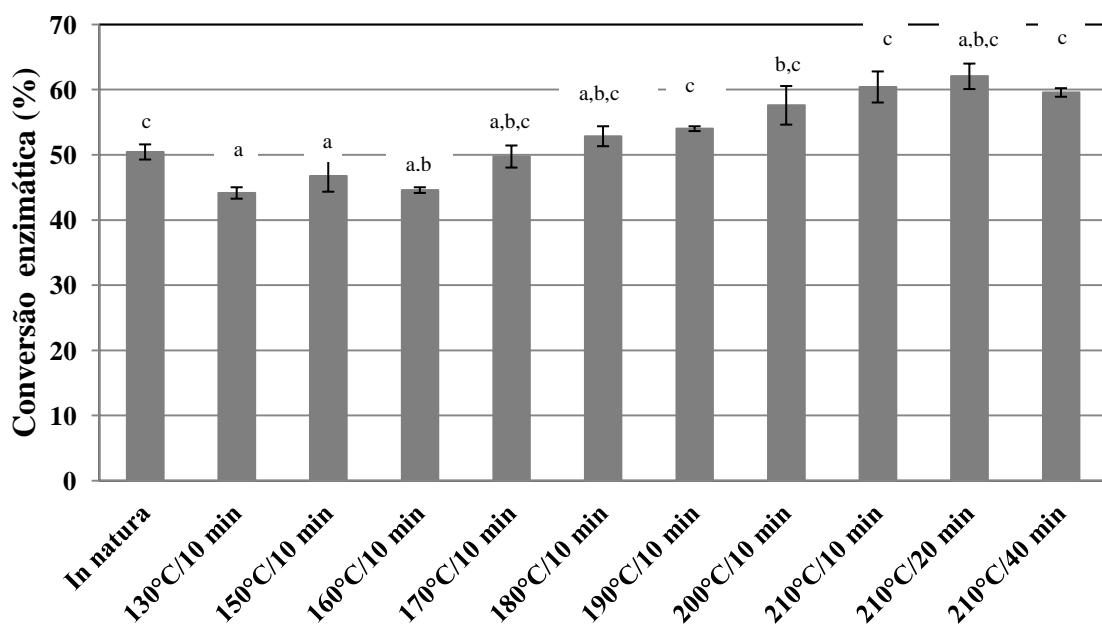


Figura 14 - Conversão enzimática de amostras do pseudocaule de bananeira *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico. Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste t a 95 % de probabilidade.

As conversões variaram entre 44 % (5,40 g/L de glicose) e 62 % (7,60 g/L de glicose) em 120 horas de hidrólise enzimática, sendo que os maiores rendimentos foram alcançados em hidrólise enzimática de materiais pré-tratados a 220 °C (62 % de conversão enzimática) e 210 °C (60 % de conversão enzimática). Os menores valores de conversão enzimática foram obtidos quando se utiliza menores temperaturas de pré-tratamento (40-50 % conversão).

Após análise estatística dos dados, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre as médias dos materiais pré-tratados (a partir de 170

°C) e material *in natura*. Estes resultados indicam que o pré-tratamento hidrotérmico não contribuiu para melhoria do rendimento final de glicose no processo de hidrólise enzimática.

A conversão enzimática de pré-tratados em temperaturas de até 170 °C apresentaram valores menores do que a conversão enzimática do material *in natura*. É provável que essas condições de pré-tratamento não tenham sido suficientes para remoção das frações de hemiceluloses e lignina. Em alguns casos, a lignina proveniente de biomassa pré-tratada pode exercer maior efeito inibitório sobre as enzimas do que a lignina de material não tratado. A presença da lignina pode diminuir a capacidade de adsorção das celulases na celulose devido à redução da área superficial da celulose ou à adsorção das enzimas na fração de lignina (Rahikainen et al., 2011).

A conversão da celulose presente na biomassa vegetal é influenciada pelas características estruturais do material utilizado, como cristalinidade (amorfo vs, celulose cristalina), pH, tempo de reação, temperatura, além do coquetel enzimático utilizado (Bansal et al., 2009). A mistura enzimática pode não ser adequada para o tipo de biomassa, limitando assim o rendimento da hidrólise. Outra hipótese seria o pré-tratamento ineficiente da biomassa, provocando uma limitação no rendimento da hidrólise enzimática (Alcántara et al., 2016). Dado que o material pré-tratado hidrotérmicamente em relação ao não tratado apresentou uma baixa solubilidade da hemicelulose (máximo de 47 % de xilose solubilizada), representado pelo monômero xilose, pode-se deduzir que a recalcitrância do material resultante do pré-tratamento comprometeu o rendimento do processo de hidrólise enzimática. A hemicelulose é considerada uma barreira física e um componente adsorvente que reduz a quantidade de celulases disponíveis no meio, bloqueando seu progresso de hidrólise ao longo da cadeia celulósica. Além disso, açúcares provenientes da solubilização das hemiceluloses como a xilose, podem inibir fortemente a atividade das celulases (Zhang et al., 2012).

4.1.3 Sacarificação e Fermentação Simultânea

Além de hidrólise enzimática, os pré-tratados hidrotérmicos também foram testados quanto à fermentabilidade da glicose utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826. Para isso foram utilizados os mesmos tubos de 1 mL e sob as mesmas condições da etapa de hidrólise enzimática (50 FPU/g; 25 °C, 120 rpm).

A contagem de células do inóculo foi de $2,85 \times 10^5$ células/mL da levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826, sendo inoculado 10 % (v/v) em cada meio fermentativo (tubo de 1 mL).

Assim como nos resultados de conversão enzimática, as médias dos dados de rendimentos de etanol também foram comparadas utilizando teste t. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$. Os rendimentos de etanol obtidos do SSF de amostras do pseudocaule de bananeira *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico são apresentadas na Figura 15.

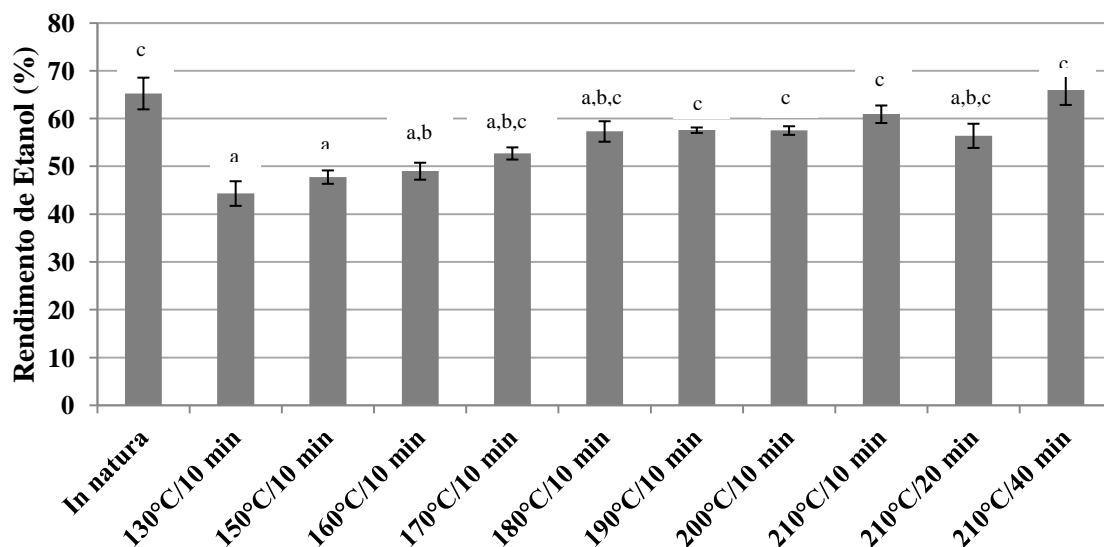


Figura 15 - Rendimentos de etanol após SSF em amostras de pseudocaule de bananeira *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico. Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si pelo teste t a 95 % de probabilidade.

Nota-se, a partir da análise da Figura 15, que praticamente todos os valores de rendimento de etanol utilizando pseudocaule de bananeira pré-tratado foram menores que o rendimento obtido com o material não tratado. Os maiores rendimentos de etanol foram alcançados pelo pré-tratado a 230 °C (66 %) e o material não tratado (65 %), apresentando valores iguais quando se observa os desvios padrão. Os demais pré-tratados obtiveram menores rendimentos de etanol.

Após análise estatística dos dados, verificou-se que não houve diferença estatística significativa entre os valores de rendimento de etanol dos pré-tratados e não tratado, assim como nos dados anteriores de conversão enzimática (Figura 14).

4.2 Pré-tratamento com NaOH

A Tabela 10 apresenta as composições dos carboidratos em diferentes condições de pré-tratamento e os rendimentos após o pré-tratamento com NaOH.

Tabela 10 - Rendimento e composição de carboidratos da fração sólida *in natura* e pré-tratada com NaOH sob diferentes condições.

Ensaio	Condições de Pré-tratamento		Carboidratos % (p/p) matéria seca							Rendimento (%)	Glicose* (%)
	NaOH % (p/v)	Temp. (°C)	Ram	Fuc	Arab	Xil	Man	Gal	Glic		
1	0,50	190	0,23	0,03	1,12	6,42	0,11	0,25	59,66	56,72	33,84
2	1,50	190	0,22	0,02	0,67	5,28	0,10	0,17	58,08	47,15	27,38
3	0,50	230	0,22	0,01	0,54	5,01	0,29	0,18	59,58	53,04	31,60
4	1,50	230	0,22	0,01	0,24	4,23	0,28	0,13	61,76	46,04	28,43
5	0,30	210	0,21	0,02	1,04	5,25	0,35	0,24	53,30	55,61	29,64
6	1,70	210	0,22	0,01	0,40	4,32	0,23	0,15	60,44	48,62	29,39
7	1,00	182	0,21	0,01	0,73	5,63	0,26	0,17	55,24	53,78	29,71
8	1,00	238	0,23	0,00	0,24	4,23	0,25	0,12	59,50	46,41	27,61
9 (C)	1,00	210	0,25	0,01	0,55	4,98	0,29	0,17	63,82	47,51	30,32
10 (C)	1,00	210	0,24	0,01	0,54	5,05	0,28	0,17	60,75	48,62	29,54
11 (C)	1,00	210	0,23	0,01	0,52	4,84	0,30	0,17	61,28	49,72	30,47
12 (C)	1,00	210	0,24	0,01	0,58	5,45	0,29	0,18	63,93	51,56	32,96
<i>In natura</i>	-	-	0,30	0,08	4,62	8,35	0,83	0,81	39,62	100,00	39,62

* Glicose: percentuais de glicose corrigidos pelos respectivos rendimentos. Cálculo do ensaio 1: $59,66 \times 0,5672 = 33,84$. Temp: temperatura, Ram: ramnose, Fuc: fucose, Arab: arabinose, Xil: xilose, Man: manose, Gal: galactose, Glic: glicose, (C) - ponto central. Os valores foram calculados com seguintes desvio padrão: Ram: 0,03-0,00; Fuc: 0,01-0,00; Arab: 0,19-0,00; Xil: 0,56-0,02; Man: 0,12-0,03; Gal: 0,05-0,00; Glic: 8,95-0,46; Rendimento: 0,0 - 1,0.

Para verificar a relação entre os teores dos monômeros de açúcar e rendimento dos sólidos após pré-tratamento com hidróxido de sódio e as demais variáveis do processo (concentração de NaOH e temperatura), foram realizadas análises estatísticas utilizando o software Design-Expert 7.0. Análise de variância revelou que o rendimento e os teores de xilose, arabinose e galactose foram estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). As tabelas

contendo os efeitos principais e interações entre as variáveis são apresentadas no apêndice C. Os demais monômeros não foram estatisticamente significativos (glicose, ramnose, fucose, manose) ($p < 0,05$).

Os rendimentos do pré-tratamento alcalino (45,6-56,7 %) apresentaram uma faixa menor que do pré-tratamento hidrotérmico (57-75 %) (Tabela 6). A adição de base auxilia no processo de solubilização dos constituintes da biomassa vegetal. Em torno de 95 % da arabinose foi removida no tratamento alcalino, nas condições dos ensaios 4 (1,5 % de NaOH, 210 °C, 40 min) e 8 (1,0 % de NaOH, 210 °C, 60 min), percentual maior que apresentado no tratamento hidrotérmico (25 %). Isso pode ser explicado pela hidrólise das ligações éster entre componentes fenólicos e arabinose provocada por alguns álcalis como hidróxido de sódio (Merali et al., 2015). Assim como no pré-tratamento hidrotérmico, os sólidos pré-tratados alcalinos apresentaram pequenas porcentagens de manose (0,10-0,35 %), galactose (0,12-0,25 %), ramnose (0,21-0,25 %), fucose (0,01-0,03%). Com relação à xilose, a maior remoção foi de 49 % para os ensaios 4 e 8 (5 % de NaOH, 210 °C, 40 min e 1,0 % de NaOH, 210 °C, 60 min), valor semelhante ao encontrado no pré-tratamento hidrotérmico (47 %).

A porcentagem relativa do monômero de glicose aumentou continuamente após o pré-tratamento alcalino variando de 39,6 % (*in natura*) alcançando em torno de 63 % no pré-tratamento com NaOH, valor semelhante ao encontrado no tratamento hidrotérmico (61 %). Resultados similares aos do presente trabalho foram obtidos por Lima et al. (2014), alcançando 60 % de celulose no bagaço de cana pré-tratado a 130 °C por 30 minutos utilizando 1 % de hidróxido de sódio. Low et al. (2015) trataram pseudocaule de bananeira utilizando 4 % (p/v) de NaOH por 4 horas à temperatura ambiente alcançando uma porcentagem relativa de 72 % de celulose no material pré-tratado em relação à 52 % do material não tratado.

Observa-se que as condições empregadas no pré-tratamento alcalino não foram suficientes para melhorar o rendimento de glicose do material pré-tratado. As condições de pré-tratamento empregadas podem não ter sido suficientes para remover bem a lignina presente na fibra, dificultando a solubilização da xilose e demais constituintes da biomassa, concentrando porção de glicose do material.

4.2.1 Quantificação dos licores e águas de lavagens

Os resultados das análises dos licores obtidos em cada condição de ensaio de pré-tratamento alcalino encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição dos licores obtidos de amostras de pseudocaule de bananeira após pré-tratamento com NaOH.

Ensaio	Condições de Pré-tratamento		Licor (g/100 g de biomassa)			
	Temp. (°C)	NaOH % (p/v)	Ácido Acético	Xilose	Glicose	Arabinose
1	190	0,50	2,65 ± 0,14	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,24 ± 0,01
2	190	1,50	2,98 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,40 ± 0,00	0,91 ± 0,02
3	230	0,50	3,14 ± 0,23	0,19 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,74 ± 0,10
4	230	1,50	3,22 ± 0,13	0,40 ± 0,15	0,43 ± 0,02	0,63 ± 0,01
5	210	0,30	3,07 ± 0,10	0,26 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,67 ± 0,02
6	210	1,70	4,08 ± 0,27	1,25 ± 0,06	0,54 ± 0,04	0,30 ± 0,00
7	182	1,00	3,43 ± 0,13	0,53 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,92 ± 0,14
8	238	1,00	4,48 ± 0,14	0,34 ± 0,01	0,60 ± 0,02	1,09 ± 0,20
9 (C)	210	1,00	3,91 ± 0,34	0,54 ± 0,06	0,52 ± 0,04	1,42 ± 0,01
10 (C)	210	1,00	4,03 ± 0,40	1,05 ± 0,02	0,54 ± 0,05	1,29 ± 0,04
11 (C)	210	1,00	4,15 ± 0,35	0,54 ± 0,14	0,55 ± 0,05	1,26 ± 0,07
12 (C)	210	1,00	3,88 ± 0,06	0,86 ± 0,77	0,52 ± 0,01	1,23 ± 0,01

Temp: Temperatura

Análise de variância revelou que os teores de ácido acético, xilose, glicose e arabinose presentes no licor não foram estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$).

Não foi observado, em nenhum dos ensaios, presença dos inibidores furfural e hidroximetilfurfural. Esses resultados corroboram com os encontrados por Lima et al. (2013), que não detectaram hidroximetilfurfural e furfurais em licores de pré-tratamento utilizando concentrações superiores a 0,25 % de NaOH. Segundo Jonsson et al. (2013), soluções de bases como NaOH podem ser utilizadas para neutralizar fração líquida proveniente do pré-tratamento, auxiliando na remoção de inibidores como furfural e hidroximetilfurfural. Wilkinson et al. (2016) também não detectaram a presença de furanos (furfural e hidroximetilfurfural) em licores sob pré-

tratamento de salgueiro, palha de trigo e *Miscanthus* a 50 °C por 12 horas utilizando 5 % de NaOH.

Comparando os dados das Tabelas 8 e 11, é possível observar que os teores de glicose, xilose, arabinose e ácido acético são significativamente maiores nos licores do pré-tratamento com hidróxido de sódio do que nos licores provenientes do pré-tratamento hidrotérmico. Segundo Almeida et al. (2007) o ácido acético causa inibição da levedura *Sacharomyces cerevisiae* a partir da concentração de 1,6 g/L. Considerando esse valor, apenas os licores provenientes dos ensaios 1 e 2 encontram-se abaixo desse valor (1,39 g/L e 1,57 g/L respectivamente). Já os licores dos pré-tratados hidrotérmicos encontram-se todos abaixo dessa concentração (0,28 - 1,25 g/L). O pré-tratamento com hidróxido de sódio auxilia no processo de solubilização da hemicelulose e quebra da estrutura cristalina da celulose, aumentando a solubilização dos açúcares, além de auxiliar no processo de conversão dos grupos acetilo dos açúcares em ácido acético (Guilherme et al., 2015).

Assim como foi realizado no pré-tratamento hidrotérmico, os sólidos pré-tratados alcalinos foram lavados (4 lavagens) e coletadas amostras da água de lavagem para análises dos teores de açúcares e ácido acético. A Tabela 12 apresenta as concentrações de ácido acético, xilose, glicose presentes em amostras da água de lavagens realizadas após pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Tabela 12 - Composição das lavagens dos sólidos pseudocaule de bananeira submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Condições Pré-tratamento			Água de lavagem (g/100 g de biomassa)				
			1° Lavagem			2° Lavagem	
Ensaio	Temp. (°C)	NaOH % (p/v)	Ácido Acético	Xil	Glic	Xil	Glic
1	190	0,50	0,16	0,16	0,34	0,00	0,00
2	190	1,50	0,20	0,42	0,28	0,00	0,24
3	230	0,50	2,08	0,16	0,32	0,00	0,00
4	230	1,50	1,96	0,28	0,64	0,08	0,32
5	210	0,30	2,08	0,16	0,24	0,00	0,00
6	210	1,70	3,24	1,24	0,40	0,00	0,24
7	182	1,00	2,36	0,40	0,40	0,00	0,08
8	238	1,00	4,26	0,30	0,50	0,00	0,36
9 (C)	210	1,00	3,56	0,76	0,40	0,00	0,33
10 (C)	210	1,00	3,40	0,68	0,44	0,00	0,36
11 (C)	210	1,00	4,16	0,64	0,44	0,00	0,36
12 (C)	210	1,00	3,60	0,56	0,42	0,00	0,34

Temp: Temperatura, Xil: xilose, Glic: glicose, Arab: arabinose. Os valores foram calculados com seguintes desvio padrão: 1° Lavagem: Ácido Acético: 0,00-0,68; Xil: 0,00-0,24; Glic: 0,00-0,48. 2° Lavagem: Xil: 0,00-0,00; Glic: 0,00-0,04.

Análise de variância revelou que o rendimento e os teores de glicose presentes nas duas lavagens foram estatisticamente significativos ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). A tabela contendo os efeitos principais e interações entre as variáveis estão apresentados no apêndice C. Os maiores teores de glicose das duas lavagens realizadas, foram obtidos nos ensaios 4 e 8. Esse resultado é explicado pelo fato de que os ensaios 4 e 8 apresentam as condições mais severas de pré-tratamento, com maiores valores de temperatura e concentração de NaOH, favorecendo assim a perda de açúcares como a glicose.

Amostras da terceira e quarta água de lavagens não foram detectadas a presença de inibidores e açúcares (xilose, glicose e arabinose).

Assim como nos licores, as águas de lavagens provenientes do pré-tratamento alcalino também tiveram concentrações superiores de ácido acético e açúcares. A adição de NaOH aumenta a severidade do pré-tratamento, aumentando

com isso a perda de açúcares do material sólido para os licores e águas de lavagens, bem como maior conversão de ácidos orgânicos como ácido acético.

4.2.2 Hidrólise enzimática

Visando melhorar a etapa de hidrólise enzimática para obtenção dos açúcares fermentescíveis, planejamentos experimentais foram realizados para o pré-tratamento com hidróxido de sódio, objetivando máxima liberação de glicose.

Os valores de concentração de glicose obtidos para cada ensaio do pré-tratamento alcalino são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - DCCR para as variáveis independentes avaliadas em função da resposta concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática.

Ensaio	Temperatura (°C)	% NaOH (p/v)	Glicose (g/L)
1	190	0,50	8,93
2	190	1,50	8,66
3	230	0,50	8,60
4	230	1,50	7,94
5	210	0,30	8,92
6	210	1,70	8,26
7	182	1,00	8,76
8	238	1,00	7,66
9 (C)	210	1,00	8,48
10 (C)	210	1,00	8,46
11 (C)	210	1,00	8,13
12 (C)	210	1,00	8,45

A análise dos efeitos dos principais e das interações das variáveis para concentração de glicose resultante de cada ensaio do pré-tratamento com hidróxido de sódio pode ser vista na Tabela 14.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose (g/L) de pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	1,25	2	0,62	14,56	0,0015
Temperatura (L)	0,43	1	0,43	10,05	0,0114
Concentração NaOH (%) (L)	0,82	1	0,82	19,07	0,0018
Resíduo	0,39	9	0,043		
Falta de ajuste	0,30	6	0,050	1,80	0,3359
Erro Puro	0,084	3	0,028		
Total	1,64	11			
R^2	0,7639				
R^2 ajustado	0,7114				

(L) - efeito linear

Somente os efeitos lineares das variáveis temperatura e concentração de NaOH foram significativos a um intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

A concentração de glicose após hidrólise enzimática dos pré-tratados com hidróxido de sódio pode ser descrita através da equação 4, após a remoção dos termos não significativos ($p > 0,05$):

$$\text{Glicose (g/L)} = 8,44 - 0,25 \text{ Temperatura (}^\circ\text{C)} - 0,34 \text{ concentração de NaOH (\%)} \quad (4)$$

O coeficiente de correlação (R^2) da equação de regressão obtida a partir de análise de variância foi 0,7639, indicando que o modelo poderia explicar cerca de 76% da variabilidade nas respostas ($p < 0,05$).

A Figura 16 apresenta os valores de conversão enzimática de amostras de pseudocaule de bananeira não tratada (NT) e após pré-tratamento com hidróxido de sódio.

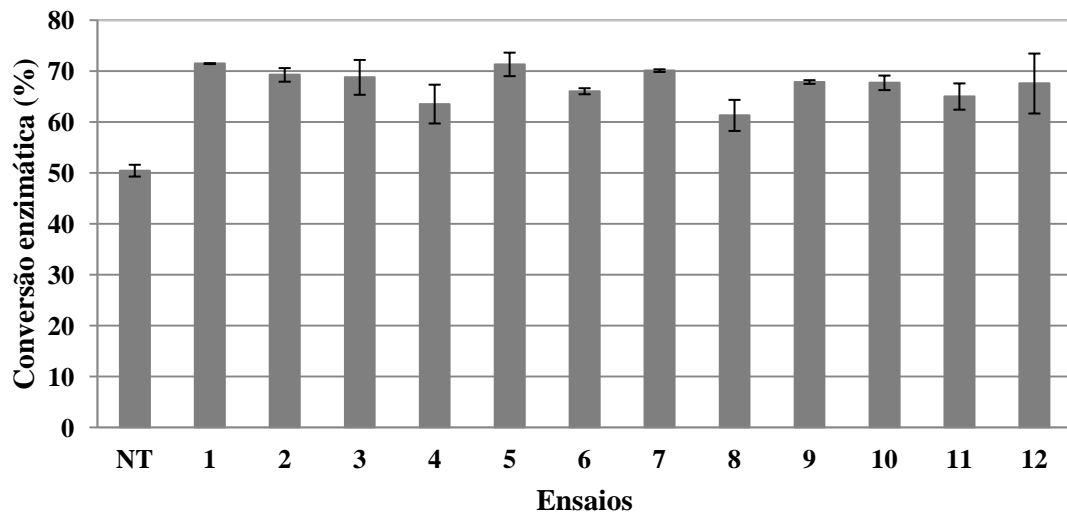


Figura 16 - Conversão enzimática de amostras do pseudocaule de bananeira não tratada (NT) e após pré-tratamento com hidróxido de sódio.

A Figura 17 apresenta o gráfico de superfície de resposta para concentração de glicose dos pré-tratados utilizando hidróxido de sódio.

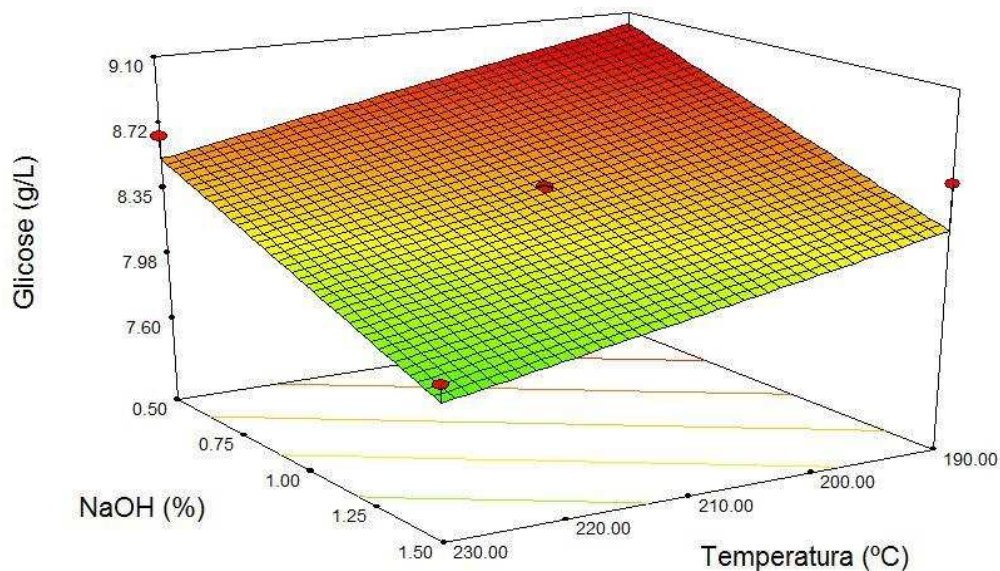


Figura 17 - Superfície Resposta para a concentração de glicose (g/L) em função das variáveis temperatura (°C) e concentração de NaOH (%) do pré-tratamento alcalino.

A partir dos resultados apresentados pode-se observar que quanto menor os valores de concentração de NaOH e temperatura, maior a concentração de glicose após a hidrólise enzimática. Deste modo, a melhor condição para hidrólise

enzimática foi obtida no ensaio 1 (190 °C; 0,5 % NaOH) com concentração de glicose de 8,93 g/L, referente a 71,5 % de conversão enzimática. Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os resultados relatados por Chen et al. (2013) utilizando palha de milho pré-tratado com 0,088 g/g NaOH obtendo uma conversão de 70 % após 120 horas de hidrólise enzimática.

4.3 Hidrólise enzimática e Fermentação e Sacarificação Simultânea

Os experimentos realizados nesta etapa tiveram o objetivo de avaliar a influência de diferentes temperaturas e o aumento de escala nos valores de conversão enzimática e rendimento de etanol durante os processos de hidrólise enzimática e SSF. Para isto, ambos os processos foram realizados em tubos de 20 mL, sendo que a hidrólise enzimática foi feita a temperaturas de 25 °C e 50 °C e SSF a 25 °C e 37 °C sob as mesmos valores de concentração de sólidos, carga enzimática, agitação e tempo de processo (2,5 % de sólidos; 50 FPU/g; 120 rpm, 120 horas) realizados anteriormente em tubos de 1 mL.

Foi selecionada uma amostra de cada tipo de pré-tratamento levando em consideração os resultados anteriormente apresentados. Para o pré-tratamento hidrotérmico, foi utilizada amostra pré-tratada a 230 °C a qual apresentou maior rendimento de etanol, e para o pré-tratamento alcalino foi utilizado o ensaio 1 (190 °C, 0,5 % NaOH), que apresentou maior valor de conversão enzimática entre os ensaios.

A Figura 18 apresenta os valores de conversão enzimática nas temperaturas de 25 °C e 50 °C de amostras de pseudocaule não tratado e submetidos a pré-tratamento hidrotérmico (230 °C) e alcalino (190 °C; 0,5 % NaOH).

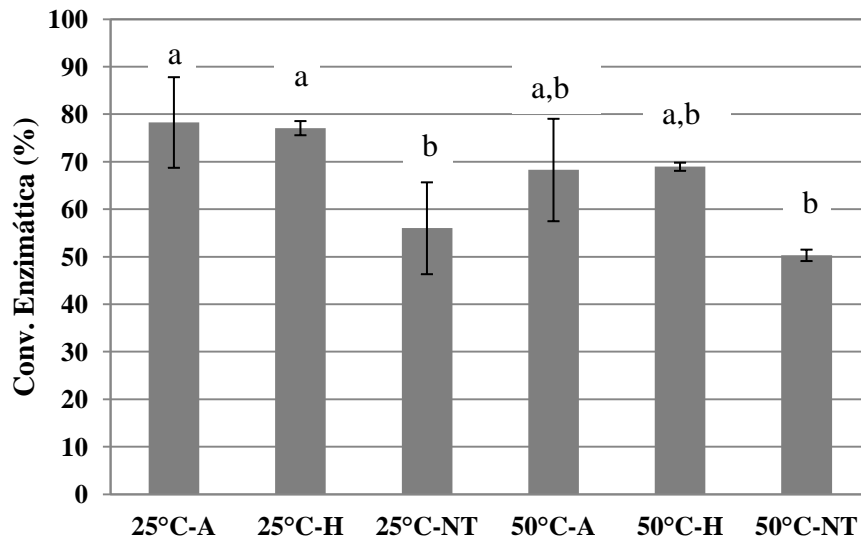


Figura 18 - Conversão enzimática nas temperaturas de 50 °C e 25 °C de amostras pré-tratadas e não tratadas (NT) do pseudocaule de bananeira. A: pré-tratado com hidróxido de sódio; H: pré-tratado hidrotérmico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5 %.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F), teste de comparação de médias (Tukey a 5 %) empregando-se o software Sas. Aplicando o teste de Tukey pode-se determinar a diferença das médias entre os dois níveis dos fatores estudados. A partir da análise do teste de Tukey, pode-se afirmar não houve diferença significativa entre os dados de conversão enzimática dos pré-tratados hidrotérmicos e alcalinos. Além disso não há diferença significativa entre os resultados às temperaturas de 25 °C e 50 °C. Os dados à temperatura de 50 °C não diferem entre si.

Os pré-tratados apresentaram um valor de conversão enzimática de cerca de 78 % (78,3 % para alcalino e 77,1 % para hidrotérmico) à 25 °C e em torno de 69 % (69,0 % para alcalino e 68,3 % para hidrotérmico) para 50 °C. O material não tratado a 25 °C apresentou conversão enzimática de 56 %, cerca de 20 % menor que os material pré-tratados. A conversão enzimática do material não tratado à 50 °C foi de 50,3 %. Menores valores de conversão enzimática foram obtidos por Low et al. (2015) utilizando pseudocaule de bananeira pré-tratado à temperatura ambiente utilizando 4 % de NaOH por 12 horas (43,4 % de conversão enzimática).

Segundo o fabricante, a celulase comercial Cellic Ctec 2 possui temperatura ótima a 50 °C. Entretanto, não houve aumento da conversão enzimática em sacarificação realizada a 50 °C. Andreaus et al. (1999) obtiveram melhores resultados de atividade de celulase à temperatura de 37 °C, menor que a

temperatura ótima apresentada pela enzima (50 °C). Li et al. (2016) encontraram valores de atividade enzimática de protease relativa próxima de 100 % até 50 °C, com decréscimo do seu valor a partir da temperatura ótima de 60 °C. Fu et al. (2016) incubaram quitinase por 4 dias em temperaturas de 55 °C, 60 °C e 65 °C e concluíram que a enzima se mantém estável por mais tempo no menor valor de temperatura testado. Desse modo, é possível que o experimento realizado à 25 °C, em temperatura menor que a temperatura ótima da celulase, possa ter contribuído para sua estabilidade ao longo de 5 dias de hidrólise enzimática (120 horas).

Se compararmos os resultados da Figura 18 aos resultados de conversão enzimática apresentados anteriormente (Figura 14 e 16), nota-se que o aumento da escala contribui para o aumento da conversão enzimática. A amostra do pré-tratamento hidrotérmico a 230 °C apresentou um aumento de conversão enzimática de 60 % para 77 %. Em relação ao ensaio 1 do pré-tratamento alcalino, esse valor aumentou de 71 % para 78,3 %. O tubo de 20 mL poderia promover uma agitação mais efetiva que em tubos de 1 mL. Uma agitação adequada contribui para melhor transferência de massa e mistura, aumentando a performance da enzima pelo aumento da cinética (Triwahyuni et al., 2015).

Sacarificação e Fermentação Simultânea foram realizadas em tubos de 20 mL sob as mesmas condições utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 2826 com incubação de 10 % (v/v) em cada meio fermentativo contendo $3,2 \times 10^7$ células por mL.

Os rendimentos de etanol obtidos do SSF em tubos de 20 mL utilizando amostras de pseudocaule de bananeira *in natura* e pré-tratados (hidrotérmico e alcalino) são apresentadas na Figura 19.

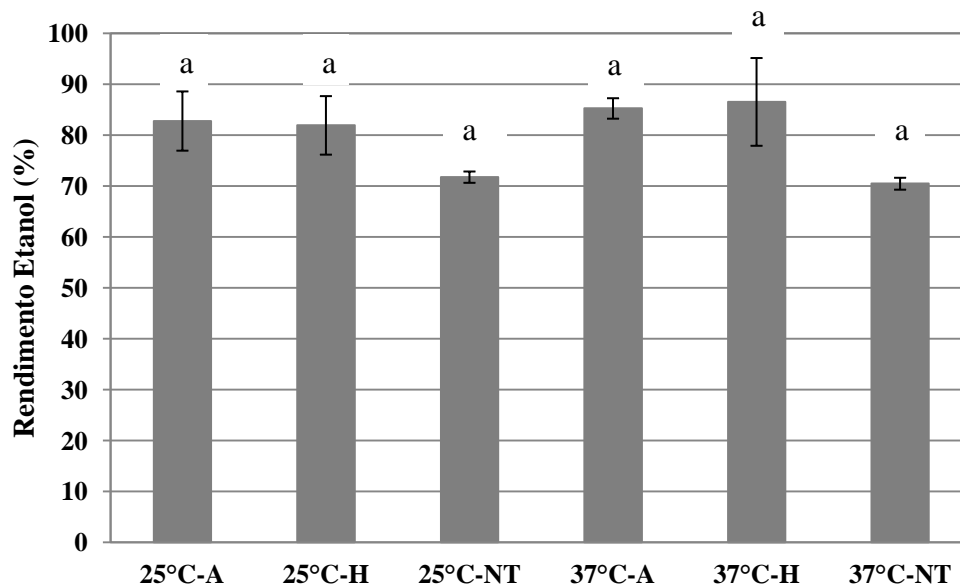


Figura 19 - Rendimento de etanol após SSF nas temperaturas de 25 °C e 37 °C de amostras de pseudocaule de bananeira não tratado (NT) e submetidos a pré-tratamentos com hidróxido de sódio e hidrotérmico. A: pré-tratado com hidróxido de sódio; H: pré-tratado hidrotérmico. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, com nível de significância a 5 %.

Assim como nos resultados de conversão enzimática, as médias dos dados de rendimentos de etanol obtidos foram comparadas por meio do teste de Tukey de comparação de médias a nível de significância de 5 %. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os valores de rendimento de etanol.

Os pré-tratados apresentaram valor de rendimento de etanol de cerca de 86 % à 37 °C, sendo 85,3 % para pré-tratado alcalino e 86,5 % para hidrotérmico. Já à temperatura de 25 °C, os pré-tratados obtiveram um rendimento de etanol de cerca de 82 % à 25 °C, sendo 82,8 % para pré-tratado alcalino e 82,0 % para hidrotérmico.

Em relação aos materiais não tratados, os valores obtidos nas duas temperaturas foram ainda mais próximos (71,7 % à 25 °C e 70,5 % à 37 °C). Assim como a conversão enzimática, os dados de rendimento de etanol demonstram resultados bem similares para ambos os pré-tratamentos testados.

Comparando o rendimento de etanol obtido utilizando pré-tratado hidrotérmico (230 °C) em tubos de 20 mL (82 %) com o resultado apresentado anteriormente em tubos de 1 mL (Figura 14) à mesma temperatura (25 °C), nota-se que houve um aumento do rendimento de etanol de 16 %. Portanto, o aumento da escala de 1 mL para 20 mL contribuiu para aumento do rendimento de etanol produzido por amostras de pseudocaule de bananeira nas condições utilizadas neste estudo. Zhao

et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes (80 %), utilizando lenha pré-tratada com explosão a vapor (210 °C, 10 minutos) e celulase comercial à uma carga enzimática de 0,87 FPU/g. Ingale et al. (2014) encontraram 84 % de rendimento de etanol utilizando pseudocaule de bananeira pré-tratado com solução 1 N de NaOH por 18 horas à temperatura ambiente.

4.4 Balanço geral dos processos testados

Os resultados de SSF obtidos foram usados para desenvolver balanço de massa para cada tecnologia de pré-tratamento. A Figura 20 apresenta um esquema dos processos de produção de etanol utilizando pseudocaule de bananeira *in natura*, submetida a pré-tratamento hidrotérmico (230 °C) e pré-tratamento com hidróxido de sódio (ensaio 1) baseado nos valores de rendimento de etanol à 37 °C.

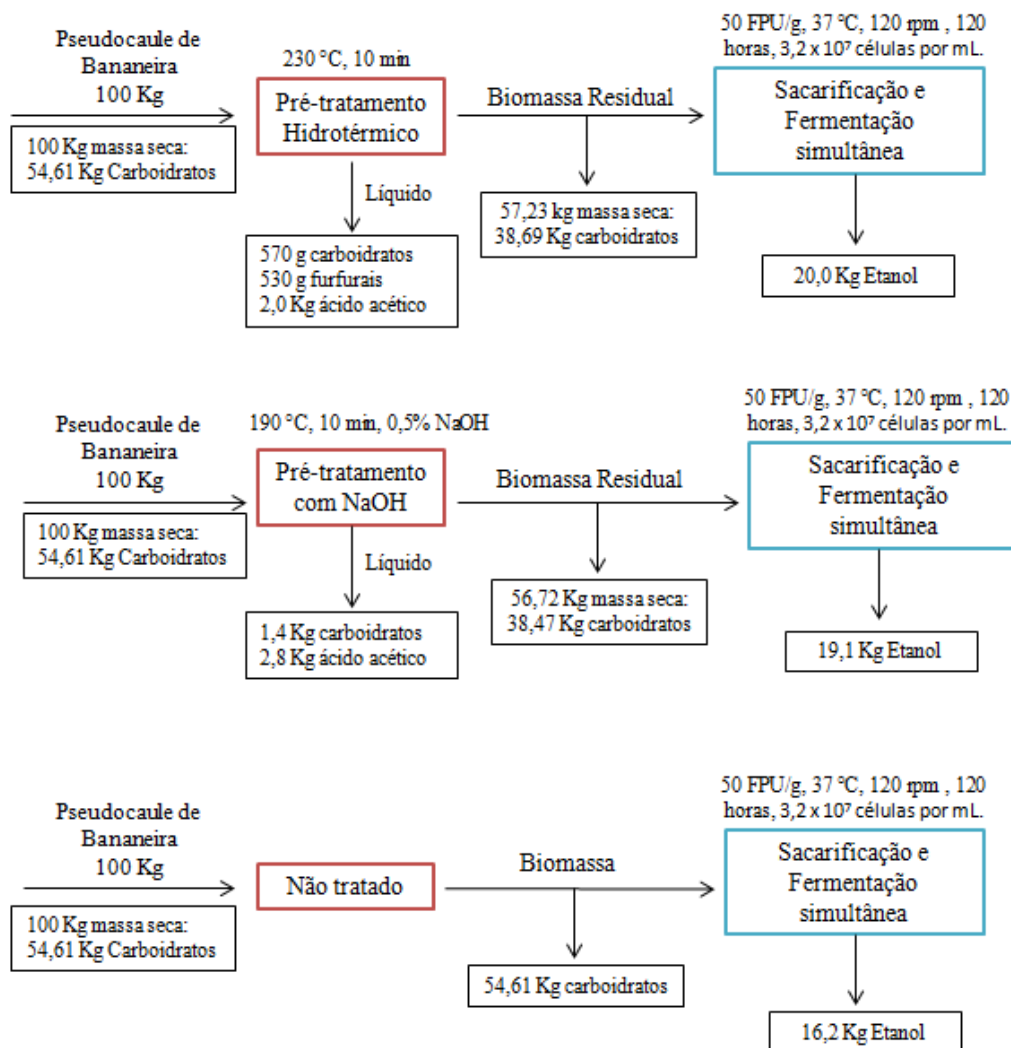


Figura 20 - Rendimento de etanol a partir de pseudocaule de bananeira não tratado e após pré-tratamento hidrotérmico e hidróxido de sódio.

De acordo com a Figura 20, a partir de 100 Kg de pseudocaule de bananeira seco, podem ser gerados 20 Kg de etanol, considerando a etapa de pré-tratamento hidrotérmico a 230 °C por 10 minutos. Esse valor é próximo ao obtido na fermentação da mesma quantidade de matéria seca após pré-tratamento alcalino (19,11 Kg etanol). Os rendimentos de matéria seca obtidos após as duas condições de pré-tratamento também se encontram próximas (57,23 Kg para hidrotérmico e 56,72 Kg para alcalino). Em relação às composições das frações líquidas (licor e lavagens) obtidos do pré-tratamento, nota-se que a fração líquida proveniente do pré-tratamento alcalino apresenta maior quantidade de ácido acético e carboidratos solúveis, indicando maior solubilidade de carboidratos da fração sólida pré-tratada em relação à fração líquida proveniente da fração sólida obtida por pré-tratamento hidrotérmico. Frações líquidas ricas em açúcares podem ser aproveitadas para aumento do rendimento da fermentação. No entanto, neste estudo, as frações líquidas não foram consideradas na conversão de etanol.

O rendimento do processo não tratado foi de 16,2 Kg de etanol obtidos de 100 Kg de pseudocaule de bananeira seco, valor próximo aos encontrados após fermentação dos pré-tratados hidrotérmicos e alcalinos. Uma possível explicação para o alto rendimento de etanol obtido com material não tratado em comparação com os tratados seria o pré-tratamento físico realizado. A moagem em moinho criogênico resultou em um material na forma de pó, tamanho de partícula menor do que normalmente é encontrado na literatura. A redução do tamanho de partícula causa aumento da área de superfície, redução do grau de cristalinidade da celulose, auxiliando na digestão do material e produção do etanol.

Resultados deste estudo foram superiores ao apresentado por Souza et al. (2014), utilizando pseudocaule de bananeira pré-tratado com solução de 2 % de ácido sulfúrico a 120 °C durante 15 minutos seguida de fermentação a 30 °C por 24 horas. Os autores obtiveram uma quantidade teórica de 14,7 Kg de etanol para 100 Kg de biomassa seca. Uppugundla et al. (2014) obtiveram resultados similares, utilizando a palha de milho pré-tratada com amônia (AFEX) a 140 °C por 15 minutos (20,5 Kg de etanol a partir de 100 Kg de biomassa seca).

5. Conclusões

- As condições de pré-tratamento hidrotérmico e alcalino estudadas contribuíram para a remoção de cerca de 50 % da xilose, componente principal das hemiceluloses;
- Os resultados de conversão enzimática e rendimento de etanol foram superiores em tubos de 20 mL do que em microtubos de 1 mL;
- Os melhores valores de conversão enzimática e rendimento de etanol foram, respectivamente, 78,3 % e 85,3 % utilizando o pré-tratado alcalino (190 °C, 0,5 % NaOH, p/v), 77 % e 86,5 % utilizando pré-tratado hidrotérmico (230 °C, 10 minutos) e 56 % e 70,5 % utilizando o material não tratado;
- A partir das análises estatísticas realizadas, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os pré-tratamentos testados. Além disso, esses resultados foram próximos aos obtidos pelo material não tratado. Com isso, é possível afirmar que não se justifica a realização desses pré-tratamentos na biomassa do pseudocaule de bananeira, nas condições realizadas no experimento.

6. Referências

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R. Berlin, A. Levin, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29. 2011. 675-685.

Alcántara, M. A. B., Dobruchowska, J., Azadi, P., García, B. D., Molina-Heredia, F. P., Reyes-Sosa, F. M. Recalcitrant carbohydrates after enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 2016. 9. 207.

Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hgerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic

hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2007. 82. 340-349.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. Bioresource Technology. Volume 101. Issue 13. July 2010. Pages 4851-4861.

Ambye-Jensen, M., Johansen, K. S., Didion, T., Kádár, Z., Meyer, A. S. Ensiling and hydrothermal pretreatment of grass: consequences for enzymatic biomass conversion and total monosaccharide yields. Biotechnology for Biofuels. 2014. 7:95.

Andrade, E. T., Carvalho, S. R. G., Souza, L. F. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. Engevista. v.11. n.2 2009. p. 127-136.

Andreus, J., Azevedo, H., Cavaco-Paulo, A. Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7 .1999. Pages: 233–239.

Anwar, Z., Gulfranz, M., Irshad, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. Volume 7. Issue 2. April 2014. Pages 163-173.

Arifin, Y., Tanudjaja, E., Dimiyati, A., Pinontoan, R. A Second Generation Biofuel from Cellulosic Agricultural By-product Fermentation Using *Clostridium* Species for Electricity Generation. Energy Procedia. Volume 47. 2014. Pages 310-315.

Ask, M., Olofsson, K., Felice, T. D., Ruohonen, L., Penttilä, M., Lidén, G., Olsson, L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundodonax* revealed by a comparison between SHF and SSF. Process Biochemistry. Vol 47. No 10. 1452-1459. 2012.

Bansal P., Hall, M., Realff, M. J., Lee, J. H., Bommarius, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. Biotechnol. Adv. 2009. 27(6). Pages 833–848.

Barbosa, L. C. A., Maltha, C. R. A., Silva, V. L., Colodette, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI - CG/EM). *Quím. Nova*. volume 31. n°8. 2008.

Behera, S. S., Ray, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 86. 2016. Pages 656-669.

Bridgwater, A.V. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and Bioenergy*. Volume 38. March 2012. Pages 68-94.

Canam, T., Town, J., Iroba, K., Tabil, L., Dumonceaux, T. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Microorganisms: Approaches, Advantages, and Limitations. Additional information is available at the end of the chapter. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/55088>.

Chen, H. *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science Business Media Dordrecht 2014. Chapter 2 Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose.

Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013. 6:8.

Ciolacu, D., Ciolacu, F., Popa, V. Amorphous cellulose – structure and characterization. *Cellulose Chem. Technol.* 45 (1-2). 2011. Pages 13-21.

Coelho, R. R. P., Mata, M. E. R. M. C., Braga, M. E. D. Alterações dos componentes nutricionais do pseudocaule de bananeira quando processado visando sua transformação em palmito. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande. 2001. v.3. 21-30.

Corrêa, T. L. R., Santos, L. V., Pereira, G. A. G. AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016. 100. 9–16.

Dahnum, D., Tasum, S. O., Triwahyuni, E., Nurdin, M., Abimanyu, H. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia.* 68. 2015. Pages: 107–116.

Dantas, J. L. L., Soares Filho, W. S. Classificação botânica. origem e evolução. In: Codeiro. J. M. (Org.). *Banana produção: aspectos técnicos.* Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 2000. 143 p. (Frutas do Brasil. 1). Disponível: http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2317.pdf

Devarapalli, M., Atiyeh, H. K. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. *Biofuel Research Journal.* 2015. Pages 268-280.

Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. 97. 8455–8465.

Donohoe, B. S., Decker, S. R., Tucker, M. B., Himmel, M. E., Vinzant, T. B. : Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnol Bioeng.* 2008. 101(5):913–925.

Dutta, S., Wu, K. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. *Green Chemistry.* 2014. 16. 4615.

Elliston, A., Collins. S. R. A., Wilson, D. R., Roberts, I. N., Waldron, K. W. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. *Bioresource Technology.* 2013. 134. Pages 117–126.

Elliston, A., Wood, I., Soucouri, M. J., Tantale., R.J., Dicks, J., Roberts, I.N. Methodology for enabling high-throughput simultaneous saccharification and fermentation screening of yeast using solid biomass as a substrate. 2015. 8:2.

EPE. Cadernos de Energia. Perspectivas para o etanol no Brasil. 2008.

Disponível:

http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/Estudos_28/Cadernos%20de%20Energia%20-%20Perspectiva%20para%20o%20etanol%20no%20Brasil.pdf

Fu, X., Yan, Q., Wang, J., Yang, S., Jiang, Z. Purification and biochemical characterization of novel acidic chitinase from *Paenicibacillus barengoltzii*. International Journal of Biological Macromolecules. Volume 91. October 2016. Pages 973-979.

Gao, Y., Xu, J., Zhang, Y., Yu, Q., Yuan, Z., Liu, Y. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology. Volume 144. 2013. Pages: 396-400.

Gauss, W. F., Suzuki, S., Takagi, M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. Volume 3990944. Edited by: Office USPT. USA. Bio Research Center Company Limited; 1976.

Ghaffar, S. H., Fan, M. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. Biomass bioenergy. 57. 2013. pp. 264-279.

Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology. Volume 101. Issue 13. July 2010. Pages 4775-4800.

Gonçalves, F. A., Ruiz, H. A., Nogueira, C.C., Santos, E. S., Teixeira, J. A., Macedo, G. R. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. Fuel. 131. 2014. Pages 66–76.

Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., Gomes, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science Technology*. v. 122. p. 1-22. 2008.

Guilherme, A. A., Dantas, P. V. F., Santos, E. S., Fernandes, F. A. N., Macedo, G. R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse. *Braz. J. Chem. Eng.* vol.32 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2015.

Gupta, A., Verma, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 41. January 2015. Pages 550–567.

Harun, R., Liu, B., Danquah, M. K. Analysis of Process Configurations for Bioethanol Production from Microalgal Biomass. *Progress in Biomass and Bioenergy Production: In Tech*. 2011.

Hasunuma, T., Kondo, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. *Process Biochemistry*. 47. 2012. Pages 1287-1294.

Heggset, E. B., Syverud, K., Oyaas, K. Novel pretreatment pathways for dissolution of lignocellulosic biomass based on ionic liquid and low temperature alkaline treatment. *Biomass and Bioenergy*. Volume 93. October 2016. Pages 194-200.

Huang, Y., Fu, Y. Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acids catalysts. *Green Chemistry*. 2013. 15. 1095.

Huijgen, W. J. J., Telysheva, G., Arshanitsa, A., Gosselink, R. J. A., Wild, P. J. Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organosolv treatment. *Industrial crops and products*. Vol 59. 2014. Page 85-95.

Ibbett, R., Gaddipati, S., Greetham, D., Hill, S., Tucker, G. The kinetics of inhibitor production resulting from hydrothermal deconstruction of wheat straw studied using a pressurised microwave reactor. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. 7: 45.

Ibbett, R., Gaddipati, S., Hii, S., Tucker, G. Structural reorganisation of cellulose fibrils in hydrothermally deconstructed lignocellulosic biomass and relationships with enzyme digestibility. *Biotechnology for Biofuels* 2013. 6:33.

IBGE/LSPA - Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.29 n.1 p.1-78 janeiro.2016

Disponível:

ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201601.pdf

IBGE/LSPA - Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Rio de Janeiro. v.29 n.5 p.1-76 maio.2015

Disponível:[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2015/lspa_201505.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2015/lspa_201505.pdf)

Infante, M., Ysambertt, F., Hernández, M., Martínez, B., Delgado, N., Bravo, B., Cáceres, A., Chávez, G., Bullón, J. Microwave assisted oxidative degradation of lignin with hydrogen peroxide and its tensoactive properties. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia* v.30 n.Especial Maracaibo nov. 2007.

Ingale, S., Joshi, S. J., Gupte, A. Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Braz. J. Microbiol.* vol.45 no.3 São Paulo July/Sept. 2014.

International Energy Agency. *Energy and Climate Change - World Energy Outlook*. 2014. Special Report. Disponível em: www.worldenergyoutlook.org

Jonsson, L. J., Alriksson, B., Nilvebrant, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013. 6:16.

Jonsson, L.J., Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. Volume 199. 2016. Pages 103-112.

Juturu, V., Wu, J. C. Microbial cellulases: Engineering. production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Volume 33. May 2014. Pages 188-203.

Kadam, K. L., Rydholm, E. C., McMillan, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Biotechnol Prog 2004. 20:698–705.

Kan, T., Strezov, V., Evans, T. J. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Volume 57. May 2016. Pages 1126-1140.

Kim, J. S., Lee, Y. Y., Kim, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. Volume 199. January 2016. Pages 42-48.

Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R: Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. Enzyme Microb Tech. 2011. 48. Pages: 408-415.

Kondo, T.J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Physics 1997. 35. 717.

Lela, B., Barisic, Nizetic, S. Cardboard/sawdust briquettes as biomass fuel: Physical-mechanical and thermal characteristics. Waste Management. Volume 47. January 2016. Pages 236-245.

Li, F., Yang, L., Lv, X., Liu, D., Xia, H., Chen, S. Purification and characterization of a novel extracellular alkaline protease from *Cellulomonas bogoriensis*. Protein Expression and Purification 121. 2016. Pages:125-132.

Lima, M. A., Lavorent, G. B., Silva, H. K. P., Bragatto, J., Rezende, C. A., Bernardinelli, O. D., Azevedo, E. R., Gomez, L. D., McQueen-Mason, S. J., Labate, C. A., Polikarpov, I. Effects of pretreatment on morphology. chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of

fermentable sugars for biofuels production - part 1. *Biotechnology for Biofuels*. 2013. 6:75.

Lima, M. B., Silva, S. O., Ferreira, C. F. *Banana*. 2^a edição. Embrapa. 2012. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82218/1/500-Perguntas-Banana-ed02-2012.pdf>

Lima, M., Gomez, L. D., Steele-King, C. G., Simister, R., Bernardinelli, O. D., Carvalho, M. A., Rezende, C. A., Labate, Azevedo, E. R., McQueen-Mason, S. J., Polikarpov, I. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. 7:10.

Liu, Z., Ho, S., Hasunuma, T., Chang, J., Kondo, A. Recent advances in yeast cell-surface display technologies for wastes biorefineries. *Bioresource Technology*. Volume 215. September 2016. Pages 324-333.

Liu, Z. H., Qin, L., Pang, F., Jin, M. J., Li, B. Z., Kang, Y., Dales, B. E., Yuan, Y. J. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Industrial Crops and Products*. Volume 44. January 2013. Pages 176–184.

Li, X., Mupondwa, E., Panigrahi S., Tabil, L., Sokhansani, S., Stumborg, M. A review of agricultural crop residue supply in Canada for cellulosic ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 16. Issue 5. June 2012. Pages 2954-2965.

Low, J. C., Halis, R., Shah, U. K. M., Tahir, P., Abood, F., Tukimin, T., Idris, M. D., Lanika, L., Razali, N. Enhancing enzymatic digestibility of alkaline pretreatment banana pseudostem for sugar production. *Bioresources*. 2015. 10 (1) 1213-1223.

Martínez-Sanz, M., Gidley, M. J., Gilbert, E. P. Application of X-ray and neutron small angle scattering techniques to study the hierarchical structure of plant cell walls: A review. *Carbohydrate Polymers*. Volume 125. July 2015. Pages 120-134.

Martins, M. T. B., Souza, W. R., Cunha, B. A. D. B., Basso, M. F., Oliveira, N. G., Vinecky, F., Martins, P. K., Oliveira, P. A., Arenque-Musa, B. C., Souza, A. P., Buckeridge, M. S., Kobayashi, A. K., Quirino, B. F., Molinari, H.C. Characterization of sugarcane (*Saccharum* spp.) leaf senescence: implications for biofuel production. *Biotechnol Biofuels*. 2016. 9:153.

Maryana, R., Marifatun, D., Wheni, A.I., Satriyo, K. W., Rizal, W. A. Alkaline Pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. *Energy Procedia*. Volume 47. 2014. Pages: 250-254.

Merali, Z., Collins, S. R. A., Elliston, A., Wilson, D. R., Kasper, A., Waldron, K.W. Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Biotechnology for Biofuels*. 2015. 8:23.

Ministério das Minas e Energia. Resenha Energética Brasileira. Maio 2016. Disponível: <http://www.aben.com.br/Arquivos/456/456.pdf>

Ministério de Minas e Energia Secretaria de Petróleo. Gás Natural e Combustíveis Renováveis Departamento de Combustíveis Renováveis. BOLETIM MENSAL DOS COMBUSTÍVEIS RENOVÁVEIS. Edição no 100. Junho 2016. Disponível: <http://www.mme.gov.br/documents/10584/3342640/Boletim+DCR+n%C2%BA+100+-+junho+de+2016.pdf/788a1a3b-3306-4d9d-b1f1-d922cca79179>

Min, D., Xu, R., Hou, Z., Lv, J., Huang, C., Jin, Y., Yong, Q. Minimizing inhibitors during pretreatment while maximizing sugar production in enzymatic hydrolysis through a two-stage hydrothermal pretreatment. *Cellulose*. Volume 22. Issue 2. 2015. Pages 1253-1261.

Minmunin, J., Limpitpanich, P., Promwungkwa, A. Delignification of elephant grass for production of cellulosic intermediate. *Energy Procedia*. Volume 79. 2015. pages 220-225.

Mood, S. H., Golfeshan. A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., Ardjmand, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol. a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 27 Pages 77-93. 2013.

Morais, S. A. L., Nascimento, E. A., Melo. D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I - estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Rev. Árvore* vol.29 no.3 May/June 2005.

Mulakhudair, A. R., Hanotu. J., Zimmerman. W. Exploiting microbubble-microbe synergy for biomass processing: Application in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biomass and Bioenergy*. Volume 93. October 2016. Pages 187–193.

NREL. 2011. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory.

Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>>

NREL. 2008. Selig. M.. Weiss. N.. Ji. Y. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. National Renewable Energy Laboratory.

Ogeda, T. L., Petri, D. F. S. Hidrólise enzimática da biomassa. *Química Nova*. Volume 33. No. 7. 2010. Pages 1549-1558.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2013. Disponível em:

http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/OECD_Reports/OECD_2013_22_biofuels_proj.pdf

OECD/IEA: World energy outlook 2014. Paris. France: OECD publishing. 2014.

Disponível:

https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/FeaturedInsight_HeatingWithoutGlobalWarming_FINAL.pdf

Oliveira, F. M. V., Pinheiro, I. O., Souto-Maior, A. M., Gonçalves, A. R., Rocha, G. J. M. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresource Technology*. 130. 2013. pp 168-173.

Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. December 2008. 1:7.

Oun, A., Rhim, J. Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers* 150. 2016. 187–200.

Overend, R. P., Chornet, E., Gascoigne, J. A. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*. 1987;321(1561):523–536.

Pacheco, D. D., Rodrigues, M. G. V., Dias, M. M., Almeida, F. A., Souza, F. V., Rodrigues, H. P., Moreira, S. A. F. Uso do pseudocaule de bananeira enriquecido com nitrogênio e fósforo como substrato para o cultivo de samambaias. *Pesq. Agropec. Trop. Goiânia*. v. 40. n. 1. p. 53-60. jan./mar. 2010.

Pacheco, T. F. *Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? Circular Técnica*. Embrapa. Abril. 2011.

Pakarinen, A., Haven, M. O., Djajadi, D. T., Várnai, A., Puranen, T., Viikari, L. Cellulases without carbohydrate-binding modules in high consistency ethanol production process. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. 7:27.

Park, S., Baker, J. O. Himmel. M.E.. Parilla. P.A.. Johnson. D.K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*. 2010. 3:10.

Peng, F., Bian, J., Peng, P., Guan, Y., Xu, F., Sun, R. Fractional separation and structure features of hemicellulose from sweet sorghum leaves. *BioResources* 7 (4). 2012. Pages 4744-4759.

Peng, F., Peng, P., Xu, F., Sun, R. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*. Volume 30. Issue 4. July-August 2012. Pages 879-903.

Petrik, S., Kádár, Z., Márová, I. Utilization of hydrothermally pretreated wheat straw for production of bioethanol and carotene-enriched biomass. *Biosource Technology*. Volume 133. April 2013. Pages 370-377.

Portal Brasil. 2015. Disponível:

<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/adicao-de-27-de-etanol-na-gasolina-e-estabelecida-pelo-governo>

Rahikainen, J. L., Mikander, S., Marjammaa, K., Tamminen, T., Angelos, L., Viikari, L., Kruus, K. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood—study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. *Biotechnol Bioeng*. 2011. 34. 108. 2823.

Reginatto, V., Antônio, R.V. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*. Volume 46. No 2. São Paulo. Apr/June 2015.

Renewable Fuels Association - RFA. World Fuel Ethanol Production. 2015. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>

Reyes-Ortiz, V., Heins, R. A., Cheng, G., Kim, E.Y., Vernon, B. C., Elandt, R. B., Adams, P. D., Sale, K. L., Hadi, M. Z., Simmons, B. A., Kent, M. S., Tullman-Ercek, D. Addition of a carbohydrate-binding module enhances cellulase penetration into cellulose substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 2013. 6:93.

Rodríguez-Zuñiga, U. F., Farinas, C. S., Neto, V. B., Crestana, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Vol. 46. nº8. Brasília Aug. 2011.

Romero-Anaya, A. J., Molina, A., Garcia, P., Ruiz-Colorado, A. A., Solano, A. L., Lecea, C. S. M. Phosphoric acid activation of recalcitrant biomass originated in ethanol production from banana plants. Biomass and Bioenergy. Vol. 35. Issue 3. 2011. Page 1196-1204.

Ruel, K., Nishyama, Y., Joseleau, J. Crystalline and amorphous cellulose in the secondary walls of Arabidopsis. Plant Science. Volume 193-194. September 2012. Pages 48-61.

Ruiz, H. A., Rodriguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. Hydrothermal processing. as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 21. 2013. Pages 35–51.

Saha, B. C., Yoshida, T., Cotta, M. A., Sonomoto, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. Industrial Crops and Products. volume 44. January 2013. Pages 367-372.

Saddler, J., Kumar, L. Special Issue from the NSERC Bioconversion network workshop: pretreatment and fractionation of biomass for biorefinery/biofuels. Biotechnology for Biofuels. 2013. 6:17.

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. Quím. Nova vol.35 no.5 São Paulo, 2012.

Santos, F. A., Queiroz, J. H., Colodette, J. L., Manfredi, M., Queiroz, M. E. L. R., Caldas, C. S., Soares, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. Quím. Nova vol.37 no.1 São Paulo. 2014.

Silva, V. F. N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Universidade Federal de São Paulo. EEL. 2009.

Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource Technology*. Volume 199. January 2016. Pages 76-82.

Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., Srivastava, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 32. April 2014. Pages 713–728.

Soffner, M. L. A. P. Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira. 2001. 56 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP. Piracicaba. 2001.

Soltani, N., Bahrani, A., Pech-Canul, M. I., Gonzalez, L. A. Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials. *Chemical Engineering Journal* 264. 2015. Pages 899-935.

Souza, E. L., Liebl, G. F., Marangonia, C., Sellina, N., Montagnolia, M. S., Souza, O. Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. *Chemical engineering transactions*. volume 38. 2014.

Sun, J. X., Sun, X. F., Sun, R. C., Su, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*. Volume 56. Issue 2. 4 June 2004. Pages 195–204.

Sun, Y., Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. Oxford. v.83. p. 1-11. 2002.

Suriyachai, N., Weerasaia, K., Laosiripoiana, N., Champred, V., Unrean, P. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. *Bioresource Technology*. August 2013. 142-171.

Taherzadeh, J. M., Karimi, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2008. 9. 1621-1651.

Tavares, E. Q. P., Buckeridge, M. S. Do plant cell walls have a code?. *Plant Science*. Volume 241. December 2015. Pages 286-294.

Teixeira, R. S. S., Silva, A. S., Moutta, R. O., Ferreira-Leitão, V. S., Barros, R. R. O., Ferrara, M. A. Bon, E. P. S. Biomass pretreatment: a critical choice for biomass utilization via biotechnological routes. *BMC Proceedings* 2014. 8 (Suppl 4):O34

Tengbor, C., Galbe, M., Zacchi, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme Microb. Technology* 2001. 28 (9-10). Pages 835-844.

Tilman, D., Socolow, R., Foley, J. A., Hill, J., Lynd, L., Pacala, S., Reilly, J., Searchinger, T., Somerville, C., Williams, R. Beneficial Biofuels - The Food, Energy, and Environment Trilemma. *Science*. Volume 325. Issue 5938. July 2009. Pages 270-271.

Triwahyunia, E., Muryantoa, Sudyania, Y., Abimanyu, H. The effect of substrate loading on simultaneous saccharification and fermentation process for bioethanol production from oil palm empty fruit bunches. *Energy Procedia*. 68. 2015. Pages: 138-146.

Unica - Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol. 2016. Disponível: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1803&safra=2015%2F2016&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>

Uppugundla, N., Sousa, L. C., Chundawat, S. P. S., Yu, X., Simmons, B., Singh, S., Gao, X., Kumar, R., Wymar, C. E., Dale, B. E., Balan, V. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*. 2014. 7: 72.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol*. 2010. 153 (3): 895-905.

Várnai, A., Siika-aho, M., Viikari, L. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. *Biotechnology for Biofuels*. 2013. 6:30.

Verardi, A., Bari. I., Ricca, E., Calabrò, V. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *Bioethanol*. 01. February. 2012.

Wang, Q., Wang, Z., Shen, F., Hu, J., Sun, F., Lin, L., Yang, G., Zhang, G., Deng, S. Pretreating lignocellulosic biomass by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) for enzymatic hydrolysis: Evaluating the pretreatment flexibility on feedstocks and particle sizes. *Bioresource Technology*. Volume 166. August 2014. Pages 420–428.

Wilkinson, S., Greetham, D., Tucker, G. A. Evaluation of different lignocellulosic biomass pretreatments by phenotypic microarray-based metabolic analysis of fermenting yeast. *Biofuel Research Journal* 9. 2016. Pages 357-365.

Yilmaz, S., Selim, H. A review on the methods for biomass to energy conversion systems design. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 25. September 2013. Pages 420-430.

Zhang, C., Li, J., Liu, C., Liu, X., Wang, J., Li, S., Fan, G., Zhang, L. Alkaline pretreatment for enhancement of biogas production from banana stem and swine manure by anaerobic codigestion. *Bioresource Technology*. Volume 149. 2013. Pages 353-358.

Zhang, J., Tang, M., Viikari, L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresource Technology*. Volume 121. 2012. Pages 8-12.

Zhang, K., Pei, Z., Wang, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource Technology*. Volume 199. January 2016. Pages 21-33.

Zhang, W., Ma, Y., Xy, Y., Wang, C., Chu, F. Lignocellulosic ethanol residue-based lignin–phenol–formaldehyde resin adhesive. *International Journal of Adhesion*. Volume 40. January 2013. Pages 11–18.

Zhao, X., Moates, G. K., Elliston, A., Wilson, D. R., Coleman, M. J., Waldron, K.W. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre. *Bioresource Technology*. 2015. 9. Pages: 194:263.

Zhu, Yongming. *Overview of Biomass Pretreatment Technologies*. Novozymes. Bioenergy. 2011.

Zhu, Z., Simister, R., Bird, S., McQueen-Mason, S. J., Gomez, L. D., Macquarrie, D. J. Microwave assisted acid and alkali pretreatment of *Miscanthus* biomass for biorefineries. *AIMS Bioengineering*. 2015. 2(4). 449-468.

Apêndice

Apêndice A

Preparo dos padrões de açúcares

Foi pesado 25 mg de cada padrão de açúcar (ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose) e dissolvidos com água com água milli-Q em balões volumétricos de 25 mL. A partir dessas soluções de 1mg/mL de cada padrão de açúcar, foram preparados tubos contendo concentrações de decrescentes dos padrões de acordo com a tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Preparo dos padrões de açúcares para análise dos carboidratos.

Tubos	Volume de cada padrão (µL)	Volume de água milli-Q (µL)	Concentração (mg/mL)
1	0	2.200	0
2	100	1.500	0,06
3	200	800	0,20
4	300	100	0,75
5	400	0	1,00

Após o preparo das soluções foi adicionado 200 µL de solução do padrão interno 2-deoxiglicose (2-DOG) de concentração 1mg/mL em cada tubo.

As análises foram realizadas em triplicata.

APÊNDICE B

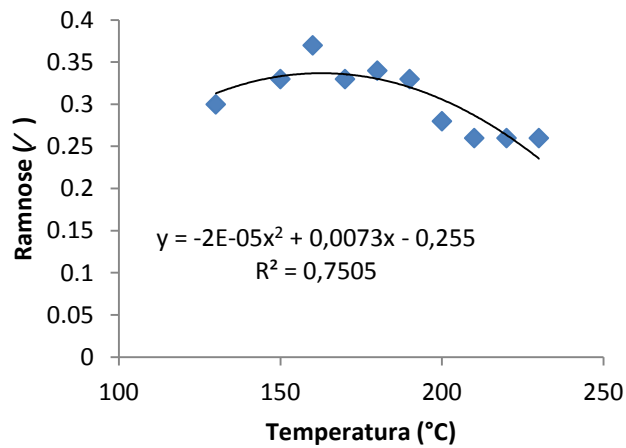


Figura 1 - Gráfico de regressão do teor de ramnose presente na fração sólida pré-tratada em função da temperatura.

Tabela 2 - Análise de regressão para teor de ramnose (%) dos sólidos após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,01053656	2	0,00526828	10,53	0,0078
Temperatura (L)	0,00648351	1	0,00648351	12,95	0,0087
Temperatura (Q)	0,00405306	1	0,00405306	8,10	0,0248
Erro	0,00350344	7	0,00050049		
Total	0,01404000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

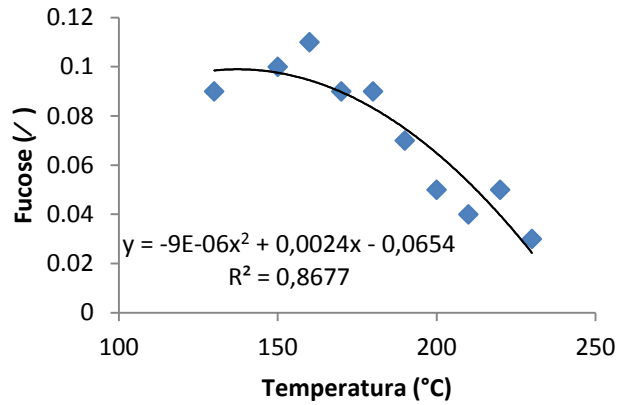


Figura 2 - Gráfico de regressão do teor de fucose presente na fração sólida pré-tratada em função da temperatura.

Tabela 3 - Análise de regressão para teor de fucose (%) dos sólidos após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,00603914	2	0,00301957	22,95	0,0008
Temperatura (L)	0,00542494	1	0,00542494	41,24	0,0004
Erro	0,00092086	7	0,00013155		
Total	0,0069600	9			

(L) - efeito linear

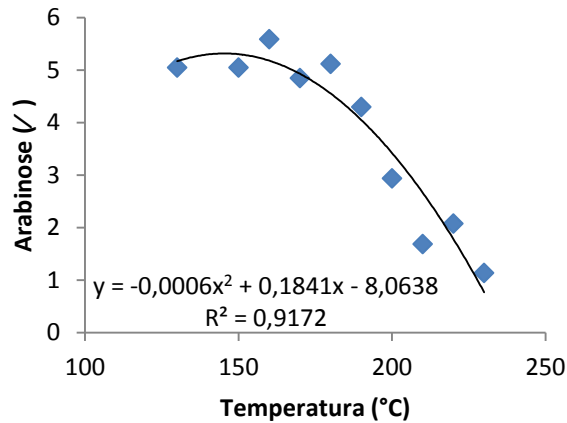


Figura 3 - Gráfico de regressão do teor de arabinose presente na fração sólida pré-tratada em função da temperatura.

Tabela 4 - Análise de regressão para teor de arabinose (%) dos sólidos após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	22,60475471	2	11,30237736	38,76	0,0002
Temperatura (L)	19,34996381	1	19,34996381	66,35	0,0001
Temperatura (Q)	3,25479090	1	3,25479090	11,16	0,0124
Erro	2,004133529	7	0,29161933		
Total	24,6460900	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

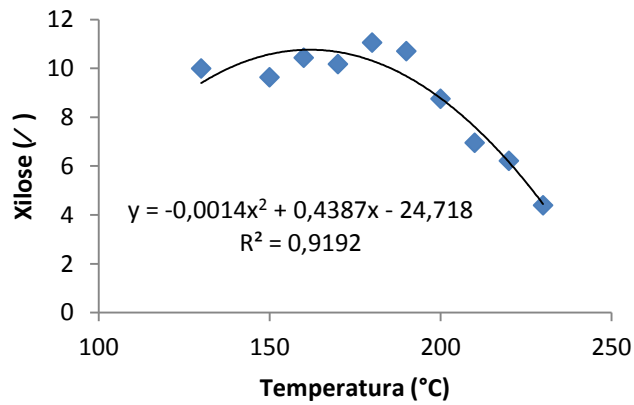


Figura 4 - Gráfico de regressão do teor de xilose presente na fração sólida pré-tratada em função da temperatura.

Tabela 5 - Análise de regressão para teor de xilose (%) dos sólidos após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	41,2592943	2	20,6294971	38,81	0,0001
Temperatura (L)	26,34456974	1	26,34456974	50,86	0,0002
Temperatura (Q)	14,91472969	1	14,91472969	28,79	0,0010
Erro	3,62591057	7	0,51798722		
Total	44,88521000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

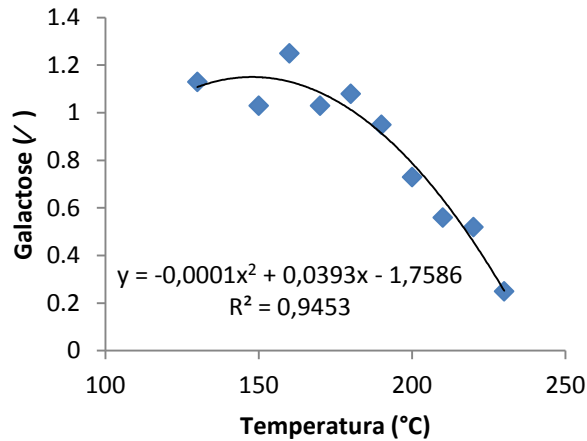


Figura 5 - Gráfico de regressão do teor de galactose presente na fração sólida pré-tratada em função da temperatura.

Tabela 6 - Análise de regressão para teor de galactose (%) dos sólidos após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,88237110	2	0,44118555	60,51	0,0001
Temperatura (L)	0,73875156	1	0,73875156	101,32	0,0001
Temperatura (Q)	0,14361954	1	0,14361954	19,70	0,0030
Erro	0,05103890	7	0,00729127		
Total	0,93341000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

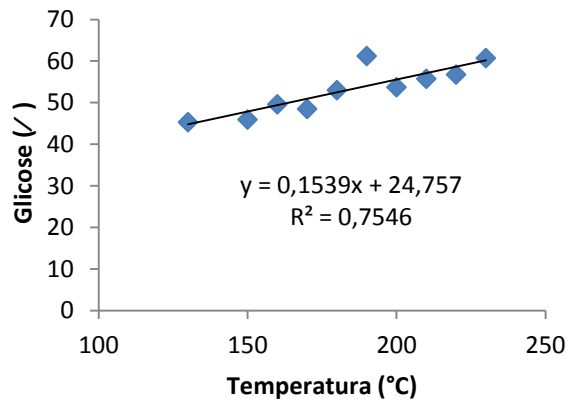


Figura 6 - Gráfico de regressão do teor de glicose presente na fração sólida pré-tratada em função da temperatura.

Tabela 7 - Análise de regressão para teor de glicose (%) dos sólidos após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	218,9326071	1	218,9326071	24,60	0,0011
Temperatura (L)	218,9326071	1	218,9326071	24,60	0,0011
Erro	71,1979929	8	8,897491		
Total	290,1306000	9			

(L) - efeito linear

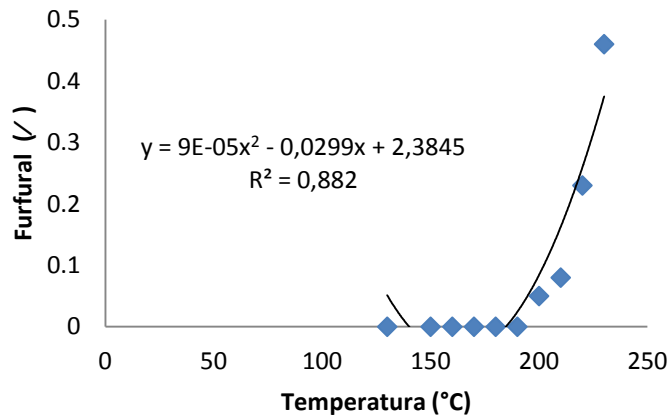


Figura 7 - Gráfico de regressão do teor de furfural presente no licor do pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 8 - Análise de regressão para teor de furfural (%) dos licores após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,18184090	2	0,9092045	26,17	0,0006
Temperatura (L)	0,05478026	1	0,05478026	15,77	0,0054
Temperatura (Q)	0,12706064	1	0,12706064	36,57	0,0005
Erro	0,02431910	7	0,00347416		
Total	0,20616000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

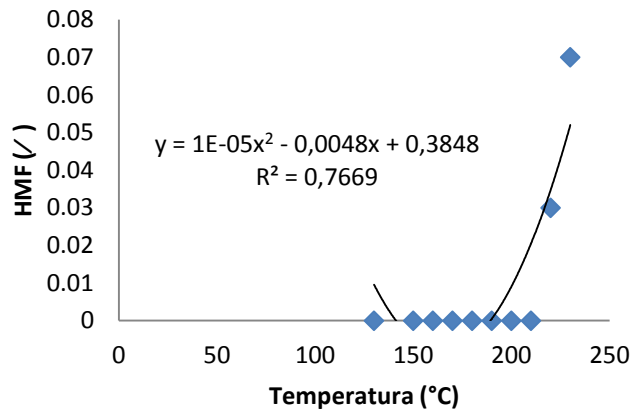


Figura 8 - Gráfico de regressão do teor de hidroximetilfurfural presente no licor do pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 9 - Análise de regressão para teor de hidroximetilfurfural (%) dos licores após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,00368106	2	0,00184053	11,51	0,0061
Temperatura (L)	0,00138471	1	0,00138471	8,66	0,0216
Temperatura (Q)	0,00229635	1	0,00229635	14,37	0,0068
Erro	0,00111894	7	0,00015985		
Total	0,00480000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

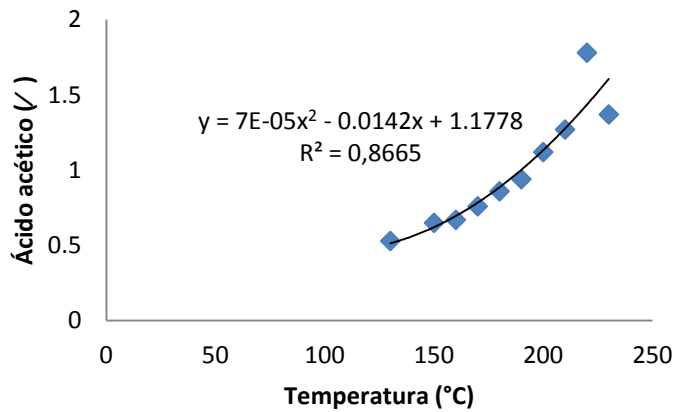


Figura 9 - Gráfico de regressão do teor de ácido acético presente no licor do pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 10 - Análise de regressão para teor de ácido acético (%) dos licores após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	1,18311429	2	0,59155714	22,71	0,0009
Temperatura (L)	0,01228521	1	0,01228521	0,47	0,5143
Temperatura (Q)	1,17082908	1	1,17082908	44,95	0,0003
Erro	0,18233571	7	0,02604796		
Total	1,36545000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

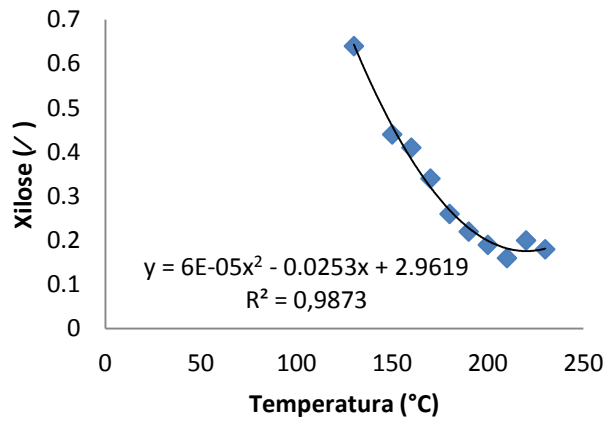


Figura 10 - Gráfico de regressão do teor de xilose presente no licor do pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 11 - Análise de regressão para teor de xilose (%) dos licores após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,210113013	2	0,10506507	217,40	0,0001
Temperatura (L)	0,03918343	1	0,03918343	101,22	0,0001
Temperatura (Q)	0,17094671	1	0,17094671	441,58	0,0001
Erro	0,00270987	7	0,00038712		
Total	0,21284000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

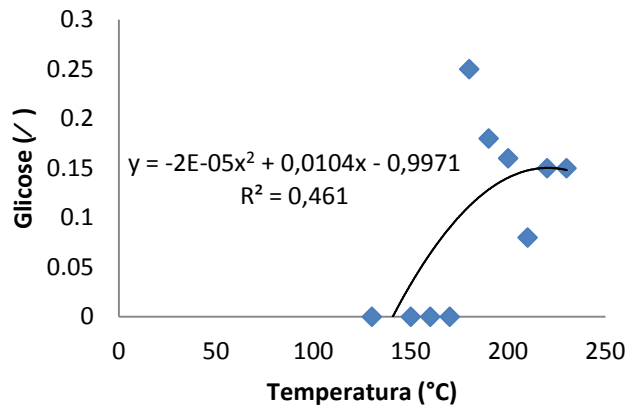


Figura 11 - Gráfico de regressão do teor de glicose presente no licor do pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 12 - Análise de regressão para teor de glicose (%) dos licores após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma	Graus de	Média	Teste F	p-valor
	Quadrática	liberdade	Quadrática		
Modelo	0,03586997	2	0,01793499	2,99	0,1150
Temperatura (L)	0,006627558	1	0,006627558	1,11	0,3279
Temperatura (Q)	0,02924239	1	0,02924239	4,88	0,0629
Erro	0,04194003	7	0,00599143		
Total	0,07781000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

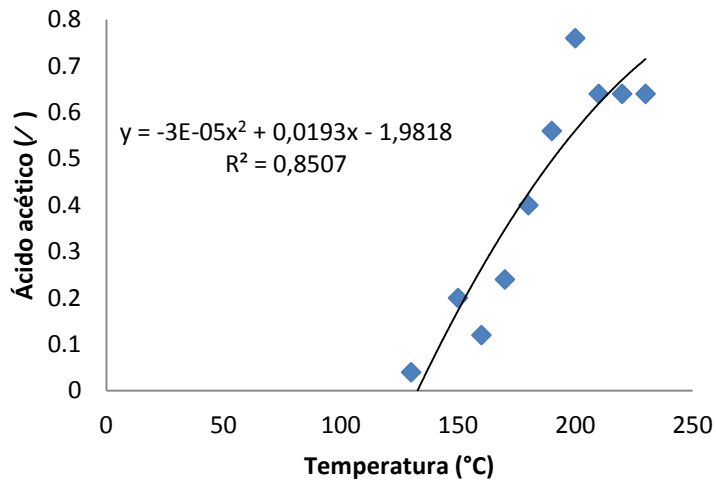


Figura 12 - Gráfico de regressão do teor de ácido acético presente na água de lavagem do pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 13 - Análise de regressão para teor de ácido acético (%) da água de lavagem após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,50690075	2	0,25345037	19,95	0,0013
Temperatura (L)	0,02280995	1	0,02280995	1,80	0,2221
Temperatura (Q)	0,48409080	1	0,48409080	38,10	0,0005
Erro	0,08893925	7	0,01270561		
Total	0,59584000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

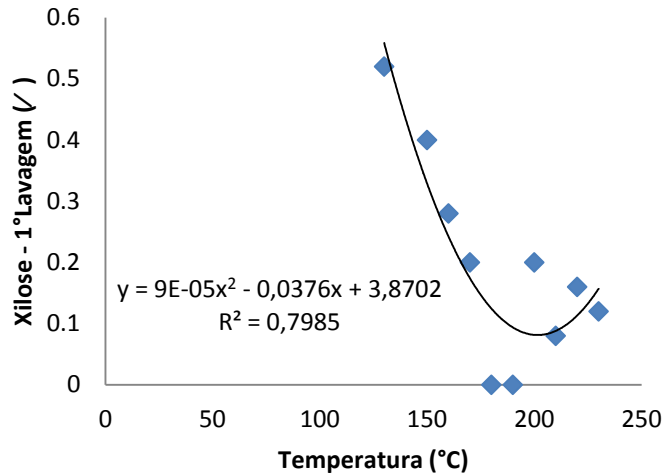


Figura 13 - Gráfico de regressão do teor de xilose da primeira água de lavagem após pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 14 - Análise de regressão para teor de xilose (%) da primeira água de lavagem após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,20045452	2	0,10022726	13,87	0,0037
Temperatura (L)	0,08651421	1	0,08651421	11,97	0,0105
Temperatura (Q)	011394031	1	011394031	15,77	0,0054
Erro	0,05058548	7	0,00722650		
Total	0,25104000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

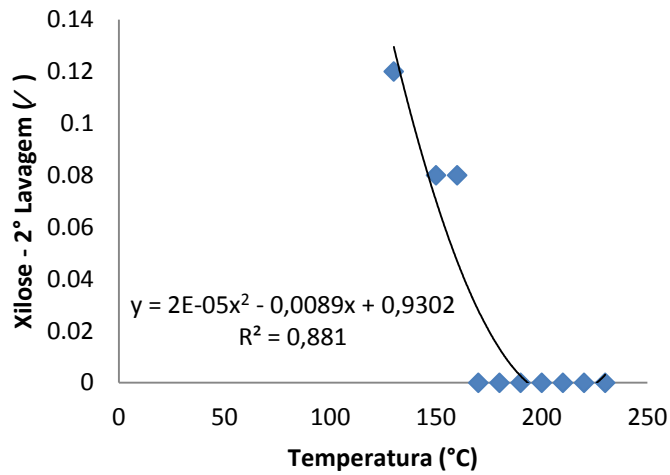


Figura 14 - Gráfico de regressão do teor de xilose da segunda água de lavagem após pré-tratamento hidrotérmico em função da temperatura.

Tabela 15 - Análise de regressão para teor de xilose (%) da segunda água de lavagem após pré-tratamento hidrotérmico.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,01705528	2	0,00852764	25,90	0,0006
Temperatura (L)	0,00487419	1	0,00487419	14,80	0,0063
Temperatura (Q)	0,01218109	1	0,01218109	37,00	0,0005
Erro	0,00230472	7	0,00032925		
Total	0,01936000	9			

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

APÊNDICE C

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) para teor de xilose (%) dos sólidos pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	3,83	5	0,77	8,20	0,0117
Temperatura (L)	2,47	1	2,47	26,39	0,0021
Concentração NaOH (%) (L)	1,31	1	1,31	14,02	0,0096
Resíduo	0,56	6	0,093		
Falta de ajuste	0,36	3	0,12	1,73	0,3318
Erro Puro	0,21	3	0,068		
Total	4,39	11			
R^2	0,8724				
R^2 ajustado	0,7660				

(L) - efeito linear

$$Y = 5,08 - 0,56 \text{ Temperatura} - 0,41 \text{ Concentração NaOH} \quad (1)$$

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para teor de galactose (%) dos sólidos pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,015	5	0,003	31,97	0,0003
Temperatura (L)	0,0041	1	0,0041	43,22	0,0006
Concentração NaOH (%) (L)	0,0083	1	0,0083	87,41	0,0001
Temperatura (Q)	0,00072	1	0,00072	7,62	0,0328
Concentração NaOH (%) (Q)	0,0014	1	0,0014	14,29	0,0092
Resíduo	0,00057	6	0,0001		
Falta de ajuste	0,0005	3	0,0002	6,57	0,0782
Erro Puro	0,00008	3	0,00003		
Total	0,016	11			
R^2	0,9638				
R^2 ajustado	0,9337				

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrática

$$Y = 0,17 - 0,023 \text{ Temperatura} - 0,032 \text{ Concentração NaOH} - 0,011 \text{ Temperatura}^2 + 0,015 \text{ Concentração NaOH} \quad (2)$$

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para teor de arabinose (%) dos sólidos pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,78	5	0,16	46,72	0,0001
Temperatura (L)	0,36	1	0,36	108,59	0,0001
Concentração NaOH (%) (L)	0,34	1	0,34	102,28	0,0001
Concentração NaOH (%) (Q)	0,060	1	0,060	17,91	0,0055
Resíduo	0,020	6	0,003		
Falta de ajuste	0,018	3	0,006	9,70	0,0471
Erro Puro	0,009	3	0,0006		
Total	0,80	11			
R^2	0,9750				
R^2 ajustado	0,9541				

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

$$Y = 0,55 - 0,21 \text{ Temperatura} - 0,21 \text{ Concentração NaOH} + 0,098 \text{ Concentração NaOH}^2 \quad (3)$$

Tabela 19 - Análise de variância (ANOVA) para rendimento (%) dos sólidos pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	128,77	5	25,75	8,26	0,0115
Temperatura (L)	28,82	1	28,82	9,25	0,0228
Concentração NaOH (%) (L)	87,71	1	87,71	28,15	0,0018
Resíduo	18,70	6	3,12		
Falta de ajuste	9,76	3	3,25		
Erro Puro	8,94	3	2,98	1,09	0,4721
Total	147,47	11			
R^2	0,8732				
R^2 ajustado	0,7676				
(L) - efeito linear					

$$Y = 49,36 - 1,91 \text{ Temperatura} - 3,33 \text{ Concentração NaOH} \quad (4)$$

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) para teor de glicose (%) da 1° lavagem dos pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,11	5	0,023	22,02	0,0009
Temperatura (L)	0,029	1	0,029	27,88	0,0019
Concentração NaOH (%) (L)	0,030	1	0,030	28,35	0,0018
Temperatura x Conc. NaOH	0,036	1	0,036	34,60	0,0011
Concentração NaOH (%) (Q)	0,016	1	0,016	15,36	0,0078
Resíduo	0,006	6	0,001		
Falta de ajuste	0,005	3	0,002	4,69	0,1182
Erro Puro	0,001	3	0,0004		
Total	0,12	11			
R^2	0,9483				
R^2 ajustado	0,9053				

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

$$Y = 0,42 + 0,061 \text{ Temperatura} + 0,061 \text{ Concentração NaOH} + 0,095 \text{ Temperatura x Concentração NaOH} - 0,051 \text{ Concentração NaOH}^2 \quad (5)$$

Tabela 21 - Análise de variância (ANOVA) para teor de glicose (%) da 2ª lavagem dos sólidos pré-tratados com hidróxido de sódio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Modelo	0,24	5	0,048	14,04	0,0029
Temperatura (L)	0,028	1	0,028	8,22	0,0286
Concentração NaOH (%) (L)	0,10	1	0,10	29,61	0,0016
Temperatura (Q)	0,032	1	0,032	9,40	0,0221
Concentração NaOH (%) (Q)	0,094	1	0,094	27,47	0,0019
Resíduo	0,021	6	0,003		
Falta de ajuste	0,020	3	0,007	29,43	0,0100
Erro Puro	0,0007	3	0,0002		
Total	0,26	11			
R^2	0,9213				
R^2 ajustado	0,8556				

(L) - efeito linear; (Q) - efeito quadrático

$$Y = 0,35 + 0,060 \text{ Temperatura} + 0,11 \text{ Concentração NaOH} - 0,072 \text{ Temperatura}^2 - 0,12 \text{ Concentração NaOH}^2 \quad (6)$$

CAPITULO 2 - Pré-tratamento do pseudocaule de bananeira utilizando reator Parr

Os experimentos descritos nesse capítulo foram realizados no laboratório de Celulose e Papel localizado na Universidade Federal de Viçosa.

Artigo - Otimização do pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira visando a produção de etanol de segunda geração

Resumo

Neste estudo, diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico foram avaliadas para conversão de pseudocaule de bananeira em açúcares fermentescíveis. Para a obtenção de uma equação de regressão, utilizou-se o Delineamento Composto Central (CCD), em função das seguintes variáveis: razão sólido/líquido (1/10; 1/12,5; 1/15), temperatura (170 °C, 190 °C, 210 °C) e tempo de reação (10 min, 15 min, 20 min). Os resultados indicaram que a digestibilidade da celulose melhorou em todas as condições testadas com digestibilidade máxima alcançada na seguinte condição de pré-tratamento: temperatura de 210 °C por 10 minutos e sólido/líquido de 1/15. O rendimento de glicose nessa condição foi de 58,4 g/L, com rendimento de sacarificação de 98 %. Estes resultados indicam que o pré-tratamento hidrotérmico nas condições realizadas nesse experimento foi efetivo na remoção da porção de hemiceluloses, tornando a fração celulósica mais acessível à hidrólise enzimática.

Palavras-chave: biomassa; pseudocaule de bananeira; pré-tratamento hidrotérmico; hidrólise enzimática

1. Introdução

Atualmente há um crescente interesse mundial em fontes alternativas de energia. O aquecimento global dado pelo acúmulo de gases de efeito estufa, impulsiona o desenvolvimento de processos industriais baseados em energia renovável.

A disponibilidade de matéria-prima celulósica renovável é quase ilimitada em todo o mundo. A produção de bioenergia em larga escala requer a utilização de matérias-primas como as biomassa lignocelulósicas, que não competem com fontes alimentares. A biomassa lignocelulósica, representada principalmente pelos resíduos agrícolas lignocelulósicos, é considerada matéria-prima promissora por representar uma fonte natural, barata e sustentável para a produção de bioenergia como o bioetanol [2]. Potencialmente, o bioetanol pode ser produzido pela fermentação de açúcares derivados da hidrólise da biomassa lignocelulósica. Dada a ampla disponibilidade dos resíduos agroindustriais no Brasil, torna-se uma opção muito atraente a utilização desse material para a produção de biocombustíveis.

Anualmente cerca de 1×10^{10} toneladas de biomassa lignocelulósica é produzida em todo o mundo [3]. A biomassa lignocelulósica consiste principalmente de carboidratos (até 75 %) que podem se tornar uma fonte essencial de açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustíveis líquidos, bem como uma grande variedade de produtos químicos e materiais biodegradáveis [4]. A disposição destes componentes dentro da biomassa faz com que seja uma estrutura extremamente complexa. As hemiceluloses são fortemente ligadas à lignina através de ligações covalentes e de hidrogênio, que tornam a estrutura altamente resistente [5]. Devido a esta natureza recalcitrante, é necessário submeter a biomassa a pré-tratamentos físicos e/ou químicos antes da sua hidrólise em monossacárideos fermentescíveis.

Estudos anteriores relataram o pré-tratamento como uma das etapas mais caras no processo de produção de etanol celulósico e, de fato, o desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento econômicas tornou-se o desafio mais importante no contexto de biorrefinaria [6, 7].

No campo da utilização da biomassa, o processo hidrotérmico é o método mais utilizado para a obtenção de monossacárideos a partir de resíduos agrícolas [8]. Neste método, ocorre a degradação térmica da biomassa causando quebra de ligações glicosídicas dos carboidratos, especialmente das hemiceluloses. Devido à

sua natureza complexa, as hemiceluloses não possuem a mesma estrutura cristalina e a mesma resistência que a celulose e, portanto, degradam-se mais facilmente quando submetida a tratamento térmico [9]. Uma parte das hemiceluloses é degradada em ácidos orgânicos, furfurais. Durante o pré-tratamento, pequenas quantidades de celulose também são solubilizadas como oligômeros, podendo também gerar produtos de degradação [10]. O pré-tratamento hidrotérmico melhora a hidrólise enzimática da celulose através de um aumento no tamanho dos poros aumentado com isso o acesso das enzimas à porção de carboidratos, além de diminuir a associação desses carboidratos com a porção de lignina. Além disso, este processo não requer adição e recuperação de quaisquer produtos químicos [12].

A biomassa escolhida para este fim é o pseudocaule de bananeira. O Brasil é um dos maiores produtores de alimentos do mundo e ocupa o quinto lugar na produção mundial de bananas, com uma produção média de 7 milhões de toneladas por ano. Para cada tonelada de bananas colhidas, são geradas cerca de 4 toneladas de resíduos lignocelulósicos; entre os quais 75 % são constituídos por pseudocaule de bananeira [13].

Diversos estudos foram realizados utilizando este método de pré-tratamento em diferentes biomassas como palha de trigo [14], bagaço de cana-de-açúcar [15], palha de cana-de-açúcar [16]. Os autores também relataram que parâmetros de pré-tratamento tais como temperatura, tempo de reação e relação sólido/líquido podem ser críticos para manter o desempenho do sistema. Portanto, neste trabalho, foi empregada uma metodologia experimental de superfície de resposta (RSM) com delineamento composto central (CCD) para investigar a influência das variáveis independentes do pré-tratamento (temperatura, tempo de reação e razão sólido/líquido) na variável resposta (rendimento de glicose após hidrólise enzimática). Ao contrário da otimização clássica, a metodologia de superfície de resposta (RSM) envolve a integração de técnicas matemáticas e estatísticas para analisar os efeitos de várias variáveis de resposta independentes. Além disso, este método leva a um número reduzido de ensaios, o que resulta em economia de tempo e materiais [17, 18].

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

O pseudocaule de bananeira (variedade "Prata Anã") foi colhido manualmente em março de 2012 em plantações localizadas em Janaúba, Brasil. As matérias-primas foram secas à temperatura ambiente durante sete dias, moídas em moinho de martelo, obtendo-se partículas com tamanho de até de 20 mesh, e posteriormente armazenados em saco plásticos até serem utilizados em experimentos subsequentes. Os reagentes furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), D-glucose, D-xilose, metanol e ácido acético foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. Reagentes químicos, incluindo ácido sulfúrico, ácido cítrico, fosfato de sódio, acetona e ácido fórmico foram obtidos da Vetec Fine Chemical (Duque de Caxias, RJ, Brasil). As soluções enzimáticas, celulasas, β -glucosidase (Cellic CTec2) foram gentilmente cedidas pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Todos os outros reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

2.2. Pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em reator Parr (modelo 4848 M) equipado com um agitador mecânico e serpentinas de arrefecimento no interior para melhor controle da temperatura. Quinze experimentos foram realizados utilizando pseudocaule de bananeira sob diferentes condições de pré-tratamento. Um Delineamento Composto Central foi realizado com quatro pontos centrais e três níveis para cada variável analisada, sendo essas: temperatura (170 °C, 190 °C e 210 °C), concentração pseudocaule/água (1/10, 1/12,5; 1/15) e tempos de reação (5, 10 e 15 min, excluído os períodos de aquecimento e resfriamento). Após o pré-tratamento, os materiais pré-tratados foram separados em frações sólida e líquida. A fração sólida foi lavada cuidadosamente com água até pH neutro, e em seguida foi armazenada em recipiente hermético para reter a umidade. A fração líquida teve o pH medido e em seguida foram armazenadas a -20 °C para posterior análises de caracterização química.

2.3. Caracterização química

Amostras de pseudocaule de bananeira tratado e *in natura* foram moídos em moinho de facas, sendo utilizado somente a fração retida entre peneiras de 40 e 60 mesh. Os resíduos moídos foram então mantidos em sala climatizada com controle

interno de temperatura e umidade relativa (23 ± 1 °C e umidade relativa de 50 ± 2 %) e armazenados em recipientes hermeticamente fechados. Após moagem foram realizadas análises de cinzas, minerais, lignina, carboidratos. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Inicialmente, as amostras foram submetidas à extração Soxhlet com acetona por cinco horas. A biomassa livre de extrativos (0,3 g) foi então submetida à hidrólise ácida utilizando H_2SO_4 a 72 % (p/p) (3 mL) a 30 °C durante 1 h. Os hidrolisados resultantes foram diluídos com 84 mL de água deionizada (até 4 % em peso de H_2SO_4) e autoclavados a 121 °C durante 1 h. Após autoclavagem, os hidrolisados foram filtrados para determinação gravimétrica de lignina insolúvel em ácido. Os filtrados resultantes foram utilizados para análise do teor de lignina solúvel e carboidratos. As ligninas solúveis em ácido foram determinadas por espectroscopia ultravioleta utilizando a equação 1, de acordo com SCAN-CM 71:09 [19]:

$$C \text{ (g / L)} = 4,53 \text{ (Al-Ac)} / 300 \quad (1)$$

Onde Al e Ac correspondem à absorvância em comprimento de onda de 215 nm e 280 nm, respectivamente.

O filtrado foi analisado por Cromatografia Iônica (IC- 3000 Dionex) com um detector amperométrico pulsado (HPAE-PAD). Para a separação dos açúcares do filtrado foi utilizado uma coluna de proteção Carbo-Pac PA1 e uma coluna analítica conectadas em série. A água foi utilizada como eluente a uma taxa de 1,0 mL/min e à temperatura de 28 °C. Os picos dos cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares a serem analisados, sendo a quantificação feita pela área do analito em uma curva de calibração de cada composto. Os teores de celulose e hemiceluloses foram calculados a partir dos açúcares individuais utilizando procedimentos matemáticos como descrito na mesma referência acima.

O conteúdo de cinzas das amostras foi analisado por método gravimétrico. As amostras (0,5 g) foram incineradas a 575 °C durante 3 h. Após calcinação, as amostras foram mantidas em dessecador até à temperatura ambiente e pesadas. A incineração foi repetida até massa constante.

2.4. Análise de ácidos orgânicos e furfurais

A fração líquida foi caracterizada quanto aos teores de ácidos orgânicos (ácido fórmico e ácido acético) e furfurais (2-furaldeído e 5-hidroximetilfurfural - HMF). Na análise dos ácidos orgânicos utilizou-se um sistema de HPLC equipado com um detector de índice de refração (RID) e uma coluna Aminex HPX-87H a 45 °C, fluxo de 0,6 mL/min e $5 \cdot 10^{-3}$ M de H_2SO_4 como fase móvel. Os furfurais foram analisados por HPLC equipado com uma coluna Phenomenex C18 (2) 100A (250 mm x 4,6 mm, 5,0 μm), temperatura do forno de 25 °C, detector UV (279 nm), e fase móvel composta por metanol 11,2 % (% em volume) contendo ácido acético (1 %) e 88,8 % (% em volume) em fluxo de 0,8 mL / min.

2.5. Análise estatística

O pré-tratamento hidrotérmico foi otimizado pelo ajuste das variáveis independentes razão sólido/líquido (S/L), temperatura e tempo de reação por meio de um Delineamento Composto Central (CCD) composto de 18 ensaios sendo 3 variáveis com 3 níveis e 4 pontos centrais. A variável dependente foi a concentração de glicose (g/L) após hidrólise enzimática.

A qualidade do ajuste do modelo estatístico foi expressa pelo coeficiente de determinação (R^2) e sua significância foi avaliada pelo teste F com 95 % de confiança. Os efeitos das variáveis foram medidos através da análise de gráficos de Pareto e gráficos de superfície de resposta. O CCD e a análise estatística foram realizados utilizando o software *Statistica*® 13.0.

2.6. Sacarificação de biomassa

A etapa de sacarificação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 4 g (peso seco) de pseudocaule de bananeira e 50 mL de tampão de citrato de sódio, 50 mol m^{-3} , pH 4,8, contendo 5,4 % (% em peso) de celulasas comerciais (Cellic Ctec 2) e 0,3 % (p/v) de azida de sódio para prevenir o crescimento microbiano. Os Erlenmeyers foram mantidos em shaker durante 72 horas à 50 °C sob 150 rpm de agitação contínua. Após 72 horas de incubação, alíquotas de cada Erlenmeyer foram mantidas em banho à 100 °C por 5 minutos, seguida de centrifugação a 13000 g durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a -4 °C para posterior determinação do teor de glicose. As análises foram feitas em triplicata. A quantificação do teor de glicose dos sobrenadantes foram

realizadas utilizando HPLC com um detector de índice de refração (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e uma coluna Aminex-HPX-87P (Shimadzu) a 80 °C, fluxo de 0,6 mL/min, utilizando 5 mol m⁻³ de H₂SO₄ como fase móvel. Os carboidratos foram calculados comparando-se a área de cada padrão de açúcar através de uma curva de calibração de cada composto.

As taxas da hidrólise da celulose foram calculadas utilizando a seguinte equação:

$$\text{Rendimento de sacarificação de glicose (\%)} = \frac{\text{Quantidade de glicose (g)} \times 0,9 \times 100}{\text{Quantidade de celulose no pseudocaulo (g)}} \quad (2)$$

3. Resultados e Discussões

3.1. Composição da matéria-prima

A Tabela 1 mostra a comparação das composições química do pseudocaulo de bananeira *in natura* e de outros materiais lignocelulósicos potencialmente utilizados para a produção de bioetanol.

Tabela 1 - Composição química, comparação do pseudo-tronco da bananeira com outra biomassa (% base seca)

	Pseudocaulo de bananeira ^a	Bagaço de cana ^[20]	Palha de cana ^[21]	Palha de trigo ^[22]
Celulose	44,9 ± 0,7	45,0	44,2	35,0
Hemiceluloses	14,2 ± 0,1	26,0	31,1	22,3
Lignina Total	13,2 ± 0,1	20,0	19,0	15,6
Cinzas	10,2 ± 0,0	2,1	4,8	6,5

a - Presente estudo

Nota-se que a soma dos componentes do pseudocaulo de bananeira atingiu cerca de 82,5-83,4 %. Isso se deve ao fato de que alguns compostos presentes no material não foram quantificados como ácidos urônicos, extrativos, entre outros.

Trabalhos anteriores encontraram faixa percentual de celulose de 33-50 %, 9-15 % de hemicelulose e 11-18 % de lignina, em amostras de pseudocaulo de bananeira [23, 24, 25]. Portanto, a composição química do pseudocaulo de bananeira deste trabalho se encontra dentro da faixa de valores relatados por outros autores. Normalmente, as comparações entre os valores de composição química

são feitas por faixas e não valores fixos. Isso ocorre devido a influência de fatores como variações climáticas, constituição de solo, métodos de plantio, época de colheita entre outros, fazendo com que plantas da mesma espécie apresentem valores de composição diferentes [26].

O percentual de celulose do pseudocaule de bananeira utilizado neste trabalho foi de 45 %. Dados comparativos mostram valores similares a outros materiais lignocelulósicos como bagaço de cana e palha de cana e valores superiores à palha de trigo (Tabela 1). Dessa forma, o teor de celulose do pseudocaule de bananeira é considerado alto, podendo ser considerado uma biomassa vegetal interessante para produção de etanol celulósico.

Por outro lado, o pseudocaule possui um baixo teor de hemiceluloses e lignina. Isso pode ser considerado vantajoso para a produção de etanol, uma vez que a lignina pode limitar a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. A lignina atua como uma barreira física, dificultando o acesso das enzimas às porções de carboidratos.

Quanto ao teor de cinzas, o pseudocaule de bananeira apresentou em torno de 10 %, representado por resíduos inorgânicos que permanecem no material vegetal após queima a altas temperaturas. A proporção destes componentes nos resíduos agrícolas depende de vários fatores como espécie, idade, tipo de solo, clima, condições de combustão o que torna a composição altamente variável [27].

3.2. Condições do processo de pré-tratamento

A separação dos componentes individuais presentes na biomassa *in natura* é considerada uma importante abordagem na biorrefinaria, uma vez que a composição da biomassa afeta a eficiência de processo, além de influenciar na escolha dos pré-tratamentos necessários para maximizar a recuperação dos açúcares. Um pré-tratamento ideal deve ser barato, minimizar a produção de resíduos tóxicos e resultar na recuperação da maioria dos componentes lignocelulósicos em frações separadas [28].

Durante o pré-tratamento hidrotérmico, a maior parte da fração de hemiceluloses foram dissolvidas na fase líquida, enquanto que a celulose ficou retida na porção sólida, assim como a maior parte da lignina insolúvel. No entanto, a proporção de compostos solúveis depende das condições de pré-tratamento. Além da remoção da fração de hemiceluloses, o pré-tratamento hidrotérmico também

provoca a quebra da estrutura celulósica favorecendo a etapa de hidrólise enzimática. A composição química das frações sólidas e líquidas após o pré-tratamento hidrotérmico do pseudocaule de bananeira é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química dos pré-tratados do pseudocaule de bananeira

Ensaio	Condições de Pré-tratamento			Componentes das frações sólidas (base seca %)			Componentes das frações líquidas (base seca %)		
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	S/L (g/mL)	Lignina	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Celulose	Hemicelulose
1	170	10	1/10	16,7±0,2	58,5±0,5	9,5±0,1	15,5±0,9	35,3±1,0	6,1±0,1
2	170	10	1/15	14,1±0,1	52,2±0,5	14,0±0,2	16,6±0,1	40,3±0,1	5,3±0,0
3	170	20	1/10	17,2±0,1	58,1±0,1	8,6±0,1	19,7±0,6	36,8±1,0	6,3±0,1
4	170	20	1/15	16,9±0,1	57,5±0,3	10,0±0,1	16,9±0,0	39,2±0,7	7,1±0,1
5	210	10	1/10	24,4±0,0	65,9±0,0	0,9±0,0	32,5±0,5	0	0,1±0,0
6	210	10	1/15	20,9±0,2	65,7±0,1	0,7±0,0	38,4±0,5	0	0,1±0,0
7	210	20	1/10	24,2±0,5	60,1±0,1	0,5±0,0	45,8±0,2	0,01	0,1±0,0
8	210	20	1/15	20,5±0,2	65,8±0,5	1,2±0,0	37,1±0,2	0	0,2±0,0
9	162	15	1/12,5	14,0±0,0	54,3±0,2	13,6±0,0	14,1±0,1	43,1±0,3	4,7±0,0
10	218	15	1/12,5	25,4±0,0	58,5±0,9	0,4±0,0	39,9±0,0	0	0,2±0,0
11	190	8	1/12,5	17,0±0,0	65,3±0,0	4,0±0,0	21,8±0,9	29,9±1,0	4,6±0,1
12	190	22	1/12,5	17,5±0,1	67,5±1,0	4,8±0,0	22,1±0,7	25,8±1,0	2,9±0,0
13	190	15	1/9	19,1±0,2	68,7±0,1	4,1±0,0	28,3±0,3	25,6±0,0	2,5±0,0
14	190	15	1/16	19,3±0,1	65,0±0,7	2,9±0,0	32,2±0,5	20,6±0,0	1,9±0,0
15	190	15	1/12,5	17,5±0,1	64,8±0,7	3,2±0,1	26,7±0,0	26,7±1,0	3,1±0,0
16	190	15	1/12,5	18,1±0,3	65,0±0,9	3,0±0,0	31,2±0,1	22,5±0,3	1,9±0,0
17	190	15	1/12,5	18,5±0,5	65,1±0,4	3,0±0,2	30,7±0,1	23,4±0,2	2,0±0,1
18	190	15	1/12,5	18,3±0,3	64,8±0,3	3,1±0,1	31,2±0,0	22,8±0,2	1,9±0,0

Nota-se que os ensaios realizados em temperaturas de pré-tratamento acima de 200 °C removeram cerca de 90 % da fração de hemiceluloses da fração sólida. No entanto apenas uma pequena quantidade de hemicelulose foi recuperada na fração líquida, o que pode ser explicado pelo fato da xilose, monossacarídeo predominante na fração de hemiceluloses, sofrer reações de desidratação formando ácido orgânicos e furanos em condições severas de pré-tratamento. A maior porcentagem de hemicelulose na fração sólida foi obtida no ensaio 2 (170 °C, 10

min, 1/15), submetido aos menores valores de temperatura e tempo de reação durante o pré-tratamento. Essa condição pode ser considerada branda para solubilização efetiva das hemiceluloses.

Após o pré-tratamento, a celulose é predominante na fração sólida, como consequência direta da remoção da porção de hemiceluloses. A porcentagem relativa da celulose na fração sólida foi de 52,3 % a 170 °C (1/15, 10 min), 65,1 % a 190 °C (1/12,5; 15 min) permanecendo próximo deste valor a 210 °C e 58,6 % a 218 °C (1/12,5; 15 min). Estes resultados sugerem que o aumento da temperatura de pré-tratamento até um certo valor (até 210 °C) provoca um aumento da concentração da porção de celulose na fração sólida. Além disso, os menores valores de celuloses na fração líquida também foram obtidas em ensaios com temperatura acima de 200 °C, assim como foi observado nas hemiceluloses. Isso pode ser explicado pela geração de inibidores a partir da porção de glicose, assim como ocorre nas xiloses. Devido a porção cristalina, a fração celulósica é considerada mais resistente à solubilização do que as hemiceluloses. Entretanto, a glicose, assim como xilose, podem sofrer reações de desidratação, formando ácidos orgânicos e furanos. Com isso, pode-se afirmar que as condições realizadas nos ensaios em temperaturas acima de 200 °C são suficientes para remoção das hemiceluloses e podem resultar em perda de fração celulósica, com formação de produtos de degradação à partir desses monossacarídeos. Esse resultado é consistente com o estudo anterior [29] que afirma que as ligações glicosídicas nos segmentos da porção amorfa de celulose começam a ser rompidas em temperaturas acima de 200 °C.

A porcentagem relativa de lignina na fração líquida também aumentou com o aumento da severidade do pré-tratamento, consequência direta da remoção dos açúcares não celulósicos provocadas pelo pré-tratamento hidrotérmico. As maiores porcentagens relativas de lignina na fração sólida foram obtidas em ensaios com temperatura acima de 200 °C, devido à maior remoção das hemiceluloses nessas condições.

3.3. Análise de furfurais e ácidos orgânicos

Durante o processo de pré-tratamento hidrotérmico, foram gerados alguns inibidores, principalmente em temperaturas de pré-tratamento mais elevadas. Concentrações dos principais inibidores, incluindo ácido acético, furfural e 5-

hidroximetilfurfural (HMF), são a principal preocupação na biomassa pré-tratada. Glicose e xilose podem ser desidratados em HMF e furfural. Acredita-se que os ácidos orgânicos sejam gerados a partir da reidratação destes furanos. Estes produtos de degradação podem formar estruturas semelhantes à lignina insolúvel, que se depositam nas fibras pré-tratadas e, portanto, diminuem a acessibilidade das celulases à fração de celulose. Os teores dos furfurais e ácidos orgânicos da fração líquida são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição química dos furfurais e ácidos orgânicos da fração líquida.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	S/L (g/mL)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Fórmico (g/L)
1	170	10	1/10	0,08	0,0046	1,11	0
2	170	10	1/15	0	0	0,94	2,06
3	170	20	1/10	0,11	0,011	0,89	1,33
4	170	20	1/15	0	0	0,93	2,36
5	210	10	1/10	0,54	1,48	2,60	1,54
6	210	10	1/15	0,62	1,38	2,89	5,09
7	210	20	1/10	0,68	1,62	8,55	10,2
8	210	20	1/15	0,32	0,72	2,53	0
9	162	15	1/12,5	0	0	1,94	1,87
10	218	15	1/12,5	0,43	1,17	4,49	5,43
11	190	8	1/12,5	0,32	0,19	0,88	1,63
12	190	22	1/12,5	0,26	0,16	3,57	5,85
13	190	15	1/9	0,58	0,49	3,79	4,56
14	190	15	1/16	0,38	0,42	0,77	0
15	190	15	1/12,5	0,42	0,33	1,43	2,23
16	190	15	1/12,5	0,46	0,42	1,42	2,31
17	190	15	1/12,5	0,43	0,40	1,40	2,28
18	190	15	1/12,5	0,42	0,44	1,42	2,33

Os ensaio 9 (162 °C, 1/12,5; 15 min), 2 (170 °C, 1/15, 10 min) e 4 (170 °C, 1/15, 20 min) não apresentaram furfurais (furfural e HMF). Os mesmos ensaios

apresentaram os maiores teores de hemiceluloses e celulose na fração sólida. As condições desses ensaios podem ser muito brandas para a dissolução dos açúcares, o que geraria menor quantidade de produtos de degradação.

Pode-se observar a partir dos resultados da Tabela 3 que os teores dos ácidos orgânicos e furfurais aumentam com aumento da temperatura de tratamento até 210 °C. As suas concentrações máximas foram observadas no ensaio 7 (210 °C, 1/10, 20 min) com alto tempo e temperatura de pré-tratamento. Tempo e temperatura de pré-tratamento favorecem a formação de furfural e HMF, bem como a sua degradação em ácidos orgânicos como ácidos acético e fórmico.

3.4 Hidrólise enzimática

O rendimento de sacarificação das diferentes condições de pré-tratamento e do material *in natura* são apresentados na Figura 1.

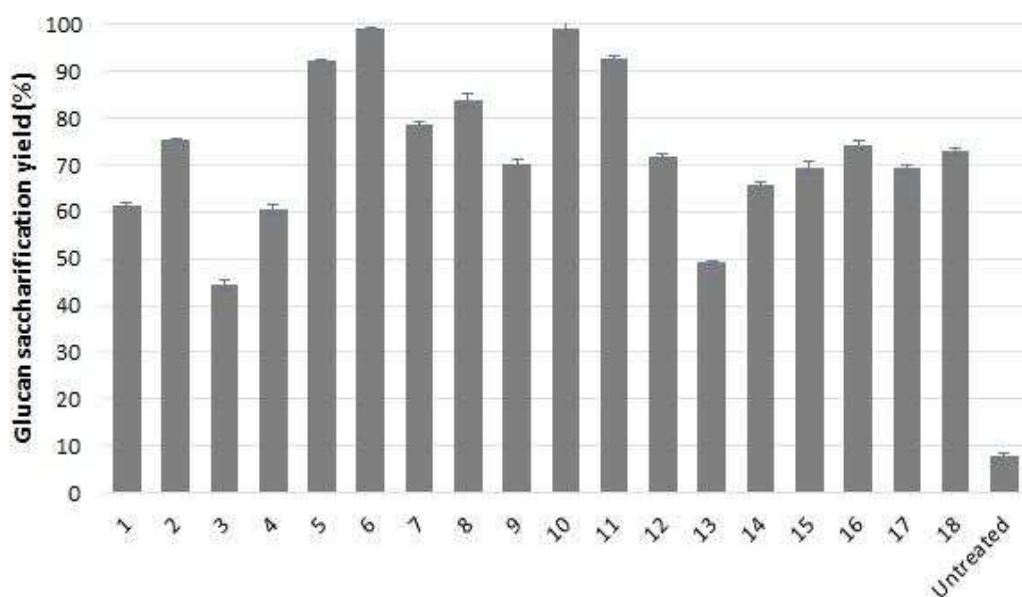


Figura 1 - Rendimento de sacarificação do pseudocaule de bananeira *in natura* e pré-tratado baseado nas condições do delineamento composto central para pré-tratamento hidrotérmico.

Os dados mostram que as diferenças nos rendimentos de glicose estão relacionadas com as condições de cada teste do desenho experimental. Um aumento na hidrólise enzimática é típico quando um pré-tratamento é aplicado a uma biomassa lignocelulósica.

Como esperado, houve um alto rendimento de glicose na biomassa pré-tratada (45-98 %) quando comparada com a biomassa não tratada (cerca de 8 %).

Os ensaios 3 (170 °C, 1/10, 20 min) e 13 (190 °C, 1/9, 15 min) apresentaram menores rendimentos de glicose, com menos de 50 % de rendimento após hidrólise enzimática. Isso pode ser explicado pelo maior conteúdo de hemiceluloses apresentado na fração sólida desses ensaios. A presença das hemiceluloses é um fator que contribui para bloquear fisicamente o acesso à celulose pelas celulasas. Já os ensaios 5, 6 e 10, apresentaram mais de 90 % de conversão em glicose.

As temperaturas de pré-tratamento mais elevadas (acima de 200 °C) apresentaram a melhor digestibilidade enzimática. Além disso, um pré-tratamento mais severo pode contribuir para hidrólise da celulose, o que poderia auxiliar no aumento do rendimento de glicose após a hidrólise enzimática. No entanto, comparando-se com os outros ensaios a uma temperatura mais elevada, o ensaio 7 (210 °C, 1/10, 20 min), apresentou menor libertação de glicose. Isso pode ser explicado pelo alto teor de furfurais e ácidos orgânicos (ácido acético e ácido fórmico) obtidos nesse ensaio (Tabela 3). Kristensen [30] sugeriu que a inibição do produto final é o principal fator que afeta os rendimentos de açúcar em altas concentrações de substrato, mas a extensão e o mecanismo exatos da inibição ainda não desconhecidos.

No que diz respeito à relação sólido/líquido, os resultados anteriores indicaram que valores de S/L mais elevados contribuem para maiores rendimentos de glicose após hidrólise enzimática. Os rendimentos de glicose nos ensaios com razão sólido/líquido de 1/15 foram maiores em relação aos valores de 1/10. O ensaio 13 (S/L de 1/9) obteve um rendimento de glicose de 45 % comparando com o ensaio 14 (S/L de 1/16) apresentando acima de 60 % de rendimento de sacarificação. Alta carga de sólidos durante o pré-tratamento e hidrólise enzimática oferece várias vantagens industriais, como o uso de menor tamanho do reator, maior taxa de hidrólise e menor consumo de água.

A sacarificação também foi afetada pelo tempo de reação. Quanto maior tempo de reação, menor os rendimentos de glicose. Os ensaios 5, 6, 10 e 11, realizados em um tempo de reação mais curto (10 min), apresentaram os maiores rendimentos de glicose. Tempos de reação mais curtos podem contribuir para redução dos custos do processo na produção do etanol de segunda geração.

3.5 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi realizada através do software *Statistica* para estimar as influências dos três fatores na liberação de glicose: temperatura, tempo e relação sólido/líquido (S/L).

Aplicando a análise de regressão múltipla nos dados experimentais, foi obtida uma equação polinomial de segunda ordem que descreve os modelos ajustados para os rendimentos de glicose após hidrólise enzimática dos pré-tratados hidrotérmicos do pseudocaule de bananeira ($p > 0,05$), levando em consideração somente os termos significativos:

$$\text{Rendimento de glicose (\%)} = 41,5 + 17,7 \text{ temperatura} - 8,1 \text{ tempo} + 6,4 \text{ tempo}^2 + 5,8 \text{ S/L} - 8,4 \text{ S/L}^2 \quad (3)$$

Quando os valores de temperatura, tempo e S/L foram substituídos na equação acima, as respostas preditas foram obtidas como mostrado abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores experimentais e preditos do delineamento composto central.

Ensaio	Glicose (g/L)	
	Experimental	Predito
1	31,6	32,8
2	35,0	36,4
3	23,0	25,1
4	31,4	32,7
5	54,0	52,9
6	58,4	56,5
7	41,5	40,3
8	49,0	48,0
9	34,5	30,4
10	51,5	55,2
11	53,7	54,1
12	43,5	42,7
13	30,2	29,7
14	37,9	37,6
15	39,2	41,3
16	43,0	41,3
17	40,0	41,3
18	42,1	41,3

A análise estatística das diferentes combinações das variáveis estudadas e suas respostas são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 – ANOVA dos modelos ajustados para rendimento de glicose após a hidrólise enzimática.

Fator	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Teste F	p-valor
Temperatura (L)	937,3	1	937,3	120,3	0,000004
Temperatura (Q)	1,043	1	1,043	0,1	0,7
Tempo (L)	196,4	1	196,4	25,2	0,001
Tempo (Q)	80,9	1	80,9	10,4	0,01
S/L (L)	99,7	1	99,7	12,8	0,007
S/L (Q)	137,4	1	137,4	17,6	0,003
Temperatura (L) by Tempo (L)	11,7	1	11,7	1,5	0,3
Temperatura (L) by S/L (L)	0,001	1	0,001	0,0002	1,0
Tempo (L) by S/L (L)	8,2	1	8,2	1,1	0,3
Erro	62,4	8	7,8		
Total SS	1532,1	17			
R ²	0,95930				
Adj R ²	0,91352				

(Q) - efeito quadrático; (L) - efeito linear.

A ANOVA é necessária para testar a significância e adequação dos modelos. Em geral, quanto menor o valor de p e maior o valor de F, mais significativo é o fator correspondente. Nota-se que os efeitos quadrático e linear das variáveis razão sólido/líquido e tempo foram estatisticamente significativos a um nível de $p < 0,05$. Em relação à temperatura, somente o efeito linear foi significativo.

O coeficiente de correlação múltipla (R^2) das equações de regressão obtidas da ANOVA foi de 0,95930 (R^2 ajustado = 0,91352), mostrando um ajuste satisfatório do modelo para os dados experimentais e indicando que o modelo poderia explicar 95 % das respostas ($p < 0,05$). Portanto, o modelo foi descrito com sucesso com base nas condições de reação utilizando a regressão linear.

Os efeitos das variáveis temperatura, tempo e razão sólido/líquido ($p < 0,05$) foram representados no gráfico de Pareto abaixo.

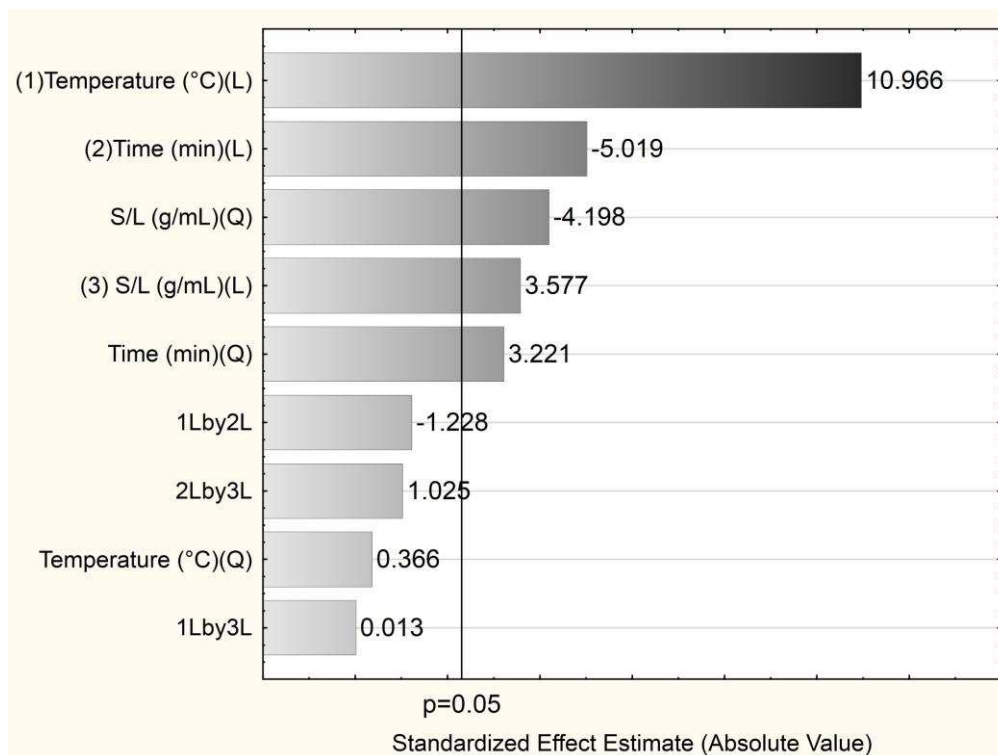


Figura 2 - Gráfico de Pareto para efeitos do rendimento de glicose.

A análise dos parâmetros significativos sugere que os efeitos lineares da temperatura e da relação sólido/líquido foram efeitos positivos. Isso indica que um aumento dessas variáveis, dentro dos intervalos estudados, aumenta a liberação de glicose na hidrólise enzimática. Por outro lado, o efeito linear do tempo teve efeito negativo, indicando que o aumento no tempo leva a diminuição do rendimento de glicose. Apesar da relação sólido/líquido ter apresentado um efeito positivo, o seu efeito quadrático foi negativo. Isto indica uma região de valor ótimo dessa variável.

As representações dos gráficos de superfície de resposta destacam visualmente as equações de regressão. Cada gráfico representa um número de combinações de duas variáveis independentes testadas enquanto as outras duas variáveis independentes são mantidas em seus níveis de ponto central. Os gráficos mostram as interações entre temperatura e tempo (figura 3a), razão sólido/líquido e tempo (figura 3b), temperatura e relação sólido/líquido (figura 3c).

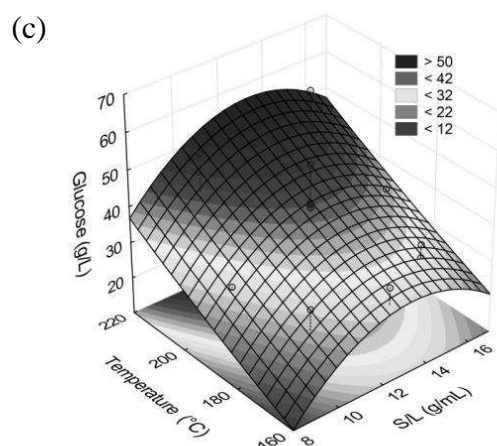
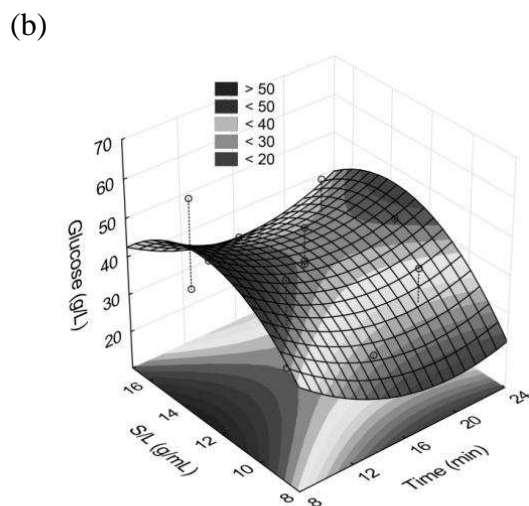
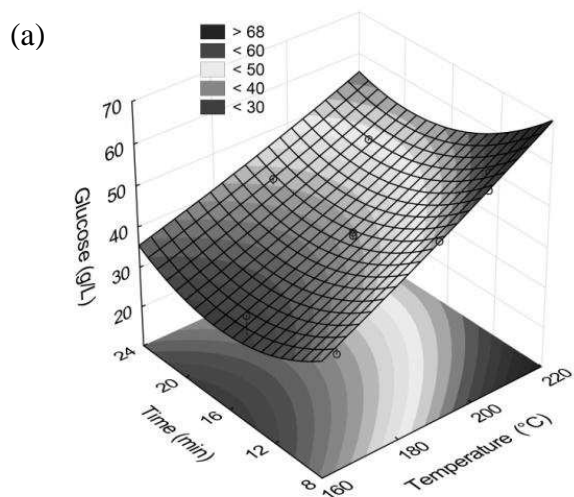


Figura 3 - Gráficos de superfície de resposta para o processo de hidrólise enzimática (a) tempo (min) e temperatura (°C); (B) relação tempo (min) e sólido líquido; (C) temperatura (°C) e relação líquido sólido.

Os resultados da Figura 3 indicam claramente que a concentração máxima de glicose foi atingida a níveis de temperatura mais elevados, em menor tempo de reação e em razão sólido/líquido entre 1/12,5 - 1/15. O ensaio 6 (210 °C, 1/15, 10 min) obteve maior rendimento de glicose (58,4 g/L), enquanto que a ensaio 3 (170 °C, 1/10, 20 min) obteve o menor valor (23,0 g/L). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores em hidrólise enzimática de diferentes fontes de biomassa, como palha de trigo [31] e bagaço de cana-de-açúcar [32].

Em geral, o aumento da temperatura de pré-tratamento aumenta o rendimento de glicose após a etapa de hidrólise enzimática. Uma parte relativamente pequena da celulose é convertida em monômeros de glicose durante o pré-tratamento. Com isso altas temperaturas de pré-tratamento podem auxiliar no rendimento de glicose. Contudo, condições severas podem inibir o processo de fermentação da glicose ao etanol. Alguns estudos concordam que tempos de reação mais longos combinados com temperaturas de pré-tratamento mais elevadas, embora auxiliem na quebra da estrutura da biomassa e melhorem o acesso enzimático à celulose, também levam à produção de subprodutos como ácidos orgânicos, furfurais e seus derivados, inibindo a atividade das enzimas e o processo de fermentação [33, 34].

4. Conclusões

- As condições de pré-tratamento hidrotérmico estudadas contribuíram para a remoção de até 97 % das hemiceluloses e concentração de 53 % de celulose em relação ao material não tratado;
- O pré-tratamento hidrotérmico, nas condições realizadas, demonstrou ser um processo eficaz no aumento do rendimento de glicose ao final da hidrólise enzimática;
- Com base na análise de variância e nos gráficos de superfície de resposta, todas as variáveis apresentadas (temperatura, razão sólido/líquido e tempo de reação) foram estatisticamente significativas, em relação à concentração de glicose após hidrólise enzimática;

- As condições otimizadas foram: temperatura de 210 °C, razão sólido/líquido de 1/10 e 10 minutos de tempo de reação, resultando em um rendimento de sacarificação de 98 % (ensaio 6).

Referências

- [1] IEA. International Energy Agency. Energy and Climate Change [Online] (2015) Available at:<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEO2015SpecialReportonEnergyandClimateChange.pdf> [Verified March 2016]
- [2] A. Gupta. J.P. Verma. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41 (2015) 550-567.
- [3] Ó.J. Sánchez. C.A. Cardona. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99 (2008) 5270-5295.
- [4] X. Zhao. L. Zhang. D. Liu. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts e Biorefining* 6 (4) (2012) 465-462.
- [5] A. Limayem. S.C. Ricke. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives. potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38 (4) (2012) 449-467.
- [6] S.I. Njoku. A.H. Uellendahl. Pretreatment as the crucial step for a cellulosic ethanol biorefinery: testing the efficiency of wet explosion on different types of biomass. *Bioresource Technology* 124 (2012) 105-110.
- [7] Y. Zheng. Z. Pan. R. Zhang. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural e Biological Engineering* 2(3) (2009) 51-68.

- [8] E. Takata. K. Tsutsumi. Y. Tsutsumi. K. Takata. Production of monosaccharides from Napier grass by hydrothermal process with phosphoric acid. *Bioresource Technology* 143 (2013) 53-58.
- [9] K. Tekin. S. Kaaragoz. S. Bektas. A review of hydrothermal biomass processing. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40 (2014) 673-687.
- [10] S. Gan. S. Zakaria. C.H. Chia. F.N.M. Padzil. P. Ng. Effect of hydrothermal pretreatment on solubility and formation of kenaf cellulose membrane and hydrogel. *Carbohydrate Polymers* 115 (22) (2015) 62-68.
- [11] H. Zhang. L.G. Thygesen. K. Mortensen. Z. Kádár. J. Lindedam. H. Jorgensen. C. Felby. Structure and enzymatic accessibility of leaf and stem from wheat straw before and after hydrothermal pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* 7 (74) (2014).
- [12] H.A. Ruiz. R.M. Rodríguez-Jasso. B.D. Fernandes. A.A. Vicente. J.A. Teixeira. Hydrothermal processing. as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21 (2013) 35-51.
- [13] E.L. Souza. G.F. Lielb. C. Marangoni. N. Sellin. M.S. Montagnoli. O. Souza. Bioethanol on fresh and dried Banana Pseudostem. *Chemical Engineering Transactions* 38 (2014).
- [14] M. Jensen-Ambye. S.T. Thomsen. Z. Kádár. A.S. Meyer. Ensiling of wheat straw decreases the required temperature in hydrothermal pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 6 (116) (2013).
- [15] X. Zhuang. Q. Yu. Z. Yuan. X. Kong. W. Qi. Effect of hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse on enzymatic digestibility. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90 (8) (2014) 1515-1520.

- [16] A.S. Silva. H. Inoue. E. Takashi. S. Yano. E.P.S. Bon. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 101 (19) (2010) 7402-7409.
- [17] Y.Y. Tye. K.T. Lee. W.N.W. Abdullah. C.P. Leh. Effects of process parameters of various pretreatments on enzymatic hydrolysability of *Ceibapentandra* (L.) Gaertn (Kapok) fibre: A response surface methodology study. *Biomass and Bioenergy* 75 (2015) 301-313.
- [18] K. Tekin. M.K. Akalin. M.G. Seker. Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Industrial Crops and Products* 77 (2015) 954-960.
- [19] Scandinavian Pulp, Paper and Board – SCAN-CM 71:09.
- [20] H. Boussarsar. M. Mathlouthi. B. Rogé. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology* 100 (2009) 6537-6542.
- [21] F.A. Santos. J.H. Queiroz. J.L. Colodette. M. Manfredi. M.E.L.R. Queiroz. C.S. Caldas. F.E.F. Soares. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Química Nova* 37 (1) (2014) 56-62.
- [22] M. Petersen. J. Larsen. M.H. Thomsen. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass and Bioenergy* 33 (2009) 834-840.
- [23] J. Velásquez-Cock. C. Castro. P. Gañán. M. Osorio. J.L. Putaux. A. Serpa. R. Zuluaga. Influence of the maturation time on the physico-chemical properties of nanocellulose and associated constituents isolated from pseudostems of banana plant c.v. *Valery*. *Industrial Crops and Products* 83 (2016) 551-560.

- [24] C. Zhang. J. Li. C. Liu. X. Liu. J. Wang. S. Li. G. Fan. L. Zhang. Alkaline pretreatment for enhancement of biogas production from banana stem and swine manure by anaerobic codigestion. *Bioresource Technology* 149 (2013) 353-358.
- [25] J.L. Guimarães. E. Frollini. C.G. Silva. F. Wypych. K.G. Satyanarayana. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops and Products* 30 (2009) 407- 415.
- [26] N. Brosse. A. Dufour. X. Meng. Q. Sun. A. Ragauskas. *Miscanthus*: a fast-growing crop for biofuels and chemical production. Review. *Biofuels Bioproducts & Biorefining* (2012).
- [27] S. Liodakis. G. Katsigiannis. G. Kakali. Ash properties of some dominant Greek forest species. *Thermochimica Acta* 437 (2005) 158–167.
- [28] V.B. Agbor. N. Cicek. R. Sparling. A. Berlin. D.B. Levin. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 675-685.
- [29] S. Sun. X. Cao. S. Sun. F. Xu. X. Song. R. Sun. G.L. Jones. Improving the enzymatic hydrolysis of thermo-mechanical fiber from *Eucalyptus urophylla* by a combination of hydrothermal pretreatment and alkali fractionation. *Biotechnology for Biofuels* 7 (116) (2014).
- [30] J.B. Kristensen. C. Felby. H. Jørgensen. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels* 2 (11) (2009).
- [31] S. Petrik. Z. Kádár. I. Márová. Utilization of hydrothermally pretreated wheat straw for production of bioethanol and carotene-enriched biomass. *Bioresource Technology* 133 (2013) 370-377.
- [32] A.G. Costa. G.C. Pinheiro. F.G.C. Pinheiro. A.B. Santos. S.T. Sataella. R.C. Leitão. The use of thermochemical pretreatments to improve the anaerobic biodegradability and biochemical methane potential of the sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal* 248 (2014) 363-372.

[33] I. Cybulska. G. Brudecki. H. Lei.in: T. Gu (Eds.). Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Springer Briefs in Molecular Science. New York. 2013. p. 88.

[34] Z. Maache-Rezzoug. G. Pierre. A. Nouviaire. T. Maugard. S.A. Rezzoug. Optimization thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology. Biomass Bioenergy 35 (7) (2011) 3129-3138.

Conclusão Geral

- O pré-tratamento hidrotérmico utilizando reator Parr se mostrou mais eficiente na conversão enzimática que os tratamentos utilizando microondas;
- O pseudocaule de bananeira mostra ser uma biomassa lignocelulósica com potencial para produção de etanol celulósico, devido ao grande teor de celulose e baixo teores de hemiceluloses e lignina.