



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS DE PALMAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Agroenergia**

**Influência do magnésio nos processos fermentativos de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira.**

**Aluno:** Rodrigo Xavier Nolasco

PALMAS – TO  
2017



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS**  
**CAMPUS DE PALMAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Agroenergia**

**Influência do magnésio nos processos fermentativos de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira.**

**Aluno:** Rodrigo Xavier Nolasco

**Orientador:** Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Agroenergia

PALMAS – TO  
2017



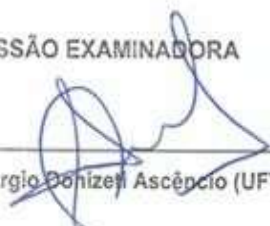
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

INFLUÊNCIA DO MAGNÉSIO NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS DE  
RESÍDUOS HIDROLISADOS DA CULTURA DA BANANEIRA


ALUNO: Rodrigo Xavier Nolasco

COMISSÃO EXAMINADORA

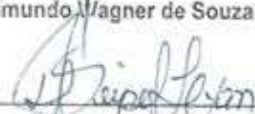
Presidente:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio (UFT)

Examinadores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim (UFT)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar (UFT)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daniele Seipel da Silva Lim Yan (UFT)

Data da Defesa: 07/06/2017

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PG para o formato da  
Dissertação foram contempladas:

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio (UFT)

Orientador

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

N789i Nolasco, Rodrigo Xavier.

Influência do magnésio nos processos fermentativos de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira. / Rodrigo Xavier Nolasco. – Palmas, TO, 2017.

89 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2017.

Orientador: Sérgio Donizeti Ascêncio

1. Bioetanol. 2. Bananeira. 3. Influência mineral. 4. Hidrólise enzimática . I. Título

**CDD 333.7**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor D.Sc. Sérgio Donizeti Ascêncio, pela confiança e orientação, não apenas para a vida acadêmica, mas para toda a vida;

Aos meus pais, por todo o apoio durante essa longa jornada.

Ao meu grande amigo Fabiano Ballin, pela parceria durante todos esses anos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio concedido durante o programa de mestrado;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN): Ilsamar, Odélio, Éber e Aline, por toda a ajuda prestada e as dúvidas tiradas nos últimos minutos.

À Universidade Federal do Tocantins - UFT, por proporcionar um agradável ambiente de estudo; aos professores do Programa de Mestrado em Agroenergia; aos colegas do mestrado, pela amizade e descontração.

À Gabriela, técnica do Laboratório de Instrumentação Científica (LABIC), por todo o tempo na realização das análises cromatográficas.

Ao professor D.Sc. Guilherme Benko, pelo apoio de fundamental importância para este trabalho;

Ao professor D.Sc. Miguel do Instituto Federal de Ciências e Tecnologias do Tocantins, campus Araguatins, pelo fornecimento do material lignocelulósico de excelente qualidade.

À todas as bandas de Metal espalhadas pelo mundo, que me mantiveram inspirado e confiante por intermédio de suas canções.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES</b> .....	<b>xvi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Redução dos Gases de Efeito Estufa (GEE)</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. O setor agroenergético brasileiro</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. Caracterização do setor energético .....	20
3.2.2. Importância do setor alcooleiro .....	22
<b>3.3. Etanol de 2ª geração</b> .....	<b>25</b>
3.3.1. Caracterização .....	25
3.3.2. Produção de bioetanol no Brasil .....	26
3.3.3. Processos produtivos.....	28
3.3.4. Lignocelulose .....	33
<b>3.4. Cultura da banana</b> .....	<b>35</b>
3.4.1. Aspectos gerais .....	35
3.4.2. Resíduos da cultura .....	38
<b>3.5. Atividade mineral na fermentação</b> .....	<b>39</b>
3.5.1. Os efeitos do alumínio sobre a fermentação.....	39
3.5.2. Os efeitos do magnésio sobre a fermentação.....	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1. Coleta e processamento dos resíduos</b> .....	<b>43</b>
4.1.1. Determinação de Umidade .....	43
4.1.2. Determinação de Cinzas.....	43
4.1.3. Determinação da lignocelulose .....	44
<b>4.3. Hidrólise enzimática</b> .....	<b>45</b>
<b>4.3. Determinação de açúcares redutores e ácido acético</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4. Fermentação</b> .....	<b>46</b>
<b>4.5. Análise estatística dos dados</b> .....	<b>47</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>

5.1. Análises preliminares .....	47
5.2. Efeitos do pré-tratamento .....	48
5.3. Hidrólise enzimática .....	50
5.4. Cromatografia da fermentação.....	51
5.5. Análise estatística da fermentação.....	52
6. CONCLUSÃO .....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Oferta interna de energia elétrica por fonte .....	21
<b>Figura 02.</b> Custo de produção do etanol para diferentes matérias-primas .....	23
<b>Figura 03.</b> Produção total de automóveis e comerciais leves por combustível no Brasil .....	24
<b>Figura 04.</b> Fluxo do processo de produção do E2G.....	29
<b>Figura 05.</b> Esquema do efeito genérico causado pelo pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.....	31
<b>Figura 06.</b> (A) Estrutura química da glicose com carbonos numerados e (B) polímero de celulose com um DP de $2^{n+2}$ .....	34
<b>Figura 07.</b> Estrutura química do polímero de hemicelulose.....	35
<b>Figura 08.</b> Estrutura química das três unidades estruturais de lignina: álcool p-cumarílico (A), álcool guaiacílico (B) e álcool sinapílico (C).....	35
<b>Figura 09.</b> Principais estados produtores no Brasil .....	36
<b>Figura 10.</b> Cromatograma da amostra MF diluída à 4:1 v/v em água ultra pura, obtido por CLAE degaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 12 min: glicose .....	50
<b>Figura 11.</b> Teste de Tukey a 5 % de significância das concentrações de glicose g/L na interação.....	54
<b>Figura 12.</b> Gráficos elaborados a partir dos resultados obtidos pela análise de regressão sobre as fontes de variação significativas (a e b) e sobre a interação entre os fatores pelo teste de Tukey a 5% de significância (c).....	57
<b>Figura 13.</b> Médias da interação dos diferentes níveis de magnésio dentro do nível 0 de alumínio pela análise de regressão.....	58



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> Estados produtores de banana.....	37
<b>Tabela 02.</b> Caracterização das enzimas CTEC e HTEC conforme a descrição da empresa fabricante Novozymes.....	45
<b>Tabela 03.</b> Resultados das análises iniciais.....	47
<b>Tabela 04.</b> Porcentagem sobre o material insolúvel obtido após pré-tratamento, valor sobre o FDN obtido pelas análises preliminares e perda por solubilização da hemicelulose obtido através da diferença entre o valor pós pré-tratamento e o FDN para as amostras MF e MF... .....	49
<b>Tabela 05.</b> Concentração de glicose dos materiais via CLAE.....	50
<b>Tabela 06.</b> Quantificação da glicose e do etanol em g/L nas amostras fermentadas de MF e PC.....	51
<b>Tabela 07.</b> Análise de variância para GL MF.....	53
<b>Tabela 08.</b> Análise de variância para GL PC.....	53
<b>Tabela 09.</b> Teste de médias das concentrações de glicose g/L na interação entre alumínio e magnésio.....	54
<b>Tabela 10.</b> Análise de variância para E PC.....	55
<b>Tabela 11.</b> Análise de variância para E MF.....	55

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>AL</b>	Alumínio.
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Sulfato de alumínio.
<b>ANFAVEA</b>	Agência Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores.
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo.
<b>AR</b>	Açúcares redutores.
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato.
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono.
<b>Conab</b>	Conselho Nacional do Abastecimento.
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Íon de cobre.
<b>E PC</b>	Etanol do pseudocaule.
<b>E MF</b>	Etanol da massa foliar.
<b>E2G</b>	Etanol de 2ª geração.
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency.</i>
<b>EPE</b>	Empresa de Pesquisas Energéticas.
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América.
<b>FDA</b>	Fibras em detergente ácido.
<b>FDN</b>	Fibras em detergente neutro.
<b>GEE</b>	Gases de efeito estufa.
<b>GL MF</b>	Glicose da massa foliar.
<b>GL PC</b>	Glicose do pseudocaule.
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico.
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural.
<b>IPCC</b>	Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas.
<b>MF</b>	Massa foliar da bananeira.
<b>Mg</b>	Magnésio.
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Íon de magnésio.
<b>MgO</b>	Óxido de magnésio.
<b>MMT</b>	Tricarbonilo metilciclopentadienil manganês.
<b>MTBE</b>	Éter metilterbutílico.

<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio.
<b>NH<sup>4+</sup></b>	Amónia.
<b>NOX</b>	Óxido de nitrogênio.
<b>P+</b>	Íon de fósforo.
<b>PC</b>	Pseudocaule da bananeira.
<b>PDE</b>	Plano Decenal de Expansão de Energia.
<b>PPM</b>	Parte por milhão.
<b>SOX</b>	Óxido de enxofre.
<b>ÚNICA</b>	União das Indústrias Canavieiras de São Paulo.

## RESUMO

NOLASCO, R. X.

**Influência do magnésio nos processos fermentativos de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira. Palmas, 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia), Universidade Federal do Tocantins – UFT, Mestrado em Agroenergia.**

Com o advento do aquecimento global e o esgotamento das reservas de petróleo, têm-se realizado maiores estudos sobre a utilização de fontes alternativas de energia, particularmente as decorrentes de biomassa. O etanol, produzido a partir de diferentes matérias-primas renováveis (fontes sacarinas, amiláceas ou celulósicas) constitui uma alternativa de combustível para motores à explosão. Os diferentes processos para a produção de etanol possuem grande variação de custo de produção, nos quais a matéria-prima constitui um forte fator de elevação dos custos. Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar os resíduos lignocelulósicos da bananeira, sua produção de glicose mediante hidrólise enzimática e seu comportamento durante a fermentação mediante a adição de magnésio e alumínio. Os diferentes resíduos estudados (pseudocaule e a massa foliar) obtiveram altos teores de glicose (73,24 e 79,75 g/L respectivamente), demonstrando o potencial desses materiais para a produção de etanol. Já na fermentação, houve diferenças significativas na adição de magnésio e alumínio, mostrando que o magnésio elevou a produção de etanol em 24% e que o alumínio gerou uma redução de 10% na produção, entretanto, não houve diferenças significativas na interação entre os minerais, o que significa que o magnésio não conseguiu suprimir o efeito tóxico causado pelo alumínio.

**Palavras chaves:** bioetanol; bananeira; influência mineral.

## **ABSTRACT**

**NOLASCO, R. X.**

**Influence of magnesium on the fermentative process of hydrolyzed residues of banana crop. Palmas, 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia), Universidade Federal do Tocantins – UFT, Mestrado em Agroenergia.**

With the advent of global warming and the depletion of oil reserves, further studies have been carried out on the use of alternative sources of energy, particularly those derived from biomass. Ethanol, produced from different renewable feedstocks (saccharin, amylaceous or cellulosic sources) is an alternative fuel for explosion engines. The different processes for the ethanol production have a large production cost variation, where the raw material is a strong factor to increase costs. In this context, the present work sought to evaluate the lignocellulosic residues of the banana tree, its glucose production through enzymatic hydrolysis and its behavior during fermentation through the addition of magnesium and aluminum. The different residues studied (pseudostem and banana leaf) obtained high levels of glucose (73.24 and 79.75 g/L, respectively), demonstrating the potential of these materials for the production of ethanol. In the fermentation, there were significant differences in the addition of magnesium and aluminum, showing that magnesium raised the ethanol production in 24% and that aluminum generated a reduction of 10% in production, however, there were no significant differences in the interaction between minerals, which means that magnesium failed to suppress the toxic effect caused by aluminum.

**Keywords:** bioethanol; banana crop; mineral influence.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o advento do aquecimento global, seguido pela poluição urbana, o esgotamento de reservas de petróleo e o custo elevado dos combustíveis fósseis, maiores estudos sobre a utilização de fontes alternativas de energia estão sendo realizados, particularmente os decorrentes de biomassa (VELÁSQUEZ-ARREDONDO et al., 2010). O etanol, produzido a partir de diferentes matérias-primas renováveis (fontes sacarinas, amiláceas ou celulósicas) constitui uma alternativa de combustível para motores à explosão. Como o carbono no etanol tem uma origem vegetal, quando ele é liberado durante o processo de combustão, não contribuirá para o aumento das emissões de CO<sub>2</sub> (MANN e SPATH, 1997; WANG et al., 1999). Além disso é considerado biodegradável, derivado da utilização de energia solar armazenada em biomassa, oxigenado e isento de enxofre.

As matérias-primas mais utilizadas para a produção de etanol são culturas de alto teor de açúcar, como a cana-de-açúcar, beterraba, melão e frutas, porque seus componentes principais são açúcares que são diretamente convertidos em etanol. A conversão das culturas à base de amido, tais como milho, cereais e batatas é mais complexa do que a das culturas à base de açúcar porque contêm hidratos de carbono que devem ser primeiro convertidos em açúcares simples (glicose) e, em seguida fermentados em etanol (SHAPOURI et al., 2004). Da mesma forma, matérias-primas lignocelulósicas decorrentes de resíduos agrícolas florestais, resíduos industriais, árvores, gramíneas e materiais dos resíduos sólidos urbanos também exigem a quebra de cadeias de açúcares complexos em açúcares simples antes da fermentação, pois são constituídas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina que são mais difíceis de quebra do que o amido (VELÁSQUEZ-ARREDONDO et al., 2010).

Em matérias-primas lignocelulósicas, ambos os componentes de hemicelulose e celulose são cadeias à base de açúcar que podem ser fermentados em etanol e um componente estrutural de lignina que não pode (GREGG e SADDLER, 1995). Os resíduos da cultura da banana são em sua grande parte compostos por materiais lignocelulósicos, portanto, eles precisam ser hidrolisados para serem convertidos em glicose, que é então fermentado para produzir etanol (CARRASCO et al., 1992; KUMAKURA e XIN, 1993).

O abastecimento com etanol oferece muitas vantagens: redução do consumo de combustíveis fósseis, aumento na segurança energética e benefícios sociais derivados de sua produção. No entanto, algumas questões políticas precisam ser resolvidas antes de

expandir a produção de bioetanol, tais como: uso da terra contrária a produção de alimentos, o desmatamento e a perda de biodiversidade (GOLDEMBERG et al., 2008).

Os diferentes processos para a produção de etanol variam consideravelmente em relação ao custo de produção, nos quais a matéria-prima constitui um forte fator de elevação dos custos (McALOON et al., 2000). A banana é uma das frutas mais populares do mundo (MEECHAONA, et al., 2007; SULAIMAN, et al., 2011), sendo consumida não somente *in natura*, mas também processada, podendo ser aproveitada em todas as fases de amadurecimento (AURORE et al., 2009). No Brasil, o consumo médio *per capita* é de 30 kg por ano (FAOSTAT, 2009). Cada hectare de banana gera em torno de 220 t de resíduos que consistem principalmente de material lignocelulósico (GABHANE et al., 2014).

As atuais vertentes de pesquisa do etanol estão focadas na utilização de matérias-primas alternativas que possam reduzir o custo de produção e formas de aumento na eficiência energética no processo industrial. Material lignocelulósico não desempenha um papel intrínseco na cadeia alimentar e este é um aspecto fundamental que o torna uma alternativa atraente para a produção de etanol (BELLO et al., 2014), um fator positivo para a exploração dos resíduos da bananeira. A grande dificuldade da exploração do etanol de celulose é o seu alto custo, fator esse que faz com que sejam buscadas matérias-primas de boa qualidade ao menor custo possível e em maneiras de aumentar a eficiência do processo.

Resíduos lignocelulósicos da bananeira possuem baixo custo e alta oferta por todo o país, podendo ser uma opção como matéria-prima para a produção de bioetanol. Entretanto, esse material carece de pesquisas nessa área, podendo ser uma matéria-prima com potencial para a produção de bioetanol a ser estudada e explorada.

Além disso, segundo o constatado por (SOUZA et al., 2014), teores elevados de magnésio auxiliam na produtividade da fermentação alcoólica, além de suprimir efeitos negativos causados por outros minerais, como o alumínio, que está constantemente presente nos mostos fermentativos e que tem como característica a toxidez em diversos seres vivos, inclusive em leveduras (AMARAL; ARANHA, 2002). Diante do exposto, a adição de magnésio no mosto fermentativo pode ser uma prática que aumente a produtividade do bioetanol produzido a partir dos resíduos da bananeira.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a influência do magnésio nos processos fermentativas de diferentes resíduos obtidos da cultura da bananeira.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar a produtividade em açúcares redutores de resíduos lignocelulósicos da cultura da bananeira (pseudocaule da bananeira e a massa foliar) submetidos a hidrólise enzimática;
- Avaliar a influência da adição de diferentes concentrações de magnésio em reações fermentativas de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira;
- Avaliar a influência do magnésio na redução dos efeitos tóxicos produzidos pelo sulfato de alumínio nos resíduos hidrolisados da cultura da bananeira.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Redução dos Gases de Efeito Estufa (GEE)**

Os elevados níveis de poluição atmosférica já alcançados em algumas regiões do planeta, tem apresentado seus reflexos negativos sobre a saúde e o meio ambiente. Tais reflexos, somados à crescente industrialização dos países e elevação do número de veículos automotores em circulação, com conseqüente aumento do nível de emissões atmosféricas, mostram a urgência de promover a conscientização dos diferentes setores da sociedade para a necessidade da preservação ambiental e da utilização de fontes energéticas mais limpas (SANTOS, 2012)

Os dados revelados no quarto relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC, 2007) e as informações divulgadas no relatório do Greenpeace Brasil “Mudanças do Clima Mudanças de Vida” (GREENPEACE, 2006) destacam os seguintes aspectos:

“A sociedade mundial terá que tomar atitude apropriada entre optar pela sustentabilidade dos recursos naturais submetidos a pressões globais para aumento do consumo ou continuar adotando o crescimento econômico, a qualquer preço, em relação à reposição dos estoques de capital natural e comprometimento dos serviços ambientais.” (GREENPEACE, 2006).

Entre tantas causas do aquecimento global, não há mais dúvidas quanto à responsabilidade dos humanos pela vulnerabilidade do Planeta e a óbvia necessidade de ações político-estratégicas, tecnológicas e financeiras para redução das emissões de GEE (IPCC, 2007).

No caso dos combustíveis fósseis, de um modo geral, os principais poluentes encontrados nos gases de combustão são os óxidos de enxofre (SOX), resultantes da queima do enxofre do próprio combustível, os óxidos de nitrogênio (NOX), resultantes tanto do nitrogênio presente no ar da combustão quanto no próprio combustível e o material particulado (VERGNHANINI e USHIMA, 1996).

As mudanças climáticas se destacam nas agendas políticas, no Brasil e em todas as partes do mundo, por conta da previsão de graves conseqüências de caráter econômico, social e ambiental. Não há dúvidas de que as principais fontes de emissões

estão nos países industrializados, do hemisfério norte, os quais consomem mais do que 70 % da energia produzida e de que os EUA, sozinho, é responsável por cerca de 25 % das emissões mundiais de GEE. Nestes países, os combustíveis fósseis – carvão, petróleo e gás natural – respondem por 70 % das emissões. (IPCC, 2007)

Globalmente, a dependência de combustíveis fósseis resultou em problemas ambientais diferentes, que incluem o aquecimento global, a deterioração da qualidade do ar, os derrames de petróleo e chuva ácida, entre outros (BORINES et al., 2013). O processo de combustão emite dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), um dos gases de efeito estufa mais significativos. O nível de concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico foi relatado em torno de 350-380 ppm em 2010 e foi previsto um aumento para 450 ppm até 2020 se não forem tomadas medidas visando o controle e a redução de CO<sub>2</sub> (KRAAN, 2010).

A conscientização do aquecimento global, bem como outras questões ambientais tem aumentado o interesse no desenvolvimento de métodos para mitigar as emissões de gases efeito estufa (GEE) e diminuir a produção de poluentes. Um desses métodos de redução é o uso de biocombustíveis produzidos a partir de fontes renováveis de energia (JANG et al., 2012; MEINITA et al., 2011).

Os biocombustíveis podem ser classificados nas categorias de biocombustíveis de primeira ou segunda geração (NAIK et al., 2010). Biocombustíveis de primeira geração são geralmente feitos a partir de carboidratos, lipídios e óleos ou resíduos agroindustriais usando tecnologias convencionais. Biocombustíveis de segunda geração são geralmente derivados a partir de biomassa lignocelulósica incluindo biomassa vegetal tais como os caules, hastes, madeira, etc. Segundo Ingale et al. (2014), muitos biocombustíveis de segunda geração, tais como biohidrogênio, biometanol, bioetanol e álcoois mistos estão em desenvolvimento. Hoje, a biomassa abrange cerca de 10 % da demanda de energia primária mundial. Num contexto de subida dos preços do petróleo, esgotamento de recursos, a instabilidade política nos países produtores e os desafios ambientais, a biomassa tem um elevado potencial para substituir o fornecimento de uma civilização com fome de energia (INGALE et al., 2014).

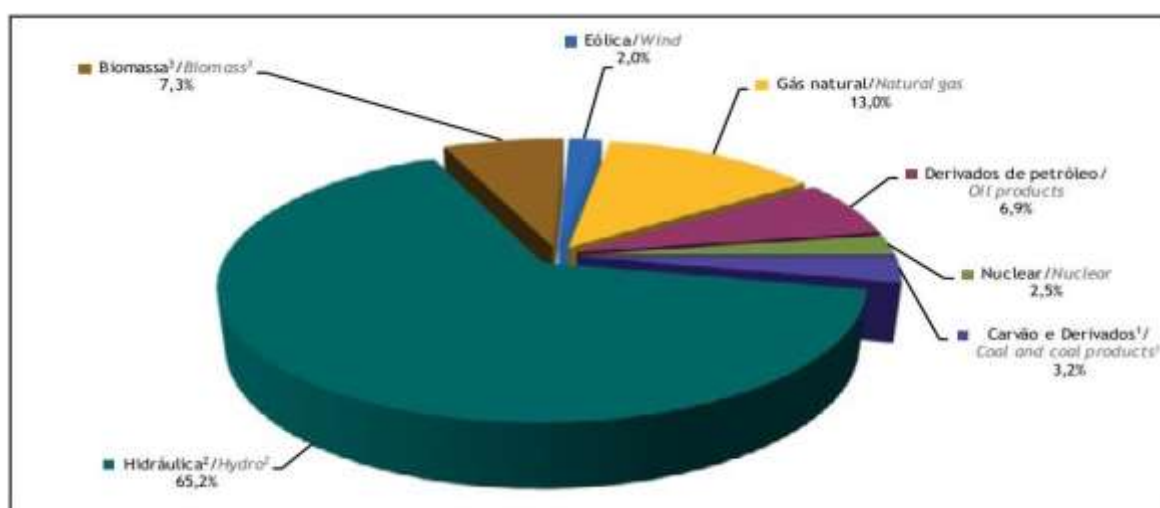
## **3.2. O setor agroenergético brasileiro**

### **3.2.1. Caracterização do setor energético**

O desenvolvimento de culturas de alta produtividade devido ao clima favorável que

oferece o Brasil, tem colocado o agronegócio em grande destaque na economia nacional, contribuindo para que os produtos brasileiros tenham competitividade no mercado internacional.

A matriz energética nacional é caracterizada pela oferta de fontes renováveis e não renováveis de energia. A geração elétrica a partir de não renováveis representou, no ano de 2014, 26,9 % do total nacional contra 23,3 % em 2013, enquanto as fontes renováveis representam 74,6 % da oferta interna de eletricidade no Brasil, conforme informações oficiais constantes no Balanço Energético Nacional de 2015, elaborado pela Empresa de Pesquisas Energéticas (EPE, 2015), e apresentadas na Figura 1.



**Figura 01.** Oferta da participação de fontes renováveis e não renováveis na oferta interna de energia no ano de 2014.

Fonte: EPE, 2015.

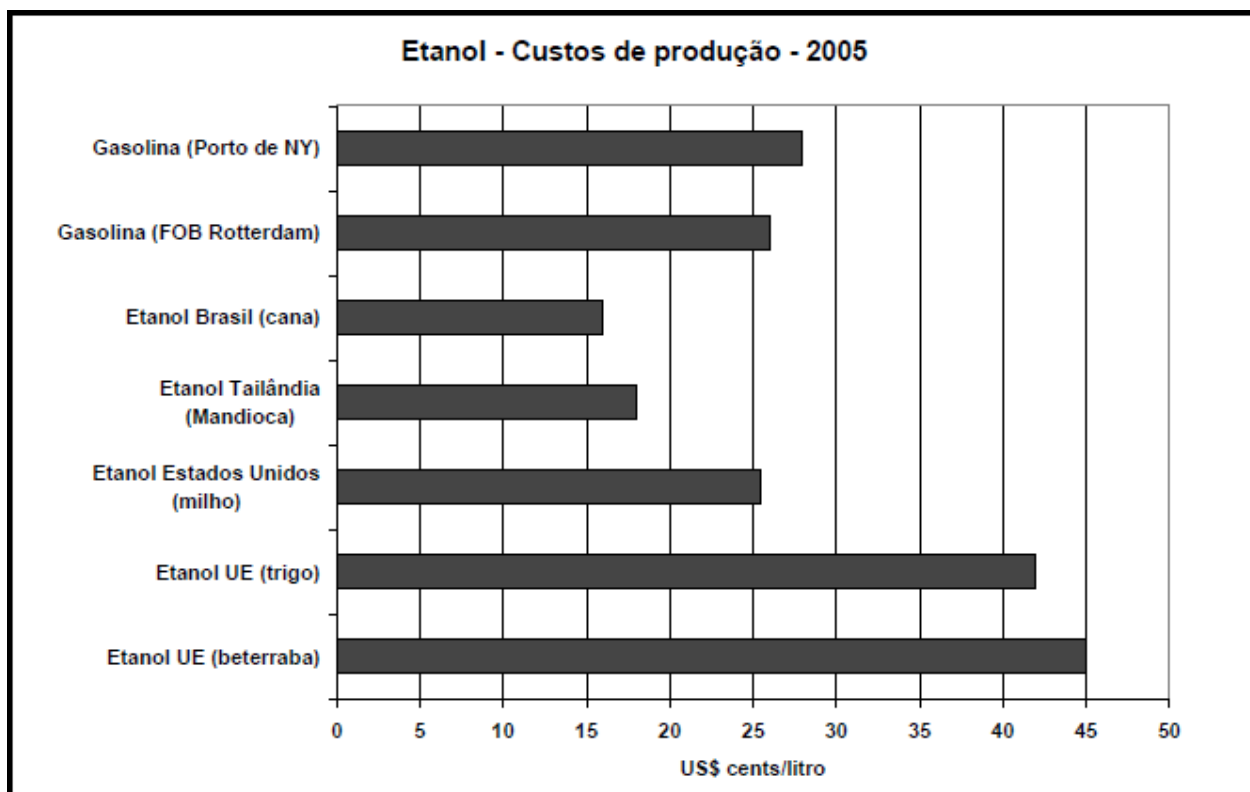
As políticas públicas e as respostas dos investidores, nos países de economia desenvolvida, estão sinalizando, claramente, para uma transição do uso de fontes fósseis, para outras consideradas “limpas”. Entretanto, quando se analisa o cenário de expansão energética da matriz elétrica brasileira proposta pelo Planejamento Nacional Energético 2030, elaborado pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE) em 2009, nota-se uma redução na utilização na oferta de energia elétrica a partir de fontes fósseis demonstrada no Plano Decenal de Expansão de Energia 2010-2019, no qual a contribuição das termoeletricas movidas a combustíveis fósseis foi revista de 14 mil MW de capacidade instalada para 9 mil MW com usinas a serem construídas até o prazo limite de 2014 (PDE, 2009).

### 3.2.2. Importância do setor alcooleiro

O agronegócio da cadeia alcooleira inclui empresas que produzem açúcar e/ou etanol, ou atuam em algum elo da cadeia produtiva desses elementos. No Brasil, este setor está diretamente relacionado ao cultivo de cana-de-açúcar, uma vez que esta é a principal matéria-prima da cadeia (LINS e SAAVEDRA, 2007).

O setor sucroalcooleiro brasileiro tem hoje uma enorme importância socioeconômica no país, fornecendo valores impressionantes relativos à área plantada. De acordo com o Conselho Nacional do Abastecimento (Conab), a produção de cana-de-açúcar na safra 2014/15 alcançou 642,1 milhões de toneladas. Este montante foi 2,5 % inferior ao registrado no ano civil anterior, quando a moagem foi de 658,8 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Em 2014 a produção nacional de etanol cresceu 3,3 %, atingindo um montante de 28.526 mil m<sup>3</sup>. Deste total, 57,1 % referem-se ao etanol hidratado: 16.296 mil m<sup>3</sup>. Em termos comparativos, houve acréscimo de 4,4 % na produção deste combustível em relação a 2013. Já a produção de etanol anidro, que é misturado à gasolina A para formar a gasolina C, registrou acréscimo de 1,9 %, totalizando 12.230 mil m<sup>3</sup>. Diante dos fatos, a produção de etanol é vista como uma das oportunidades mais atraentes do setor energético e de combustíveis e, devido à busca por fontes de energias renováveis, visando a reestruturação da matriz energética mundial, a produção de etanol tem crescido significativamente no País.

Em relação às outras matérias-primas para a produção do etanol, a cana-de-açúcar no Brasil tem a vantagem de possuir maior produtividade, aproximadamente 8.100 litros por hectare, contra o etanol produzido, por exemplo, a partir de milho, nos EUA, de 3.300 litros por hectare (EPA, 2010). Além disso, os custos de produção do etanol brasileiro são significativamente menores em relação a outros países produtores de etanol, conforme Figura 02. Os preços são mais elevados nos Estados Unidos e na União Europeia, os mais baixos ocorrem no Brasil, seguido pela Tailândia (FULTON, 2004).

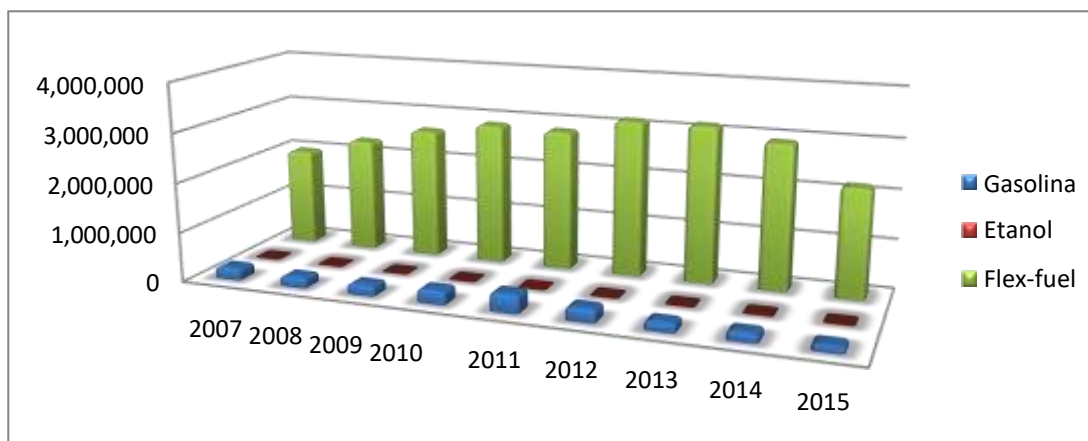


**Figura 02.** Custo de produção do etanol para diferentes matérias-primas em diferentes regiões do planeta.

Fonte: FULTON, 2004.

Todo esse crescimento no setor alcooleiro se deve em grande parte ao programa Proálcool e à produção de veículos com combustível flexível ou *flex fuel*. Esse fato foi verificado pela ANP (2012), uma vez que no período compreendido entre 2003 (lançamento da tecnologia *flex fuel*) a 2008, houve um acréscimo de cerca de 309 % no consumo de etanol hidratado no Brasil.

Segundo Walter (2009) a partir do lançamento dos veículos *flex fuel* em 2003, houve um “boom” nas vendas de veículos movidos a etanol anualmente, como pode ser observado na Figura 03, alterando completamente o cenário da produção deste combustível no país. Em 2010, tais veículos representavam cerca de 77 % dos veículos vendidos, acumulados desde 2003 até abril de 2010, tem-se 9,6 milhões de veículos flex no mercado (ANFAVEA, 2011). Em 2012 foram licenciados 3.162.874 de veículos *flex fuel* no Brasil, sendo que apenas em janeiro de 2013, este número alcançou 262.500 veículos (ANFAVEA, 2013). Já para o ano de 2015 foram licenciados 2.194.006 novos veículos *flex fuel*, indicando uma queda de 30 % na produção de veículos no Brasil (ANFAVEA, 2016).



**Figura 03.** Produção total de automóveis e comerciais leves por combustível no Brasil.

Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de ANFAVEA (2016).

Além do mercado interno, o mercado externo também desempenha um papel importante na demanda por etanol brasileiro. Em 2008, as exportações de etanol brasileiro somaram 5,12 bilhões de litros, sendo que os principais compradores foram Estados Unidos (34 %), Holanda (26 %), Jamaica (8 %) e El Salvador (7 %). Em estudo realizado por Mitsutani (2010), foi considerada uma expansão das exportações do etanol brasileiro para o Japão. Os volumes de 2007 foram de 364 milhões de litros e poderá alcançar em 2018 três bilhões de litros anuais. Outro potencial significativo para o crescimento das exportações é mercado da China para a qual será exportado 750 milhões de litros em 2017, isso significa um quantitativo de 200 milhões de litros a mais que o ano de 2008. Embora o volume exportado seja pequeno se comparado à produção total (26,6 bilhões de litros), já sinaliza grande potencial de crescimento, pois desde 2001, o volume multiplicou 14 vezes e o faturamento, 24 vezes (UNICA, 2010).

Outro fator que torna o etanol um combustível tão bom e competitivo é a sua característica limpa frente a emissões de Gases de Efeito Estufa (GEE). Segundo os dados apresentados pela *Environmental Protection Agency* (EPA), as emissões de GEE do etanol comparado as emissões da gasolina, podem ser entre 60 e 90 % menores, dependendo do cenário avaliado (EPA, 2010). É importante ressaltar também que este estudo do EPA leva em consideração diversos aspectos, como a produção do combustível, a mudança do uso do solo (interna e externa ao país), entre outros. Portanto, conclui-se que o etanol é uma resposta rápida para reduzir as emissões de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), pela disponibilidade agrícola, tecnológica e custos compatíveis com os do petróleo. O Brasil tem potencial para reduzir entre 18 % e 36 % das emissões de poluentes com biocombustíveis até 2020, mas deve associar sua expansão a uma postura social e ambiental responsável.

Essa atitude pode superar inclusive as barreiras impostas ao etanol brasileiro no exterior (BERNARDES, 2008).

### **3.3. Etanol de 2ª geração**

#### **3.3.1. Caracterização**

De acordo com Agustini e Júnior (2007), o etanol (álcool etílico),  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , é um dos principais álcoois existentes. Trata-se de um líquido incolor, inflamável e de odor característico, miscível em água e em outros compostos orgânicos. Apresenta ponto de fusão de  $-114,1\text{ }^\circ\text{C}$  e ponto de ebulição de  $78,5\text{ }^\circ\text{C}$ , e densidade de  $0,789\text{ g/ml}$  a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  (REIS, 2006). Possui várias aplicações, sendo as mais comuns o chamado uso potável, alimentício e farmacêutico, além de usos menos nobres como o industrial (BRINGHENTI, 2004).

Para a produção do etanol, existem diversas matérias-primas, e as mesmas podem ser divididas em três categorias, segundo Macedo (1993). Entre os produtos chamados sacarinos, assim conhecidos por possuírem o açúcar sacarose, que dá origem ao etanol, citam-se: cana-de-açúcar, sorgo sacarino (colmo), beterraba, sucos de frutas em geral, entre outros. Com relação aos amiláceos, que possuem esse nome por conterem amido, mencionam-se mandioca, cereais de um modo geral, sorgo (grãos), batata e babaçu (mesocarpo). A outra categoria é a de matérias-primas celulósicas, na qual o etanol é produzido em biorrefinarias a partir da celulose existente em sua composição, na qual se destacam: eucalipto, marmeleiro, serragem, bagaço de cana, pericarpo de babaçu, casca de arroz, entre outros.

O etanol de 2ª geração (E2G) ou, bioetanol, é o biocombustível que se espera que seja mais amplamente usado em todo o mundo, que pode ser produzido a partir das abundantes camadas de biomassa celulósica (JOHN et al., 2011). Os mais importantes países produtores de bioetanol no mundo são Brasil, Estados Unidos e Canadá (CHIARAMONTI, 2007). Países como o Brasil têm desenvolvido tecnologia para o uso do etanol puro ou misturado em altas proporções com gasolina como combustível para motores de ignição, o que justifica os esforços em pesquisas científicas para desenvolvimento de tecnologias de produção cada vez mais eficientes. O uso da mistura gasolina/etanol e óleo diesel/biodiesel têm crescido em popularidade em vários países, não só para trazer benefícios ambientais, mas também como forma de estabelecer recursos

energéticos domésticos possuindo custos competitivos e gerar desenvolvimento econômico adicional (BORINES et al., 2013).

A utilização de bioetanol é vantajosa porque usa como matéria-prima biomassa, produto da assimilação do dióxido de carbono atmosférico pelas plantas. Além disso, o etanol é menos tóxico, é facilmente biodegradável e seu uso produz menos poluentes transportados pelo ar do que os combustíveis de petróleo (JOHN et al., 2011). O bioetanol também possui outros usos, como forma de mistura à gasolina, contribuindo significativamente para reduzir essas emissões. Ele também pode ser usado como combustível para a geração de energia elétrica, em células de combustível (de ação termoquímica), em sistemas de cogeração de energia elétrica, e como matéria-prima na indústria química (PETROU e PAPPIS, 2009). Bioetanol pode ser empregue como substituto de intensificadores de octanagem como tricarbonilo metilciclopentadienil manganês (MMT) e hidrocarbonetos aromáticos, tais como benzeno ou produtos oxigenados, tais como éter metilterbutílico (MTBE) (CHAMPAGNE, 2007).

Em relação a outros tipos de energias renováveis, a biomassa, transformada em energia química na forma de E2G, se destaca pela geração de alta densidade energética e pelas facilidades de armazenamento, conversão e transporte. Outra vantagem é a semelhança entre os sistemas de produção de energia a partir de biomassa e os que utilizam energias fósseis, de forma que a substituição não teria grande impacto na sua aplicação em equipamentos. Além disso, programas de biomassa, responsáveis por 25 % da energia primária do País, também podem representar um incremento na geração de empregos e diminuição dos danos ambientais causados pelo petróleo e pela cana-de-açúcar (CASTRO, et al. 2012).

A literatura geralmente sugere como alternativa, o aproveitamento de resíduos orgânicos para a produção E2G para a cogeração de energia (BARREIRA, 2003; GONÇALVES, 2005; LOPES, 2007). Dessa maneira, nenhuma outra opção sustentável para a produção de combustíveis pode competir contra o E2G, em relação a sua temática ecológica e as suas vantagens econômicas e de infraestrutura (CHAND e VENKATESWAR, 2009).

### 3.3.2. Produção de bioetanol no Brasil

Não se pode deixar de levar em consideração que a expansão do cultivo de terra para a produção de energia, ou qualquer outro uso, torna irreversível a conversão de



ecossistemas virgens. O desmatamento, por exemplo, causa a extinção da espécie e de seus habitat, e a perda das funções de um ecossistema. Estudos revelam que a destruição em larga escala das florestas pode afetar o ciclo hidrológico e o clima, reduzindo a precipitação regional e provocando o aumento da temperatura (SANTOS, 2012). Portanto, faz-se necessário a utilização de matérias-primas baratas e que produzam o mínimo de danos ambientais possíveis, como os resíduos lignocelulósicos.

As pesquisas no Brasil voltadas para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica residual são quase que exclusivamente para o bagaço de cana-de-açúcar. O Brasil processou na safra 2008/2009 mais de 569 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, gerando aproximadamente 136 milhões de toneladas de bagaço (UNICA, 2010).

No Brasil, a expansão da cana-de-açúcar está limitada pela precipitação pluviométrica e pela logística do combustível (SANTOS, 2012). Ainda segundo o mesmo autor, a cana-de-açúcar não é uma cultura com particular exigência em termos do solo, adaptando-se razoavelmente aos solos de fertilidade média e de porosidade elevada. Solos mais férteis implicam em níveis mais elevados da produtividade e/ou na demanda menor para fertilizantes e produtos corretivos, mas apresentam custo maior. As áreas que necessitam de irrigação são mais problemáticas, devido aos investimentos iniciais e ao custo da energia usada na irrigação. A maioria do solo da região amazônica não é apropriada ao cultivo da cana-de-açúcar por razões não agricultáveis, além do fato do desmatamento indesejável (GOLDEMBERG et al., 2008).

O aproveitamento dos resíduos florestais e agroindustriais como substratos em processos biotecnológicos para a produção de produtos de alto valor agregado é uma alternativa atrativa e promissora, haja visto que estes materiais são abundantes, renováveis e de baixo custo (BRAGATTO, 2010). Nas últimas duas décadas vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de converter materiais lignocelulósicos em etanol (AZZAM, 1989; DALE et al., 1994; DUFF e MURRAY, 1996; MARTIN et al., 2002; RESHAMWALA et al, 1995; YANASE et al., 2005). Muitos outros resíduos agroindustriais lignocelulósicos já foram estudados, tais como: o bagaço da cana-de-açúcar (SANTOS e GOUVEIA, 2009), palha de arroz (SILVA e ROBERTO, 2001), palha de trigo (NIGAM, 1995), resíduos da bananeira (INGALE et al., 2014).

Aguiar (2002) estudou a transformação do bagaço da cana em açúcares fermentescíveis pelo processo de hidrólise e concluiu ser possível obter até 60 % de conversão. Uma das grandes dificuldades encontradas para fermentar os açúcares

encontrados no hidrolisado lignocelulósico é a presença de inibidores do metabolismo microbiano, tais como: furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e também compostos aromáticos derivados da degradação da lignina e extrativos (RODRIGUES et al., 2001; MUSSATO e ROBERTO, 2004).

Embora sejam evidentes os avanços tecnológicos alcançados pelo Brasil, no que tange a produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração), poucos foram os investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de E2G (BRAGATTO, 2010). Atualmente, o E2G é uma das melhores propostas em termos de biocombustíveis para o Brasil devido à grande quantidade de biomassa que o país possui.

### 3.3.3. Processos produtivos

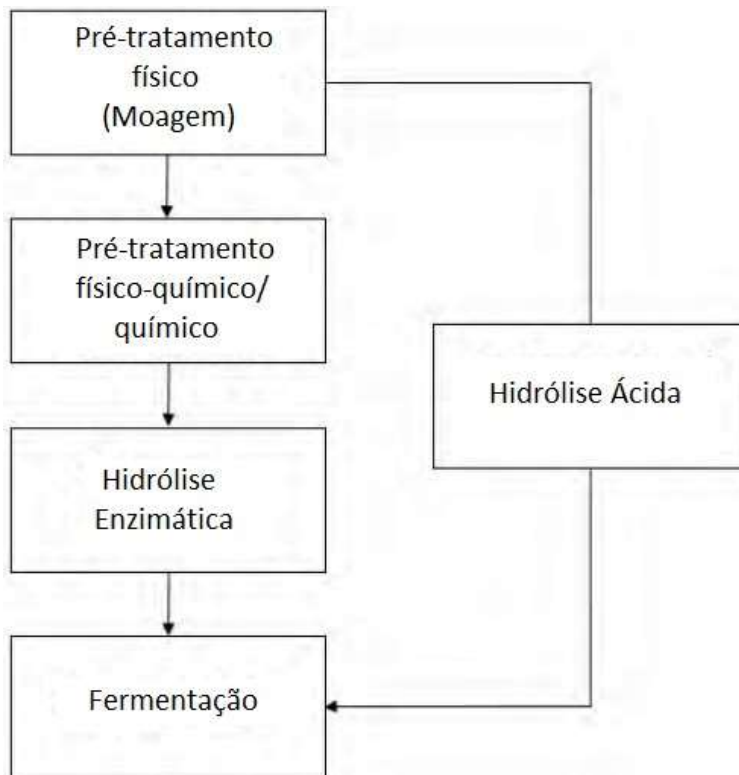
O processamento do bioetanol é realizado em biorrefinarias. De acordo com Kamm et al. (2005), as biorrefinarias são baseadas na utilização de toda a planta, ou complexo da biomassa, e na integração de processos tradicionais e modernos de utilização de matérias-primas biológicas. A biorrefinaria contempla a produção de bioetanol (com base na celulose e hemicelulose), empregando processo de hidrólise ácida ou enzimática, bem como produtos derivados de segunda geração da alcoolquímica, como o etilenoglicol e o propilenoglicol, empregando a hidrogenólise (BASTOS, 2007). Desta maneira, a bioconversão da celulose contida nos materiais lignocelulósicos em etanol de segunda geração (E2G) requer um processo que compreende três etapas: pré-tratamento, hidrólise (ácida ou enzimática) dos polímeros, seguido do processo fermentativo dos monômeros (glicose) em etanol realizado por leveduras ou bactérias (LOHMEIER-VOGER et al., 1998). A hidrólise pode ser catalisada por enzimas específicas (celulases) ou por meio químico (ácido). Na hidrólise ácida não é necessária uma seleção das características químicas do material lignocelulósico. A metodologia ácida produz altas concentrações de monossacarídeos disponíveis para a fermentação, porém a desvantagem do uso de ácidos minerais (sulfúrico ou clorídrico) está centrada na corrosão de equipamentos e recuperação dos reagentes (BRAGATTO, 2010).

A hidrólise enzimática não utiliza reagentes químicos, e conseqüentemente não gera poluentes ambientais. A desvantagem deste processo envolve a aplicação em escala industrial, pois são necessários grandes volumes de enzimas, além da baixa eficiência do processo em biomassas *in natura* (sem pré-tratamento) (MATSUSHITA et al, 2009). Desta

maneira, a hidrólise enzimática necessita de etapas de pré-tratamento, a fim de alterar a biomassa *in natura*, com o objetivo de melhorar o acesso das enzimas.

Devido às ligações intermoleculares entre lignina, pectina, celulose e hemicelulose dentro das paredes celulares, o material vegetal deve ser pré-tratado antes de ser hidrolisado e fermentado em etanol. Segundo Oliver et al. (2014), existem dois métodos principais de pré-tratamento: ácido ou alcalino e explosão à vapor.

Os objetivos do pré-tratamento de lignocelulose são hidrolisar as hemiceluloses completamente a monómeros sem degradação, para remover a lignina e para reduzir o tamanho da estrutura semi-cristalina de celulose para a hidrólise (GALBE e ZACCHI, 2007; KUMAR et al., 2009). De acordo com Kumar et al. (2009), o pré-tratamento deve melhorar a liberação de açúcares para a hidrólise, evitar a degradação ou perda de carboidratos, evitar a formação de sub-produtos que são inibitórios para os processos de hidrólise e posterior fermentação e deve ter custo efetivo. Depois do pré-tratamento, os polímeros de celulose são expostos para a hidrólise enzimática, que necessita de um pré-tratamento mais complexo, ou ácido, hidrolisando o material diretamente após um pré-tratamento físico (Figura 4).



**Figura 04.** Fluxo do processo de produção do E2G.

Fonte: Adaptado de Oliver et al. (2014)

### **Pré-tratamento físico (moagem)**

Os substratos são moídos até um tamanho de partícula menor para a hidrólise através de picagem e de moagem. Demonstrou-se, em relação a espécies de plantas lenhosas, que o tamanho de partícula tem um impacto direto sobre a eficácia do pré-tratamento (TILLMAN et al., 1989). Os substratos são geralmente picados para um tamanho de 10-30 mm e/ou moídos até um tamanho de 0,2-2 mm (SUN e CHENG, 2002). O efeito genérico da moagem é que a celulose perde um pouco de sua estrutura semicristalina.

### **Pré-tratamento físico-químico**

O pré-tratamento físico-químico utiliza uma combinação de pré-tratamentos físicos, tais como a pirólise leve, que explora a alteração molecular e decomposição de biomassa sob calor, com decomposição química. De acordo com Oliver et al. (2014), existem três tipos de pré-tratamento que são os mais comumente utilizados, são eles:

Explosão a vapor: a biomassa é exposta a vapor entre 160-260 °C em alta pressão, seguido de uma redução rápida da pressão, o que obriga a biomassa a se submeter a uma descompressão altamente potente (SUN e CHENG, 2002), utilizando ou não catalisadores como ácido sulfúrico e dióxido de enxofre. Na ausência de catalisadores, ocorrem reações de auto-hidrólise, nas quais o ácido acético proveniente da biomassa age como catalisador das reações de hidrólise da hemicelulose por meio da diminuição do pH do meio (CARRASCO et al., 2010).

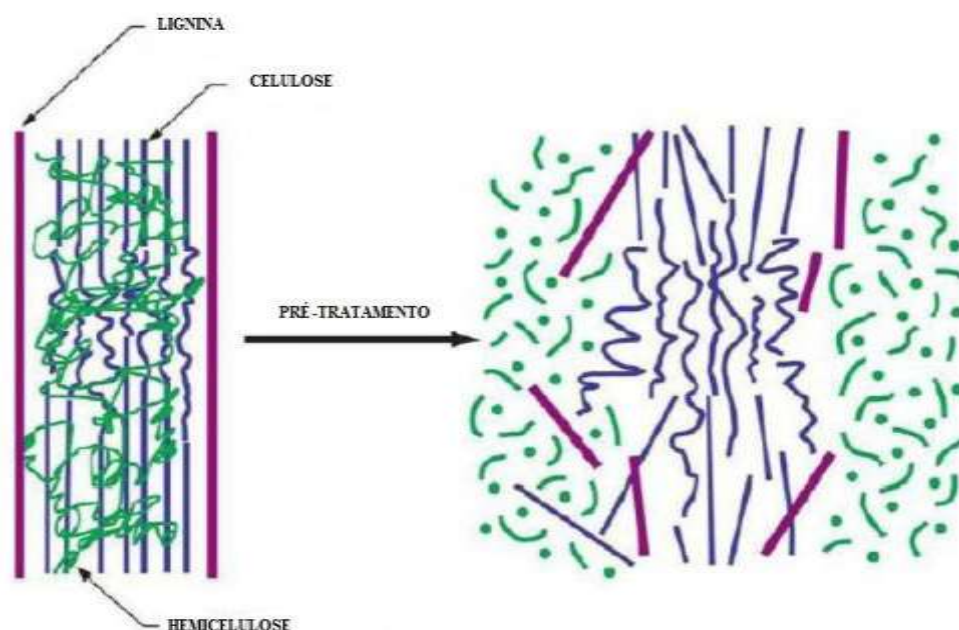
- Explosão de fibra em amônia: a biomassa é exposta a amônia líquida a alta pressão e temperatura, seguido de uma redução rápida da pressão. Este pré-tratamento não solubiliza significativamente as hemiceluloses em relação aos outros pré-tratamentos (SUN e CHENG, 2002).

- Explosão de CO<sub>2</sub>: a explosão de CO<sub>2</sub> é semelhante a explosão a vapor e de amônia, em que a biomassa é tratada sob alta pressão e temperatura com CO<sub>2</sub>. Isto seguido por uma descida rápida da pressão. Durante esse processo, o CO<sub>2</sub> se transforma em ácido carbônico que, em seguida acelera a hidrólise (SUN e CHENG, 2002).

### **Pré-tratamento químico**

Os populares pré-tratamentos químicos, uma alternativa para o pré-tratamento físico-químico, geralmente envolvem técnicas com ácidos, bases e, em menor medida, agentes oxidantes. Ácidos, tais como ácidos sulfúrico, clorídrico, nítrico ou ácido fosfórico

são utilizados individualmente ou em combinação com um pré-tratamento físico-químico, tais como explosão a vapor, para quebrar as celuloses. Peróxidos ou substâncias alcalinas, tais como hidróxido de sódio, amoníaco e hidróxido de cálcio são utilizados para deslignificação (remoção de lignina) e a remoção de hemicelulose. Os solventes, tais como metanol, etanol e acetona também são utilizados para a deslignificação (MOUSDALE, 2008).



**Figura 05.** Esquema do efeito genérico causado pelo pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica.

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

A Figura 5 apresenta o esquema da desestruturação que sofre a biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento. Neste processo, ocorrem alterações na estrutura da parede celular, com significativos aumentos da área superficial da celulose. Pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos são mais eficientes e representam as melhores opções para o processo de fracionamento da biomassa lignocelulósica (RAMOS, 2003).

### Hidrólise enzimática

Três principais processos de hidrólise são normalmente utilizados na produção de etanol: ácido diluído, ácido concentrado e hidrólise enzimática (KUMAR et al., 2009). A hidrólise enzimática tem 3 principais vantagens. Em primeiro lugar, a produção de subprodutos pode ser controlada e assim, aumentar a eficiência de produção. Em segundo

lugar, ela exige condições mais suaves (pH, temperatura e pressão) e em terceiro lugar ela possui baixo consumo de insumos energéticos (BADGER et al., 2002). Existem duas desvantagens distintas de hidrólise enzimática: a produção de enzimas aumenta o custo do processo e, a amostra requer neutralização após pré-tratamentos ácido/básico, que podem produzir sais inibitórios ou aumentar o tempo de preparação da amostra antes da análise e fermentação (OLIVER et al., 2014).

As enzimas são disponíveis comercialmente para os polímeros de celulose, hemicelulose e pectina. Uma classe de enzimas denominadas celulases decompõe a celulose em glicose. Segundo Taherzadeh e Karimi (2007), as três principais celulases são:

- Endoglucanase, que se liga, e cliva as ligações glicosídicas mais acessíveis da cadeia de polímero de celulose para criar cadeias de celulose menores (oligómeros) e, assim, aumentar a quantidade de extremidades de ligação para as outras enzimas de celulase.
- Exoglucanase, que se liga às extremidades da cadeia e quebra o dissacárido celobiose.
- $\beta$  - glucosidase, que rompe a celobiose em monossacarídeos (glicose).

### **Hidrólise ácida**

A hidrólise ácida, que é anterior a hidrólise enzimática, tem a vantagem de não necessitar de matéria-prima para a produção de enzimas (MOUSDALE, 2008) e é simples e relativamente barato para se realizar em pequena escala e em experimentos laboratoriais. Ácidos fortes (30-70 %) são utilizados próximo de temperatura ambiente, enquanto que em concentrações muito baixas ( $\approx 1$  %) podem ser usado em combinação com temperaturas elevadas (190 °C / 220 °C). A desvantagem é que os inibidores microbianos, tais como furfural e Hidroximetilfurfural (HMF), são formados. Os íons de determinados ácidos, tais como os sulfatos do ácido sulfúrico, também são inibitórios para a fermentação (SUN e CHENG, 2002; TAHERZADEH e KARIMI, 2007). Inibidores microbianos devem ser removidos antes do processo de fermentação.

### **Fermentação**

Uma vez que os polissacarídeos são divididos em monossacarídeos e dissacarídeos, a fermentação é o próximo passo. As vias bioquímicas de microorganismos

produzem muitos produtos finais diferentes que são desejáveis para as indústrias. Estes incluem ingredientes farmacêuticos ativos, antibióticos, sabores e enzimas (RATLEDGE e KRISTIANSEN, 2006). O objetivo da fermentação é ganhar acumulação do produto final (no caso, o etanol), o que é conseguido alterando as condições de crescimento e/ou os substratos disponíveis. A fermentação de carboidratos em etanol é conseguido através de microorganismos produtores de etanol chamados etanologens.

A via bioquímica usada para produzir etanol varia dependendo do organismo e influencia os requisitos de crescimento e a velocidade de produção de etanol. Para a fermentação da glicose em etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* usa a via de Embden-Meyerhof-Parnas (MARIS et al., 2006), que utiliza frutose 1,6 biofosfato como substrato para o processo de clivagem, sendo esta a via mais comum, enquanto que a bactéria *Zymomonas mobilis* utiliza a via Entner-Doudoroff, exclusiva de algumas bactérias gran-negativas, que utiliza 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato na clivagem (DAWES et al., 1966).

#### 3.3.4. Lignocelulose

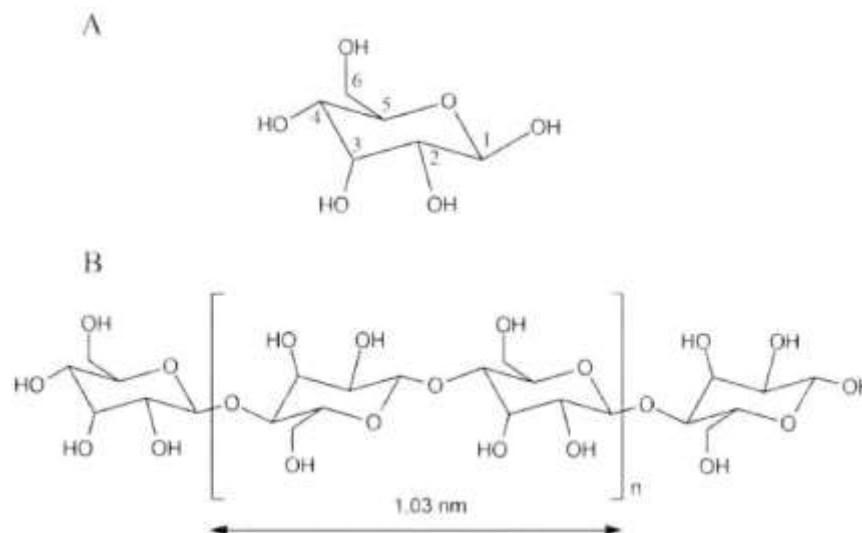
As lignoceluloses são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera abrangendo aproximadamente 50 % da biomassa no mundo e estão presentes nos processos residuais da agricultura, florestas, frutas e vegetais. São polímeros organizados e com ligações covalentes e ligações de hidrogênio acompanhadas diretamente na combinação com ligações de forças Van der Waals (OVEREND, 1987).

A lignocelulose representa mais de 90 % do peso seco de uma célula vegetal, sendo composta pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes. Nas paredes celulares de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão localizadas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

A quantidade de cada um dos polímeros varia com a espécie, a idade e entre as partes de uma planta. Em média, a lignocelulose consiste de 45 % de celulose, 30 % de hemicelulose e 25 % de lignina (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

A natureza estrutural da molécula de celulose, constituídas de unidades D-glicose unidas por ligações tipo  $\beta$ -1,4 altamente ordenadas, confere características estruturais a esta, tornando difícil a sua separação do complexo lignocelulósico e particularmente ao processo de hidrólise deste polímero. As ligações de hidrogênio conferem às cadeias de

celulose uma estrutura altamente ordenada e rígida (BOBBIO & BOBBIO, 1989). A porção de celulose insolúvel em base forte (ex: NaOH 18 %) é chamada de alfa-celulose e a parcialmente precipitada em condições neutras é dita beta-celulose. Já restante dissolvida é a gama-celulose (BOBLETER, 1994).

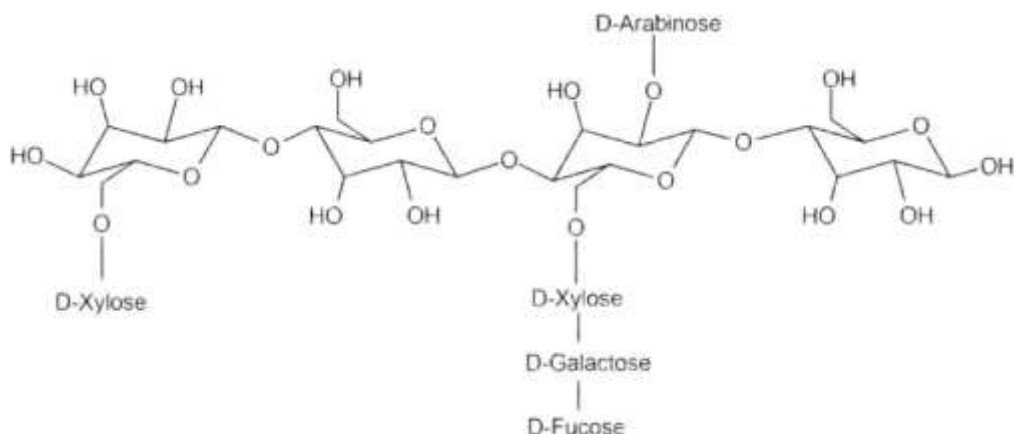


**Figura 06.** (A) Estrutura química da glicose com carbonos numerados e (B) polímero de celulose com um DP de  $2^{n+2}$ .

Fonte: Adaptado de Gandini e Belgacem (2008).

A hemicelulose é constituída por unidades de pentoses (xilanas) ou alternadas de manoses e glicoses ou de galactoses. Possuem cadeias laterais de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses que são responsáveis pela solubilidade em água e/ou em álcalis (PEREIRA JR., 1999). Nas plantas, as hemiceluloses estão na maioria, conectadas às ligninas, através de ligações covalentes, e assim fixadas à estrutura fibrosa. Para o isolamento da hemicelulose, é necessário quebrar as ligações lignina - polissacarídeo através de processo hidrotérmico que pode ser seguido ou não de rápida descompressão. Há o desarranjo da estrutura física do material e facilitando a extração de um licor composto principalmente de xilose com pequeno grau de polimerização (<10) (SCHUCHARDT et al., 2001).

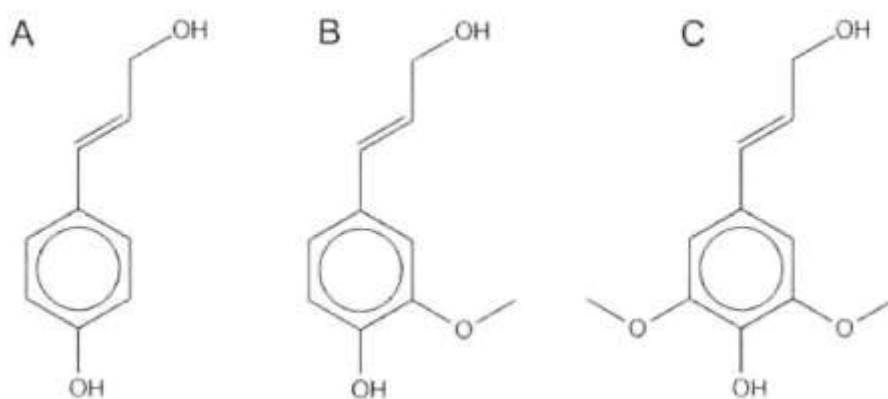




**Figura 07.** Estrutura química do polímero de hemicelulose.

Fonte: Adaptado de Heldt e Heldt (2005).

A lignina, ao contrário da celulose e da hemicelulose, possui uma estrutura aromática que forma uma rede macromolecular tridimensional e é mais hidrofóbica (BOBLETER, 1994). É o mais abundante composto fenólico na natureza, sendo polímeros formados pela união covalente de três tipos de monômeros: álcoois p-cumarílico, guaiacílico e sinapílico. As ligações do tipo éter resistem a vários agentes hidrolíticos e sistemas enzimáticos (FUKUSHIMA et al., 2003).



**Figura 08.** Estrutura química das três unidades estruturais de lignina: álcool p-cumarílico (A), álcool guaiacílico (B) e álcool sinapílico (C).

Fonte: Adaptado de Smith et al. (2010).

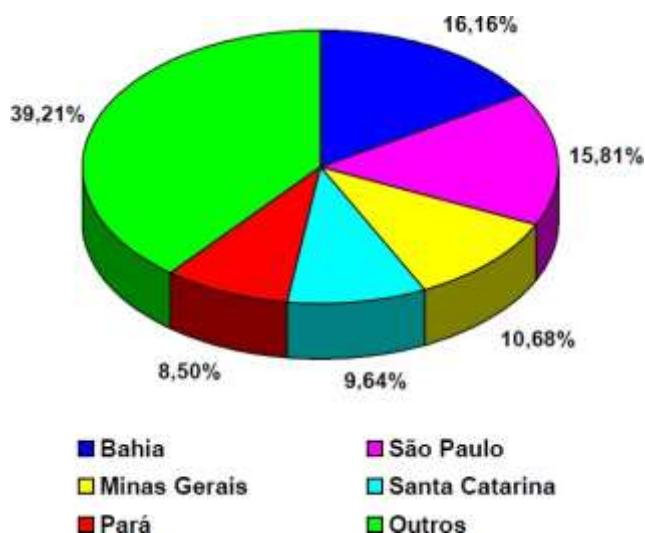
### 3.4. Cultura da banana

#### 3.4.1. Aspectos gerais

Originária da Ásia, a banana é a fruta símbolo do clima tropical. A expansão do islã levou a fruta ao Mediterrâneo e, em seguida, ela foi difundida na África. Nos séculos XV e XVI, os portugueses já cultivavam bananas na Ilha da Madeira e na costa ocidental africana – berço da palavra banana, hoje usada em muitas línguas. As primeiras mudas foram trazidas para o Brasil das Ilhas São Tomé e Príncipe (MIRANDA, 2007).

Atualmente, a banana é a fruta mais consumida no mundo, com 59 milhões de toneladas produzidas anualmente e envolve um agronegócio de nove bilhões de dólares por ano em todo o planeta (VELOSO et al., 2013). Nesse sentido, a bananicultura tem se expandido bastante na maioria dos países nas três últimas décadas, passando de 35 milhões de toneladas na safra 1978 para 107 milhões de toneladas na safra 2011. Isso foi possível graças ao uso mais intensivo de tecnologia, proporcionando melhores produtividades. Além disso, a cultura possui grande importância econômica e social, presente na mesa de todas as camadas sociais da população.

O Brasil é o sexto maior produtor de banana do mundo. Possui uma produção de 6.892.622 toneladas, com uma área de plantio de 485.075 hectares e com participação de 6,9 % na produção mundial (CONAB, 2014). É a segunda fruta mais cultivada, estando presente em todos os estados, desde a faixa litorânea até os planaltos centrais. Entretanto, devido a fatores climáticos, a exploração da banana está concentrada nos Estados da Bahia, que responde por 16,16 % da produção, seguido por São Paulo, com 15,81 %, Minas Gerais com 10,68 %, Santa Catarina com 9,64 %, e o Pará, com 8,5 %, conforme o demonstrado na Figura 09.



**Figura 09.** Principais estados produtores no Brasil.

Fonte: Adaptado de Conab (2014).

Com relação à produtividade, o destaque nacional é o estado do Rio Grande do Norte com a expressiva marca de 31,4 toneladas/ha, sendo 135 % maior que a média do país (13,4t/ha). Na sequência, aparecem Santa Catarina e São Paulo com produtividades superiores à média brasileira: 64 % e 54,7 %, respectivamente (Tabela 01).

**Tabela 01.** Estados produtores de banana.

<b>Estados</b>	<b>Área Colhida (ha)</b>	<b>Produção (t)</b>	<b>Rendimento (t/ha)</b>
Bahia	73.837	1.113.930	15,09
São Paulo	50.79	1.090.009	21,50
Minas Gerais	41.341	736.038	17,80
Santa Catarina	29.031	664.336	22,88
Pará	43.510	585.943	13,47
Ceará	49.255	375.531	7,62
Pernambuco	36.309	364.144	10,03
Paraná	11.707	280.458	23,96
Espírito Santo	21.793	248.653	11,41
Goiás	12.441	196.540	15,80
Rio de Janeiro	22.365	150.586	6,73
Rio Grande do Norte	5.186	148.721	28,60
Paraíba	12.442	145.721	11,71
Rio Grande do Sul	12.208	122.934	10,07
Maranhão	9.921	102.974	10,38
Roraima	8.735	92.030	10,54
Amazonas	6.660	84.726	12,72
Acre	7.336	77.742	10,60
Rondônia	8.277	70.762	8,53
Mato Grosso	6.300	68.073	10,81
Piau	1.957	37.518	19,17
Sergipe	2.790	37.494	13,44
Alagoas	3.927	35.698	9,09
Tocantins	3.461	29.356	8,48
Amapá	1.985	17.115	8,62
Mato Grosso do Sul	1.402	12.445	8,88
Distrito Federal	190	3.699	19,47
<b>Brasil</b>	<b>485.075</b>	<b>6.892.622</b>	<b>14,21</b>

Fonte: Adaptado de Conab (2014).

### 3.4.2. Resíduos da cultura

As bananas comuns e bananas de cozimento (constituição do genoma AAA, AAB, ABB) são derivadas de cruzamentos entre as espécies selvagens da *Musa acuminata* (AA) e *Musa balbisiana* (BB) (HESLOP-HARRISON e SCHWARZACHER, 2007). Elas são cultivadas por pequenos produtores em associação com outras culturas alimentares em baixas densidades (isto é, como árvores de sombra para plantas perenes, como café e cacau) ou nas plantações comerciais em altas densidades, principalmente da banana comum (GRAEFE et al., 2011).

Cerca de 20 a 40 % das bananas que são produzidas não cumprem as normas de exportação ou mesmo exigências dos mercados locais de qualidade, e são geralmente depositados em lixões a céu aberto (HAMMOND et al., 1996; CLAY, 2004). Em relação a área, para cada hectare de cultura da banana, são gerados cerca de 220 t de resíduos que consistem principalmente de material lignocelulósico. A maioria destes resíduos são descartados pelos agricultores em locais inadequados ou queimados, o que provoca uma séria preocupação ambiental (INGALE et al, 2014). No entanto, os resíduos de banana contêm boa quantidade de lignocelulose que podem ser convertidos em biocombustíveis e outros produtos químicos. O teor de celulose, hemicelulose e lignina de resíduos de banana é classificado como 28,92 % 25,23 % e 10,56 %, respectivamente (REDDY et al., 2010), embora menor variação poderia ser possível com a mudança de espécies de banana, crescimento e outras condições ambientais.

Já no Brasil, em particular nas regiões do Sul, estima-se que para cada 100 kg de frutos colhidos, 46 kg não são utilizados (EMBRAPA, 2006). Souza et al. (2010) indicam que, para cada tonelada de bananas produzidas aproximadamente 3 toneladas de pseudocaule, 160 kg de hastes, 480 kg de folhas e 440 kg de peles são gerados. Além disso, Fernandes et al. (2013) constataram que menos de 10 % da biomassa disponível como resíduo, que totalizam 440 milhões de toneladas no Brasil, é designado para alguma aplicação.

Resíduos dessa cultura têm sido utilizados para diversos fins energéticos, como para a produção de biogás (DEL ROSARIO e PAMATONG, 1985), enzimas ligninolíticas (ROBINSON et al., 2001). Shah et al. (2005), Krishna e Chandrasekaran (1996), Sharma et al. (2007) e Bello et al. (2012), utilizaram resíduos de banana para a produção de etanol. Velásquez Arredondo-et al. (2010) investigaram a hidrólise ácida de polpa de banana e de fruta e a hidrólise enzimática da haste de flor e casca de banana, e os resultados obtidos

demonstram um balanço de energia positivo para as quatro vias de produção avaliadas. O estudo de Graefe et al. (2011) apresenta resultados de um estudo de caso na Costa Rica e Equador, que concluiu que montantes consideráveis de etanol podem ser produzidos a partir de cachos de banana que não cumprem as normas de qualidade, bem como a partir dos quais são parcialmente deixados a apodrecer nos campos. Oberoi et al. (2011) também demonstraram que a casca de banana pode servir como um substrato ideal para a produção de etanol por meio de sacarificação e fermentação simultâneas. Hossain, et al. (2011) avaliaram o bioetanol a partir de banana podre e concluíram que este pode ser utilizado em motores de automóveis, produzindo emissões reduzidas e, assim, ela pode ser usada como um processo de reciclagem para a gestão de resíduos.

Em comparação com outros resíduos lignocelulósicos, a biomassa de banana possui, geralmente, menores teores de lignina, mas de natureza mais fibrosa. São mais facilmente deslignificadas, mas a sua natureza fibrosa limita a velocidade da hidrólise enzimática, devido ao seu elevado grau de cristalização e polimerização (MANSFIELD et al, 1999; KIM e LEE, 2005; FAN et al, 1980; LEE e FAN, 1983).

### **3.5. Atividade mineral na fermentação**

#### **3.5.1. Os efeitos do alumínio sobre a fermentação**

O alumínio é o metal mais abundante do planeta e o terceiro elemento em teor na crosta terrestre, principalmente nas formas insolúveis e atóxicas de aluminossilicatos ou óxidos, mas, à medida que os solos se tornam mais ácidos, formas fitotóxicas de alumínio são disponibilizadas, nomeadamente o íon  $Al^{3+}$ , na forma hexahidratada de  $Al(H_2O)_6^{3+}$  (Kochian, 1995).

O metal é normalmente encontrado em solos ácidos ( $pH < 5,0$ ), especialmente em regiões tropicais, podendo compreender até 40 % de toda a área arável do mundo (Kochian, 1995). Entretanto, estimativas sugerem que está presente em cerca de 70 % da área agricultável dos países tropicais (Haug e Vitorello, 1997). Os solos brasileiros, em sua maioria, apresentam acidez e elevados teores de alumínio (CRISTINA et al., 2007).

Além disso, o alumínio apresenta um quadro de toxicidade, o que o torna um fator limitante na produtividade de diversas culturas. Essa toxicidade, causada pelo íon  $Al^{3+}$ , também é observada em outros organismos como bactérias, fungos e algas verdes (FOY e GERLOFF, 1972; DATE e HOLLIDAY, 1979; GUIDA et al., 1991; ZEL et al., 1993).

O fator limitante do alumínio não se restringe apenas a culturas, mas também a

outras formas de exploração de microrganismos, como é o caso das leveduras utilizadas na fermentação alcoólica. Segundo Amaral e Aranha (2002), mosto e o meio fermentativo podem ser contaminados pelo alumínio através da cana-de-açúcar cultivada em solos ácidos com grande disponibilidade de alumínio e da utilização de água tratada com alúmen de potássio ou sulfato de alumínio, um tratamento muito comum em meio industrial. Foi relatado que em destilarias de etanol combustível no estado de São Paulo foram encontradas concentrações elevadas de alumínio em mostos industriais, oscilando entre 8 e 40 mg.L<sup>-1</sup> mas podendo chegar a até 130 mg.L<sup>-1</sup> (AMARAL e ARANHA, 2002), influenciando diretamente no rendimento do processo fermentativo. Quanto aos níveis de toxidez do alumínio, Tun et al. (2013) verificou que o íon Al<sup>3+</sup> foi medianamente tóxico para as células de levedura na concentração de 21,5 mg.L<sup>-1</sup> enquanto Oliveira et al. (2009), obteve uma inibição de 72 % da atividade das leveduras com uma concentração de 54 mg.L<sup>-1</sup>.

Outro ponto que deve ser considerado é que no processo industrial de produção de etanol a levedura é reutilizada de um ciclo fermentativo para outro. Em fermentações de 6-10 horas, obtêm-se um total de dois ciclos por dia, durante uma safra de 200 a 250 dias, podendo gerar uma acumulação de alumínio, aumentando os efeitos tóxicos do metal mesmo para níveis mais baixos do que aqueles preconizados na literatura. Tais informações justificam uma pesquisa sobre técnicas de proteção às células de leveduras a toxidez do alumínio (AMARAL; ARANHA, 2002).

### 3.5.2. Os efeitos do magnésio sobre a fermentação

A composição do caldo destinado a fermentação alcoólica pode variar, afetando vários parâmetros operacionais industriais, tais como o rendimento da fermentação. Embora o teor de cinzas no caldo seja um pouco constante, a sua composição mineral pode variar amplamente, dependendo da fonte da matéria-prima (BASSO et al., 2011).

Diversos minerais são importantes na nutrição de levedura, permitindo que o metabolismo celular seja adequado ao crescimento. Os componentes principais são o nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre e ferro. Além disso, no caso do metabolismo fermentativo, minerais como potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro, zinco e cobre, são considerados essenciais (AMORIM et al., 2009).

Segundo Stehlik-Thomas et al. (2004), alguns destes minerais, tais como o

magnésio, manganês zinco, cobre e ferro, desempenham papéis importantes como cofatores de enzimas e na manutenção da homeostase celular. No entanto, quantidades excessivas destes componentes podem ser tóxicos e podem causar danos nas funções que estão associados. Por exemplo, níveis elevados de potássio e cálcio presentes em melação de cana podem causar estresse osmótico que prejudica o desempenho da levedura (AMORIM et al., 2009). Nitrogênio pode ser assimilado pela *Saccharomyces cerevisiae* na forma de íon de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), amida (ureia) ou amínicos (aminoácidos), mas não na forma de nitrato e pouco ou nenhuma na forma de proteínas. Esses componentes têm uma influência direta sobre as taxas de brotamento, de crescimento específico e de transporte de açúcares (SILVERIO, 2002).

O magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) é o mais abundante cátion divalente intracelular e representa cerca de 0,3 % do peso seco da célula de levedura. Atua como um cofator para diversas enzimas envolvidas em diferentes reações metabólicas, tais como o ADN e a síntese de ATP (SOUZA et al., 2014). O magnésio desempenha funções multifacetadas na fisiologia de células de levedura em níveis citológicos, bioquímicos e biofísicos, e é muito importante em processos de fermentação industrial, nos quais é necessário para a ativação de várias enzimas glicolíticas e na proteção dos estresses ambientais durante a fermentação, tais como aquelas causadas pelo etanol, temperaturas elevadas ou de alta pressão osmótica. Portanto, ainda segundo o mesmo autor, a sua disponibilidade na forma, a absorção celular e a subsequente utilização metabólica parece ser um pré-requisito para atingir o máximo de atividade de fermentação da célula de levedura.

Souza et al. (2014), observaram uma diminuição na produção de etanol nos lotes que apresentaram uma menor concentração de íons de  $\text{Mg}^{2+}$  e Fósforo ( $\text{P}^+$ ). Karamushka e Gadd (1994) relataram um efeito protetor do  $\text{Mg}^{2+}$  em relação a toxicidade causada por concentrações elevadas de  $\text{Cu}^{2+}$  em ambiente laboratorial. Assim, este resultado corrobora a conclusão de que o efeito inibitório de  $\text{Cu}^{2+}$  poderia ser suprimido pela presença de concentrações elevadas de cátions divalentes de  $\text{Mg}^{2+}$ , conduzindo a um aumento de rendimento de fermentação.

A absorção de magnésio e subsequente utilização metabólica parece ser um pré-requisito para atingir o máximo de atividade de fermentação da levedura (CHANDRASENA e WALKER, 1997). Três enzimas chave que, subsequentemente, trabalham para a biossíntese de etanol são dependentes da  $\text{Mg}^{2+}$ : A enolase, que converte 2-fosfoglicerato em 2-fosfoenolpiruvato (SCHREIER e HOCKER, 2010), piruvato-quinase, que converte 2-fosfoenolpiruvato em piruvato (BOLLENBACK e NOWAK, 2001), e piruvato-

descarboxilase, que converte mais piruvato em acetaldeído (TUN et al., 2013). Diante dos fatos apresentados, a pesquisa sobre a influência do magnésio nas reações fermentativas é justificada.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta e processamento dos resíduos

A coleta dos resíduos da cultura da banana foi feita na unidade experimental do Instituto Federal de Ciências e Tecnologias, Campus de Araguatins. O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN), localizado na Fundação Universidade Federal do Tocantins (UFT), latitude -10.17650 e longitude -48.35862, à 5,6 km da capital.

A bananeira escolhida foi da variedade FHIA-18, grupo genômico AAAB, tendo seu corte sido realizado aos 6 meses após a germinação. O resíduo foi separado em duas diferentes partes morfológicas da bananeira: o pseudocaule (PC) e a massa foliar (MF), cortados em pequenos pedaços do tamanho de 2-3 polegadas usando uma faca de aço inoxidável. Os materiais cortados foram secos ao sol durante 2 dias, seguido de secagem em estufa a 70 °C até peso constante. Após a secagem, o material foi moído em um moinho de facas do tipo "Willie" até atingir o tamanho de 18 mesh (1 mm) para possibilitar redução da cristalinidade da celulose (SUN et al., 2000).

#### 4.1.1. Determinação de Umidade

A determinação da umidade foi realizada pelo método gravimétrico que tem como base a perda de massa da amostra, por dessecação até peso constante. Uma fração da amostra total (cerca de 10 g) foi levada a estufa de secagem e esterilização da marca Tecnal TE-393/I, à temperatura de 105°C durante uma hora. Após esse período a amostra foi pesada até não apresentar variação no peso.

#### 4.1.2. Determinação de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por meio da incineração da amostra em forno mufla da marca Coel TLK49, a temperatura de 550 °C pelo período de quatro horas. Para isso o cadinho foi previamente calcinado, arrefecido e pesado. Em seguida, foram distribuídas uniformemente 2g da amostra no cadinho. A mesma foi incinerada na temperatura de 550 °C. Após esta etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação a amostra submetida ao processo de secagem.

#### 4.1.3. Determinação da lignocelulose

O método proposto por Van Soest (1994) foi utilizado para a determinação da composição das fibras da bananeira por permitir um melhor fracionamento dos diversos componentes da fração fibrosa. Este método é baseado na separação das diversas frações constituintes das fibras, por meio de reagentes específicos denominados detergentes (EMBRAPA, 2010). Foram avaliadas as quantidades de fibras em detergente neutro (FDN), que são constituídas basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, as fibras em detergente ácido (FDA), constituídas principalmente por celulose e lignina, assim como a hemicelulose, calculada pela diferença entre FDN e FDA.

Para a determinação do FDN foi realizado o seguinte procedimento: foi utilizado 1,0 g de amostra condicionada em copos de vidro com capacidade 600 mL proveniente do digestor de fibra, adicionando-se 100 mL da solução detergente neutro. A solução contendo as amostras permaneceu em fervura durante 60 minutos a 100° C, em seguida o conteúdo foi filtrado em cadinho filtrante com porosidade de 50 a 150 µm – nº 2.

Para a análise das fibras em detergente ácido pesou-se 1,0 g de amostra sendo submetida ao mesmo procedimento de lavagem a quente que o descrito para FDN, porém agora, sendo utilizado o detergente ácido. Terminado este processo, a amostra foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo e lavada primeiramente com água quente (90 a 100 °C) duas vezes, utilizando aproximadamente 80 mL no total da lavagem, e após com acetona outras duas vezes (utilizando aproximadamente 25 mL por lavagem). A amostra foi levada a uma estufa para secar por 12 h a 60 °C. Depois foi esfriada em um dessecador para que fosse feita a pesagem.

#### 4.2. Pré-tratamento

Os materiais foram submetidos a um pré-tratamento intercalado, entre ataque ácido ( $H_2SO_4$  a 1 % v/v, 150 g material/500 ml solução) e básico (NaOH a 4 % v/v, 150 g material/1000 ml solução) da fibra por 60 min à temperatura de 120 °C a 125 °C em autoclave em cada etapa do processo. Terminado o pré-tratamento, as amostras foram filtradas utilizando uma bomba de vácuo e lavou-se por duas vezes com água quente (90 a 100 °C), aproximadamente 1000 mL no total, e outras duas vezes com acetona (aproximadamente 80 mL por lavagem), até que as fibras se tornassem incolor em toda a amostra. As amostras foram secas em estufa por 12 h a 60 °C e esfriada em dessecador por 1 h antes de ser pesada.

### 4.3. Hidrólise enzimática

Com finalidade de digerir a biomassa para liberar os açúcares fermentecíveis, as amostras (pré-tratadas) foram submetidas à hidrólise enzimática. No tratamento enzimático (digestão enzimática) foi utilizada a associação dos complexos enzimáticos Cellic® HTec2 e Cellic® CTec2, obtidos a partir de cepas de *Trichoderma reesei*, da empresa Novozymes.

**Tabela 02.** Caracterização das enzimas CTEC e HTEC conforme a descrição da empresa fabricante Novozymes.

Produto	Cellic CTec2	Cellic HTec2
Especificação e Descrição	- Complexo de Celulase para degradar celulose em açúcares fermentáveis - uma mistura de celulases agressivas, alto percentual de $\beta$ -glucosidase e hemicelulase	- Endoxilanase com alta especificidade para hemicelulose solúvel. - Percentual de Celulase
Características	- Alta eficiência de conversão - Eficiente para alta concentração de sólidos - Tolerante a inibidores - Compatível com vários tipos de biomassa e pré-tratamentos - Alta concentração e estabilidade	- Pode ser combinada com CTec2 para aumentar hidrólise da celulose - Favorável para substrato com pré-tratamento ácido ou alcalino - Converte hemicelulose em açúcares fermentáveis
Benefícios	- Até 50 % menos de dosagem de enzima	- 20% menos enzima requerida

FONTE: Adaptado de Novozymes (2016).

O meio reacional consistiu de 5,0 g do substrato, 100 mL do tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M, pH = 5) em 10 frascos âmbar de 120 mL. As reações enzimáticas ocorreram em banho maria à 48 °C, durante 72 horas. A dosagem dos complexos enzimáticos Cellic CTec2 e HTec2 foi baseada na proporção relativa de FDA e hemicelulose (FDN-FDA) em relação ao FDN contido na amostra; foi usado o nível de dosagem correspondente a 6,0 % da FDN como complexo enzimático.

### 4.3. Determinação de açúcares redutores e ácido acético

A análise dos açúcares redutores (AR) e do ácido acético foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) marca Shimadzu (LC-10 Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo

bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura (destilada e deionizada). O fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 15 minutos. A detecção em detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-10A). As amostras foram previamente centrifugadas a 2500 rpm por 10 min a 20 °C, em seguida foram filtradas em filtros de seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) hidrofílico com 0,22 µm de espessura. Após o preparo das amostras, uma alíquota de 20,0 µl foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) e permeada por uma coluna Phenomenex Rezex ROA-OrganicAcid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a Cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

#### 4.4. Fermentação

O experimento foi conduzido da seguinte forma: Com base nas menores concentrações citadas pela literatura, foram calculadas as concentrações de magnésio e alumínio utilizadas no experimento, sendo utilizado o fator dois afim de estabelecer as demais concentrações acima e abaixo do valor mínimo. Em tubos de ensaio (30 mL), foram acrescentados 3 concentrações de óxido de magnésio PA (99,0 % MgO) e 2 concentrações de sulfato de alumínio (15 % de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), nas quantidades de 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de MgO (M1, M2 e M3) e de 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (A1 e A2), sendo que, para cada concentração de alumínio foram analisadas todas as concentrações de magnésio. Foi utilizado também soluções controle para MgO e para Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (M0 e A0). Para cada concentração de minerais, incluindo as testemunhas, foram adicionados 10 mL do caldo hidrolisado de PC e separadamente 10 mL do caldo hidrolisado de MF, formando dois lotes de fermentação. Foi adicionado sulfato de amônio, visando a nutrição nitrogenada das leveduras durante o processo, na concentração de 5 g/L. Após isso, foi adicionado a levedura seca *Saccharomyces cerevisiae* (fermento comercial) na concentração de 10 g/L. Para cada concentração de magnésio x alumínio foram realizadas 3 repetições. A incubação ocorreu em uma incubadora com agitação 32 °C por 24 horas de acordo com Lalue et al. (2009).

#### 4.5. Análise estatística dos dados

A fermentação foi realizada em triplicata, com delineamento experimental inteiramente casualizado e os teores de AR e etanol produzido foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente à análise de variância pelo teste F, seguido por análise de regressão ao nível de 5 % de significância, utilizando-se o software estatístico "Sisvar".

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Análises preliminares

De acordo com os resultados obtidos pelas análises iniciais, foi construída uma tabela (Tabela 03) com os parâmetros avaliados.

**Tabela 03.** Resultados das análises iniciais.

Parâmetros*	Pseudocaule	Massa foliar
Teor de umidade (%)	84	65
Teor de cinzas (%)	14,7	19,1
FDN (%)	40,6	45,3
FDA (%)	29,5	28,8
Matéria orgânica (%)	85,3	80,9

\* Valores obtidos através de análises sobre base seca dos materiais.

Pelos resultados apresentados, o pseudocaule apresentou 85,3 % de matéria orgânica e 14,7 % de cinzas. A massa foliar apresentou uma leve diferença, possuindo uma quantidade mais elevada de cinzas (19,1 %), o que reflete, provavelmente, em uma maior concentração de minerais como sódio, potássio e fósforo nessa parte da planta (GABHANE et al., 2014).

É possível observar através dos dados que os materiais são ricos em celulose e em hemicelulose. Segundo Cordeiro et al. (2004), o pseudocaule possui a natureza de apresentar uma maior quantidade de celulose em sua composição com baixo teor de

lignina, entretanto, não se pode afirmar o teor de lignina das amostras pela análise utilizada neste trabalho. Através das análises, o que se pode afirmar é a quantidade de fibras totais (FDN), a quantidade de celulose + lignina (FDA) e a hemicelulose pela diferença de valores entre FDN (Fibra em Detergente Neutro) e FDA (Fibra em Detergente Ácido).

Para PC, os resultados apresentaram bons valores em FDN (40,6 %) e um elevado FDA (29,5 %) mostrando que o material, em sua maior parte, é composto por celulose e lignina. Os valores de FDN e FDA foram igualmente altos para a MF (45,6 % e 28,8 % respectivamente), revelando um valor ainda maior para hemicelulose (16,5 %). Tais valores para FDN e FDA se aproximaram dos valores obtidos por Fernandes et al., (2003) para a cana-de-açúcar (47,6 e 26,7 % respectivamente), demonstrando que os materiais possuem potencial como fonte lignocelulósica de igual valor a cana-de-açúcar que hoje, é a matéria prima mais utilizada na produção de etanol de 2ª geração.

Entretanto, PC apresentou uma grande diferença no teor de umidade em relação a MF (84 % de umidade para PC e 64% para MF). Diante desse ponto, é recomendável uma análise comparativa dos custos e rendimentos entre a utilização dos dois materiais, afim de se identificar o mais rentável.

## **5.2. Efeitos do pré-tratamento**

A metodologia utilizada para o pré-tratamento é semelhante à determinação de fibra bruta, descrita por Silva e Queiroz (2012), tendo como diferença, apenas a concentração de ácido e base utilizada no pré-tratamento (1,25 % v/v para ambos os tratamentos). Desta maneira, será apresentada a proporção de material insolúvel recuperado após pré-tratamento, equivalente a fibra bruta do método de Silva e Queiroz (2012) fazendo a comparação com a quantidade de FDN do material, avaliando assim a eficiência do pré-tratamento e podendo-se estimar uma possível perda da hemicelulose durante o processo.

A partir das considerações pontuadas sobre o pré-tratamento, estão apresentados na tabela 04 os resultados observados. Nesta tabela fica explicito as proporções de perda da fração de hemicelulose solubilizada com o pré-tratamento e a comparação entre a fração insolúvel (pré-tratamento) e a concentração de FDN observada nas amostras.

**Tabela 04.** Porcentagem sobre o material insolúvel obtido após pré-tratamento, valor sobre o FDN obtido pelas análises preliminares e perda por solubilização da hemicelulose obtido através da diferença entre o valor pós pré-tratamento e o FDN para as amostras MF e PC.

Amostras	Material insolúvel (%)*	FDN (%)*	Hemicelulose solubilizada (%)*
<b>MF</b>	42	45,3	3,3
<b>PC</b>	19,6	40,6	21

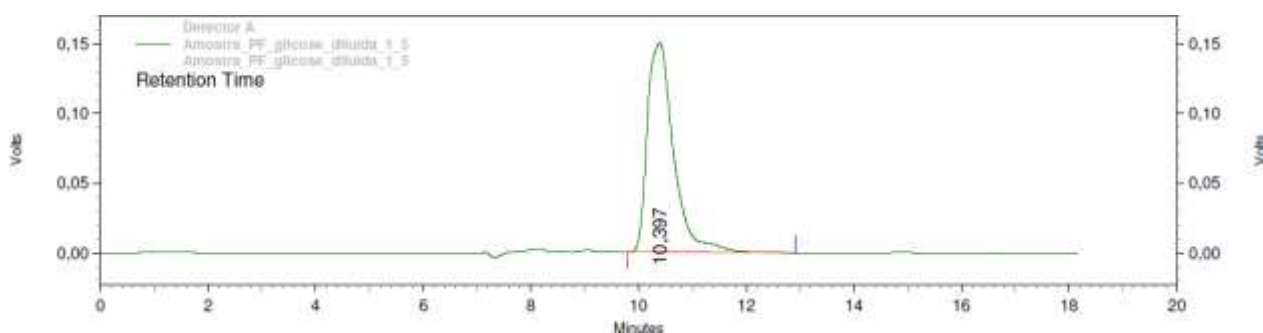
\* Valores obtidos através de análises sobre base seca dos materiais.

De acordo com a tabela 04, após o pré-tratamento ácido/básico, a amostra MF sofreu uma redução de 58 % do seu peso inicial (150 g), resultando em 63 g de material pré-tratado (42 %), podendo-se constatar que a fração insolúvel após o pré-tratamento corresponde a fração fibrosa (que foi posteriormente submetida a digestão enzimática) e que se aproxima dos resultados para FDN (45,3 %). Assim, a subtração direta da fração do material insolúvel com a fração FDN resultou em uma perda de 3,3 % de hemicelulose para MF. Esta perda ocorre devido ao pré-tratamento ácido, onde a hemicelulose é separada da celulose e é recuperada na forma de xilose, arabinose e outros monômeros, na fração aproximada de 80 a 90 % de taxa de recuperação. Desse processo se obtém a celulignina (celulose mais lignina) (CHENG et al., 2008). A partir desse resultado é possível constatar que o pré-tratamento foi efetivo na liberação da fração fibrosa (celulose, hemicelulose e lignina) nas amostras de MF, para a hidrólise enzimática, com pouca perda de hemicelulose no processo, aumentando assim o quantitativo de fibras digeríveis que podem se transformar em açúcares fermentescíveis.

Para a amostra PC, o pré-tratamento combinado ácido/básico acarretou em uma maior solubilização da hemicelulose em relação a MF (21 %) e conseqüentemente em uma maior perda de material (80,4 % de seu peso inicial). Esses dados sugerem que o pré-tratamento combinado não foi eficiente, pois segundo Santos et al. (2012), para o pré-tratamento ser eficiente, ele deve apresentar uma elevada recuperação de todos os carboidratos. A fim de aumentar o rendimento, recomenda-se a mudança do pré-tratamento, fazendo-se o uso apenas de um ataque básico, conforme o trabalho de Ingale et al. (2014).

### 5.3. Hidrólise enzimática

Para a determinação da concentração de glicose, foi criado um modelo padrão na concentração de 20 g/L, o qual gerou uma curva com a seguinte equação:  $y = 571032x - 100979$ , (onde “y” corresponde ao valor da área obtido pelo cromatograma e “x” a concentração de glicose em g/L) com  $R^2 = 0,982$ . A seguir, as amostras ricas em glicose foram diluídas em água ultra pura, sendo o fator de diluição de 1:5 v/v para a amostra MF e 1:10 v/v para PC. A partir dos cromatogramas gerados pelo CLAE, foi possível determinar as concentrações de glicose das amostras (Figura 10).



**Figura 10.** Cromatograma da amostra MF diluída à 1:5 v/v em água ultra pura, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 12 min: glicose.

De acordo com os resultados obtidos mediante análise via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ouve uma ligeira diferença entre a concentração de glicose para MF e PC, os quais foram relacionados na tabela abaixo.

**Tabela 05.** Concentração de glicose dos materiais via CLAE.

	MF	PC
<b>Glicose (g/L)</b>	79,75	73,24
<b>Ácido acético</b>	NO*	NO*

\*: Não observado.



Segundo a tabela 5, ambas amostras obtiveram quantidades elevadas de glicose em relação a outros trabalhos, como o de Pereira (2013), onde se avaliou o rendimento em açúcares redutores totais de forrageiras submetidos a hidrólise enzimática. Entretanto, analisando separadamente cada matéria-prima, percebe-se que existem diferenças quanto ao rendimento sobre a quantidade de material em base seca necessário para se chegar a essas concentrações.

Para a amostra MF, foram gastos unicamente 150 g de material seco, dando um total de 53,16 % p/p de glicose produzida. Já para PC, foram gastos 290 g de material (193 % a mais de matéria-prima) para a produção de quase a mesma quantidade de glicose, resultando em um total de 25 % p/p de rendimento de glicose sobre a matéria seca utilizada. Essa baixa taxa de recuperação se deve principalmente a ineficiência do pré-tratamento sobre essa matéria-prima, pois como já foi descrito neste trabalho, ocorreram perdas do material devido a solubilização da hemicelulose durante o pré-tratamento.

Chama a atenção nas análises o teor reduzido de outros açúcares como xilose, celobiose e arabinose e a não formação de ácido acético durante a hidrólise. É possível realizar este diagnóstico através da observação da figura 10, onde se constata a ausência dos picos referentes a estes outros açúcares.

#### 5.4. Cromatografia da fermentação

Após a realização do método de CLAE, foram obtidos *fingerprints* com as áreas da glicose e etanol, as quais são usadas para quantificar as concentrações dos mesmos. Estes *fingerprints* foram relacionados no ANEXO. A partir das áreas obtidas, foi feita a quantificação da glicose e do etanol contido nas amostras fermentadas, os quais foram relacionados na tabela 06.

**Tabela 06.** Quantificação da glicose e do etanol em g/L nas amostras fermentadas de MF e PC.

Concentração Glicose		Concentração etanol		Concentração Glicose		Concetração etanol	
MF				PC			
AOM0R1	55,132552	4,891944		45,844588		6,47956	
AOM0R2	51,28346	4,68056		58,337312		7,269104	
AOM0R3	47,738416	4,900248		48,130324		7,040448	
AOM1R1	44,535792	5,821312		70,56778		7,956488	
AOM1R2	63,376872	6,35352		59,383908		7,231624	
AOM1R3	53,482072	5,8602		60,011232		7,266392	

A0M2R1	41,386984	5,662672	59,16754	7,377056
A0M2R2	52,629516	5,77824	56,530512	7,311392
A0M2R3	51,701064	5,763528	55,647532	7,14376
A0M3R1	53,50548	5,200224	58,419332	7,007648
A0M3R2	46,70048	5,125488	60,05148	7,250792
A0M3R3	51,646864	4,931152	62,119824	7,478272
A1M0R1	55,725756	4,961592	65,617272	7,414632
A1M0R2	46,150296	4,694928	61,071072	7,699584
A1M0R3	44,403576	4,8262	63,446056	7,383504
A1M1R1	48,504992	4,944912	55,687696	7,137984
A1M1R2	54,20264	4,79324	67,353648	7,77316
A1M1R3	54,272588	4,833328	54,29622	6,885944
A1M2R1	61,511412	5,100736	51,947544	6,873528
A1M2R2	52,255844	5,098912	60,476812	7,401704
A1M2R3	50,419412	4,869496	64,710948	7,508736
A1M3R1	54,858056	5,070784	60,49084	7,600176
A1M3R2	45,739576	4,778224	61,620404	7,53812
A1M3R3	51,3092	4,75684	62,041948	7,618312
A2M0R1	49,996972	4,818768	59,5433	7,536512
A2M0R2	55,517092	5,02616	64,589412	7,428664
A2M0R3	54,847564	5,109504	58,17342	7,178008
A2M1R1	54,842672	4,859296	65,906488	7,451808
A2M1R2	50,698136	4,914592	61,183288	7,403288
A2M1R3	47,105088	4,760072	59,33322	7,249536
A2M2R1	58,33506	5,01804	55,94372	7,135648
A2M2R2	51,339796	4,822992	56,439856	7,448696
A2M2R3	54,858696	4,664104	56,174616	7,15128
A2M3R1	49,011052	4,921848	52,113876	7,13132
A2M3R2	50,2881	4,75564	48,249116	6,966184
A2M3R3	45,355204	4,864024	61,277824	7,432488

A partir da análise da tabela 06, nota-se a baixa quantidade de etanol produzido no prazo de 24h em relação a quantidade de glicose presente nos materiais. Portanto, constata-se que fermentação não ocorreu de forma eficiente, tendo ocorrido algum tipo de inibição na atividade das leveduras. Esse efeito retardatório não foi influenciado pela adição de magnésio e alumínio, tendo sido manifestado em todas as amostras, naquelas em que houve ou não adição de minerais.

### 5.5. Análise estatística da fermentação

Após análise das concentrações pelo método de CLAE foi-se realizado a análise de variância das seguintes variáveis: Glicose da massa foliar (GL MF), etanol da massa foliar

(E MF), glicose do pseudocaule (GL PC) e etanol do pseudocaule (E PC). Foi realizada análise de variância nas concentrações de glicose a fim de se avaliar a eficiência da levedura no consumo da glicose e a relação entre o consumo de glicose e os diferentes níveis de alumínio e magnésio. Para GL MF obteve-se a seguinte análise.

**Tabela 07.** Análise de variância para GL MF.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ALUMINIO	2	3.591935	1.795967	0.072	0.9312 ns
MAGNESIO	3	45.665215	15.221738	0.606	0.6173 ns
ALUMINIO*MAGNESIO	6	131.224653	21.870776	0.871	0.5302 ns
Erro	24	515.302133	21.470922		
<b>Total corrigido</b>	<b>35</b>	<b>782.977041</b>			
<b>CV ( %) =</b>	<b>9.73</b>				Número de
<b>Média geral:</b>	<b>51.5185647</b>				observações: 36

\*: significativo a 1 %. \*\*: significativo a 5 %. ns: não significativo.

De acordo com a análise de variância, não houve efeitos significativos no consumo da glicose pelas leveduras, o que significa que os minerais não afetaram a taxa de consumo de glicose das leveduras neste substrato em questão. Entretanto, fermentado de PC, a taxa de glicose consumida pelas leveduras foi alterada pela presença de minerais, conforme os resultados da análise de variância apresentados na tabela 07.

**Tabela 08.** Análise de variância para GL PC.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ALUMINIO	2	58.530489	29.265244	1.363	0.2750 ns
MAGNESIO	3	345.842067	28.539292	1.329	0.2881 ns
ALUMINIO*MAGNESIO	6	85.617875	57.640344	2.685	0.0388 *
Erro	24	515.302133	21.470922		
<b>Total corrigido</b>	<b>35</b>	<b>1005.292564</b>			
<b>CV ( %) =</b>	<b>7.86</b>				Número de
<b>Média geral:</b>	<b>58.9369444</b>				observações: 36

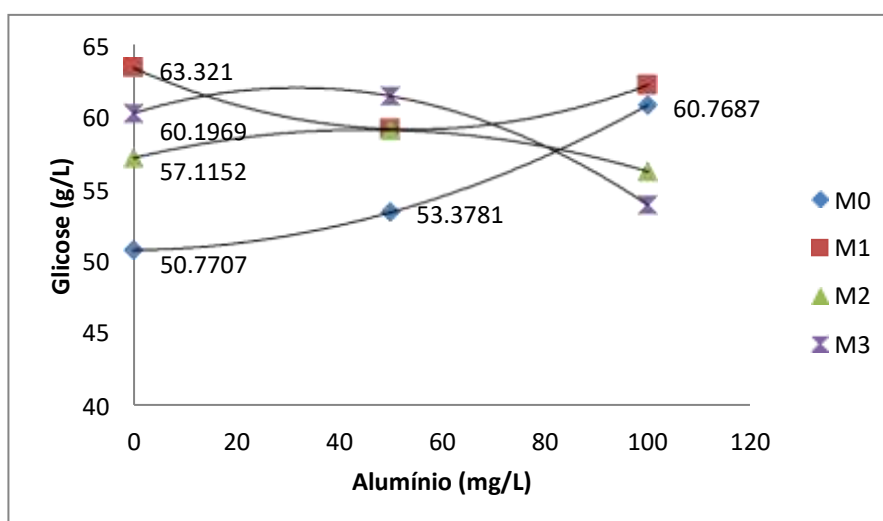
\*\* : significativo a 1 %. \*: significativo a 5 %. ns: não significativo.

Segundo a tabela 07, a taxa de consumo de glicose no substrato PC foi alterada pela interação entre as diferentes concentrações de alumínio e magnésio. Neste caso, foi realizado o desdobramento da interação a fim de identificar onde ocorreu essa interação e teste de médias para visualização dos pontos estatisticamente diferentes, os quais foram exibidos na tabela 08 e na figura 15.

**Tabela 09.** Teste de médias das concentrações de glicose g/L na interação entre alumínio e magnésio.

		MAGNÉSIO			
ALUMÍNIO		0	1	2	3
0		50,7707 bB*	63,321 aA	57,1152 aAB*	60,1969 aAB*
50		53,3781 aA	59,1125 aA	59,0451 aA	61,3844 aA
100		60,7687 aA	62,141 aA	56,1861 aA	53,8803 aA

\*: As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



**Figura 11.** Teste de Tukey a 5 % de significância das concentrações de glicose g/L na interação.

Pelo gráfico exibido na figura 15, é possível notar o efeito da interação entre os dois minerais. De acordo com o teste de médias, houve efeito significativo em M0 e A0, o que significa que na ausência de 1 mineral, o outro influenciou a taxa de absorção de glicose. Ambos minerais, conforme aumentaram suas dosagens, reduziram a taxa de consumo de glicose, sendo que, o ponto 0, obteve a menor média de concentração (50 g/L).

Entretanto, essa diferença na taxa de absorção de glicose não influenciou na produção de etanol do substrato PC, sendo que na análise de variância, a produção de etanol não apresentou diferenças significativas em nenhum dos fatores avaliados conforme o mostrado na tabela 10.

**Tabela 10.** Análise de variância para E PC.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>ALUMINIO</b>	2	0.175356	0.087678	1.181	0.3242 ns
<b>MAGNESIO</b>	3	0.078253	0.026084	0.351	0.7885 ns
<b>ALUMINIO*MAGNESIO</b>	6	0.726222	0.121037	1.630	0.1821 ns
<b>Erro</b>	24	1.781867	0.074244		
<b>Total corrigido</b>	35	5.707211			
<b>CV ( %) =</b>	3.73				Número de
<b>Média geral:</b>	7.3047222				observações: 36

\*\* : significativo a 1 %. \* : significativo a 5 %. ns: não significativo.

Os resultados exibidos na tabela 10 poderiam levar a conclusão de que a adição ou não de minerais não interferem na eficiência da fermentação, entretanto, os resultados obtidos na fermentação do substrato MF trazem outras informações que contrabalanceiam os resultados obtidos em PC. Para o rendimento de etanol de MF, a análise de variância revelou os seguintes resultados, conforme a tabela 11.

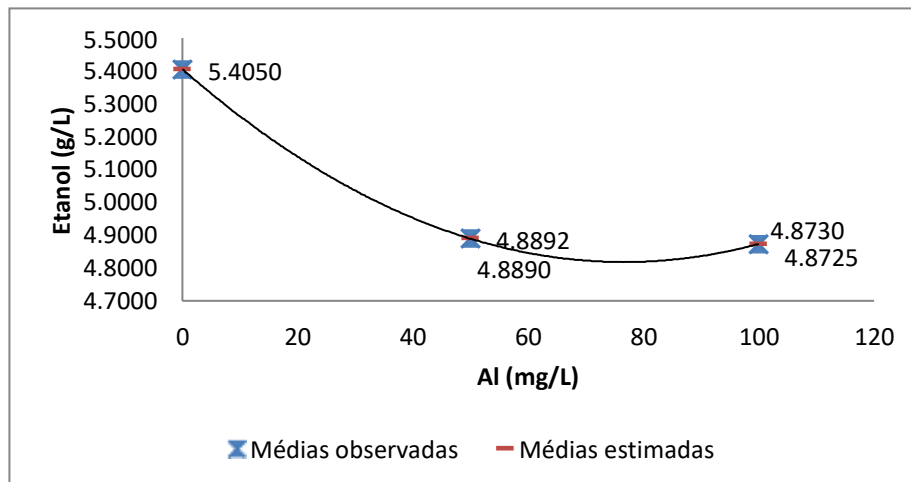
**Tabela 11.** Análise de variância para E MF.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
<b>ALUMINIO</b>	2	2.199812	1.099906	47.116	0.0000 **
<b>MAGNESIO</b>	3	0.922960	0.307653	13.179	0.0000 **
<b>ALUMINIO*MAGNESIO</b>	6	2.024165	0.337361	14.451	0.0000 **
<b>Erro</b>	24	0.560273	0.023345		
<b>Total corrigido</b>	35	5.707211			
<b>CV ( %) =</b>	3.02				Número de
<b>Média geral:</b>	5.0555611				observações: 36

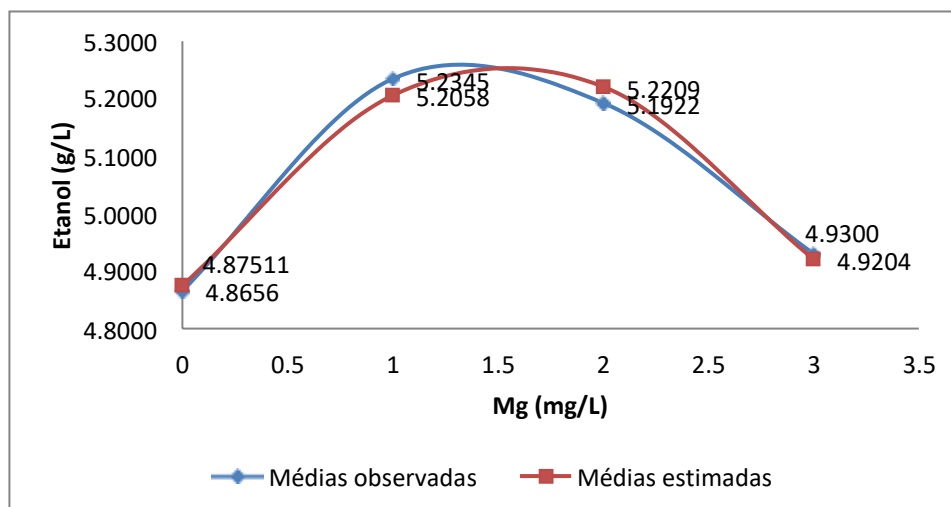
\*\* : significativo a 1 %. \* : significativo a 5 %. ns: não significativo.

Pela análise de variância, tanto os tratamentos individuais como a interação tiveram efeitos significativos sobre a produção de etanol. Para análise dos efeitos individuais, foi realizada análise de regressão visando o entendimento do comportamento das concentrações dos minerais sobre o substrato, sendo demonstrado por meio de gráficos para melhor visualização dos dados. Para visualização do efeito da interação entre os fatores, foi realizado teste de médias com os valores esboçados em um gráfico.

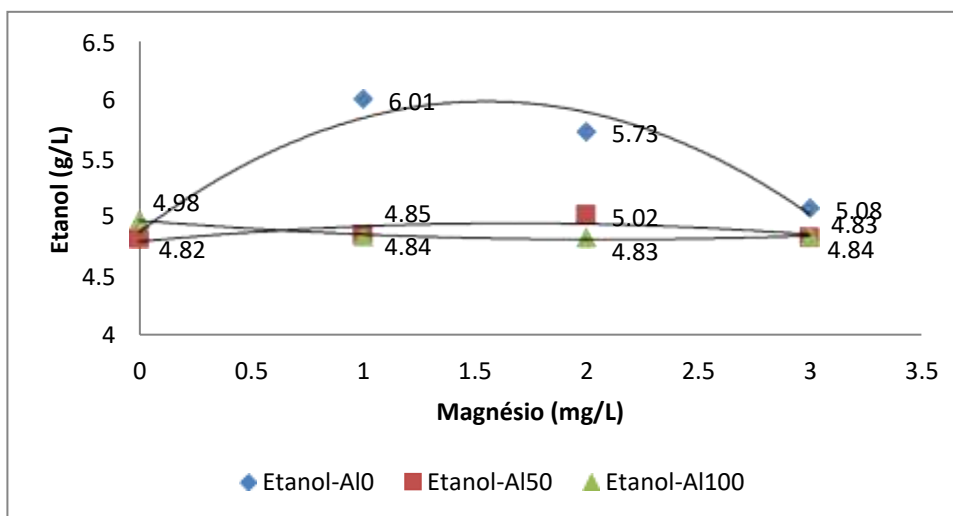
a) Regressão na fonte de variação Alumínio.



b) Regressão na fonte de variação Magnésio.



c) Teste de médias das concentrações de etanol (g/L) na interação.



**Figura 12.** Gráficos elaborados a partir dos resultados obtidos pela análise de regressão sobre as fontes de variação significativas (a e b) e sobre a interação entre os fatores pelo teste de Tukey a 5% de significância (c).

Para a fonte de variação alumínio, a análise de regressão detectou o efeito inibidor do alumínio sobre as leveduras, reduzindo a produção de etanol significativamente conforme se aumentou a quantidade de alumínio no material. Isso pode ser explicado pela liberação dos íons  $Al^{3+}$ , cátions que possuem caráter tóxico para as leveduras entre outros organismos (FOY e GERLOFF, 1972; DATE e HOLLIDAY, 1979; GUIDA et al., 1991; ZEL et al., 1993). Segundo a figura 16a, pelas médias obtidas a produção de etanol caiu de 5,40 para 4,87 g/L, uma redução de cerca de 10 % na produção de etanol, um valor que em uma macro escala (nível industrial) pode significar um prejuízo econômico altamente significativo.

A regressão apresentou uma equação quadrática a fim de demonstrar o comportamento do alumínio sobre o material. A equação  $y = 0,0001x^2 - 0,0153x + 5,405$  apresentou um  $R^2$  de 100 %, o que significa que o modelo consegue explicar 100 % das variações nas concentrações do mineral. Desse modo, à medida que se aumenta a concentração de alumínio, acontece um decaimento na produção de etanol até que a variação se torne insignificante a partir de 100 mg/L.

Sobre a fonte de variação magnésio, exibido pela figura 16b, pode-se observar um grande aumento na produção de etanol entre 1 e 2 mg/L seguida de um acentuado decaimento em 3 mg/L. Isso significa que o mineral conseguiu auxiliar a levedura, fornecendo um suporte nutricional e conseguindo assim elevar significativamente o teor de etanol produzido neste substrato, partindo de 4,87 g/L obtido no nível 0, até o ponto

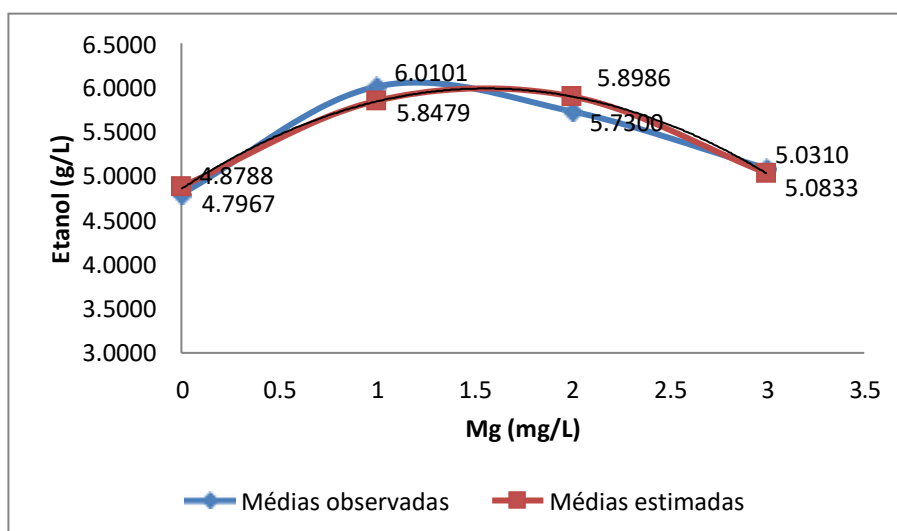
máximo de 5,23 g/L obtido no nível 1 de concentração, um aumento de 7% sobre o material sem adição de magnésio.

Entretanto, a medida que se elevou a concentração ocorreu uma saturação do mineral nas leveduras, acarretando em um efeito inverso, reduzindo a produção de etanol de 5,23 g/L no ponto máximo para 4,93 g/L no nível 3, uma redução de cerca de 6%. Portanto, mesmo que o mineral seja altamente essencial as leveduras, altas concentrações do mesmo não são toleradas, podendo prejudicar a mesma na função fermentativa.

A equação gerada foi a seguinte:  $y = -0,1578x^2 + 0,4885x + 4,8751$ , tendo um  $R^2$  de 98,2 %. Isso quer dizer que o modelo estatístico consegue explicar 98 % do efeito do mineral, demonstrando um alto grau de correlação entre a produção de etanol e as concentrações de magnésio.

Em relação à interação entre os fatores, o gráfico exposto na figura 16c demonstra que a interação aconteceu apenas dentro do nível 0 de alumínio para todas as concentrações de magnésio. Portanto, a utilização de magnésio aumentou a produtividade das leveduras, elevando a concentração de etanol no substrato durante a ausência de alumínio na solução. Com a adição de alumínio, os efeitos tóxicos causados pelo mineral causaram a inibição nas leveduras, inibição a qual o magnésio não conseguiu corrigir, ou seja, o magnésio não conseguiu suprimir a toxidez causada pelo alumínio nesse substrato.

Para realizar a análise de regressão sobre a interação, foi feito o desdobramento dos fatores sendo que, a partir do teste de médias, foi escolhido apenas o desdobramento dos níveis de magnésio sobre o nível 0 de alumínio, pois foi onde ocorreu a maior diferença entre as médias. As médias da interação geraram o gráfico exposto na figura 17.



**Figura 13.** Médias da interação dos diferentes níveis de magnésio dentro do nível 0 de alumínio pela análise de regressão.



Através da observação da figura 17, é possível identificar o ponto ótimo da concentração de magnésio em 1,5 mg/L. A partir desse dado, pode-se usar a equação de regressão para estimar a maior produtividade teórica de etanol obtida pela adição de magnésio na solução. A equação gerada foi:  $y = -0,465x^2 + 1,453x + 4,853$  (onde y é a produção de etanol em g/L e x é a concentração de magnésio em mg/L), com  $R^2$  de 0,932. Pela equação, a concentração ótima de etanol foi de 6,32 g/L, um aumento de 24 % sobre o material sem a adição de magnésio.

Esse incremento na produtividade só é possível na ausência de concentrações elevadas de alumínio, o que justifica o controle dos níveis de alumínio em mostos fermentativos. Neste estudo foi possível identificar a concentração ideal de magnésio a se utilizar e o ganho que é possível obter a partir de sua utilização, trabalhos futuros deverão aprofundar mais o assunto afim de verificar sua viabilidade econômica em larga escala.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que os materiais (pseudocaule e a massa foliar) apresentam amplo potencial para exploração como matéria-prima lignocelulósica visando a produção de glicose e etanol. A folha obteve maior rendimento geral em comparação ao pseudocaule, entretanto a metodologia adotada neste trabalho não conseguiu extrair todo o potencial do pseudocaule, e sendo ele a matéria-prima mais abundante oriunda da cultura da banana, carece de maiores estudos acerca de se estabelecer uma metodologia mais eficiente para a produção de glicose, com exclusivo enfoque no pré-tratamento, pois foi onde ocorreram as maiores perdas do material.

Um fato geral acerca da fermentação foi sua baixa rentabilidade na produção de etanol em um prazo de 24h levando em consideração os altos teores de glicose do meio fermentativo, o que traz a necessidade de uma investigação mais aprofundada acerca das causas que geraram essa redução na velocidade de consumo da glicose pelas leveduras. Recomenda-se uma revisão na metodologia afim de identificar qual dos métodos adotados neste trabalho ocasionou esse baixo rendimento.

Em relação a adição de minerais no mosto fermentativo, o alumínio gerou uma redução de cerca de 10 % na produção de etanol, reduzindo a quantidade produzida de 5,40 para 4,87 g/L de etanol, enquanto que o magnésio elevou a produção de etanol no mosto MF em 24 %, podendo aumentar a produtividade de 4,87 para 6,32 g/L. Entretanto,

na interação entre os dois minerais, o magnésio não conseguiu suprimir os efeitos tóxicos causados pelo alumínio sobre as leveduras.

Portanto, os resultados aqui apresentados indicam que se deve controlar os níveis de alumínio nos mostos fermentativos a fim de evitar possíveis perdas causadas por ele. Recomenda-se também uma análise de viabilidade sobre a utilização do magnésio em larga escala, visando o aumento da produção em nível industrial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. **Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, nº 26, mai-jun, 2002. p.52-55.
- AGUSTINI, D.; JUNIOR, H. E. **Produção de álcool de mandioca a partir de hidrólise enzimática natural**. Synergismus scyentifica UTFPR, v. 2, n. 1, 2007.
- AMARAL, D.; ARANHA, D. **Efeitos Do Alumínio Sobre a fermentação alcoólica**. 2002. 102f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage**. In W. M. Ingledew, G. D. Austin, C. Kluhspies, & D. R. Kelsall (Eds.), The alcohol textbook. Nottingham: Nottingham University Press. 5th ed., pp. 39–46, 2009.
- ANFAVEA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES. **Anuário da Indústria Automobilística Brasileira – 2011**.
- ANFAVEA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES. **Anuário da Indústria Automobilística Brasileira – 2016**.
- ANFAVEA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE VEÍCULOS AUTOMOTORES. **Carta da ANFAVEA: resultados de janeiro de 2013**. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta321.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2016.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2012**. Brasília. 2012.
- AUORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. **Bananas, raw materials for making processed food products**. Trends in Food Science & Technology, v. 20, p. 78 – 91, 2009.

AZZAM, A.M. **Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation.** Journal Environmental of Science and Health, New York; 24, n.4, p. 421–433, 1989.

BABATUNDE, G. M. **Availability of banana and plantain products for animal feeding.** In: Machin D, Nyvold S, editors. FAO expert consultation on roots, tubers, plantains, and bananas in animal feeding. Rome: FAO; 1992. FAO Animal Production and Health Paper 95.

BADGER, P. C. **Ethanol from cellulose: a general review.** In: Janick J, Whipkey A, editors. Trends in new crops and new uses. Alexandria, VA: ASHS Press; p. 17–21, 2002.

BARREIRA, P. **Biodigestores: energia, fertilidade e saneamento para a zona rural.** São Paulo: EDITORA ÍCONE, 2003.106 P.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation.** In M. A. S. Bernardes (Ed.), Biofuel production-recent developments and prospects (pp. 85–100). Rijeka: Intech. 2011.

BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias.** BNDES Setorial, Rio de Janeiro, 25: 5-38, 2007.

BELCHIOR, M.; BRASILEIRO, I. Pam. **Produção Agrícola Municipal**, v. 40, 2013.

BELLO, R.H.; SOUZA, O.; SELLIN, N.; MEDEIROS, S.H.W.; MARANGONI, C. **Effect of the microfiltration phase on pervaporation of ethanol produced from banana residues.** Comput. Aided Chem. Eng. 31, 2012. 820–824p.

BELLO, R. H.; LINZMEYER, P.; FRANCO, C. M. B.; SOUZA, O.; SELLIN, N.; MEDEIROS, S. H. W.; MARANGONI, C. **Pervaporation of ethanol produced from banana waste.** Waste Management, v. 34, n. 8, p. 1501–1509, 2014.

BERNARDES, J. **Expansão da bioenergia deve respeitar meio ambiente e não provocar prejuízos sociais.** Disponível em:

<[http://www.abdi.com.br/abdi\\_redesign/publicacao/engine.wsp?tmp.area=244&tmp.texto=1518](http://www.abdi.com.br/abdi_redesign/publicacao/engine.wsp?tmp.area=244&tmp.texto=1518)>. Acesso em 04 de março de 2016.

BORINES, M. G.; DE LEON, R. L.; CUELLO, J. L. **Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp.** *Bioresource Technology*, v. 138, p. 22–29, 2013.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol.** 2010. 154 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos.** 2ª ed., São Paulo: Editora Varela Ltda, p.11-70, 1989.

BOBLETER, O. **Hydrothermal Degradation of Polymers Derived from Plants.** *Prog. Polym. Sci.*, v. 19, p. 797-841, 1994.

BOLLENBACK, T.; NOWAK, T. **Biochemistry.** [s.l.; s.n.], 13097–13106p. 2001.

BRINGHENTI, L. **Qualidades do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca.** Botucatu, 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2004.

CARRASCO J, MARTÍNEZ M, PÉREZ J, MOLINA A. **La Hidrólisis Ácida como Tecnología para el Fraccionamiento de la Biomasa Lignocelulósica (I y II).** *Ingeniería Química de España*, 1992. 195e200. 261e268 p.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H.M.; SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; HAHN- HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. **SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse.** *Enzyme and Microbial Technology* 46, 64–73. 2010.

CASTRO, L. A. S.; OLIVEIRA, A. C. B.; MARTI, B.; EMYGDIO, A. B. **Padronização de procedimentos para obtenção de etanol de batata-doce na Embrapa Clima**

**Temperado.** In *Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: Simpósio Estadual de Agroenergia, 4.; Reunião Técnica de Agroenergia, 4., 2012, Porto Alegre, RS. Anais... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012

CHAMPAGNE, P. **Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: a Canadian perspective feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada.** *Resour. Conserv. Recy.* 50, 211–230. 2007.

CHAND, P.; VENKATESWAR, L. R. **Thermotolerant yeasts for Bio-ethanol Production using Lignocellulosic substrates.** *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, vol. 111, 2009. p551-588.

CHANDRASENA, G.; WALKER, G.M. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 55, 24–29. 1997.

CHENG, T. C., S. H. ORKIN, S. E. ANTONARAKIS, M. J. POTTER, J. P. SEXTON, A. F. MARKHAM, P. J. V. GIARDINA, A. LI, AND H. H. KAZAZIAN, JR. **Thalassemia in Chinese: use of “in vivo” RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2821-2825. 2008.

CHIARAMONTI, D. **Bioethanol: role and production technologies.** In: Ranalli, P. (Ed.), *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*, pp. 209–251. 2007.

CLAY, J. W. **World agriculture and the environment. A commodity-by-commodity guide to impacts and practices.** 1st ed. Washington: Island Press; 2004.

CONAB – Conselho Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** Dez. de 2014. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_12\\_19\\_09\\_02\\_49\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_2014-15.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_19_09_02_49_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_2014-15.pdf). Acesso em: 20 mar. 2016.

DALE, B. E.; HENK, L.L.; SHIANG, M. **Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion.** *Developments in Industrial Microbiology*, Edinburgh, v.26,

p. 223–233, 1984.

DATE, R. A.; HOLLIDAY, J. **Selecting Rhizobium for acid, infertile soils of the tropics.** Nature, v.277, n.6, p.62-64, 1979.

DAWES, E. A.; RIBBONS, D.W.; LARGE, P.J. **The route of ethanol formation in Zymomonas mobilis.** Biochem. J., v 98. 1966. 795-803.

DEL ROSARIO, E.J.; PAMATONG, F.V. **Continuous flow fermentation of banana fruit pulp sugar into ethanol by carrageenan-immobilized yeast.** Biotechnol 7, 1985. 819–820 p.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. **Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review.** Bioresource Technology, New York, v.55, p.1–33, 1996.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA de PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa fruta. Disponível em: <[http://www.jornalentreposto.com.br/anteriores/janeiro\\_2006/transporte.htm](http://www.jornalentreposto.com.br/anteriores/janeiro_2006/transporte.htm)>. Acesso em: 11 de abr. 2016.

EPA - Environmental Protection Agency. **Renewable Fuel Standard Program (RFS2) Regulatory Impact Analysis.** Assessment and Standards Division Office of Transportation and Air Quality U.S. Environmental Protection Agency. 2010.

EPE - Empresa de Pesquisas Energéticas. **Plano Decenal de Energia.** Rio de Janeiro, 2009.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. **Balço Energético Nacional 2015: Ano base 2014.** Rio de Janeiro. 2015.

FAN, L.T., LEE, Y.H., BEARDMORE, D.H., **Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymic hydrolysis.** Adv. Biochem. Eng. 14, 1980. 101–117.

FAOSTAT - On-Line Statistical Database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 17 de abr. 2016.

FERNANDES, A. M.; QUEIRÓZ, A. C.; PEREIRA, J. C.; LANA, R. P.; BARBOSA, M. H. P.; FONSECA, D. M.; DETMANN, E.; CABRAL, L. S.; PEREIRA, E. S.; VITTORI, A.

**Composição químico-bromatológica de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp* L.) com diferentes ciclos de produção (precoce e intermediário) em três idades de corte.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, n. 4, p. 977–985, 2003.

FERNANDES, E. R. K.; MARANGONI, C.; SOUZA, O.; SELLIN, N. **Thermochemical characterization of banana leaves as a potential energy source.** Energy Convers. Manage. 75, 603–608. 2013.

FOY, C. D.; GERLOFF, G. C. **Response of *Chlorella pyrenoidosa* to aluminum and low pH.** Journal Phycology, v.8, n.2, p. 268-271, 1972.

FUKUSHIMA, S. R.; HATFIELD, R. D. **Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear.** [s.l.]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 4, p. 505-511, 2003.

FULTON, L. **Recent biofuels assessment and two new scenarios.** Paper apresentado no IEA Seminar Assessing the Biofuels Option. Paris, 2004.

GALBE, M.; ZACCHI, G. **Biofuels (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).** L. Olsson (Ed.), Springer, 2007, p. 41.

GABHANE, J.; PRINCE WILLIAM, S. P. M.; GADHE, A.; RATH, R.; VAIDYA, A. N.; WATE, S. **Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication.** Waste Management, v. 34, n. 2, p. 498–503, 2014.

GANDINI, A.; BELGACEM M.N. **Chapter 1 - The State of the Art, In: Monomers, polymers and composites from renewable resources.** Elsevier, Amsterdam, 2008.



GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. 2ª ed., New York, W.H. Freeman and Company, 1995. 640 p. ISBN 0-71-67 2608-4.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. **The Sustainability of Ethanol Production from Sugarcane**. *Energy Pol* 2008, p86 e 97.

GONÇALVES, M. S. **Gestão de resíduos orgânicos**. Porto, Portugal: EDITORA PRINCIPIA 2005, 104 P.

GRAEFE, S.; DUFOUR, D.; GIRALDO, A.; MUÑOZ, L. A.; MORA, P.; SOLÍS, H.; GARCÉS, H.; GONZALEZ, A. **Energy and carbon footprints of ethanol production using banana and cooking banana discard: A case study from Costa Rica and Ecuador**. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 2640–2649, 2011.

GREENPEACE. **“A Caminho da Sustentabilidade Energética”**. São Paulo, 2008.

GREGG, D.; SADDLER, J. N. **Bioconversion of lignocellulosic residue to ethanol: process flowsheet development**. *Biomass Bioenergy*, 1995. 9: p287 e 302.

GUIDA, L.; SAIDI, Z.; HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. **Aluminum toxicity and binding to Escherichia coli**. *Archives of Microbiology*, v.156, n.9, p.507-512, 1991.

HAMMOND, J. B.; EGG, R.; DIGGINS, D.; COBLE, C. G. **Alcohol from bananas**. *Bioresour. Technol.* 56, 1996. p125–130.

HAUG, A.R.; VITORELLO, V. **Cellular aspects of aluminum toxicity in plants**. In: YAFUI, M.; STRONG, M.J.; OTA, K.; VERITY, M.A. *Mineral and metal neurotoxicology*. New York: CRC Press, 1997. cap.4, p.35-41.

HELDT, H. W.; HELDT, F. **Plant Biochemistry** (Third Edition). Academic Press, Burlington, 2005.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. **Domestication, genomics and the**

**future for banana.** Ann Bot-London 2007; 100: p73 e 84.

HOSSAIN, A. B. M. S.; AHMED, S. A.; AHMED, M. A.; FARIS, M. A. A.; ANNUAR, M. S. M.; HADEEL, M.; NORAH, H. **Bioethanol fuel production from rotten banana as an environmental waste management and sustainable energy.** Afr. J. Microbiol. Res. 5, 2011. p586–598.

HSU, T. A.; LADISCH, M.R.; TSAO, G.T. **Alcohol from cellulose.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology Chemical Technology, Oxford, v.10, n.5, p. 315–319, 1980.

INGALE, S.; JOSHI, S. J.; GUPTA, A. Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 45, n. 3, p. 885–92, 2014.

IPCC - INTERGOVERNMENTAL PANEL on CLIMATE CHANGE. **Fourth Assessment Report – Climate Change 2007.** Disponível em: [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_and\\_data\\_reports.htm#1](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_and_data_reports.htm#1). Acesso em: 05 de mar. 2016.

JANG, J.; CHO, Y.; JEONG, G.; KIM, S. **Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed Saccharina japonica.** Bioprocess Biosyst. Eng. 35 (1–2), 2012. p11–18.

JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. **Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol.** Bioresource Technology, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.

KAMM, B.; KAMM, M.; GRUBER, P. **Biorefineries – biobased industrial processes and products: status quo and future directions.** Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

KARAMUSHKA, V. I.; GADD, G. M. **Influence of copper on proton efflux from Saccharomyces cerevisiae and the protective effect of calcium and magnesium.** FEMS Microbiology Letters, 122, 1994. p33–38.

KIM, T. H.; LEE, Y. Y.; **Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process.** *Bioresour. Technol.* 96, 2005. p2007–2013.

KOCHIAN, L. V. **Cellular mechanisms of aluminum and resistance in plants.** *Annual Review Plant Physiology*, v.46, n.9, p.237-260, 1995.

KRAAN, S. **Mass cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production.** *Mitig. Adap. Strat. Global Change.* 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s11027-010-9275-5>.

KRISHNA, C.; CHANDRASEKARAN, M. **Banana waste as substrate for a-amylase production by Bacillus subtilis (CBTK 106) under solid-state fermentation.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 1996. p106–111.

KUMAKURA, M.; XIN, L. Z. **Effect of radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of rice straw with low concentrations of alkali solution.** *Bioresour Technol*, 1993. 43: 13e7.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v48, 2009. p3713.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F. ; SOUZA, C. S. ; MORAIS, M. R. **Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability.** *Applied Microbiology and Biotechnology.* Heidelberg. v.83, p. 627–637, 2009.

LEE, Y.H.; FAN, L. T. **Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II). Analysis of extended hydrolysis times.** *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1983. p939–966.

LINS, C.; SAAVEDRA, R. **Sustentabilidade corporativa no setor sucroalcooleiro brasileiro.** [s.l.]. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável. 2007.

LOHMEIER-VOGER, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. **Intracellular acidification as a**

**mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Amsterdam, v.20, p. 75-81, 1998.

LOPES, R. P. **Energia na Agricultura.** Notas de aula, UFFRJ – DEPARTAMENTO DE ENERGIA, 2007.

MACEDO, L. C. H. **Etanol etílico: da cachaça ao cereal.** São Paulo: Ícone, 1993.

MANN, M. K.; SPATH, P. L. **Life cycle assessment of a biomass gasification combined-cycle system.** In: Life cycle assessment. National Renewable Energy Laboratory; 1997. p. 160.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. **Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis biotechnol.** Prog 15, 1999. p804–816.

MARIS, A. A.; ABBOTT D.; BELLISSIMI, E.; BRINK, KUYPER, J. M.; LUTTIK, M.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; DIJKEN, J.; PRONK, J. [s.l.]: Antonie Van Leeuwenhoek, 2006. 391p.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JONSSON, L.J. **Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xyloseutilising Saccharomyces cerevisiae.** Enzyme and Microbial Technology, Guildford, v.31, 2002. p274–282.

MATSUSHITA, Y.; YAMAUCHI, K.; TAKABE, K.; AWANO, T.; YOSHINAGA, A.; KATO, M.; KOBAYASHI, T.; ASADA, T.; FURUJYO, A.; FUKUSHIMA, K. **Enzymatic saccharification of Eucalyptus bark using hydrothermal pretreatment with carbon dioxide.** Bioresource Technology, New York, v.101, 2010. p4936-4939.

MCALOON, A.; TAYLOR, F.; YEE, W.; IBSEN, K.; WOOLEY, R. **Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks.** Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2000.

MEECHAONA, R.; SENGPRACHA, W.; BANDITPURITAT, J.; KAWAREE, R.; PHUTDHAWONG, W. **Fatty acid content and antioxidant activity of Thai bananas**, *Maejo International Journal of Science and Technology*. v. 1, 2007. p222 – 228.

MEINITA, M.D.N.; HONG, Y.; JEONG, G.; **Comparison of sulfuric acid and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii)**. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35 (1–2), 2011. p123–128.

MIRANDA, E. E. **A invenção do Brasil**. National Geographic Brasil, v. 86, 2007.

MITSUTANI, C. **A logística do etanol da cana-de-açúcar no Brasil: condicionantes e perspectivas**. 2010, 103 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MOUSDALE, D. M. **Biofuels : biotechnology, chemistry, and sustainable development**. CRC Press, Boca Raton, Fl., 2008.

MOSIER, N., WYMAN, C. E., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M. T., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.96, n.6, p. 673–686, 2005.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. **Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review**. *Bioresource Technology*, New York, v. 93, 2004. p. 1-10,

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K. **Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review**. *Renew Sustain Energy Rev* 14, 2010. p578-597.

NIGAM, P.; SINGH, D. **Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute**. *Process Biochemistry*, New York, v. 30, 1995. p117-124.

NOVOZYMES, **Novozymes Cellic® CTec2 and HTec2** - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. Disponível em: <[www.bioenergy.novozymes.com](http://www.bioenergy.novozymes.com)>. Acesso em 13 de outubro de 2016.

- OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; SAIDA, L.; BANSAL, S.D.; HUGHES, J.D. **Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process.** Waste Manage. (Oxford) 31 (7), 2011. p1576–1584.
- OLIVEIRA, R. P. S.; TORRES, B. R.; ZILLI, M.; MARQUES, D. A. V.; BASSO, L. C.; CONVERTI, A. **Use of Sugar Cane Vinasse to Mitigate Aluminum Toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 57, 2009. p488–494.
- OLIVER, J. D.; MARKHAM, J.; PEIRIS, P. P. **Investigating and applying free solution capillary electrophoresis with direct UV detection to bioethanol research** By. n. July, 2014.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E. **Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments.** Phil. Trans. R. Soc. Lond., v. 321, 1987. p523-536,
- PEREIRA, D. G. S. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.
- PEREIRA JR, N. **Biotecnologia de Hemicelulose.** Anais. Enzitec - IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro. v. 1, 1999. p. 1-5.
- PETROU, C. E.; PAPPIS, P.C.; **Biofuels: a survey on pros and cons.** Energy Fuel 23, 2009. p1055–1066.
- RAMOS, L. P. **The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.** Química Nova, São Paulo, v. 26, 2003. p863-871.
- RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic biotechnology.** Cambridge University Press, Cambridge, UK ; New York, 2006.

REDDY, C. V. K.; SREERAMULU, D.; RAGHUNATH, M. **Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India.** Food Research International, v. 43, 2010. p285 – 288.

REIS, J. P. Z. **Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação.** 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2006.

RESHAMWALA, S.; SHAWKY, B. T.; DALE, B. E. **Ethanol production from enzymatic hydrolysis of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass.** Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifton, v.51/52, 1995. p43–55.

ROBINSON, T.; CHANDRAN, B.; NIGAM, P. **Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes.** Enzyme Microb. Technol. 29, 2001. p575–579.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA, S. J. B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P. V. **The Influence of pH, Temperature and Hydrolysate Concentration on the Removal of Volatile and Non-Volatile Compounds from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolyzate Treated With Activated Charcoal Before or After Vacuum Evaporation.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, São Paulo, v. 18, n. 3, 2001. p299-311.

SANTOS, A. F.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTI, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. **Potencial da palha de cana-de açúcar para produção de etanol.** Química Nova. n.5, pág 1004-1012. 2012.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. **Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.11, n.11, 2009. p27-33.

SANTOS, S. M. A. **Perspectivas para a Contribuição do Uso do Etanol no Transporte Público Urbano, Visando à Redução da Poluição Atmosférica - Estudo de Caso: Projeto Best.** Tese (Doutorado) - Universidade de Sao Paulo, São Paulo, 2012.

SCHREIER, B.; HOCKER, B. **Engineering the enolase magnesium II binding site: implications for its evolution.** *Biochemistry*, v49, 2010. p7582–7589.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONCALVES, A. R. **A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, n. 2, 2001.

SHAH, M. P.; REDDY, G. V.; BANERJEE, R.; RAVINDRA, P.; KOTHARI, I.L. **Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi (Phylosticta spp. MPS-001 and Aspergillus spp. MPS- 002).** *Process Biochem.* 40, 2005. p445–451.

SHAPOURI, H.; DUFFIELD, J.; MCALOON, A.; WANG, M. **The 2001 Net Energy Balance of Corn-Ethanol.** U.S. Dept. of Agriculture, Washington, DC, 2004.

SHARMA, N.; KALRA, K. L.; OBEROI, H. S.; BANSAL, S. **Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from Kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation.** *Indian J. Microbiol.* 47, 2007. p310–316.

SILVA, C. J.; ROBERTO, I. C. **Improvement of xylitol production by Candida guilliermondii FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate.** *Applied Microbiology*, Oxford, v.32, n.4, 2001. p248-52.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2012. 235 p.

SIVERIO, J. M. **Assimilation of nitrate by yeasts.** *FEMS Microbiology Review*, 26, 2002. p277–284.

SMITH, A.M.; DOLAN, C. G.; HARBERD, N.; JONES, J.; MARTIN, C.; SABLONSKI, R.; AMEY, A. [s.l.] **Plant Biology.** Garland Science, 2010.

SOUZA, M. C. M. R.; MONTEIRO, R. N. F.; SANTOS, F. R. M.; CAMELO, F. M. B.;



SALES, M. L. M. NUNES, P. J. F. **Avaliação dos teores de alumínio encontrados em análises de solo do município de Ibiapina – ce evaluation of the tenors of aluminum found in analyses of soil of town of Ibiapina – ce.** Anais. Enzitec - IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro. v. 1, 1999. p. 1-5. 2007.

SOUZA, O.; FEDERIZZI, M.; COELHO, B.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E. **Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogas.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 2010. p438–443.

SOUZA, R. B.; MENEZES, J. A. S.; SOUZA, R. F. R.; DUTRA, E. D.; MORAIS JR, M. A. **Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 175, n. 1, p. 209–222, 2014.

STEHLIK-THOMAS, V.; ZETIC, V. G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. **Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Food Technology and Biotechnology, 42, 2004. p115–120.

SULAIMAN, S. F.; YUOFF, N. A. M.; ELDEEN, I. M.; SEOW, E. M.; SAJAK, A. A.; SUPRIATNO; K. L. O. **Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa sp*).** Journal of Food Composition and Analysis, v. 24, 2011. p1 – 10.

SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.** Bioresour. Technol., v83 (2002). p1-11.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol.** BioResources, 01, Vol.2(4), 2007. p.707-738.

TILLMAN, L.; ABASEED, A.; LEE, Y.; TORGET, R. **Effect of transient variation of temperature on acid-hydrolysis of aspen hemicellulose.** Appl. Biochem. Biotechnol., 20-21, 1989. p107-117.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística.** 7º ed. LTC, Rio de Janeiro, 1999.

TUN, N.M.; O'DOHERTY, P. J.; PERRONE, G. G.; BAILEY, T.D.; KERSAITIS, C.; WU, M. **J. Disulfide stress-induced aluminium toxicity: molecular insights through genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*** *Metallomics*, v5, 2013. p1068–1075.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética.** São Paulo: UNICA, 2010. (Projeto AGORA)

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant.** Ithaca: Cornell University, 476p. 1994.

VELÁSQUEZ-ARREDONDO, H. I.; RUIZ-COLORADO, A. A.; OLIVEIRA JUNIOR, S. **Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis.** *Energy*, v. 35, n. 7, p. 3081–3087, 2010.

VELOSO, M. E. C.; VASCONCELOS, L. F. L.; SOUZA, V. A. B.; JÚNIOR, A. S. A.; RIBEIRO, V. Q. **Níveis de Irrigação na Cultura da Banana no Município de Teresina.** [s.l.; s.n.], 2012. 4p.

VERGNAHNINI, R; USHIMA, A. H. **Formação de Poluentes em Processos Industriais de Combustão (mimeografado).** Curso de “Uso de Energia na Indústria: Racionalização e Otimização”. IPT - Instituto de Pesquisa Tecnológica. São Paulo, 1996.

WALTER, A. **Bio-Ethanol development in Brazil.** Department of Energy NIPE and, State University of Campinas (Unicamp), Brazil. 2009.

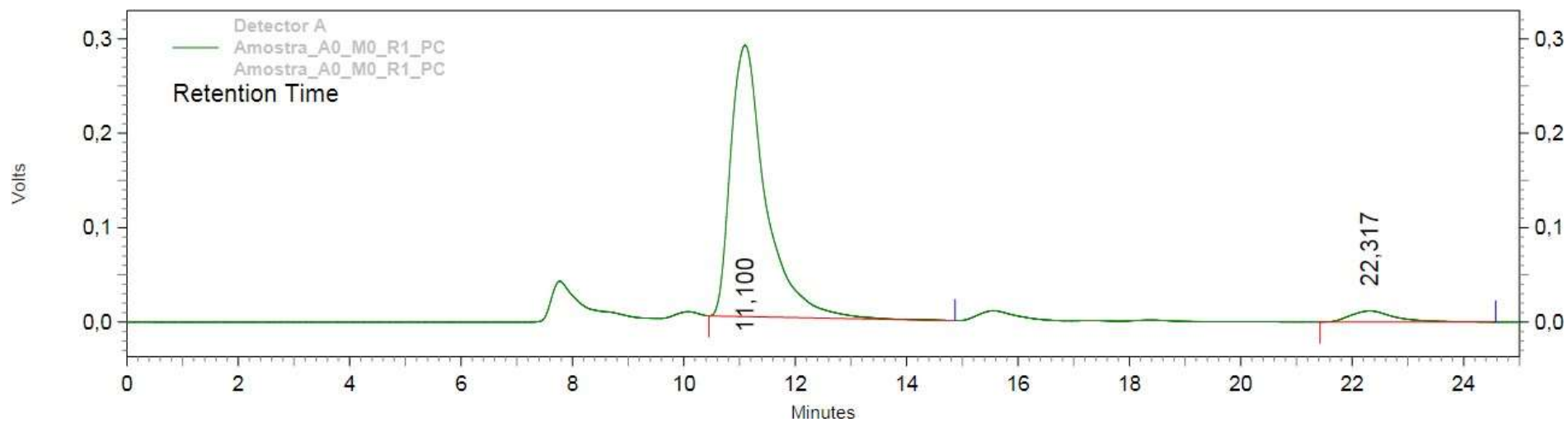
WANG, M.; SARICKS, C.; SANTINI, D. **Effects of fuel ethanol use on fuel-cycle energy and greenhouse gas emissions.** Argonne: Argonne National Laboratory, Center for Transportation Research; 1999.

YANASE, H.; YAMAMOTO, K.; SATO, D.; OKAMOTO, K. **Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus*-glucosidase gene.** *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.118, 2005. p35–43.

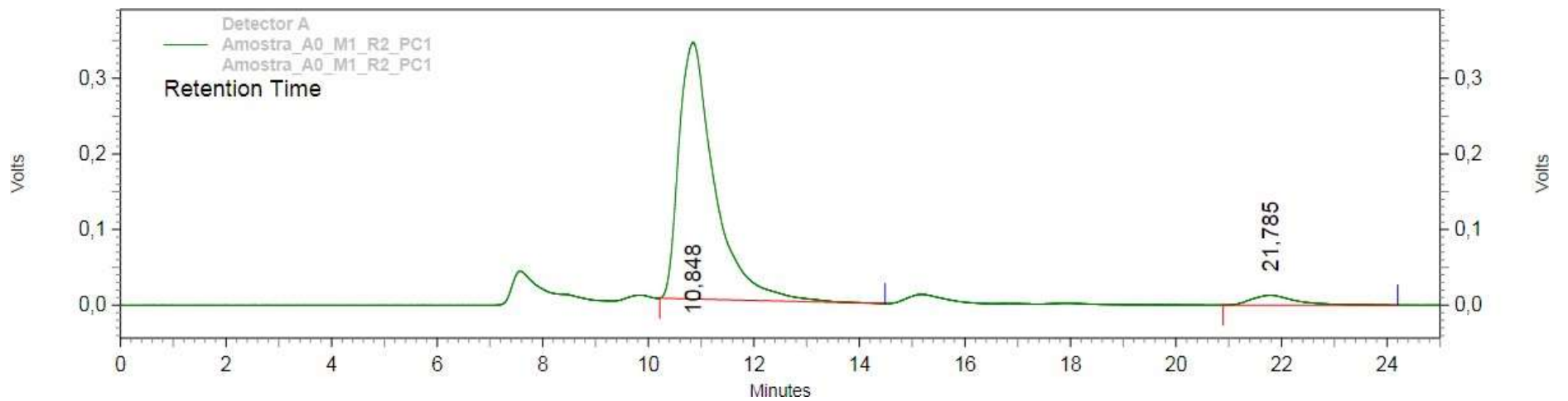
ZEL, J.; SVETEK, J.; CRNE, H. **Effects of aluminum on membrane fluidity of the**

**mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*.** *Physiology Plantarum*, v.89, n.3, 1993. p172-176.

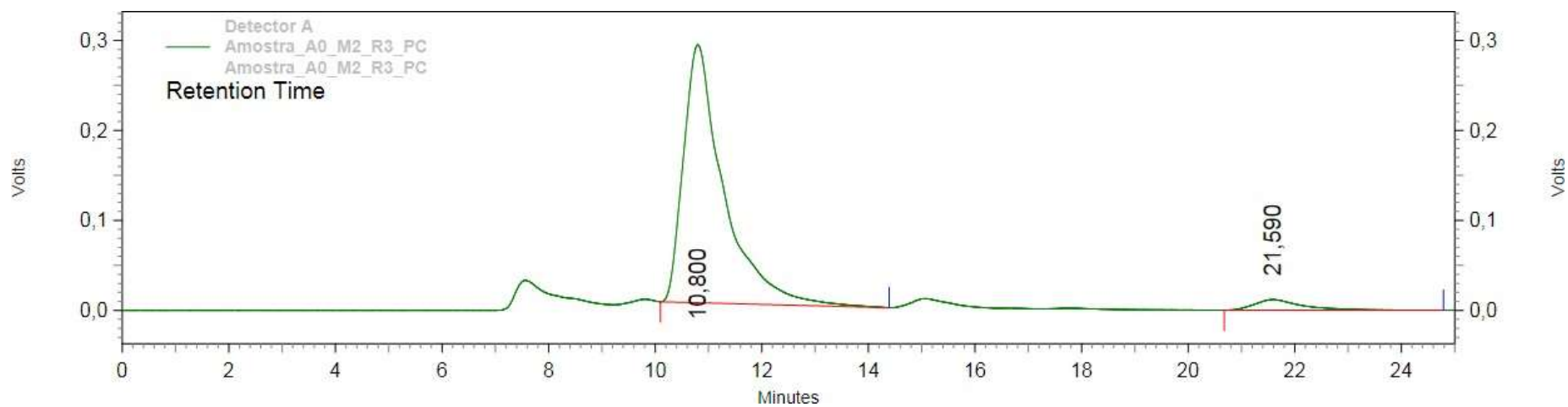
## **ANEXOS**



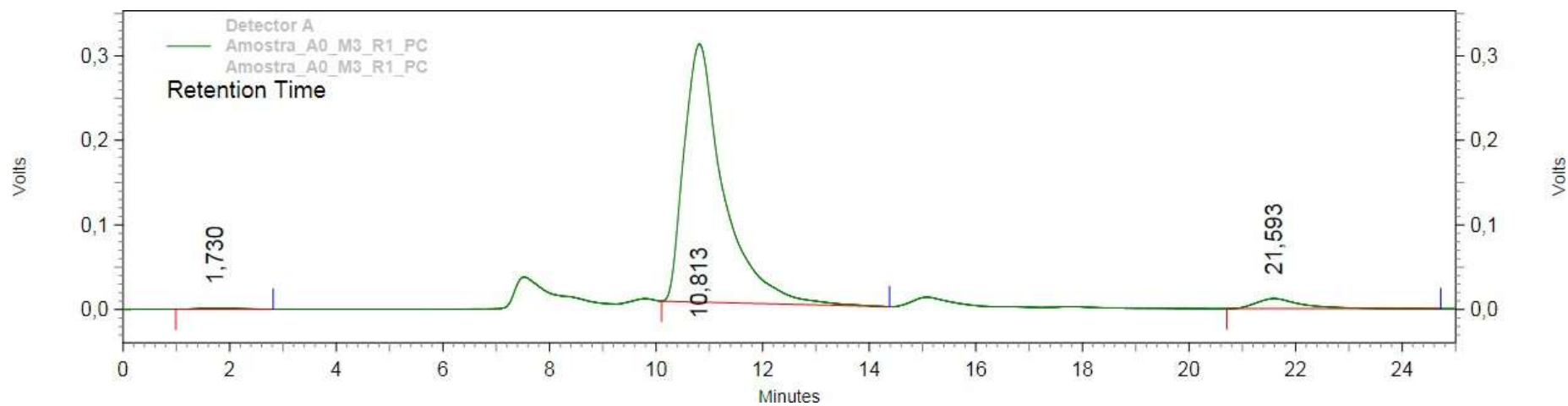
**ANEXO A.** Cromatograma da amostra A0M0R1 PC fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 12 min: glicose; 20,7 a 24,3 min: etanol.



**ANEXO B.** Cromatograma da amostra A0M1R2 MF fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 15 min: glicose; 20,5 a 24,1 min: etanol.

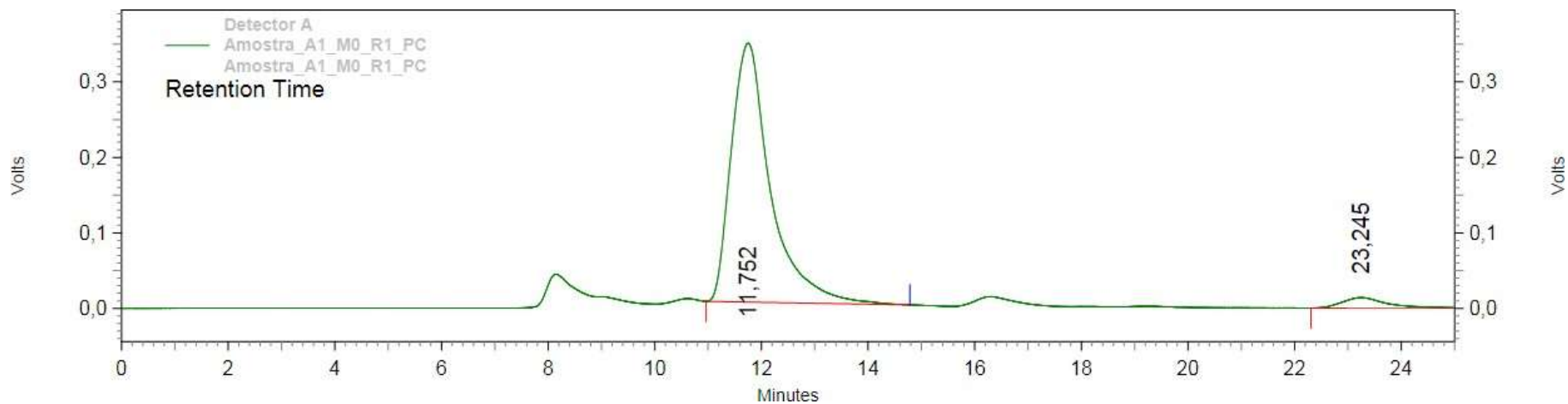


**ANEXO C.** Cromatograma da amostra A0M2R3 PC fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 14,2 min: glicose; 20,3 a 24,4 min: etanol.

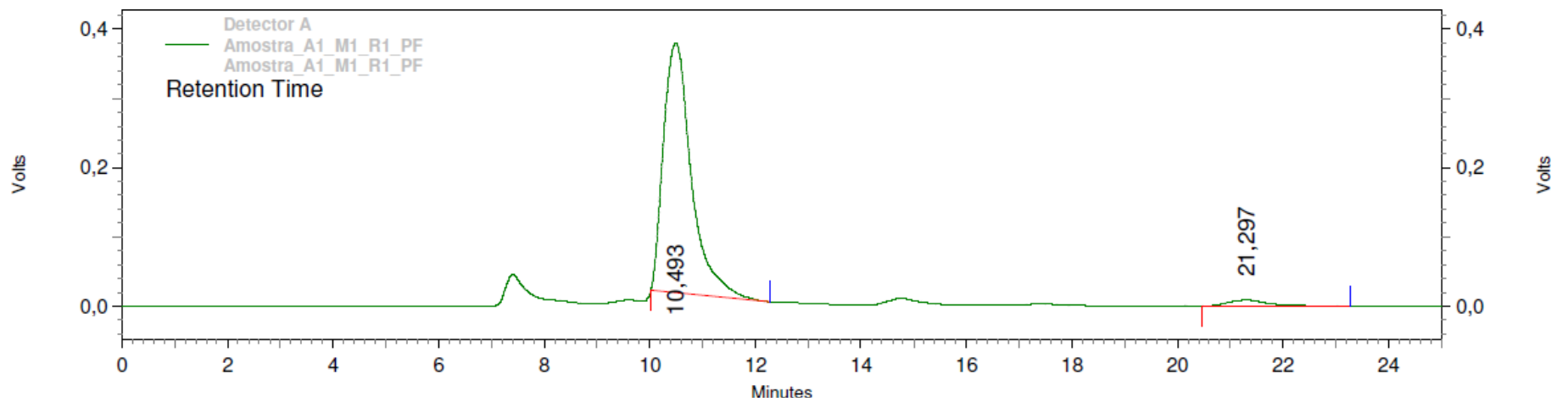


**ANEXO D.** Cromatograma da amostra A0M3R1 MF fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 14 min: glicose; 20 a 24,2: etanol.

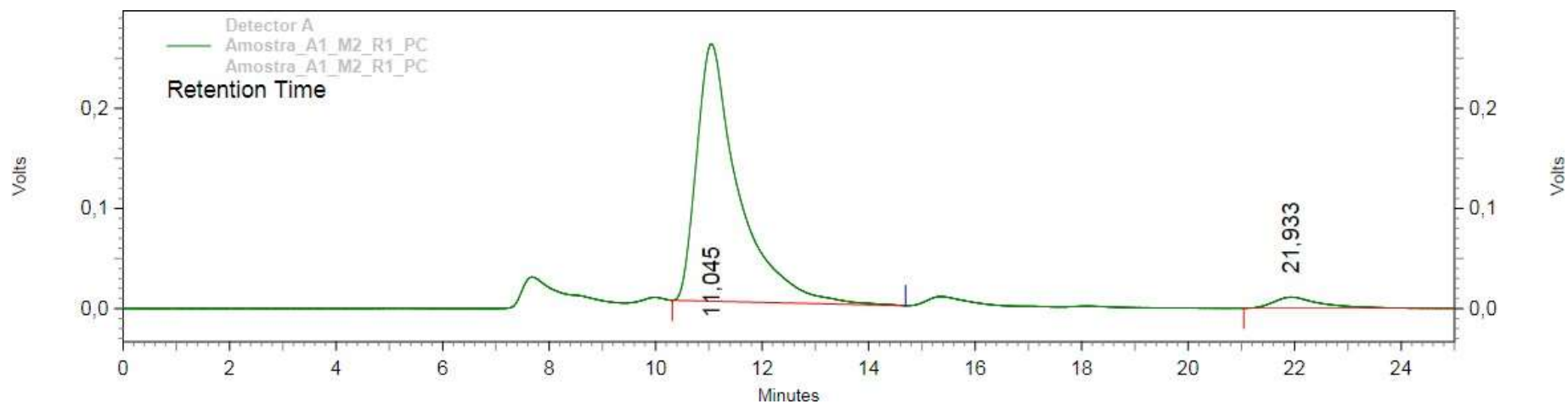




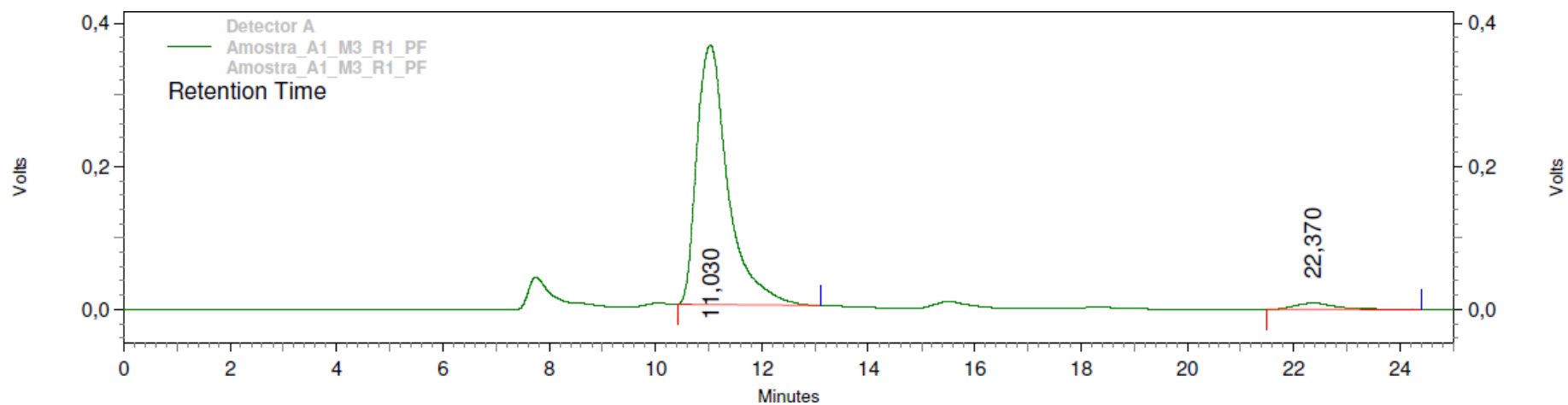
**ANEXO E.** Cromatograma da amostra A1M0R1 PC fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 11 a 15 min: glicose; 22 a 25: etanol.



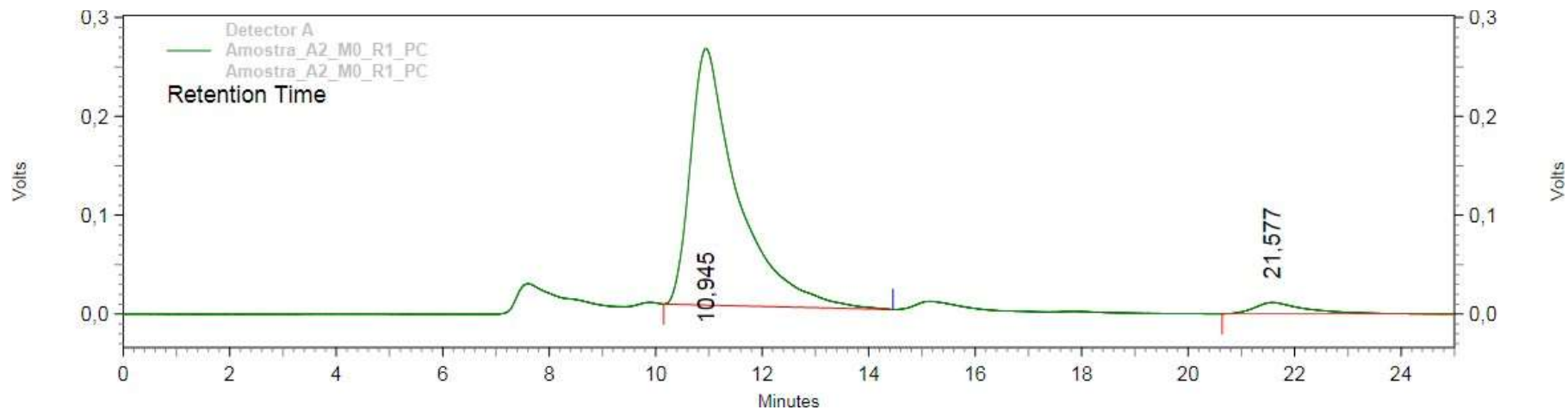
**ANEXO F.** Cromatograma da amostra A1M1R1 MF fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 12 min: glicose; 20 a 23: etanol.



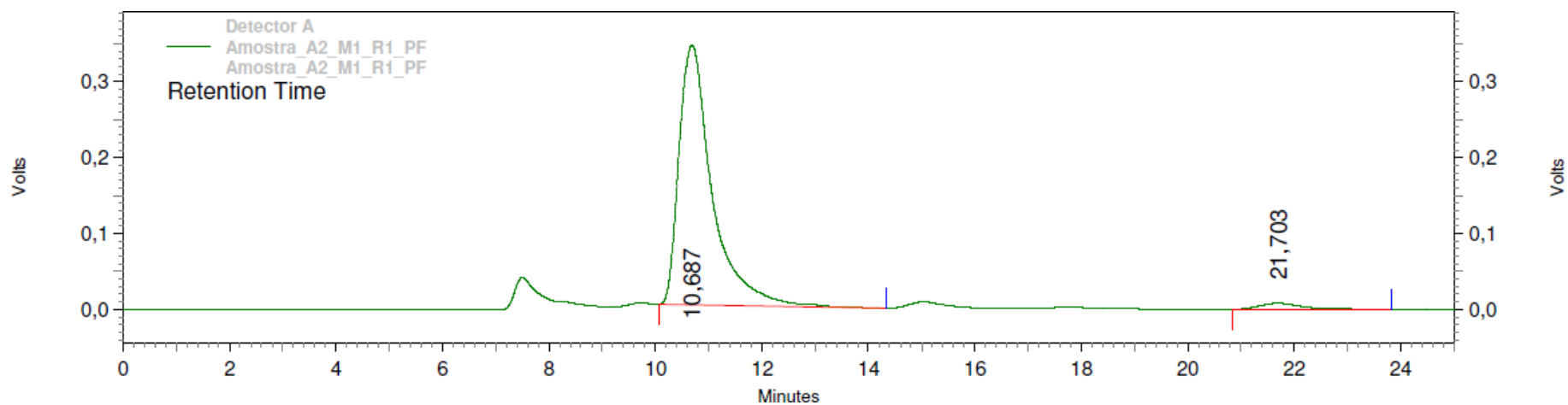
**ANEXO G.** Cromatograma da amostra A1M2R1 PC fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 14 min: glicose; 21 a 24: etanol.



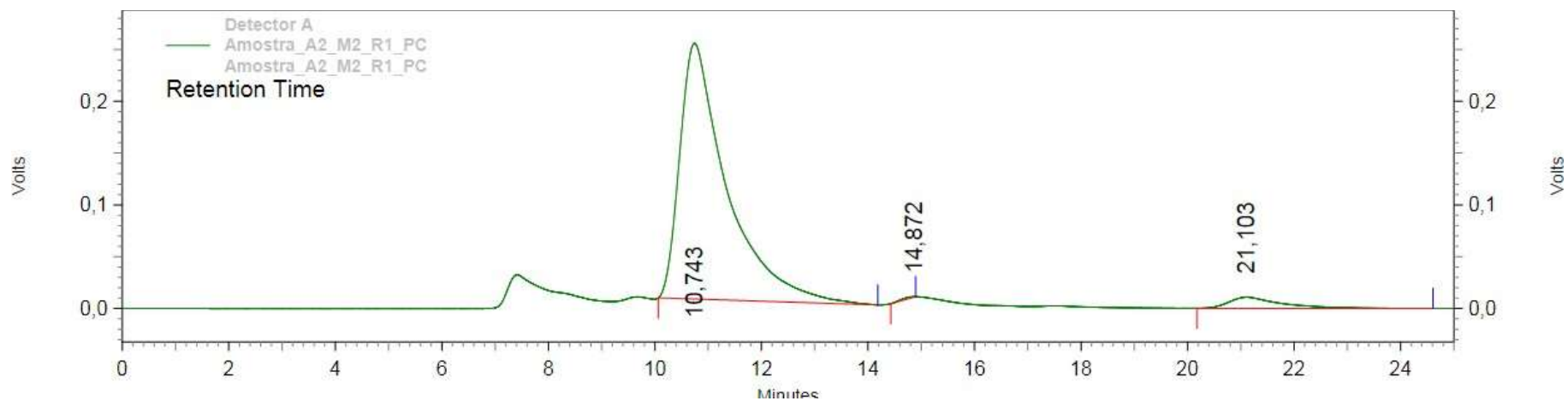
**ANEXO H.** Cromatograma da amostra A1M3R1 MF fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com corrida de tempo total de 15 minutos. Pico 10 a 13 min: glicose; 21 a 24: etanol.



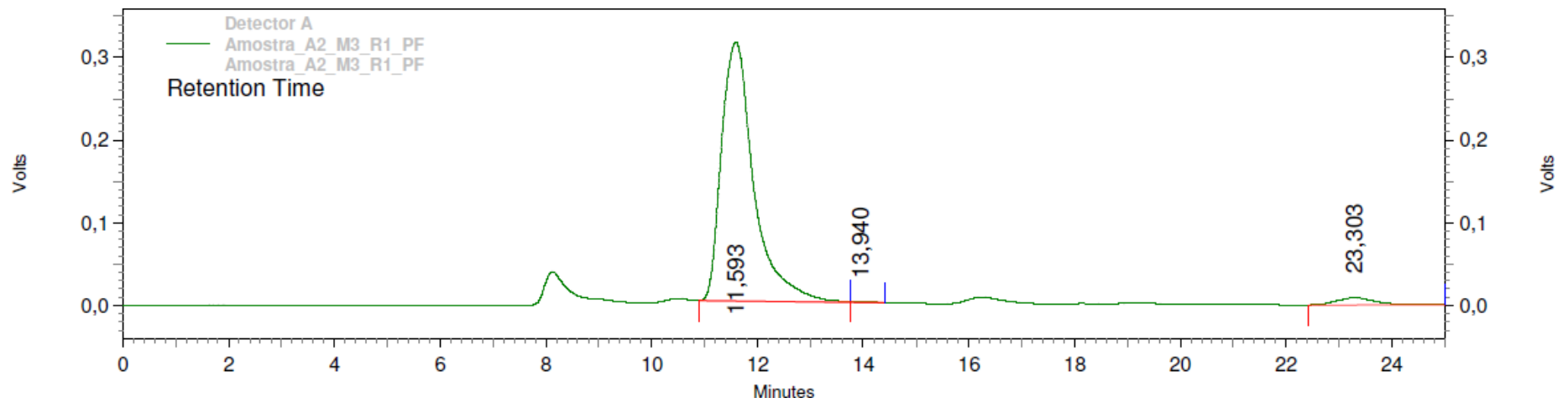
**ANEXO I.** Cromatograma da amostra A2M0R1 PC fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com tempo total de corrida de 25 minutos. Pico 10 a 14 min: glicose; 20 a 24: etanol.



**ANEXO J.** Cromatograma da amostra A2M1R1 MF fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com tempo total de corrida de 25 minutos. Pico 10 a 14 min: glicose; 20 a 24: etanol.



**ANEXO K.** Cromatograma da amostra A2M2R1 PC fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com tempo total de corrida de 25 minutos. Pico 10 a 14 min: glicose; 20 a 24: etanol.



**ANEXO L.** Cromatograma da amostra A2M3R1 MF fermentada, obtido por CLAE desgaseificador DGU-14A, integrador CLASS LC-10, com eluição isocrática, fase móvel composta de 5mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, fluxo do eluente de 0,6 mL/min, a 30 °C com tempo total de corrida de 25 minutos. Pico 10 a 14 min: glicose; 22 a 24: etanol



