



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

ROSINETE NOGUEIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE DO PSEUDOCAULE DA
BANANEIRA UTILIZANDO *Penicillium oxalicum***

PALMAS - TO

2021

ROSINETE NOGUEIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE DO PSEUDOCAULE DA
BANANEIRA UTILIZANDO *Penicillium oxalicum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda
Coorientadora: Profa. Dra. Fabrícia Vieira Silva Bomtempo

PALMAS - TO

2021

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

S725a Sousa, Rosinete Nogueira de.

Avaliação do rendimento de hidrólise do pseudocaule da bananeira utilizando *Penicillium oxalicum*. / Rosinete Nogueira de Sousa. – Palmas, TO, 2021.

68 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2021.

Orientador: Emerson Adriano Guarda

Coorientadora : Fabrícia Vieira Silva Bomtempo

1. Pseudocaule da bananeira. 2. Extrato enzimático bruto. 3. Hidrólise. 4. Etanol. 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).

ROSINETE NOGUEIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE HIDRÓLISE DO PSEUDOCAULE DA
BANANEIRA UTILIZANDO *Penicillium oxalicum***

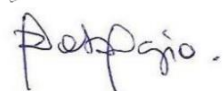
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins, avaliada para a obtenção do título de Mestre em Agroenergia e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 20/12/2021

Banca Examinadora



Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (Presidente)



Profa. Dra. Solange Aparecida Ságio (Examinadora interna)



Prof. Dr. Danylo Bezerra Mendes (Examinador externo)

DEDICATÓRIA

IN MEMORIAN à minha avó Maria Lima Nogueira, que está presente em minhas doces lembranças e que agora repousa ao lado do Nosso Supremo Criador.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande protetor, pela oportunidade de chegar até aqui, mantendo-me sempre firme no alcance dos meus objetivos.

À Universidade Federal do Tocantins (UFT) e ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia – PPGA pela oportunidade de realizar este curso.

A todo o corpo docente do PPGA pelos ensinamentos e dedicação.

Aos amigos do mestrado pelas horas de estudo, convivência e amizade.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda pelo apoio, incentivo e orientações.

À Profa. Dra. Fabrícia Bomtempo, por todo o auxílio durante o planejamento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Danylo Mendes e à Profa. Dra. Solange Sággio por aceitarem participar da banca e pelas valiosas sugestões.

Ao Projeto de Irrigação Manuel Alves pelo fornecimento da biomassa estudada.

À Coleção de Culturas Carlos Rosa, do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da UFT, pelo fornecimento da Cepa fúngica.

Aos amigos Filipe Alves, Illy Janes e Larissa Galberto pelas contribuições e por sempre estarem dispostos a ajudar.

À equipe do Laboratório LAPEQ, pelas colaborações para o desenvolvimento deste estudo, pelas tardes de café, pelas risadas e companheirismo.

Às equipes dos laboratórios LASPER, LMA, LASSOLO, LABIC, LANA pela parceria e assistência no desenvolvimento dos ensaios.

Ao meu namorado, Antônio Wanderley de Oliveira, por me acompanhar e me incentivar em todos os momentos.

À minha família, minha base, por estar sempre ao meu lado, torcendo e acreditando em mim.

Aos amigos Mateus Brito, Thays Fernandes e Micaele Souza, pela amizade, cuidado e carinho que sempre tiveram comigo

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O etanol é o biocombustível mais utilizado do Brasil. O país, sendo um dos maiores produtores agrícolas do mundo, destaca-se na produção de banana, a qual gera grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos, que podem ser aproveitados na produção de etanol. É de grande interesse a utilização deste tipo matéria-prima na produção do biocombustível, dando assim destinação aos resíduos e barateando os custos de produção do etanol. Em relação a esses custos, um grande limitante são as enzimas utilizadas na hidrólise, que possuem preços elevados e atualmente são produzidas comercialmente apenas no exterior. A busca por produção de enzimas celulósicas pode reduzir os custos de produção, assim como diminuir a dependência do fornecimento internacional. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar, em diferentes condições a hidrólise do pseudocaule da bananeira, utilizando enzimas da espécie *Penicillium oxalicum*. Primeiramente foi realizado um pré-tratamento hidrotérmico a 121°C/30 min. Depois a caracterização da biomassa *in natura* e pré-tratada. Realizou-se a produção de extrato enzimático bruto utilizando como substrato o pseudocaule da bananeira *in natura* e pré-tratado. Foram determinadas as atividades enzimáticas (CMCase, Avicelase e FPase) dos extratos enzimáticos, obtendo resultados maiores ao extrato produzido em biomassa *in natura*. Foi realizada a hidrólise do pseudocaule da bananeira, utilizando o extrato enzimático bruto produzido em biomassa pré-tratada. A partir de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), verificou-se a melhor condição de hidrólise. Obteve-se como melhor rendimento de hidrólise o ensaio 9, com 26,36%, nas seguintes condições: 20 mg de biomassa e 2 ml de enzima e pH 5. Nessas mesmas condições, foi realizada outra hidrólise, utilizando o extrato enzimático produzido de biomassa *in natura*, tendo como resultado 42% de rendimento de hidrólise.

Palavras-chaves: pseudocaule da bananeira, extrato enzimático bruto, hidrólise, etanol.

ABSTRACT

Ethanol is the most used biofuel in Brazil. As one of the largest agricultural producers in the world, the country stands out in the production of bananas, which generate large amounts of lignocellulosic residues, which can be used in the production of ethanol. The use of this type of raw material in the production of biofuel is of great interest, thus disposing of waste and lowering ethanol production costs. In relation to these costs, a major limiting factor are the enzymes used in hydrolysis, which have high prices and are currently produced commercially only abroad. The search for the production of cellulosic enzymes can reduce production costs, as well as reduce dependence on international supply. In this context, the objective of this work was to carry out, under different conditions, the hydrolysis of the banana pseudostem, using enzymes of the species *Penicillium oxalicum*. First, a hydrothermal pretreatment at 121°C/30 min was carried out. Afterwards, the characterization of the *in natura* and pre-treated biomass. The production of crude enzymatic extract was carried out using the pseudostem of the banana *in natura* and pre-treated as substrate. The enzymatic activities (CMCase, Avicellase and FPase) of the enzymatic extracts were determined, obtaining greater results for the extract produced in *in natura* biomass. The hydrolysis of the banana pseudostem was carried out, using the crude enzymatic extract produced in pre-treated biomass. From a Central Rotational Composite Design (CRCD), the best hydrolysis condition was verified. The best hydrolysis yield was obtained in test 9, with 26.36%. Under these same conditions, another hydrolysis was performed, using the extract enzymatic produced from *in natura* biomass, resulting in a 42% hydrolysis yield.

Keywords: banana pseudostem, crude enzyme extract, hydrolysis, ethanol.

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Composição de alguns materiais lignocelulósicos.	18
Tabela 2 - Composição percentual em base seca de celulose, hemicelulose e lignina dos resíduos da bananicultura.....	25
Tabela 3 - Rendimento de etanol do pseudocaule seco da bananeira (cultivar prata anã) não tratada e após pré-tratamento hidrotérmico e hidróxido de sódio.	26
Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR.	44
Tabela 5 - Composição química do pseudocaule in natura e após pré-tratamento hidrotérmico	46
Tabela 6 - Comparação das atividades de celulase produzida por cepas de fungos celulolíticos	49
Tabela 7 - ANOVA da liberação de glicose (g/L) nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	50
Tabela 8 - Planejamento Experimental utilizando três variáveis (biomassa, enzima e pH) para Concentração e Rendimento de glicose na etapa de hidrólise enzimática.	52
Tabela 9 - Coeficientes de Regressão do rendimento em 24 h.....	52
Tabela 10 - ANOVA do Rendimento de Hidrólise em 24h.	54

LISTA DE EQUAÇÃO

Equação (1).....	34
Equação (2).....	34
Equação (3).....	35
Equação (4).....	35
Equação (5).....	36
Equação (6).....	36
Equação (7).....	37
Equação (8).....	37
Equação (9).....	38
Equação (10).....	42
Equação (11).....	43
Equação (12).....	43
Equação (13).....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da molécula de celulose.	19
Figura 2 - Região amorfa e cristalina da celulose.	19
Figura 3 - Estrutura da hemicelulose.	20
Figura 4 - Estrutura da lignina.	20
Figura 5 - Partes da Bananeira.	23
Figura 6- Etapas do processo de obtenção de etanol de segunda geração.	27
Figura 7- Pré-tratamento esquemático de material lignocelulósico.	27
Figura 8 - Secagem das bainhas foleares em estufa.	33
Figura 9 - Fungo em PDA após sete dias.	39
Figura 10 - Fluxograma do Processo de FES.	40
Figura 11- EEB 1 (à esquerda) e EEB 2 (à direita).	40
Figura 12- Hidrólise do pseudocaule da bananeira in natura utilizando o EBB 1.	44
Figura 13 - Hidrólise do pseudocaule da bananeira in natura utilizando o EBB 2.	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	Biocombustíveis	16
3.3.1	Etanol	16
3.1.1.1	Etanol de segunda geração (E2G)	17
3.2	Resíduos Lignocelulósicos	18
3.2.1	Celulose	18
3.2.2	Hemicelulose	19
3.2.3	Lignina	20
3.3	Banana	21
3.3.1	Produção de banana no Tocantins	22
3.4	Bananeira	23
3.5	Resíduos da bananicultura	24
3.6	Uso do pseudocaule da bananeira para a produção de E2G	25
3.7	Etapas da produção de etanol de segunda geração	26
3.7.1	Pré-tratamento	27
3.7.1.1	Pré-tratamento Hidrotérmico	28
3.7.2	Hidrólise	29
3.7.2.1	Hidrólise enzimática	29
3.7.2.1.1	Penicillium	30
3.7.3	Fermentação e Destilação	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Matéria-Prima	33
4.2	Caracterização química do pseudocaule da bananeira	33
4.2.1	Umidade	34
4.2.2	Cinzas	34
4.2.3	Extrativos	35
4.2.4	Lignina Total	35
4.2.5	Determinação do teor de holocelulose	36
4.2.6	Celulose	37
4.2.7	Hemicelulose	38
4.3	Pré-tratamento	38

4.4	Espectrofotometria no Infravermelho.....	38
4.5	Microrganismo e condições de cultura.....	38
4.6	Produção de enzimas	39
4.7	Atividades enzimáticas.....	41
4.8	Hidrólise enzimática do pseudocaule da bananeira.....	43
4.8.1	Hidrólise da biomassa <i>in natura</i> com EEB1	43
4.8.1.1	Análise estatística	44
4.8.1	Hidrólise da biomassa <i>in natura</i> com EEB2	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Caracterização química do pseudocaule da bananeira.....	46
5.2	Espectroscopia no Infravermelho	47
5.3	Atividades enzimáticas das celulasas	48
5.4	Hidrólise enzimática	50
5.4.1	Hidrólise da biomassa <i>in natura</i> com EEB1	50
5.4.2	Hidrólise da biomassa <i>in natura</i> com EEB2	55
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
	ANEXO I.....	67
	ANEXO II.....	68

1 INTRODUÇÃO

As preocupações com o meio ambiente vêm aumentando a cada dia, principalmente, no que se refere às mudanças climáticas, fenômeno ocasionado pelo aumento da temperatura da Terra, que, por sua vez, vem ocorrendo pelas altas concentrações de gases de efeito estufa (GEE's) na atmosfera (LI et al., 2020).

Entre os GEE's, o dióxido de carbono (CO₂) é o mais comum, por ser emitido em maior quantidade. Grande parte de sua emissão decorre da queima de combustíveis fósseis e, por essa razão, existem várias iniciativas para reduzir o uso desses combustíveis e substituí-los por fontes de energias renováveis (LENFERNA, 2018; LEONARD, MICHAELIDES e MICHAELIDES, 2020). Uma dessas iniciativas é impulsionar o uso de biocombustíveis líquidos, como o etanol.

O etanol é o biocombustível líquido mais utilizado no Brasil (EPE, 2019). Existem quatro classificações desse biocombustível, entretanto os mais produzidos e citados na literatura são: o etanol de primeira geração (E1G), produzido por fontes sacarídeas ou amiláceas e etanol de segunda geração (E2G), produzido pelas fontes lignocelulósicas.

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, sendo o terceiro maior produtor de frutas, atrás apenas da China e Índia (ANDRADE, 2017, ABRAFRUTAS, 2019). A banana é a segunda fruta mais produzida no país. De acordo com dados do IBGE (2021), a safra de 2020 dessa fruta foi de 6.718.160 toneladas.

Com a grande produção da banana, a qual contribui para a economia do país, há também uma grande geração de resíduos lignocelulósicos. Para cada tonelada de banana colhida, são geradas três (SOUZA et al., 2012) a quatro toneladas de resíduos, os quais 75% consistem do pseudocaule da bananeira (LINZMEYER et al., 2019). Esses resíduos geralmente são deixados no solo do plantio, fornecendo-lhe nutrientes. Entretanto, segundo Luna e Oliveira Júnior (2018), apenas uma pequena parte já seria suficiente para ser aproveitada neste processo. De acordo com Uchôa et al (2021), vêm sendo realizadas buscas de aproveitamento desse resíduo, evitando assim o desperdício e redução de impactos ambientais.

A biomassa lignocelulósica vem despertando interesse, para a produção de etanol, pelo fato de ser um meio de destinação dos resíduos, contribuir com a redução dos custos de produção da fonte geradora (BHUSHAN et al., 2019) e ser um recurso renovável, servindo como uma alternativa ao petróleo, que possui disponibilidade limitada e causa impactos negativos ao meio ambiente (HERNÁNDEZ, VÉLIZ-LORENZO e MARTÍNEZ, 2019).

A utilização de biomassa lignocelulósica para esse tipo de aproveitamento enfrenta

algumas barreiras. A primeira delas é a necessidade do uso de um pré-tratamento para romper a recalcitrância da biomassa, ocasionada pelas propriedades estruturais de seus compostos e tornar o material acessível à conversão em açúcar (GUERRERO, BALLESTEROS e BALLESTEROS, 2017; BAKSI et al., 2019; RABELO, PRADELLA e IENCZAK, 2019). A segunda é a etapa subsequente, a hidrólise, em que ocorre a conversão da celulose em açúcares fermentáveis.

Um dos meios de realização da hidrólise é fazendo o uso de enzimas, as quais, porém possuem custos elevados (FLORENCIO, BADINO e FARINAS, 2017; DOS SANTOS et al., 2019). Além disso, para muitos resíduos lignocelulósicos, como, por exemplo, os resíduos de banana, ainda não há informações precisas sobre as condições ideais da conversão enzimática (GUERRERO, BALLESTEROS e BALLESTEROS, 2018).

Muitos estudos, relacionados ao melhoramento do processo produtivo de E2G vêm sendo desenvolvidos, em vários países, inclusive no Brasil, que, por ser um grande produtor agrícola, tem um bom potencial para a geração desse biocombustível. Entretanto, de acordo com Lorenzi e Andrade (2019), no que diz respeito ao desenvolvimento de enzimas, é baixo o investimento por parte das empresas brasileiras, ocasionando assim dependência de fornecedores internacionais, tais como as empresas: Beta Renewables e Novozymes.

A criação de novas enzimas poderá contribuir tanto para minimizar a dependência do mercado internacional, como diminuir custos e melhorar o processo de degradação da biomassa. Para isso, um passo crucial é a seleção de um bom produtor enzimático. Atualmente, os fungos filamentosos são os microrganismos mais explorados para tal finalidade, em especial, o gênero *Trichoderma* (BISCHOF, RAMONI e SEIBOTH, 2016). Existem também vários outros gêneros em estudo, os quais apresentam potenciais de produção de enzimas lignocelulósicas, como é o caso do *Penicillium* (BOMTEMPO et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2018).

Bomtempo, et al. (2017), em seu estudo sobre produção de celulasas de *Penicillium oxalicum* em substratos agroindustriais utilizaram a Cepa fungica *Penicillium oxalicum* F-3380, obtida de uma colônia de formigas cortadeiras, a *Acromyrmex Balzani* (Hymenoptera: Formidae). Os resultados do estudo foram considerados satisfatórios. A Cepa foi escolhida por apresentar, entre isolados de *Acromyrmex Balzani*, previamente testadas, a maior produtividade.

Diante da alta produção de resíduos agrícolas da bananicultura e a busca por técnicas viáveis de produção de etanol, o presente estudo teve por finalidade realizar, em diferentes condições, a hidrólise do pseudocaule da bananeira, utilizando enzimas produzidas pela Cepa fúngica *Penicillium oxalicum* F-3380, visando obtenção de maior rendimento de hidrólise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a melhor condição da hidrólise do pseudocaule da bananeira a partir de enzimas de *Penicillium oxalicum* F-3380.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o pseudocaule da bananeira *in natura* quanto à sua composição química;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento no pseudocaule da bananeira;
- Determinar a atividade enzimática dos Extratos Enzimáticos Brutos produzidos pelo fungo *Penicillium oxalicum* F-3380 no pseudocaule da bananeira *in natura* e pré-tratada;
- Realizar processo de hidrólise enzimática, variando a quantidade de biomassa (g), quantidade de enzima (ml) e pH;
- Quantificar a produção de açúcares e rendimento de hidrólise.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biocombustíveis

Um fator de grande relevância, quando se fala em fontes energéticas, é o acordo assumido na assinatura do Protocolo de Quioto, o qual visa à redução de emissão de GEE's, buscando assim fontes enérgicas mais sustentáveis (SOUZA et al., 2012; GUIMARÃES, COLAVITE e SILVA, 2019).

A queima de combustíveis fósseis, a qual emite grandes quantidades de GEE's para a atmosfera, é a principal causa do efeito estufa (AMOAHA et al., 2019). Com o aumento populacional, a demanda de combustíveis vem crescendo cada vez mais. Entretanto as fontes fósseis são finitas (GUIMARÃES, COLAVITE e SILVA, 2019). Desta forma, tanto a demanda quanto as reservas limitadas e os impactos causados por determinados combustíveis são razões que fazem com que haja procura por fontes energéticas mais limpas e renováveis (DING et al., 2019).

Os biocombustíveis surgiram como uma alternativa atrativa, por serem de origem renovável e contribuírem para a redução das emissões de GEE's, (SIQUEIRA et al., 2016; RAUD et al., 2019), mostrando ser um substituto sustentável para os combustíveis fósseis (BAKSI et al., 2019). Os biocombustíveis são derivados de biomassa (matéria vegetal). Os tipos mais conhecidos são: biodiesel, biogás e etanol.

Diversos estudos são realizados, em todo o mundo, com enfoque nesse tema, como o desenvolvimento de novos biocombustíveis, a otimização do processo produtivo e a busca por novas matérias-primas (REZENDE E PASA, 2017).

3.3.1 Etanol

Na década de 70, o Brasil se encontrava numa situação dependente do uso de combustíveis fósseis. Na mesma década, com a descoberta de que o petróleo era um recurso natural não renovável, houve grandes variações em seu preço. Esse período foi denominado com a crise do petróleo, que durou de 1973-1974. Logo após, mais precisamente em 1975, foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) (GUIMARÃES, COLAVITE e SILVA, 2019), com a finalidade de substituir o uso de combustível fóssil na frota de automóveis por etanol (MORAES e BACCHI, 2015).

Atualmente existem quatro gerações de etanol (etanol de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração, também

chamadas de E1G, E2G, E3G e E4G) que são derivados, respectivamente: de amido ou açúcares de vegetais; de biomassa lignocelulósica; de algas; e da combinação de matérias-primas geneticamente modificadas (NIPHADKAR, BAGADE e AHMED 2017).

O etanol de primeira geração é o mais produzido, em todo o mundo, sendo os Estados Unidos e o Brasil os principais produtores, tendo com matéria-prima, respectivamente, o milho e a cana-de-açúcar. No entanto o uso de certa cultura, para a produção de biocombustível, assim como o milho, que é um alimento básico em alguns países, pode provocar uma insegurança alimentar (NIPHADKAR, BAGADE e AHMED 2017).

Não necessariamente precisa haver uma competição entre produção de biocombustível e alimentos. Pode se investir na produção de E2G, o qual é oriundo de resíduos agroindustriais. Além de ser mais uma alternativa de combustível, também, é uma eficiente fonte de destinação das grandes quantidades de resíduos agrícolas gerados (FERREIRA, 2015; BINOD et al., 2019; HALDAR e PURKAIT, 2020).

A diferença entre o E1G e E2G está no processo de obtenção de ambos. O produto final será o mesmo, com as mesmas especificações para cada um (LOPES, SANTOS e COSTA, 2017).

3.1.1.1 Etanol de segunda geração (E2G)

O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, para a produção de biocombustíveis, é visto como uma atividade de grande importância, em nível mundial, no que se refere à redução da dependência de combustíveis fósseis (SAYAR, et al., 2019) e, conseqüentemente, à redução de GEE's. O E2G, em comparação com a gasolina, reduz 85% dessas emissões (EL-ZAWAWY et al., 2011).

A biomassa lignocelulósica é um recurso renovável abundante (DING et al., 2019; BAKSI et al., 2019). Utilizar tal matéria-prima na produção de etanol traz vantagens tanto ambientais quanto econômicas (PACHECO, 2011; RUIZ et al., 2013; WANG et al., 2019b).

Atualmente o Brasil possui três plantas de etanol de segunda geração, que são: GranBio, em São Miguel dos Campos-AL; Raízen, em Piracicaba-SP e o Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, em São Manuel-SP. As duas primeiras são plantas comerciais e a última é experimental. Todas essas plantas utilizam como matéria-prima os resíduos da cana-de-açúcar e a maior parte dos investimentos, para sua implantação, partiu do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social BNDES (LORENZI e ANDRADE, 2019).

Estas plantas possuem capacidade instalada de 82, 40 e 3 milhões de litros/ ano,

respectivamente, o que faz com que o país ocupe o ranking de quarto lugar em capacidade instalada do mundo. No entanto a produção realizada até o momento foi de apenas 10% da capacidade, pelas dificuldades relacionadas à etapa de pré-tratamento (LORENZI e ANDRADE, 2019).

3.2 Resíduos Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são polímeros de carboidratos complexos compostos, basicamente, por: celulose, hemicelulose e lignina (BALAT, 2011; BRISSAC et al., 2018). A quantidade de cada um destes compostos varia, de acordo com a espécie, idade e parte da planta (LI et al., 2015; CHOONG et al., 2016). A Tabela 1 apresenta a composição lignocelulósica de algumas culturas.

Tabela 1- Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

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

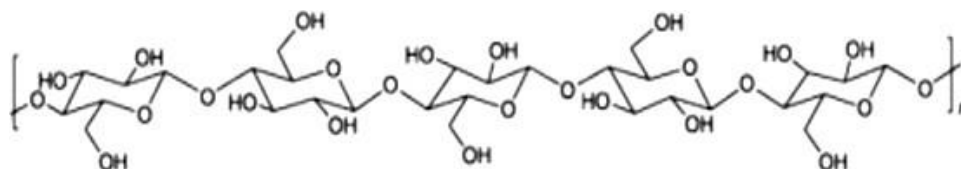
Fonte: SILVA, 2016.

3.2.1 Celulose

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polissacarídeo formado por ligações β -1,4-glicosídicas. Suas moléculas são completamente lineares e têm forte tendência para formar ligações de

hidrogênio inter e intramoleculares (LINO, 2015). Tais ligações são estabelecidas por grupos de hidroxilas das moléculas de glicose, que compõem as unidades repetitivas da celulose (Figura 1). Em consequência dessas ligações, há uma forte tendência de a celulose formar cristais (SILVA et al., 2009). A Figura 1 apresenta a molécula de celulose.

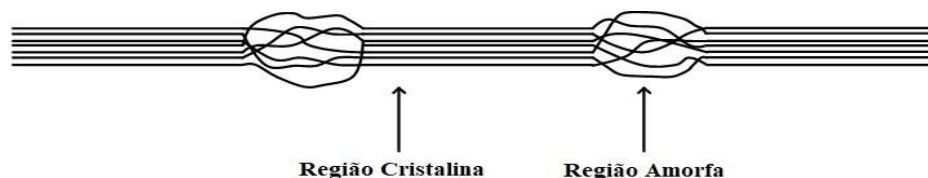
Figura 1- Representação esquemática da molécula de celulose.



Fonte: SANTOS, et al., 2012.

A celulose apresenta regiões cristalinas e regiões não cristalinas, denominadas de regiões amorfas. A primeira possui estrutura altamente ordenada, enquanto a segunda é menos ordenada, suas cadeias apresentam uma orientação randomizada (FARINAS 2011). A Figura 2 apresenta as regiões amorfas e cristalinas presentes na celulose.

Figura 2 - Região amorfa e cristalina da celulose.



Fonte: Elaborado pela Autora, 2020.

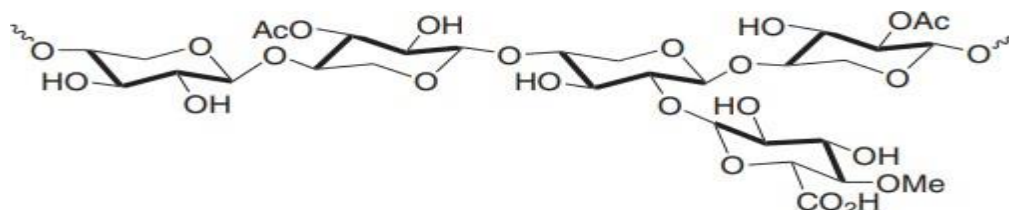
A acessibilidade de reagentes químicos difere nessas duas regiões. Segundo Ribeiro e Seravalli (2007), as regiões amorfas são suscetíveis ao ataque de solventes e reagentes químicos, enquanto a cristalina não. Isso decorre pelo fato da estrutura organizada da região cristalina que a torna mais resistente.

3.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polissacarídeos complexos constituídos principalmente por unidades de D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-manose e L-ramnose. Junto com a pectina, forma uma matriz amorfa em torno das fibras de celulose dando elasticidade e impedindo que elas se toquem (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007; FERREIRA, ROCHA e SILVA, 2009). A

representação da estrutura desse polissacarídeo é apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura da hemicelulose.



Fonte: FERREIRA, ROCHA e SILVA, 2009.

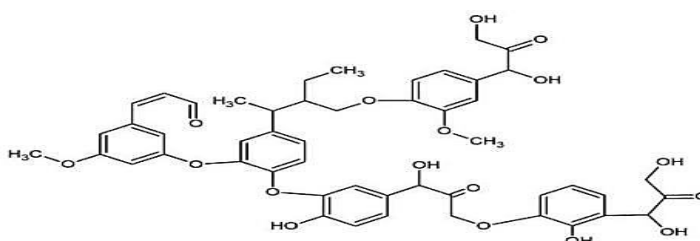
De acordo com Ogeda e Petri (2010), a composição química e características estruturais das hemiceluloses variam amplamente por espécies, localizações subcelulares e estágios de desenvolvimento.

3.2.3 Lignina

A lignina é o segundo composto orgânico mais abundante do Planeta (WANG et al., 2019a). É uma substância amorfa e hidrofóbica com estrutura altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropanoides, denominadas C6C3 (SALIBA et al., 2001; SILVA et al., 2009; BINOD et al., 2019). A Figura 4 apresenta a estrutura da lignina.

De acordo com Macêdo Júnior et al., (2007), sua composição, estrutura e quantidade variam, de acordo com o tecido, os órgãos, a origem botânica, a idade da planta e os fatores ambientais.

Figura 4 - Estrutura da lignina.



Fonte: Adaptada de RAUD et al., 2019.

A extração desse polímero é realizada sob condições em que ele é decomposto em fragmentos de menor peso molecular, resultando em alterações em suas propriedades físico-químicas (ERDOCIA et al., 2014).

3.3 Banana

A banana (*Musa spp.*) é uma das frutas mais consumidas no mundo (FERREIRA et al., 2015; DA SILVA BARROS et al., 2016). É uma fonte rica em carboidratos, fibras alimentares, vitaminas e minerais e possui baixos teores calóricos e de gordura (BORGE e SOUZA, 2004; SIDHU e ZAFAR, 2018). Além de sua composição nutricional, apresenta custo relativamente baixo o que a torna um integrante na mesa de pessoas de baixa renda (RAMBO et al., 2015; DA SILVA BARROS et al., 2016).

É uma cultura de origem asiática (BORGES, SOUZA e CORDEIRO, 2006). No entanto é produzida em muitos países, principalmente nos tropicais.

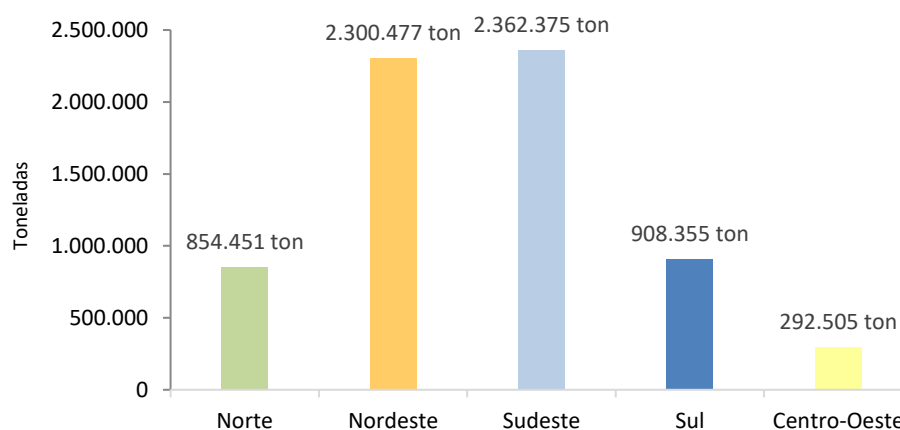
A banana é uma importante fonte de renda para a agricultura familiar (Sousa et al., 2019). Estudos realizados, em dez países produtores de banana, mostraram que 75% da renda familiar mensal dos pequenos produtores é provinda do cultivo dessa fruta (FAO, 2020).

Os dados de produção e consumo da banana não são precisos, sendo subestimados, pelo fato de grande parte de seu cultivo ser realizado por pequenos produtores e sua comercialização ocorrer, muitas vezes, no setor informal (FAO, 2020; FAO 2021).

A produção global de banana, em 2017, era de 114 milhões de toneladas, tendo como maiores produtores a Índia, China, Filipinas, Brasil e Equador. A média de produção (toneladas/ano) desses países entre os anos de 2010 e 2017 são, respectivamente: 29 milhões, 11 milhões, 7,5 milhões, 7 milhões e 7 milhões (FAO, 2020).

No Brasil sua produção é bem disseminada, sendo produzida nas cinco regiões brasileira, (Gráfico 1).

Gráfico 1– Produção (Ton) de bananas nas regiões brasileiras em 2020.



Fonte: Autora, 2021. Dados: IBGE/LSPA, 2020.

De acordo com o gráfico acima, as maiores produções de banana ocorrem nas regiões Sudeste e Nordeste, com produção de 2.362.373 e 2.300.477 toneladas, respectivamente. O percentual de produção, em cada região, é: 12,72% no Norte, 34,24% no Nordeste, 35,16% no Sudeste, 13,52% no Sul e 4,35% no Centro-Oeste.

3.3.1 Produção de banana no Tocantins

A bananicultura é uma importante atividade que se encontra presente em grande parte dos municípios do Tocantins. Dos 139 municípios Tocantinenses, 102 têm plantios de banana. A banana ocupa o segundo lugar no ranking das frutas mais cultivadas no estado (MATOS, VANCONCELOS e SIMÃO, 2019). De acordo com os dados do IBGE (2021), a produção dessa fruta no estado, em 2020, foi 31.852 toneladas, utilizando uma área de plantio de 3.393 hectares.

Atualmente as áreas onde mais se produz banana no Tocantins é nos perímetros irrigados do Projeto São João, em Porto Nacional e do projeto Manuel Alves em Dianópolis. A produção é destinada ao consumo dos municípios do estado e também é comercializada para outros estados da região Norte e Nordeste do país (MATOS, VANCONCELOS e SIMÃO, 2019).

O projeto Manuel Alves é o principal polo produtor de banana do Tocantins e um dos maiores projetos de irrigação do Brasil. Fica a 320 km da capital Palmas e possui área de cinco mil hectares e expansão para mais de quinze mil hectares. A área é dividida em lotes (199 lotes para pequenos produtores e 14 lotes empresariais) que são explorados à fruticultura como banana, maracujá, coco e manga (SEAGRO, 2015).

A Secretaria da Agricultura, Pecuária e Aquicultura do Tocantins (SEAGRO), em parceria com o ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Embrapa Mandioca e Fruticultura, Instituto de Desenvolvimento Rural do Tocantins (Ruraltins) e Agência de Defesa Agropecuária (ADAPEC), desenvolvem o Programa de Produção Integrada, que tem como objetivo incentivar as boas práticas de produção. Tais práticas são realizadas por produtores que recebem orientações de técnicos que vêm até o campo (SEAGRO, 2015).

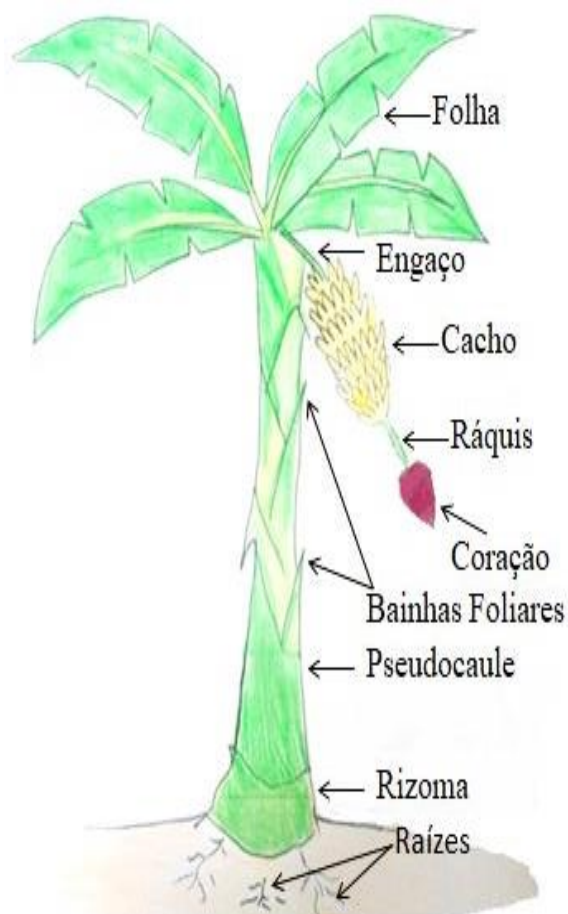
A Produção Integrada da Banana (PI-Banana), no Estado do Tocantins, teve início no ano de 2012 e visava à obtenção de práticas mais ecológicas, na produção e pós-colheita da banana, conforme os procedimentos estabelecidos nas normas técnicas dessa cultura. O PI-Banana aborda temas como: manejo integrado de pragas e doenças; capacitação e treinamento de pessoas envolvidas no agronegócio tocantinense da banana, atendendo produtores,

trabalhadores rurais, técnicos e estudantes; uso racional de agrotóxicos e fertilizantes; melhoria da qualidade dos frutos; e criação de maior consciência ambiental do produtor em busca da sustentabilidade da produção (MATOS, VANCONCELOS e SIMÃO, 2019).

3.4 Bananeira

A bananeira é uma planta monocotiledônea e perene, já que novos perfilhos nascem da base da planta-mãe. Não é considerada como uma árvore, uma vez que não possui caule lenhoso (BORGES, SOUZA e ALVES, 2000). Morfologicamente é composta por raízes, rizoma, folhas, engaço, cacho, ráquis, coração e pseudocaule, também chamado de falso caule, que é formado pelas bainhas foliares superpostas (LUNA e OLIVEIRA JÚNIOR, 2018) (Figura 5).

Figura 5 - Partes da Bananeira.



Fonte: Autora, 2021.

A reprodução dessa cultura é vegetativa (ocorre a multiplicação assexuada de partes da planta-mãe originando indivíduos geralmente idênticos a ela), sendo as mudas obtidas a partir

do desenvolvimento natural de filhotes ou por técnicas de fracionamento de rizoma (BORGES et al., 2006; GUERRA e MENDONÇA, 2013; SALOMÃO et al., 2016).

Em relação ao tempo de colheita, há variações, de acordo com as condições a que determinada espécie é submetida. Em regiões de clima tropical e nas regiões irrigadas, a colheita do primeiro cacho ocorre por 11 a 13 meses, enquanto, em clima subtropical e sem irrigação, esse período é um pouco maior, 15 a 18 meses (ALVES et al., 2004).

A faixa ótima de temperatura, para a produção de banana, é entre 26°C e 28°C. Os solos devem ser preferencialmente profundos de textura areno - argilosa, pH variando de 6,0 a 6,5, com lençol freático igual ou superior a 1,80 m, com boa drenagem, sem camadas de impedimento ou barreiras físicas e de topografia plana a levemente ondulada (MATOS, VASCONCELOS E SIMÃO, 2019).

3.5 Resíduos da bananicultura

A produção e comercialização de banana gera grande quantidade de resíduo, provindos tanto dos resíduos vegetais como de frutos rejeitados (SOUZA, et al., 2010). O elevado índice de perdas, na comercialização de banana no Brasil, faz com que apenas uma parcela, entre 50 e 60% da produção, chegue à mesa do consumidor (SILVA e RAMOS, 2009).

O cacho corresponde 34% da quantidade total produzida na colheita, o restante (66%) é todo o resíduo vegetal da planta (BORGES, SOUZA e CORDEIRA, 2006), o qual inclui o pseudocaule, folhas e engaço.

Geralmente o pseudocaule e folhas são dispostos ao solo do plantio (BASTIANELLO et al., 2009; BORGES et al., 2009). Já o engaço é deixado, em solo de áreas urbanas ou descartado em lixo doméstico, o que pode acabar contribuindo para a geração de problemas ambientais e fitossanitários (SOFFNER 2001).

O aproveitamento dos resíduos do cultivo da banana, para a produção de biocombustível, é uma alternativa muito atraente, pois, além de contribuir para a preservação do meio ambiente, evitando o acúmulo de resíduo, também valoriza a matriz de produção de frutas, transformando o resíduo em uma mercadoria (SOUZA et al., 2014).

No que diz respeito à composição química da biomassa da bananeira, a Tabela 2 vem apresentar o percentual dos compostos lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) em algumas partes da planta.

Tabela 2 - Composição percentual em base seca de celulose, hemicelulose e lignina dos resíduos da bananicultura.

Partes da bananeira	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Engaço	28,40	9,50	10,50	Oliveira et al. (2007)
Casca de banana	8,40	5,36	2,05	Souza et al. (2012)
Folhas	20,70	11,40	8,79	Oliveira et al. (2007)
Pseudocaule <i>Musa cavendishii</i>	36,10	24,50	4,50	Ingale et al. (2014)
Pseudocaule <i>Musa acuminata</i>	34,50	25,60	12,00	Cordeiro et al. (2014)
Pseudocaule <i>Musa sapientum</i>	50,15	0,77	17,74	Guimarães (2009)

Fonte: MONTAGNOLI, 2017.

De acordo com dados da tabela 2, percebe-se que, entre os resíduos avaliados, o pseudocaule é a parte que apresenta maior percentual de celulose, visto que a variedade *Musa Cavendishii* é a que mais se destaca, em relação à proporção desses compostos, apresentando baixo teor de lignina e alto teor de celulose o que facilita no processo de produção do bioetanol.

A banana do tipo *Cavendish*, entre as mais de mil variedades existentes, é a mais comercializada em todo o mundo (FAO, 2020).

3.6 Uso do pseudocaule da bananeira para a produção de E2G

Como já mencionado, o pseudocaule da bananeira é a maior fração dos resíduos da bananicultura. Apresenta atrativas proporções dos compostos lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina) para a produção de etanol. Diversos estudos com essa biomassa vêm sendo realizados para tal aproveitamento e tais estudos vêm apresentando resultados satisfatórios.

Silva (2016) avaliou o rendimento de etanol oriundo do pseudocaule seco da bananeira (cultivar prata anã) não tratada e após pré-tratamento hidrotérmico e com hidróxido de sódio. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 3 - Rendimento de etanol do pseudocaule seco da bananeira (cultivar prata anã) não tratada e após pré-tratamento hidrotérmico e hidróxido de sódio.

Tratamentos	Rendimento de etanol (kg) a cada 100 kg de pseudocaule seco	Rendimento de etanol (L) a cada tonelada de pseudocaule seco
Pré-tratamento hidrotérmico (230°C, 10 min)	20	255,4
Pré-tratamento com NaOH (190°C, 10 min, 0,5 % NaOH)	19,1	243,9
Não Tratado	16,2	206,9

Fonte: Autora, Dados de SILVA et al. 2016.

Os dados da Tabela 3, mostra que 1 tonelada de pseudocaule seco produziu de 206,9 a 255,4 L de etanol. A biomassa não tratada, foi a que apresentou o menor rendimento, mas ainda assim considerado satisfatório, levando a vantagem de ser mais barata que as demais, já que não realizou o pré-tratamento.

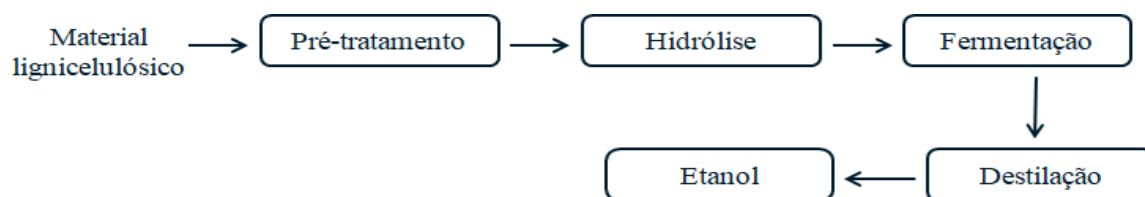
De acordo com Gonçalves Filho (2011), 1 tonelada de massa seca de pseudocaule de bananeira equivale em torno de 21,28 toneladas de massa úmida. Levando em consideração um pseudocaule com frações de celulose de 44% pode-se chegar a produzir 320 L de etanol.

Dos Santos Rocha, Almeida e Da Cruz (2017), avaliando o potencial de produção de etanol, a partir da celulose presente nos resíduos de cada cultura, obtiveram os seguintes resultados: palha de cana-de-açúcar (206,29 L/Ton), bagaço de cana-de-açúcar (180,68L/Ton) e palha de milho (170,90 L/Ton) e sabugo de milho (164,85 L/Ton). Comparando-se com o pseudocaule da bananeira, apenas a palha de cana-de-açúcar apresentou rendimento próximo, os demais resíduos apresentaram rendimento inferior ao pseudocaule.

3.7 Etapas da produção de etanol de segunda geração

O processo de obtenção de etanol, a partir de materiais lignocelulósicos, possui as seguintes etapas: obtenção da biomassa, pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6- Etapas do processo de obtenção de etanol de segunda geração.

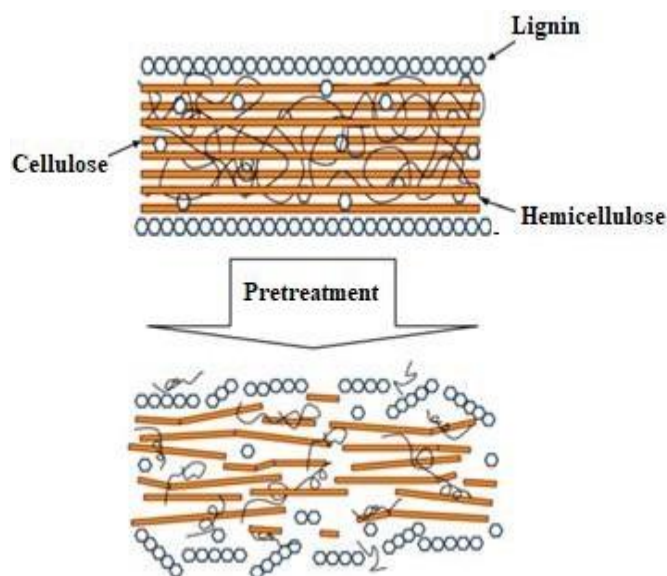


Fonte: Autora, 2021.

3.7.1 Pré-tratamento

A função do pré-tratamento é quebrar a barreira física formada pelas ligninas ao redor das fibras celulósicas (disponibilizando a celulose para a conversão em açúcares), reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose (OGEDA e PETRI, 2010; ALBERNAS-CARVAJAL, et al., 2014; DOTSENKO et al., 2018), obtendo assim melhores rendimentos. A Figura 7 mostra a separação dos compostos lignocelulósicos após pré-tratamento.

Figura 7- Pré-tratamento esquemático de material lignocelulósico.



Fonte: MOOD et al., 2013.

O pré-tratamento é a etapa mais cara na biotransformação lignocelulósica, variando aproximadamente 20 a 40% do custo do produto final (JIANG et al., 2020), porém é o mais promissor para aumentar a eficiência da conversão e reduzir custos (FEI et al., 2019). De acordo com Pacheco (2011), o melhor pré-tratamento é o que não ocasiona a desestruturação da celulose e lignina.

Os pré-tratamentos são classificados em dois regimes principais: não biológicos e biológicos. Os métodos não biológicos de pré-tratamento não envolvem nenhum tratamento microbiano, sendo eles divididos em diferentes categorias: métodos físicos, químicos e físico-químicos (KUMAR E SHARMA, 2017). O Quadro 1 apresenta comparações de alguns parâmetros das classificações dos pré-tratamentos.

Quadro 1- Avaliações comparativas dos pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Físico	Químico	Físico-Químico	Biológico
Procedimentos	Secagem, corte e moagem	Ácido, alcalino	Hidrotérmico Explosão a vapor	Fungos, bactérias, enzimas
Parâmetro crucial	Concentração de biomassa, temperatura e tempo de exposição	Concentração de biomassa, carga química, temperatura e mistura.	Temperatura e potência	Atividade enzimática, carga de fungos/bactérias, temperatura, pH e mistura
Necessidade de energia	Alto	Moderado	Alto	Suave
Eficiência	Baixo	Alto	Moderado	Moderado

Fonte: Adaptada de BHUSHAN et al., 2019.

3.7.1.1 Pré-tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico é um processo que utiliza água a altas temperaturas (em torno de 160°C a 220°C) e pressão (RUIZ et al., 2013). Apresenta vantagens como não fazer uso de reagentes químicos e não utilizar reatores altamente resistentes à corrosão (MAIONE et al., 2019), que contribui para a redução de custos.

Trata-se de um sistema autocatalítico, já que são gerados no próprio sistema íons de hidrogênio, que aceleram a reação (RUIZ et al., 2013). É o pré-tratamento utilizado na maior produtora de E2G do Brasil, a GranBio (LORENZI e ANDRADE, 2019). É um dos métodos mais conhecidos na literatura, quanto á solubilização de hemicelulose (RABELO, PRADELLA e IENCZAK, 2019), tendo o tempo de retenção e temperatura como principais variáveis de interferência na eficiência do processo (SOUZA 2016, WANG et al., 2019b).

Souza (2016), avaliando diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico em cana-de-açúcar (170°C/5 min, 170°C/15 min, 220°C/5 min, 220°C/15 min e 195°C/10 min), obteve

melhor remoção de hemicelulose (85,58%) em temperatura/tempo de 195°C/10 min.

Dos Santos-Rocha et al. (2017) obtiveram 70,7% de remoção de hemicelulose a 170°C/15 min e 89,7% a 195°C/10 min na palha da cana-de-açúcar. E 58,7% a 170°C/15 min e 67,8% a 195°C/10 min no sabugo de milho.

3.7.2 Hidrólise

A hidrólise é a etapa na qual ocorre a quebra de ligação química de uma molécula para a obtenção de açúcares, que podem ser fermentados gerando o etanol (SCHULTZ, 2012). De acordo com Ogeda e Petri (2010), a hidrólise de celulose origina a glicose e celobiose, enquanto a hidrólise de ligninas e hemicelulose gera açúcares e subprodutos (tais como difenois, derivados de fenilpropano) que, muitas vezes, inibem a fermentação microbiana.

Para a realização da hidrólise, é necessária à utilização de meios químicos (hidrólise ácida) ou biológicos (hidrólise enzimática) (FERREIRA, 2015). A escolha deve ser baseada em fatores como: o tipo de biomassa a ser hidrolisada, o organismo usado para a fermentação e viabilidade (OGEDA e PETRI, 2010).

De acordo com Jardine, Dispatto e Peres (2009), para a hidrólise de celulose tem sido mais indicada a rota enzimática, que é realizada em condições mais brandas, como pH 5,0 e temperatura por volta de 50°C, o que reduz os custos. Já para a hidrólise de hemicelulose, tem sido indicado o uso da rota química, que ocorre em condições de alta severidade.

3.7.2.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática faz uso de um conjunto de enzimas, que atuam sinergicamente em razão da alta recalcitrância do material a ser hidrolisado (RODRIGUES et al., 2014; FARINAS, 2011).

As enzimas celulósicas geralmente são produzidas por fungos e bactérias. Entre as espécies mais utilizados, na produção dessas enzimas, incluem-se: *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* e *Aspergillus* (fungos); *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* e *actinomicetos* *Streptomyces* e *Actinomucor* (bactérias) (RODRIGUES et al., 2014).

As classes de enzimas responsáveis pela degradação celulose, hemicelulose e lignina são denominadas celulasas, hemicelulasas e ligninases, respectivamente.

Quadro 2 apresenta alguns dos tipos dessas classificações.

Quadro 2 - Algumas das principais enzimas necessárias para transformar materiais

lignocelulósicos em açúcares.

Ligninases	Lacase, peroxidase de manganês, lignina peroxidase.
Hemicelulases	Endoxilanase, acetilxilanesterase, β -xilosidase, endomananase, β -manosidase, α - L- arabinofuranosidase, α -glucuronidase, esterase de ácido ferúlico, α -galactosidase, esterase de ácido <i>p</i> - carmarínico.
Celulases	Exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase.

Fonte: Adaptada de VAN DYK e PLETSCHE, 2012.

As celulases são as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose. Esse processo ocorre com a atuação das três celulases: exoglucanase, endoglucanase, β -glucosidase. Inicialmente a endoglucanase é absorvida na superfície da celulose sólida e ataca o interior da cadeia do polímero. Logo após, as exoglucanases removem as unidades de celobiose das células não redutoras. Por fim, as betaglicosidases fazem a quebra da ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celobiose, liberando assim unidades de glicose (WRIGHT, WYMAN e GROHMANN, 1988).

A atuação das enzimas deve ocorrer em condições ideais para a eficiência do processo. Para o alcance dessas condições, leva-se em consideração fatores como temperatura, pH, concentração de substrato e concentração de enzimas. Não atingir tais condições poderá implicar aumento de custos, já que pode haver a necessidade de adicionar mais cargas enzimáticas para a eficiência do processo de hidrólise (VAN DYK e PLETSCHE, 2012).

A necessidade de aumento de quantidade de cargas enzimáticas pode ser resolvida pelo desenvolvimento de complexos enzimáticos mais específicos para cada tipo de biomassa (FLORENCIO, BADINO e FARINAS, 2017). De acordo com Binod et al. (2019), os avanços, para o desenvolvimento de enzimas sob medida econômicas e com atividades específicas altas, são considerados expressivo, entretanto a maioria dessas enzimas ainda não são comercialmente viáveis.

3.7.2.1.1 *Penicillium*

Os fungos filamentosos são os principais microrganismos utilizados para a produção de enzimas lignocelulósicas. A espécie mais explorada para tal finalidade é a *Trichoderma reesei* (GUSAKOV, 2011). Com pesquisas e desenvolvimento tecnológico, a produção industrial de enzimas dessa espécie vem melhorando cada vez mais (MARTINEZ et al., 2008). Entretanto é de grande importância o estudo da eficiência de outros microrganismos, a fim de encontrar

atividades enzimáticas mais altas e diminuir os custos com enzimas.

Gusakov (2011), em seu estudo sobre alternativas para *Trichoderma reesei*, na produção de biocombustíveis, relatou com a busca de outros estudos, que o gênero *Penicillium* apresenta características satisfatórias para a produção de enzimas celulóticas. O autor aponta alta atividade da β -glucosidase com uma grande vantagem em relação ao *Trichoderma reesei*.

Várias espécies de *Penicillium* vêm sendo analisadas, quanto à produção de enzimas celulósicas e muitas dessas espécies apresentam bons resultados, como o *P. oxalicum*. Jing et al. (2015), avaliando a cepa fúngica *P. oxalicum* Z1-3, mostram que ela chegou a hidrolisar 92,5% do bagaço de cana-de-açúcar.

Bomtempo et al. (2017), avaliando cepa *P. oxalicum* F 3380, utilizando o sorgo como substrato, encontraram os seguintes resultados para a atividade enzimática de papel filtro (FPase), endoglucanase (CMCase) e celobio-hidrolases (Avicelase), respectivamente: 4,2 U/g, 9,2 U/g e 8,4 U/g. Tais resultados indicam que essa cepa pode ser uma alternativa promissora na produção de enzimas lignocelulósicas.

3.7.3 Fermentação e Destilação

A fermentação é o processo de transformação de açúcares, como sacarose, frutose e glicose em etanol e CO₂. Essa conversão é realizada por leveduras. Em se tratando de produção de etanol, as leveduras mais atrativas são do gênero *Saccharomyces* (SILVA, JESUS e COUTO, 2011), especialmente, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por apresentar baixo custo, ser de fácil disponibilidade e manipulação (TEIXEIRA et al., 2019).

O processo de fermentação se divide em três etapas: na primeira fase, ocorre a adaptação das leveduras ao meio; na segunda fase, também chamada de principal ou tumultuosa, acontece a multiplicação das leveduras e, na terceira e última fase, há a precipitação do fermento e a diminuição do crescimento das leveduras e de CO₂ (SILVA, JESUS e COUTO, 2011).

A fermentação pode ser afetada por vários fatores, tais como: temperatura, pH, contaminação bacteriana, aeração/agitação, nutrientes e o etanol (SOUSA e MONTEIRO, 2011). A temperatura, por exemplo, compromete o processo fermentativo, quando há um aumento da faixa ideal, que, segundo Teixeira et al. (2019), geralmente, ocorre em temperaturas de 32-35 °C em fermentação realizada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O aumento da temperatura promove o aumento da velocidade da fermentação, entretanto pode provocar a contaminação bacteriana (DE ALMEIDA LIMA, 2019).

Após a fermentação, para a separação do etanol, utiliza-se a destilação do álcool. Essa

operação inicia-se com a passagem do líquido em colunas de destilação aquecidas para que ocorra a evaporação. Logo após, por meio de resfriamento, ocorrerá a condensação, que é a transformação do vapor em líquido (RIZZON e MENEGUZZO, 2008; DE ALMEIDA LIMA, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matéria-Prima

A matéria-prima utilizada para o presente estudo, o pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*, foi coletada no município de Dianópolis -TO, na área do projeto Manuel Alves, um dos maiores polos de produção de frutas do estado, que está localizado a 347 km da capital Palmas.

O pseudocaule foi colhido manualmente e cortado em pedaços em torno de 30 cm. Foram destacadas as bainhas foliares, para facilitar no processo de secagem, que inicialmente foi realizado em temperatura ambiente, num período de dois dias e, posteriormente, em estufa a 60 °C por 72 horas (Figura 8). Após a secagem do material, ocorreu o processo de moagem, a fim de aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização do resíduo, utilizando moinho de facas acoplado com peneira de 20 mesh. Em seguida, o material foi armazenado em sacos plásticos, a fim de manter-se conservados para análises laboratoriais.

Figura 8 – Secagem das bainhas foleares em estufa.



Fonte: Autora, 2021.

4.2 Caracterização química do pseudocaule da bananeira

Foram realizadas as seguintes análises químicas: umidade, extrativos, cinzas, lignina (solúvel e insolúvel), holocelulose, hemicelulose e celulose. A determinação de lignina foi realizada, de acordo com a metodologia de Sluiter et al. (2008); a celulose conforme Sun et al.

(2004) e as demais análises de acordo com Moraes, Rosa e Marconcini (2010).

4.2.1 Umidade

Em cadinhos limpos e previamente secos até peso constante, foram adicionados 3g da amostra da amostra úmida. Posteriormente os cadinhos com as amostras foram submetidos à secagem em estufa 60°C até atingir peso constante. Em seguida, as amostras foram resfriadas em dessecador, por 30 minutos e pesadas para a determinação da massa seca. Com os valores encontrados, utilizou-se a Equação 1 para o cálculo da umidade.

$$TU(\%) = \frac{MRAU - MRAS}{MAU} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

TU (%): teor de umidade;

MRAU: massa do conjunto recipiente/amostra úmida;

MRAS: massa do conjunto recipiente/amostra seca;

MAU: massa da amostra úmida.

4.2.2 Cinzas

Em cadinhos previamente calcinados, a 600°C por 30 minutos e resfriado em dessecador, foram adicionados 2g da biomassa úmida. O conjunto (cadinho/amostra) foi colocado em mufla com uma rampa de aquecimento de aproximadamente 9,6 °C/min até chegar a 600 °C. Após três horas nessa temperatura, ocorreu um decaimento para 200 °C permanecendo por mais uma hora. Em seguida, o conjunto foi resfriado em dessecador e pesado. O cálculo da determinação do teor de cinzas totais foi realizado pela Equação 2, a seguir:

$$TC(\%) = \frac{MRAC - MR}{MA} \times \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

TC (%): teor de cinzas totais;

MRAC: massa do conjunto recipiente/amostra calcinada;

MR: massa do recipiente;

MA: massa da amostra.

4.2.3 Extrativos

A extração ocorreu por Soxhlet, em aparelhagem limpa e desengordurada, em que foram adicionados cartuchos com 5g da biomassa em estudo. Ao balão de vidro, foram adicionados 150 ml do solvente e, posteriormente, conectou-se ao extrator, no qual permaneceu por cinco horas fazendo a extração. Após esse tempo, o balão com o solvente e extrativos foi removido. O extrato foi transferido para um recipiente de pesagem, utilizando-se pequenos volumes do solvente fresco para que não houvesse perdas.

O recipiente foi posto em uma estufa a 105 ± 2 °C por uma hora. Após esse tempo, foi removido o material da estufa para um dessecador, para resfriar à temperatura ambiente e, em seguida, pesado. O teor de extrativo foi encontrado pela Equação 3.

$$TE(\%) = \frac{MRE - MRRS}{MA} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

TE (%): teor de extrativos;

MRE: massa do conjunto recipiente/extrativos;

MRRS: massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente;

MA: massa da amostra.

4.2.4 Lignina Total

Para a determinação de lignina insolúvel, foram adicionados, em tubos autoclaváveis, 0,3g de biomassa moída seca e sem extrativos e 3,0 ml de ácido sulfúrico (72%). As amostras foram deixadas em banho-maria a 30°C por 1h, sendo agitadas a cada 10 min. Após esse período, foram adicionados 84 ml de água destilada na amostra e submetida à autoclavagem a 121°C por 1 h e depois resfriada em temperatura ambiente. Depois de resfriada, foi realizada a filtração a vácuo. Do filtrado foi retirada uma alíquota e que foi acondicionada sob refrigeração, para análise posterior. Os sólidos restantes da filtração foram lavados com 50 ml de água destilada aquecida. O resíduo insolúvel foi submetido à secagem a 50°C até peso constante. O teor lignina insolúvel foi calculada a partir da Equação 4.

$$TLI(\%) = \left(\frac{MFL - MF}{MA} \times 100 \right) - TC(\%) \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

TLI (%): teor de lignina insolúvel;

MFL: massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa; MF: massa do funil limpo e seco;

MA: massa da amostra;

TC (%): teor de cinzas.

A análise da amostra para lignina solúvel em ácido foi realizada, a partir da leitura da absorbância do filtrado hidrolisado, em espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda de 240 nm. O teor de lignina solúvel em ácido foi calculado por meio da Equação 5.

$$\text{TLS}(\%) = \left(\frac{\text{ABS} \times V_f \times F_d}{\varepsilon \times M_{\text{man}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

TLS (%) = Teor de Lignina Solúvel;

ABS = Absorbância a 240 nm;

Vf = Volume de filtrado;

Fd = Fator de diluição;

ε = Constante de absorvidade para biomassa versus comprimento de onda;

M_{am} = Massa inicial de amostra (g).

A quantidade de lignina total foi calculada conforme a Equação 6.

$$\text{Lig}_{\text{total}}(\%) = \text{TLI}(\%) - \text{TLS}(\%) \quad \text{Equação 6}$$

4.2.5 Determinação do teor de holocelulose

Em um erlenmeyer de 500 ml, foram adicionadas 3 g da biomassa em estudo, sem umidade nem extrativos, 120 ml de água destilada, 2,5 g de clorito de sódio (NaClO_2), com pureza aproximada de 80% e 1 ml de ácido acético glacial, com pureza $\geq 99,85\%$. O conjunto erlenmeyer-reagente foi tampado com um erlenmeyer de 25 ml e deixado em banho-maria, com agitação e temperatura de 70°C , por 60 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 2,5 g de clorito de sódio e 1 ml de ácido acético, mantendo a temperatura de 70°C por mais uma hora. Após esse tempo, foram adicionados, mais uma vez, 2,5 g de clorito de sódio e 1 ml de ácido acético, deixando por mais três horas em banho-maria. Após esse processo, os erlenmeyer foram submetidos ao banho de gelo, que ocorreu por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi

filtrada, por filtração a vácuo. O conteúdo dos erlenmeyer foi transferido para um funil e, em seguida, iniciou o processo de filtração a vácuo. Para que não houvesse perdas, o erlenmeyer foi lavado com água destilada e o líquido transferido ao funil. O funil foi levado para uma estufa a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até temperatura constante. Em seguida, resfriado em dessecador por 30 minutos.

Com base na massa do funil limpo e seco, na massa da amostra e na massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa, calculou-se o teor de holocelulose, pela Equação 7.

$$\text{TH}(\%) = \frac{\text{MFH} - \text{MF}}{\text{MA}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

TH % = teor de holocelulose;

MF = massa do funil limpo e seco;

MA = massa da amostra;

MFH = massa do funil somada à massa de holocelulose, após secagem em estufa.

4.2.6 Celulose

Em tubos autoclaváveis com tampa de rosca, foram adicionados 5 g (amostra seca, livre de extrativos totais), 100 mL de ácido acético aquoso 80 % e 10 mL de ácido nítrico 70 %. O recipiente foi vedado e submetido a um banho-maria na temperatura de 110°C por 20 min. Logo depois, foi resfriado em banho de gelo. Adicionaram-se 60 mL de água destilada e, nesse ponto, o reagente decantou e filtrou-se a vácuo o conteúdo do tubo. O resíduo decantado foi lavado várias vezes com água destilada e etanol 95%, de maneira a remover o ácido nítrico e os produtos gerados durante a extração. A amostra restante foi transferida, para uma placa de petri, previamente tarada e submetida à secagem em estufa a 70°C por 24 h. O teor de celulose foi calculado de acordo com a Equação 8.

$$\text{TCel}(\%) = \left(\frac{M_{p+am} \cdot M_p}{M_{man}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

TCel (%) = Teor de celulose;

M_{p+am} = Massa da placa + massa final da amostra;

M_p = Massa da placa vazia e tarada;

M_{am} = Massa inicial de amostra.

4.2.7 Hemicelulose

Pela diferença entre os valores dos teores de homocelulose (TH %) e celulose (Tcel %), apresentado na Equação 9, obteve-se o percentual de hemicelulose (The).

$$\text{Hemicelulose (\%)} = \text{TH(\%)} - \text{Tcel (\%)} \quad \text{Equação 9}$$

4.3 Pré-tratamento

Em erlenmeyer de 500 ml, foram adicionados 16 g do pseudocaule seco e moído em 240 ml de água (proporção 1:15). Os erlenmeyer foram agitados manualmente por alguns segundos e encaminhados à autoclave no qual permaneceu por 30 minutos depois atingir a temperatura de 121°C. Após esse período, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, filtradas, e a fração sólida foi seca em estufa a 50°C em temperatura até peso constante. Em seguida, resfriadas e armazenadas em temperatura ambiente.

4.4 Espectrofotometria no Infravermelho

A fim de avaliar de forma qualitativa a influência do pré-tratamento, foram obtidos, por meio de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), espectros de absorção no infravermelho da biomassa *in natura* e pré-tratada. Utilizou-se aparelho Agilent FT-IR Cary-630, usando um intervalo de 800 a 3600 cm^{-1} .

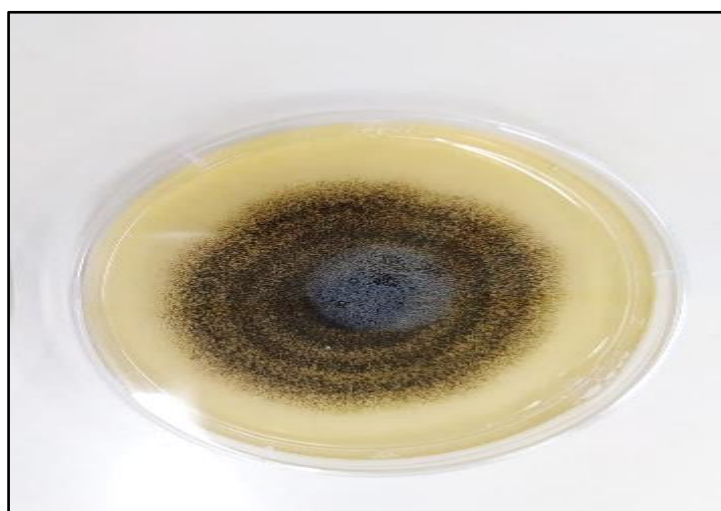
4.5 Microrganismo e condições de cultura

O microrganismo utilizado, para a produção de enzimas celulósicas, foi o fungo filamentoso *Penicillium oxalicum* F-3380, que foi escolhido, por ser considerado um bom produtor de celulasas, conforme aponta o estudo de Bomtempo et al. (2017), sendo promissor para usos industriais. A Cepa foi obtida de uma colônia de formigas cortadeiras, a *Acromyrmex Balzani* (Hymenoptera: Formicidae). Essa Cepa pertence à coleção de cultura de microrganismo

Coleção de Culturas Carlos Rosa, do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins.

O cultivo ocorreu em placas de Petri em meio PDA (Potato Dextrose Agar), num período de 7 dias, a uma temperatura de 25 °C (Figura 9). Com a adição de água destilada, foram obtidas as suspensões de esporos cuja contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

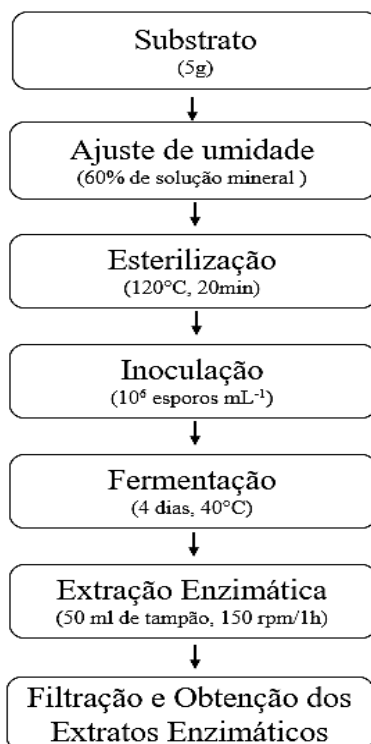
Figura 9 - Fungo em PDA após 7 dias.



Fonte: Autora, 2021.

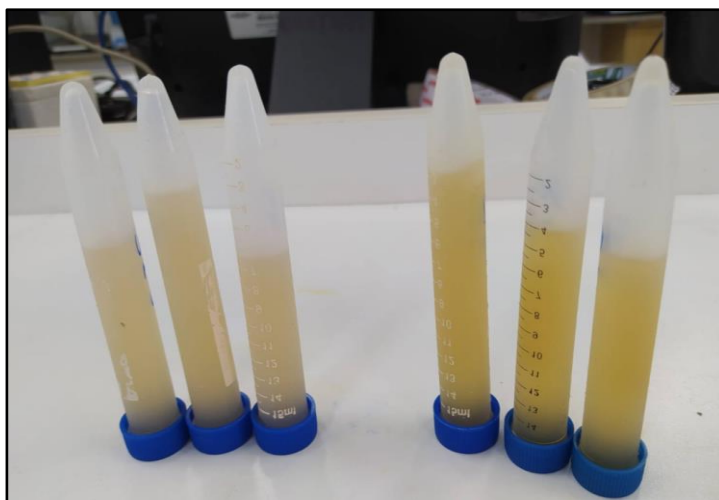
4.6 Produção de enzimas

A produção de enzimas ocorreu por Fermentação de Estado Sólido (FES) utilizando como substrato o pseudocaule da bananeira pré-tratada e *in natura*. Em frascos de Erlenmeyer de 250 ml, foram adicionados 5g de substrato (pseudocaule da bananeira) e uma solução de sal mineral descrita por Mandels e Weber (1969). Os frascos com as amostras foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min, resfriado, inoculados com suspensão de esporos do fungo *P. Oxallicum* F-3380 e incubados (Aguiar & Lucena, 2011). A extração enzimática foi realizada pela adição de 50 ml de tampão citrato (0,05 M, pH 4,8), seguido de agitação a 150 rpm por 1 h, filtração simples e armazenamento a 20 °C para análises posteriores. O tempo de incubação, temperatura, concentração do inóculo, umidade e pH foram realizadas, conforme Bomtempo et al. (2017), que obtiveram maiores produções de enzimas de *P. oxallicum* F-3380, utilizando o sorgo como substrato, nas seguintes condições: tempo de incubação de 4 dias, temperatura de 40°C, concentração do inóculo de 10^6 esporos mL^{-1} , umidade inicial de 60% e pH 4. A Figura 10 apresenta o fluxograma das etapas realizadas no processo de FES.

Figura 10 - Fluxograma do Processo de FES.

Fonte: Autora, 2021.

A Figura 11 apresenta os extratos enzimáticos brutos obtidos. O Extrato Enzimático, oriundo da fermentação da biomassa pré - tratada, está denominado como EEB 1 enquanto o extrato obtido da biomassa *in natura* está como EEB 2.

Figura 11- EEB 1 (a esquerda) e EEB 2 (a direita).

Fonte: Autora, 2021.

4.7 Atividades enzimáticas

Foi utilizada a metodologia de Ghose (1987) para determinar a atividade enzimática da endoglucanase (CMCase), (Avicelase) e celulase total (FPase). A redução da concentração de açúcar foi medida usando o método DNS descrito por Miller (1959). O passo a passo de todo o processo de determinação de CMCase e Avicelase são os mesmos, mudando apenas o substrato. O substrato da CMCase é carboximetilcelulose diluída a 2% em tampão citrato (0,05 M, pH 4,8), enquanto o substrato da Avicelase é celulose microcristalina diluída a 1% em tampão citrato (0,05 M, pH 4,8).

O Quadro 3 apresenta a metodologia de determinação de CMCase e Avicelase.

Quadro 3 – Etapas da determinação de CMCase e Avicelase.

Passos	Amostra	Zero do espectro	Branco da enzima
1	0,5 ml de solução de substrato + 0,5 ml de enzima	0,5 ml de solução de substrato	0,5 ml de solução de substrato
2	Banho-maria (50°C, 30 min)	Banho-maria (50°C, 30 min)	Banho-maria (50°C, 30 min)
3	Banho de gelo	Banho de gelo	Banho de gelo
4	3 ml de DNS	3 ml de DNS + 0,5 de tampão citrato de sódio	3 ml de DNS + 0,5 ml de enzima
5	Ferver 5 min	Ferver 5 min	Ferver 5 min
6	Banho de gelo	Banho de gelo	Banho de gelo
7	20 ml de água	20 ml de água	20 ml de água
8	Leitura a 540 nm	Leitura a 540 nm	Leitura a 540 nm

Fonte: Adaptado de Ghose (1987).

A determinação de FPase está apresentada no Quadro 4. O substrato utilizado foi uma tira de papel Whatman n° 1 (1,0 x 6 cm).

Quadro 4 – Etapas da determinação de FPase.

Passos	Amostra	Zero do espectro	Branco da enzima
1	1 ml de tampão citrato + 0,5 ml de enzima + substrato		
2	Banho-maria (50°C, 60 min)		
3	Banho de gelo		
4	3 ml de DNS	3 ml de DNS + 1,5 de tampão citrato de sódio	3 ml de DNS + 0,5 ml de enzima + 1ml de tampão citrato de sódio
5	Ferver 5 min	Ferver 5 min	Ferver 5 min
6	Banho de gelo	Banho de gelo	Banho de gelo
7	20 ml de água	20 ml de água	20 ml de água
8	Leitura a 540 nm	Leitura a 540 nm	Leitura a 540 nm

Fonte: Adaptado de Ghose (1987).

Foi construída uma curva de calibração (ANEXO I) e, com base na equação da reta gerada, foram calculadas as concentrações de açúcares redutores.

Os cálculos das atividades da CMCCase, Avicelase e FPase foram realizados pela seguinte equação (Equação 10):

$$(U/ml) = \frac{V_T}{0,18 * V_C * T_H} \quad \text{Equação 10}$$

Em que:

AR = açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise (mg/ml);

VT = volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume de extrato enzimático bruto) (ml);

VC = volume de extrato enzimático bruto na hidrólise (ml);

TH = tempo de hidrólise (min);

0,18 = 1µmol de glicose (mg).

Uma unidade de atividade celulósica (U/ml) foi considerada como a quantidade de

enzima capaz de liberar 1µmol de glicose por ml por minuto de reação. A conversão em U/ml para U/g se deu pela seguinte equação (Equação 11):

$$\text{Atividade enzimática (U/g)} = \frac{\text{atividade enzimática (U/ml)} \cdot \text{TP}}{\text{MA}} \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

TP = tampão citrato utilizado na FES (ml);

MA = massa da amostra utilizada na FES (g).

4.8 Hidrólise enzimática do pseudocaule da bananeira

4.8.1 Hidrólise da biomassa *in natura* com EEB 1

Foram adicionados, em frascos Erlenmeyer de 250 ml, o substrato *in natura* com 8 ml de solução tampão de citrato de sódio e o EEB 1. O recipiente com a mistura foi incubado, sob agitação de 150 rpm e 50°C. Foi coletada uma alíquota do hidrolisado nos tempos de 24, 48 e 72 h. As amostras foram armazenadas em freezer até serem submetidas à quantificação de glicose (g/L), realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se o equipamento da marca Agilent, modelo 1260 infinity II, equipado com detector de índice de refração a 40°C, usando uma coluna cromatográfica Supelcogel C-610H (30cm x 7.8mm) – Sigma-Aldrich, pré-coluna Supelguard C610H (5cm x 4,6mm) – Sigma –Aldrich. A fase móvel utilizada foi 0.1% H₃PO₄ (água deionizada e ácido fosfórico), com fluxo (vazão da fase móvel) de 0,5mL.min⁻¹, sendo o tempo total de corrida de 18 minutos e temperatura de forno de 40°C.

Após a obtenção da concentração de glicose, calculou-se o rendimento de hidrólise, conforme a equação apresentada por Siqueira et al. (2016) (Equação 12).

$$\text{RH(\%)} = \left(\frac{\text{Gli}}{\text{Cel}} \times 0,9 \right) \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Em que:

RH%: rendimento da hidrólise em porcentagem;

Gli.: concentração de glicose (g/l);

Cel.: concentração de celulose da biomassa (g/l);
0,9: fator de conversão da celulose.

4.8.1.1 Análise estatística

Foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) $2^3 + 2 * 3$ pontos axiais + 4 pontos centrais, totalizando 18 ensaios para determinar a melhor condição de obtenção de RH. Os níveis utilizados no DCCR estão apresentados na Tabela 4.

A Figura 12 apresenta os 18 ensaios realizados.

Figura 12- Hidrólise do pseudocaule da bananeira in natura utilizando o EBB 1.



Fonte: Autora, 2021.

Tabela 4 - Valores utilizados no DCCR.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Biomassa (mg)	20	28	40	52	60
Enzima (ml)	1	1,4	2	2,6	3
pH	4	4,4	5	5,6	6

Fonte: Autora, 2021.

Foi gerada uma análise de variância (ANOVA), pelo *software* *Statística*, para verificar a significância, ao nível de 5% da concentração de glicose em relação aos tempos de 24, 48 e 72h. Após a escolha do tempo, que obteve a maior concentração de glicose, foi realizada uma

estimativa dos efeitos das variáveis e suas interações sobre a RH %, considerando o nível de significância de 5%. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada, para testar a validade do modelo matemático obtido pelo teste F e pelo cálculo do coeficiente de determinação do modelo (R^2). Tal modelo foi representado por meio de gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno. Com exceção da ANOVA da concentração de glicose, em relação aos períodos avaliados, todos os outros dados experimentais foram analisados por meio do *software* Protimiza Experimental Design.

4.8.1 Hidrólise da biomassa *in natura* com EEB2

Após a realização da hidrólise enzimática da biomassa *in natura*, utilizando o EEB 1, foi verificada qual das condições das variáveis avaliadas obteve maior rendimento de hidrólise. A partir disso, foi realizada uma nova hidrólise do pseudocaule *in natura*, porém, dessa vez, utilizando o EEB2. O experimento foi realizado em triplicata, conforme apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Hidrólise do pseudocaule da bananeira *in natura* utilizando o EEB 2.



Fonte: Autora, 2021.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do pseudocaule da bananeira

Os dados da caracterização do pseudocaule da bananeira *in natura* e pré-tratada estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição química do pseudocaule *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.

Parâmetros	Biomassa <i>in natura</i>	Biomassa pré-tratada (120 °C/30 min)
Umidade (%)	90,98 ± 0,80	-
Cinzas (% MS)	6,97 ± 0,013	-
Extrativos (%MS)	24,35 ± 0,94	-
Lignina (% MS)	8,58 ± 0,64	12,08 ± 1,22
Hemicelulose (% MS)	24,02 ± 1,18	19,05 ± 0,99
Celulose (% MS)	35,86 ± 0,70	40,58 ± 1,40

MS – Massa Seca

O percentual de umidade encontrado na biomassa do presente estudo foi 90,98%, próximo ao valor obtido por Jayaprabha, Brahmakumar e Manilal (2011) (96,7%) e de Brissac et al (2018) (95,2%), que também avaliaram o pseudocaule da bananeira. Esse alto percentual de umidade mostra que o percentual de biomassa seca é baixo, e isso afeta diretamente o rendimento de etanol de segunda geração, que também será reduzido.

O percentual de cinzas (6,97%), que representa o material inorgânico da biomassa, foi bem inferior aos encontrados nos pseudocaules analisados por Rosa, Pereira e Morais (2021) (12,5%) e Fiorese et al. (2020) (14,45%). Quanto menor a quantidade de cinzas, maior é o aproveitamento da biomassa, o que resulta na redução de resíduos gerados após processo de hidrólise (FIORESE et al. 2020).

O teor de extrativos (24,35%) foi próximo ao encontrado, nos estudos de pseudocaule, de Rosa, Pereira e Morais (2021) (24,6%) e de Díaz et al. (2021) (21,11%). É um percentual considerado alto, comparando-se, por exemplo, com o bagaço na cana-de-açúcar (12,80%) (RODRIGUES et al., 2020), que é uma das principais matérias-primas utilizadas na produção de etanol de segunda geração.

A lignina encontrada na biomassa (8,58%) foi próxima aos resultados de Rosa, Pereira

e Morais (2021) (8,4%), que também avaliaram o pseudocaule da bananeira. Esse percentual é inferior ao do bagaço da cana-de-açúcar (22,78 %) (ANDRADE et al., 2019), e isso é um fator positivo, pois facilita o acesso à celulose.

A hemicelulose (24%) foi superior à de Rosa, Pereira e Morais, (2021) (11,3%) e Díaz et al. (2021) (19,11%). Esse alto percentual indica que a biomassa necessita de um pré-tratamento que solubilize esse composto, pois, de acordo com Ogeda e Petri (2010), a hidrólise da hemicelulose pode gerar subprodutos (principalmente, difenois, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que, muitas vezes, inibem a fermentação microbiana.

A fração de celulose apresentada (35,86%) é considerada satisfatória no aproveitamento para etanol, sendo superior aos valores encontrados nas análises de pseudocaules de Guerrero, Ballesteros e Ballesteros (2018) (20,1 %) e Díaz et al. (2021) (26,29%).

Em ralação à biomassa pré-tratada, o teor de lignina aumentou 28,9% após pré-tratamento. Maione et al. (2019), em seu estudo do efeito do pré-tratamento hidrotérmico no bagaço do malte, obtiveram aumento do teor de lignina em todas as condições de pré-tratamento (160°C/20 min 200°C/20 min, 160°C/60 min, 200°C/60 min). Conforme o mesmo autor, é esperado que biomassas submetidas a esse tipo de pré-tratamento apresentem percentual de lignina um pouco maior em relação à biomassa *in natura*.

O teor de hemicelulose diminuiu 20%, considerado baixo comparado ao estudo de Dos Santos-Rocha et al. (2017), que obtiveram 70,7% de remoção de hemicelulose a 170°C/15 min e 89,7% a 195°C/10 min na palha da cana-de-açúcar e 58,7% a 170°C/15 min e 67,8% a 195°C/10 min no sabugo de milho. Vale ressaltar que tais resultados foram obtidos em temperaturas bem superiores em relação ao estudo atual (121°C) e, com agitação (200 rpm), o que pode explicar a maior remoção de hemicelulose.

O teor de celulose teve um aumento de 11,63%. Rosa e Pinheiro (2021), avaliando o efeito do pré-tratamento hidrotérmico no bagaço da laranja, em condições parecidas com a do presente estudo (121°C/60min), obtiveram um aumento de 3,66% de celulose. O aumento de celulose do presente estudo, apesar do aumento da lignina, pode se explicar pela desestruturação da fibra celulósica, após o pré-tratamento e também pela a solubilização de outros componentes como hemicelulose, que diminuiu após o pré-tratamento.

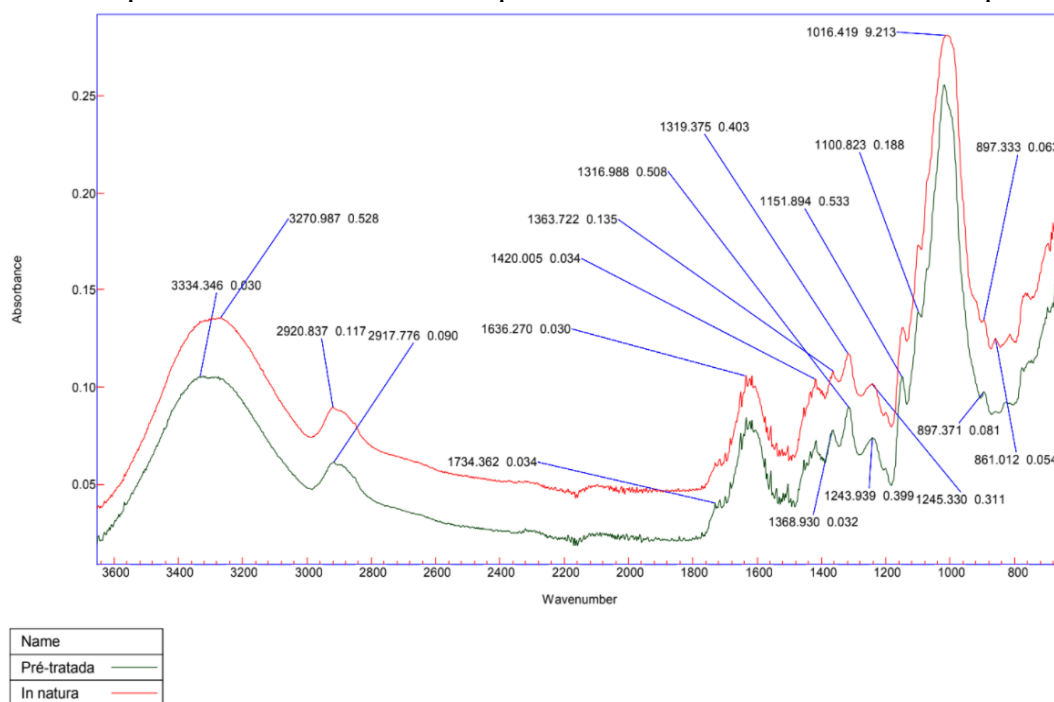
5.2 Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros da biomassa *in natura* e pré-tratada estão apresentados no Gráfico 2. Percebe-se que os espectros apresentaram um alto pico de absorbância, próximo à banda 1015

cm^{-1} , em que ocorrem deformações C-H e C-O, características da celulose. Os picos apresentados entre as bandas 1100 e 1150 referem-se às vibrações C-O-C de anéis aromáticos, características de celulose e hemicelulose. Entre as bandas 1675-1660 cm^{-1} , ocorre o estiramento C=O em anel aromático conjugado, presente na lignina. Entre as bandas 3300 e 3400 cm^{-1} , houve um aumento de absorvância; nessa região, ocorre a vibração axial da hidroxila, presença de álcoois e fenóis com ligação de hidrogênio, indicando presença de água, fenóis e celulose (HOAREAU et al., 2004; PASTORE et al. 2008; NANDIYANTO, OKTIANI e RAGADHITA, 2019; DARCIE et al., 2021).

Os espectros de FTIR apresentaram perfil muito semelhante, o que evidencia que o pré-tratamento utilizado não alterou em grandes proporções os componentes lignocelulósicos da biomassa.

Gráfico 2 – Espectros do Infravermelho do pseudocaule da bananeira *in natura* e pré-tratada.



Fonte: Autora, 2021.

5.3 Atividades enzimáticas das celulases

Os dados das atividades enzimáticas avaliadas (CMCase, Avicelase e FPase) estão apresentados na Tabela 6. Alguns estudos, utilizando diferentes microrganismos e substratos indutores de celulases, foram selecionados a fim de comparar com os resultados do presente trabalho.

Tabela 6 - Comparação das atividades de celulase produzida por cepas de fungos celulolítico.

Microrganismo	Substrato	Atividade Enzimática (U/g)			Referência
		CMCase	Avicelase	FPase	
<i>P. oxallicum</i> (F-3380)	PB (<i>in natura</i>)	1,54	1,31	2,33	Estudo atual
<i>P. oxallicum</i> (F-3380)	PB (Pré-tratada)	0,52	0,94	1,29	
<i>P. oxallicum</i> (F-3380)	S	9,2	8,4	4,2	Bomtempo et al. (2017)
<i>P. oxallicum</i> (F-3380)	BC	1,3	1,6	3,3	
<i>Aspergillus niger</i>	BC	2,4	-	1,09	Cavalcante et al. (2018)
	SB	3,37	-	1,06	
<i>Trichoderma reesei</i>	BC	-	-	25,6	Mekala et al. (2008)

PB - Pseudocaule da bananeira, S BC- Bagaço de cana-de-açúcar e SB – Sabugo de milho.

De acordo com os dados da Tabela 6, percebe-se que as celulases produzidas na biomassa *in natura*, neste estudo, apresentaram maiores atividades enzimáticas que as produzidas na biomassa pré-tratada. Os fungos precisam de celuloses para produzir celulases. Os teores de celulose da biomassa *in natura* e pré-tratada foram próximos, sendo o da biomassa pré-tratada (40,58%) superior à da *in natura* (35,86%). Logo a diferença dos resultados das atividades enzimáticas, nas duas biomassas avaliadas, não poderia ser explicada pelo percentual desse componente. Supõe-se que a menor atividade enzimática das celulases, produzida, na biomassa pré-tratada, tenha sido ocasionada por inibidores originados no pré-tratamento.

Bomtempo et al. (2017) apresentam as maiores atividades enzimáticas obtidas em seu estudo de otimização das condições de produção de enzimas, da mesma cepa desse estudo (*P. oxallicum* F-3380), utilizando sorgo e bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Os resultados de CMC (9,2 U/g) e Avicelase (8,4 U/g), no sorgo, foram consideravelmente superiores às do presente estudo. Já a FPase do sorgo (4,2 U/g), assim como todas as atividades enzimáticas avaliadas (CMC, Avicelase e FPase) na cana-de-açúcar, foi próxima aos resultados obtidos.

Os dados das atividades enzimáticas de Cavalcante et al. (2018) das enzimas obtidas pelo fungo *Aspergillus niger*, mostram que tanto a CMC (2,4 U/g) e FPase (1,09 U/g), no bagaço de cana-de-açúcar, como a CMC (3,37 U/g) e FPase (1,06 U/g), no sabugo de milho, também foram semelhantes aos dados do presente estudo.

Todas as celulases analisadas, no presente estudo, tanto as produzidas em biomassa *in natura* quanto em biomassa pré-tratada, apresentaram FPase consideravelmente inferior ao resultado obtido por de MeKala et al. (2008), utilizando o *Trichoderma reesei* e o bagaço da cana-de-açúcar (25,6 U/g). Isso é de se esperar, já que este mesmo fungo é considerado

referência na produção comercial de celulases. No entanto, ainda assim, considera-se que a cepa analisada (*P. oxalicum* F-3380) obteve resultados atrativos.

Bomtempo et al. (2017) e Cavalcante et al. (2018), utilizando o mesmo substrato (bagaço de cana-de-açúcar) e microrganismos diferentes (*Penicillium oxalicum* e *Aspergillus niger*, respectivamente) obtiveram resultados próximos de CMC_{Case} (3,5 e 2,4 U/g) e FPase (3,3 e 1,09 U/g). No entanto, as maiores atividades enzimáticas foram das celulases produzidas pelo fungo *Penicillium oxalicum*. Tanto os resultados de Bomtempo et al. (2017) como o atual estudo comprovam a potencialidade do fungo *Penicillium oxalicum* (F-3380) como produtor de celulases.

5.4 Hidrólise enzimática

5.4.1 Hidrólise da biomassa *in natura* com EEB 1

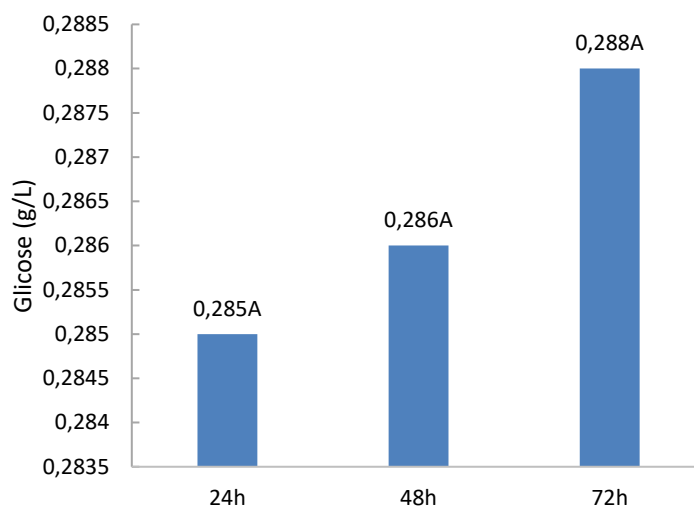
A Tabela 7 apresenta a ANOVA utilizada para verificar, ao nível de 5%, a significância dos períodos avaliados (24, 48 e 72h) em relação a liberação de glicose (g/L). Nota-se que não houve diferença significativa na liberação de glicose entre os referidos períodos. O Gráfico 3 expõe o quantitativo de glicose (g/L) liberada em cada um dos períodos avaliados.

Tabela 7 - ANOVA da liberação de glicose (g/L) nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Horas	2	0,000104	0,000052	0,015	5,78	0,9848
Erro	51	0,172328	0,003379			
Total Corrigido	53	0,17431				
CV (%)	20,29					
Média geral	0,28648					
Número de observações	54					

Fonte: Autora, 2021.

Gráfico 3 – Liberação de glicose (g/L) nos períodos de 24, 48 e 72 horas.



Fonte: Autora, 2021.

O gráfico acima mostra que a glicose liberada (g/L) entre 24, 48 e 72 horas foi semelhante ($p > 0,05$), variando de 0,285 – 0,288 g/L. De acordo com Medeiros (2014), esse comportamento de liberação de glicose, após o tempo de 24h, pode ser atribuído à inibição gerada pela própria enzima, que ocorre de forma natural, quando o meio de reação já se encontra com uma determinada concentração de glicose. Outra hipótese é a possível inibição gerada no pré-tratamento.

Como, estatisticamente, os resultados não apresentaram diferença, observa-se que o tempo de reação de 24 h parece ser mais viável que manter o processo hidrolítico até 48 ou 72 h, pelo fato do menor gasto energético e menor tempo no processo. Sendo assim, foi utilizada a glicose obtida em 24h, para o cálculo de rendimento de hidrólise (RH), conforme apresentado na Tabela 8.

Com o intuito de verificar o efeito das variáveis e suas interações, em nível de significância de 5%, foram gerados os cálculos de coeficientes de regressão dos fatores lineares, quadráticos e das interações, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 8 - Planejamento Experimental, utilizando com três variáveis (biomassa, enzima e pH), para a Concentração e Rendimento de glicose na etapa de hidrólise enzimática.

Ensaio	Biomassa (g)	Enzimas (ml)	pH	Biomassa (mg)	Enzimas (ml)	pH	Concentração de glicose (g/L)	RH (%)
Variáveis Codificadas			Variáveis Reais			Respostas		
24h								
1	-1	-1	-1	28	1	4	0,21	17,62
2	1	-1	-1	52	1	4	0,34	15,22
3	-1	1	-1	28	3	4	0,28	26,17
4	1	1	-1	52	3	4	0,37	18,95
5	-1	-1	1	28	1	6	0,22	18,35
6	1	-1	1	52	1	6	0,34	15,30
7	-1	1	1	28	3	6	0,25	24,19
8	1	1	1	52	3	6	0,33	16,72
9	-1,68	0	0	20	2	5	0,21	26,36
10	1,68	0	0	60	2	5	0,39	16,20
11	0	-1,68	0	40	1	5	0,25	14,12
12	0	1,68	0	40	3	5	0,33	22,53
13	0	0	-1,68	40	2	4	0,25	15,46
14	0	0	1,68	40	2	6	0,29	18,37
15	0	0	0	40	2	5	0,28	17,37
16	0	0	0	40	2	5	0,24	14,97
17	0	0	0	40	2	5	0,30	18,51
18	0	0	0	40	2	5	0,30	18,94

Fonte: Autora, 2021.

Tabela 9 - Coeficientes de Regressão do rendimento em 24 h.

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	T calculado	p-valor
Média	17,44	0,70	24,74	0,0000
X₁	-2,73	0,38	-7,13	0,0001
X₁²	1,39	0,40	3,49	0,0082
X₂	2,47	0,38	6,46	0,0002
X ₂ ²	0,34	0,40	0,86	0,4158
X ₃	0,11	0,38	0,29	0,7819
X ₃ ²	-0,16	0,40	-0,40	0,7013
X₁.X₂	-1,16	0,50	-2,31	0,0494
X ₁ .X ₃	-0,11	0,50	-0,23	0,8273
X ₂ .X ₃	-0,63	0,50	-1,26	0,2442

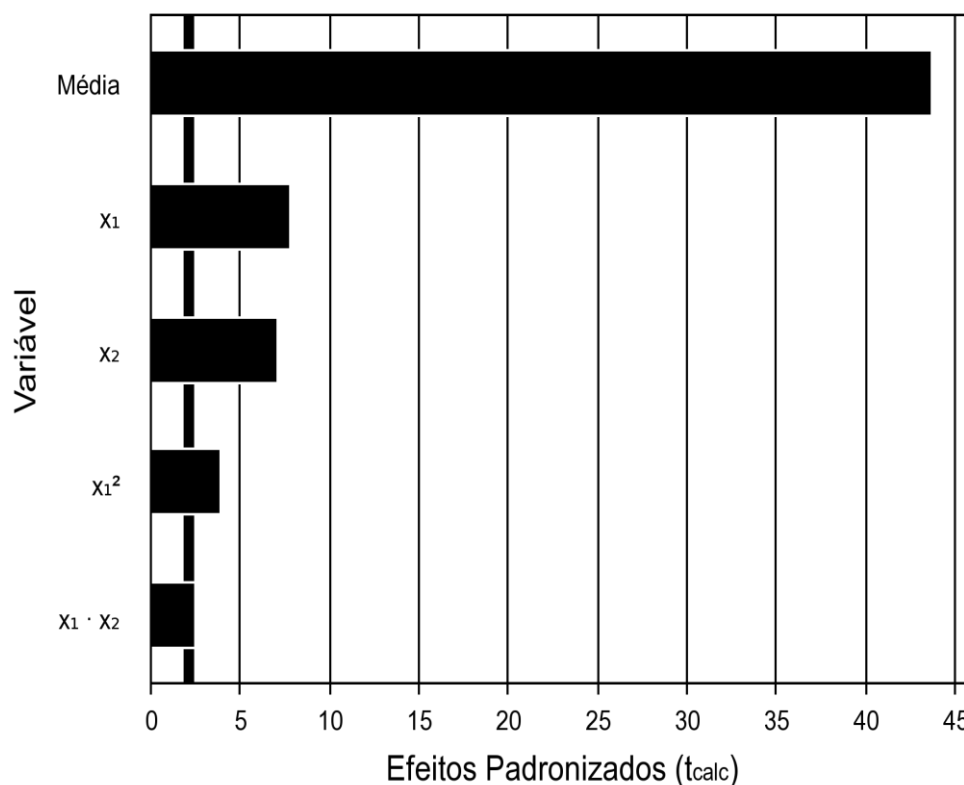
X₁= Biomassa (mg), X₂ = enzima (ml) e X₃= pH.

Fonte: Autora, 2021.

Os dados apresentados na Tabela 9 mostram que as variáveis significativas, em nível de 5%, foram Biomassa (mg), Enzima (ml) e a interação entre elas. O pH não teve interferência significativa nos resultados. Ressalta-se que o pH foi ajustado apenas no início da reação, podendo ter ocorrido variação do decorrer do processo.

O Diagrama de Pareto (Gráfico 4) mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão. A linha vertical mostra que os coeficientes estão significativos em nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Gráfico 4 - Diagrama de Pareto das variáveis significativas dos efeitos padronizados.



X₁= Biomassa (mg), X₂= enzima (ml) e X₃= pH.
Fonte: Autora, 2021.

Mediante os dados experimentais indicados na Tabela 9, foi obtido um modelo matemático (Equação 13) que relaciona o Rendimento de Hidrólise (Y) com as variáveis significativas em nível de 5% de significância, Biomassa (X₁) e enzima (X₂).

$$Y = 17,60 - 2,73 x_1 + 1,35 x_1^2 + 2,47 x_2 - 1,16 x_1 x_2 \quad \text{Equação 13}$$

Para avaliar a qualidade de ajuste do modelo Equação 13, na Tabela 10 são apresentados os resultados da Análise de Variância (ANOVA), em nível de 5% de significância.

Tabela 10 - ANOVA do Rendimento de Hidrólise em 24h.

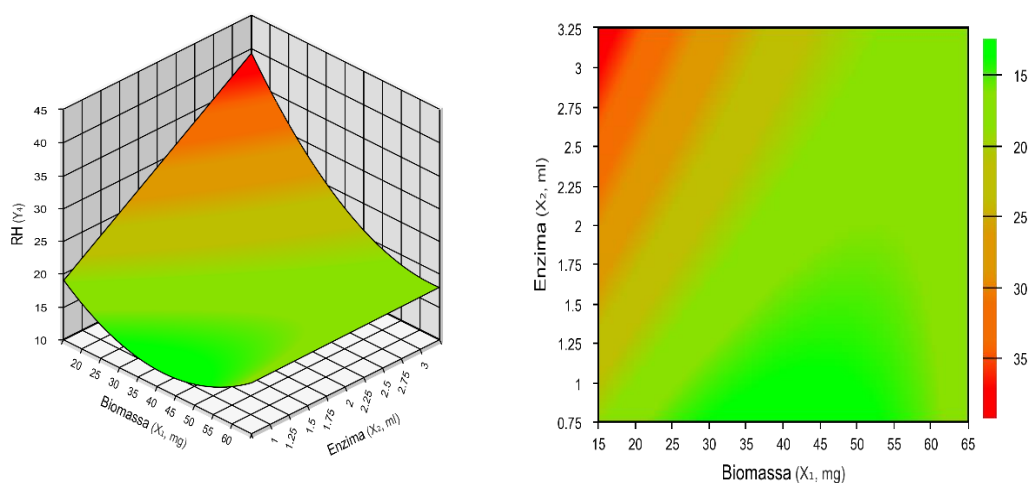
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	F _{tab}	p-valor
Regressão	220,2	4	55,1	33,2	3,179	0,00000
Resíduo	21,5	13	1,7			
Falta de Ajuste	12,0	10	1,2	0,4	8,785	0,89258
Erro Puro	9,5	3	3,2			
Total	241,7	17				

$R^2 = 91,10\%$

Fonte: Autora, 2021.

De acordo com o software Protimiza Experimental Desing, um modelo matemático é considerado estatisticamente significativo, quando o $F_{calc} (\text{regressão/resíduos}) \geq F_{tab}$, o $F_{calc} (\text{falta de ajuste/erro puro}) \leq F_{tab}$ e o R^2 forem suficientes. Desta forma, analisando os resultados da tabela acima, verifica-se que o modelo gerado na regressão é significativo. O R^2 do referido modelo foi de 91,10% que significa que 91,10% dos dados foram bem representados.

A superfície de resposta e curvas de contornos, considerando apenas os efeitos significativos, são apresentadas no Gráfico 5, a fim de demonstrar a tendência do processo estimado pelo modelo encontrado. Ele mostra que maiores rendimentos de hidrólise se encontram na região de tonalidade alaranjada, em que tais rendimentos estão diretamente relacionados com a menor quantidade de biomassa e maior de enzima.

Gráfico 5 - Superfície de resposta (à esquerda) e curva de contorno (à direita) para o rendimento de hidrólise em 24 horas.

Fonte: Autora, 2021.

Observando os resultados da Tabela 8, nota-se que o ensaio 9 foi o que apresentou maior rendimento de hidrólise (26,36%). As condições desse ensaio foram: 20 mg de biomassa e 2 ml de enzima e pH 5, visto que a última variável não foi significativa estatisticamente.

Avaliando os ensaios 9 e 10, que representam os pontos axiais, em que variou apenas o quantitativo de biomassa, percebe-se que o primeiro, possuindo menor quantidade do material lignocelulósico, obteve RH de 26,36%, sendo superior ao segundo ensaio que obteve 16,20% de RH.

Em relação pontos axiais, em que variaram apenas a quantidade de enzima, ensaios 11 e 12, nota-se que o ensaio 11, que possuía menor quantidade de enzima, apresentou RH de 14,12%, inferior ao ensaio 12, que obteve RH de 22,53%.

Alves (2017), em seu estudo sobre otimização da hidrólise enzimática, na casca do arroz, obteve, nos pontos axiais referentes à quantidade de biomassa, maior RH no ensaio que continha menor quantidade de biomassa. O mesmo estudo, nos pontos axiais referentes à quantidade de enzima, obteve maior RH no ensaio que continha maior quantidade de enzima.

Como visto, o maior RH entre os ensaios avaliados ocorreu pela menor quantidade de biomassa e maior de enzima, que facilita a ação das enzimas na degradação da biomassa.

Obs. Apesar da EEB 2 apresentar a maior atividade enzimática, levando a vantagem do não uso do pré-tratamento, a EEB 1 foi escolhida, para realizar o estudo com condições de hidrólise. Em razão de problemas com ensaios testes a quantidade EEB2 não seria suficiente para ser utilizada nos 18 ensaios.

5.4.2 Hidrólise da biomassa *in natura* com EEB2

Com já mencionado, o ensaio 9 foi o que apresentou maior RH (26,36%) entre os 18 ensaios (Tabela 8) utilizando a EEB1. Assim, foram escolhidas as mesmas condições de hidrólise desse ensaio para a realização da hidrólise da biomassa *in natura* com o EEB2, que foi: 20 mg de biomassa, 2 ml de enzima e pH 5. Vale ressaltar que o pH não foi uma variável significativa. No entanto foi utilizado, para a presente hidrólise, o mesmo pH do ensaio 9, a fim de comparação com os dados da hidrólise anterior.

O RH obtido foi na hidrólise com o EEB 2 de $42\% \pm 1,71$. Comparando-se com o rendimento obtido, utilizando o EEB1, percebe-se que houve um aumento de 37,24%. Isso pode se explicar pelo fato das atividades enzimáticas do EEB2 serem maiores que a EEB1 (Tabela 6). O EEB 1, por ter sido produzido em biomassa pré-tratada, pode conter presença de

inibidores, que tenham limitado a produção de glicose. Neste sentido, é mais viável a hidrólise em biomassa *in natura*, por reduzir custos, em relação ao pré-tratamento e obter maior rendimento em comparação com a pré-tratada.

O RH, utilizando o EBB2 (42%), foi relativamente próximo ao encontrado em outras biomassas, como o capim-elefante (53,9%) (SIQUEIRA, et al., 2016) e o bagaço de cana-de-açúcar (57,7%) (ANDRADE et al., 2019), que é uma das principais matérias-primas utilizadas, atualmente, para a produção de etanol lignocelulósico. Logo, nota-se que o pseudocaule da bananeira *in natura* tem potencial para o aproveitamento de etanol lignocelulósico.

6 CONCLUSÃO

- O pré-tratamento hidrotérmico, nas condições utilizadas (121°C/30min), não promoveu grandes variações nos percentuais de celulose, lignina e hemicelulose. Além disso, pode ter sido o fator limitante nas atividades enzimáticas e, conseqüentemente, no rendimento de hidrólise.
- A Cepa *P. Oxalicum F- 3380* possui potencial para produzir enzimas celulolíticas. As atividades enzimáticas avaliadas (CMCase, Avicelase e FPase) do extrato produzido pelo fungo *P. Oxalicum F- 3380*, em biomassa *in natura*, obtiveram resultados superiores comparados com o extrato enzimático produzido em biomassa pré-tratada, o que promove a redução de custos para a sua produção;
- A hidrólise enzimática do pseudocaule *in natura* com EEB1, nas condições avaliadas, considerou somente o quantitativo de biomassa e enzima como variáveis significativas. O modelo proposto foi considerado significativo, o que demonstra ser adequado para as respostas desejadas;
- A hidrólise enzimática do pseudocaule *in natura* com o EEB2 obteve RH superior a hidrólise com EEB1, demonstrando assim ser mais eficaz e econômico.
- O pseudocaule da bananeira *in natura* mostrou-se atrativo para a produção de etanol lignocelulósico. É necessário que haja mais estudo sobre como intensificar seu rendimento, como testar outros tipos de pré-tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAFRUTAS - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frutas e Derivados. 2019. Acesso em: 09/08/2021. Disponível em:<
<https://abrafrutas.org/2019/02/abrafrutas-trabalha-para-que-o-brasil-se-torne-um-dos-cinco-maiores-exportadores-de-frutas-do-mundo/>>.
- AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulases por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.
- ALVES, E. J. et al. Tratos culturais e colheita. **O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Editora Embrapa Mandioca e Fruticultura**, p. 107-131, 2004.
- ALVES, F. S. Otimização e avaliação do processo de hidrólise enzimática da casca de arroz. Dissertação, Universidade Federal do Tocantins, 2017.
- ALBERNAS-CARVAJAL, Y. et al. Optimal design for an ethanol plant combining first and second-generation technologies. **CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 5, n. 5, p. 97-120, 2014.
- AMOAHA, J. et al. Bioenergy and Biorefinery: feedstock, biotechnological conversion and products. **Biotechnology journal**, v. 14, n. 6, p. 1-12, 2019.
- ANDRADE, P. F. S. Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/17. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento**, 2017.
- ANDRADE, Thaysi CC et al. Hidrólise Enzimática de Celulose para Obtenção de Glicose Utilizando Líquido Iônico como Meio Solvente. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, 2019.
- BAKSI, S. et al. Efficacy of a novel sequential enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass and inhibition characteristics of monosugars. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 634-644, 2019.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BASTIANELLO, S. F. et al. Avaliação das propriedades físicas e mecânicas de papéis reciclados artesanais com resíduos de bananeira ou palha de arroz. **Revista Matéria**, v. 14, n. 4, p. 1172 –1178, 2009.
- BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Fábricas de células microbianas**, v. 15, n. 1, p. 106, 2016.
- BINOD, Parameswaran et al. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317-325, 2019.
- BHUSHAN, S. et al. Energy harnessing from banana plant wastes: A review. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. 100212, p. 1-2, 2019.

BOMTEMPO, F. V.S. et al. Production of cellulases by *Penicillium oxalicum* through solid state fermentation using agroindustrial substrates. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 321-329, 2017.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S.; ALVES, E. J. Exigências edafoclimáticas. *In*: CORDEIRO, Z. J. M. **Banana. Produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 17-23, 2000.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. O cultivo da bananeira. **EMBRAPA**. Cruz das Almas. 2004.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S.; CORDEIRO, Z.J.M. Cultivo orgânico da bananeira. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Circular técnica**, n. 81, p. 1-10, 2006.

BORGES, A. L. et al. **A cultura da banana**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. – 3º ed. **Rev. e amp.** (Coleção Plantar, 56). Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 1-110, 2006.

BORGES, A. L. et al. Sistema de produção da bananeira irrigada. **Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, p. 1-115, 2009.

BRISSAC, D.C.O. et al. Deslignificação do pseudocaule da bananeira pelo caldo de cultivo enzimático de *Pleurotus sajor-caju*. **Revista Matéria**, v.23, n.4, p. 1-10, 2018.

CAVALCANTE, P. A. W. et al. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulases por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n. 6, 2018.

CHOONG, F.X. et al. Nondestructive, real-time determination and visualization of cellulose, hemicellulose and lignin by luminescent oligothiophenes. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.

DA SILVA BARROS, E. C. et al. A utilização da banana como fonte de renda para pequenos produtores. **LINKSCIENCEPLACE-Interdisciplinary Scientific Journal**, v. 3, n. 2, 2016.

DARCIE, L. R. et al. Utilização de biomassa lignocelulósica como potencial removedor de Rodamina B Utilization of lignocellulosic biomass as a potential Rhodamine B remover. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 66756-66771, 2021.

DE ALMEIDA LIMA, U. Produção de etanol com matérias-primas sacarinas. *In*: DE ALMEIDA LIMA, U. **Processos fermentados e enzimáticos**. 2. ed., Editora: Blucher, v. 3, 2019. p. 19-69.

DÍAZ, Sara et al. Assessment of the effect of autohydrolysis treatment in banana's pseudostem pulp. **Waste Management**, v. 119, p. 306-314, 2021.

DING, D. et al. Synergy of hemicelluloses removal and bovine serum albumin blocking of lignin for enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 273, p. 231-236, 2019.

DOS SANTOS, A. C. et al. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic

Biomass. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518-531, 2019.

DOS SANTOS ROCHA, M. S. R.; ALMEIDA, R. M. R. G.; DA CRUZ, A. J. G. Avaliação do potencial energético de resíduos agroindustriais provenientes de diferentes regiões brasileiras. **Engevista**, v. 19, n. 1, p. 217-235, 2017.

DOS SANTOS-ROCHA, M. S. R. et al. Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração. **Scientia Plena**, v. 13, n. 3, 2017.

DOTSENKO, A. S. et al. Complex effect of lignocellulosic biomass pretreatment with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid on various aspects of ethanol and fumaric acid production by immobilized cells within SSF. **Bioresource technology**, v. 250, p. 429-438, 2018.

EL-ZAWAWY, W. K. et al. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate polymers**, v. 84, n. 3, p. 865-871, 2011

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional (BEN) 2019**. Relatório Síntese / Ano Base 2018. Disponível em: < <http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-377/topico-470/Relat%C3%B3rio%20S%C3%ADntese%20BEN%202019%20Ano%20Base%202018.pdf>>. Acesso em: 10/05/2020.

ERDOCIA, X. et al. Effect of different organosolv treatments on the structure and properties of olive tree pruning lignin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1103-1108, 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization Medium-term Outlook: Prospects for global production and trade in bananas and tropical fruits 2019 to 2028. 2020.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Cultivares de banana**. Disponível em:< <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.YRqvYYhKhPY>>. Acesso em 18/05/2020.

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação-Documentos (INFOTECA-E)**, p. 1-13, 2011.

FEI, X. et al. Study on enzymatic hydrolysis efficiency and physicochemical properties of cellulose and lignocellulose after pretreatment with electron beam irradiation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p.733-739, 2019.

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. **Rev. Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, MS – v. 12, n.1, 2015.

FERREIRA, V. F; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FERREIRA, C. F. et al. (Ed.). O agronegócio da banana. Brasília: **EMBRAPA**, 2015.

- FIGLIANO, C. H. U. et al. Aferição do pseudocaule dos resíduos da bananicultura para a produção de biocombustível. **Multidisciplinary Science Journal**, v. 2, p. e2020001-e2020001, 2020.
- FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Quím. Nova**, v.40, n. 9, p. 1082-1093, 2017.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 548 2, p. 257-268, 1987.
- GONÇALVES FILHO, L. C. Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: Avaliação de diferentes processos de despolimerização. **Dissertação. Universidade da Região de Joinville**, 2011.
- GUERRA, A. G.; MENDONÇA, V. Manual de fruticultura tropical: banana, caju, goiaba e mamão. **Clube de Autores**, 375p., 2013.
- GUERRERO, A.B.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Optimal conditions of acid-catalysed steamexplosion pretreatment of bananalignocellulosic biomass for fermentable sugarproduction. **Journal of Chem Technol Biotechnology**, v. 92, n. 9, p. 2351-2359, 2017.
- GUERRERO, A. B.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. **Fuel**, v. 213, p. 176-185, 2018.
- GUIMARÃES, A. F.; COLAVITE, A.P.; SILVA, E. A. A rede de produção de biocombustíveis da região sul do Brasil. **Revista de Geografia**, v. 36, n. 3, p. 63-82, 2019.
- GUSAKOV, A. V. Alternativas a Trichoderma reesei na produção de biocombustíveis. **Tendências em biotecnologia**, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.
- HALDAR, D.; PURKAIT, M. H. Lignocellulosic conversion into value-added products: a review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, 2020.
- HERNÁNDEZ, C. C; VÉLIZ-LORENZO, E.; MARTÍNEZ, J. M. A. Alternative pretreatments of rice and tobacco wastes for the production of fermentable sugars. **Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia**, n. 91, p. 24-30, 2019.
- HOAREAU, W. et al. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: Characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 3, p. 567-576, 2004.
- IBGE. LSPA. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**. Banana. Área plantada, área colhida e produção de banana - safras de 2020. Ano 2021.
- JARDINE, J. G.; DISPATO, I.; PERES, M. R. Considerações Sobre o Bioetanol Lignocelulósico para Subsidiar a Elaboração de Conteúdo da Árvore do Conhecimento Agroenergia. **Embrapa Informática Agropecuária-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.
- JAYAPRABHA, J. S.; BRAHMAKUMAR, M.; MANILAL, V. B. Banana pseudostem

characterization and its fiber property evaluation on physical and bioextraction. **Journal of Natural Fibers**, v. 8, n. 3, p. 149-160, 2011.

JIANG, L. et al. Selective saccharification of microwave-assisted glycerol pretreated corncobs via fast pyrolysis and enzymatic hydrolysis. **Fuel**, v. 265, p. 116965, 2020.

JING, L. et al. Isolation and characterization of a novel *Penicillium oxalicum* strain Z1-3 with enhanced cellobiohydrolase production using cellulase-hydrolyzed sugarcane. **Industrial crops and products**, v. 77, p. 666-675, 2015.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.

LENFERNA, G. A. Can we equitably manage the end of the fossil fuel era? **Energy research & social science**, v. 35, p. 217-223, 2018.

LEONARD, M. D.; MICHAELIDES, E. E.; MICHAELIDES, D. N. Energy storage needs for the substitution of fossil fuel power plants with renewables. **Renewable Energy**, v. 145, p. 951-962, 2020.

LI, X. et al. Determination of hemicellulose, cellulose and lignin in moso bamboo by near infrared spectroscopy. **Scientific reports**, v. 5, n. 17210, p. 1-11, 2015.

LI, Y. et al. Economic viability and environmental impact investigation for the biofuel supply chain using co-fermentation technology. **Applied Energy**, v. 259, p. 1-21, 2020.

LINO, A.G. Composição química e estrutural da lignina e lipídios do bagaço e palha da cana-de-açúcar. 2015. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Viçosa.

LINZMEYER, P. et al. Effects of by-products of fermentation of banana pseudostem on ethanol separation by pervaporation. **Biotechnology progress**, v. 35, n. 4, p. 1-10, 2019.

LOPES, J. G.; SANTOS, K. C.; COSTA, A. A. Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Cad. Prospec.**, v. 10, n. 3 p.590-599, 2017.

LORENZI, B. R.; ANDRADE, T. H. N. O etanol de segunda geração no Brasil: políticas e redes sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, n. 100, p. 1-19, 2019.

LUNA, S.V.; OLIVEIRA JÚNIOR, A.I. Uso de resíduos oriundos da bananeira no desenvolvimento de artesanato em uma comunidade localizada no cariri cearense. In: SILVA, R. C. P.; SANTOS, J. P. O.; MELLO, D. P.; EL- DEIR, S. G. **Resíduos sólidos: tecnologia e boas práticas de economia circular**. 1. ed., 2018, p. 485-498.

MACÊDO JÚNIOR, G. L. et al. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. **Ciência Animal**, v. 17, n. 1, p. 7-17, 2007.

MAIONE, N. R. et al. Efeito da temperatura e do tempo no pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte/Effect of temperature and time on hydrothermal pretreatment of malt bagasse. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 15229-15235, 2019.

MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry**. v. 95, p. 391-414, 1969.

MARTINEZ, Diego et al. Sequenciamento de genoma e análise do fungo degradador de biomassa *Trichoderma reesei* (sin. *Hypocrea jecorina*). **Nature biotecnologia**, v. 26, n. 5, p. 553-560, 2008.

MATOS, A. P.; VASCONCELOS, JAR; SIMÃO, A. H. Práticas de cultivo para a cultura da banana no Estado do Tocantins. **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Documentos (INFOTECA-E)**, 2019.

MEKALA, N. K. et al. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: statistical optimization of process parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2, p. 122-131, 2008.

MEDEIROS, G. A. Utilização de líquidos iônicos na obtenção de glicose a partir de materiais lignocelulósicos e no estudo mecanístico da reação de UGI. Dissertação. Universidade de Brasília (UNB). Brasília, 2014.

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

MONTAGNOLI, M. S. et al. Análise da produção de etanol 2G de pseudocaule de bananeira por cocultura microbiana em bateladas sequenciais. **Dissertação de mestrado**, UFSC, 2017.

MORAES, M. L.; BACCHI, M. R. P. Etanol: do início às fases atuais de produção. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n. 4, p. 5-22, 2015.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. FREITAS; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. Embrapa Algodão, p. 11- 54, 2010.

MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, Rosi; RAGADHITA, R. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 97-118, 2019.

NIPHADKAR, S.; BAGADE, P.; AHMED, S. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. **Biofuels**, v. 9, n. 2, p. 229-238, 2017.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

NGAMSIRISOMSAKUL, M. et al. Enhanced bio-ethanol production from *Chlorella* sp. biomass by hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 141, p. 482-492, 2019.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda geração? Embrapa Agroenergia-

Circular Técnica (INFOTECA-E), p. 1-6, 2011.

PASTORE, T. C. M. et al. Efeito do intemperismo artificial em quatro madeiras tropicais monitorado por espectroscopia de infravermelho (DRIFT). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2071-2075, 2008.

RABELO, S. C.; PRADELLA, J. G. C.; IENCZAK, J. L. Produção de Etanol de Segunda Geração. *In*: LIMA, U. de A. **Processos Fermentativos e enzimáticos**, 2º Edição, Editora Edgard Blucher Ltda, p. 107-147, 2019.

RAMBO, J. R. et al. Análise financeira e custo de produção de banana-maçã: um estudo de caso em Tangará da Serra, Estado do Mato Grosso. **Informações econômicas**, v. 45, n. 5, p. 29-39, 2015.

RAUD, M. et al. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 111, p. 44-56, 2019.

REZENDE, D. B.; PASA, V. M. D. Tendências e oportunidades nas pesquisas em biocombustíveis. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 3, p. 561-572, 2017.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. 2º edição. São Paulo. Editora Blucher, 2007.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Sistema de produção de destilado de vinho. **EMBRAPA Uva e Vinho**. 2008. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/DestiladoVinho/destilacao.htm> > Acesso em, 10/03/2020.

RODRIGUES, C. et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações**, v. 4, p. 283-314, 2014.

RODRIGUES, J. S. et al. Isolamento e caracterização de lignina acetossolve extraída do bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Virtual Química**, v. 12, n. 4, 2020.

ROSA, M. de F.; PEREIRA, LSP; MORAIS, J. P. S. Processo de obtenção de nanocristais de celulose a partir do pseudocaule de bananeira. **Embrapa Agroindústria Tropical- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2021.

ROSA, J. L. M; PINHEIRO, I. R. Planejamento Experimental DCCR aplicando a Hidrólise Enzimática do bagaço de Laranja empregando as enzimas Celulases e Pectinases. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 3191-3208, 2021.

RUIZ, H. A. et al. A importância dos pré-tratamentos no conceito das biorrefinarias. **biotecnologia**, p. 3-6, 2013.

SALIBA, Eloísa de Oliveira Simões et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência rural**, v. 31, n.5, p. 917-928, 2001.

SALOMÃO, L. C. C. et al. Crescimento e produção da bananeira (*Musa spp.AAB*)Prata-Anã´

oriunda de rizoma e micropropagada. **Rev. Ceres**, v. 63, n. 3, p. 340-347, 2016.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SAYAR, N. A. et al. Bioethanol Production From Turkish Hazelnut Husk Process Design and Economic Evaluation. *Waste and Biomass Valorization*, v. 10, n. 4, p. 909-923, 2019.

SCHNEIDER, W. D. H. et al. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 162-170, 2018.

SCHULTZ, E. L. Informações patentárias sobre etanol lignocelulósico. Embrapa Agroenergia - **Circular Técnica** (INFOTECA-E), p. 1-7, 2012.

SEAGRO - Secretaria da Agricultura, Pecuária e Aquicultura. Produção de banana está em expansão no projeto hidroagrícola Manuel Alves. 2015. Acesso em 06/06/2021. Disponível em: < <https://www.to.gov.br/seagro/noticias/producao-de-banana-esta-em-expansao-no-projeto-hidroagricola-manuel-alves/1xcqcrtdiayf> >.

SIDHU, J. S.; ZAFAR, T. A. Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Quality and Safety*, v. 2, n. 4, p. 183-188, 2018.

SILVA, M. B. L.; RAMOS, A. M. Composição química, textura e aceitação sensorial de doces em massa elaborados com polpa de banana e banana integral. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 56, n.5, p. 551-554, 2009.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, J. D.; JESUS, J. C.; COUTO, S. M. Noções sobre Fermentação e Produção de Álcool na Fazenda. SILVA, J. D. **Produção de Álcool na Fazenda**, 2011, p. 17-47.

SILVA, I. F. Potencial do pseudocaule de bananeira (cultivar prata anã) para a produção de etanol de segunda geração. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Viçosa, 2016.

SIQUEIRA, L. N. et al. Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 4, p. 191-96, 2016.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, v. 1617, n. 1, p. 1-16, 2008.

SOFFNER, M. de L. A. P. Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.

SOUSA, J. L. U.; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, v. 2, n. 08, p. 1-8, 2011.

SOUSA, A. S. et al. A Produção de Banana e seus Impactos Socioeconômicos no Desenvolvimento da Microrregião de Araguaína-TO. 2019. **Revista Observatório**, v. 5, n. 5, p. 314-350, ago. 2019.

SOUZA, E. L. D. et al. Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 271-276, 2014.

SOUZA, O. et al. Energia alternativa de biomassa: Bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 16, n. 8, p. 915-921, 2012.

SOUZA, O. et al. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2010.

SOUZA, R. B. A. de et al. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos- SP. 2016.

SUN, J. X. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer degradation and stability**, v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004.

TEIXEIRA D. A. et al. Produção de etanol de segunda geração a partir de aguapé: uma revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 127-143, 2019.

UCHÔA, P. Z. et al. Ethanol from residual biomass of banana harvest and commercialization: A three-waste simultaneous fermentation approach and a logistic-economic assessment of the process scaling-up towards a sustainable biorefinery in Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 174, p. 114170, 2021.

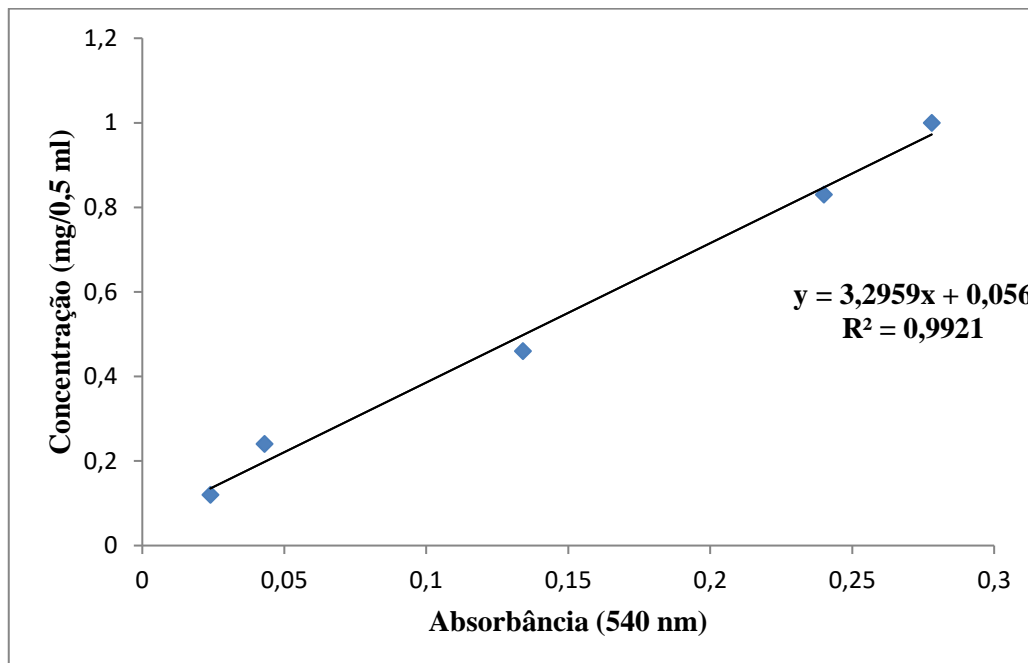
VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

WANG, Y. et al. Characterization and comparison of lignin derived from corncob residues to better understand its potential applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 134, p. 20-27, 2019 (a).

WANG, Z. W. et al. Effects of hydrothermal treatment on enhancing enzymatic hydrolysis of rapeseed straw. **Renewable energy**, v. 134, p. 446-452, 2019 (b).

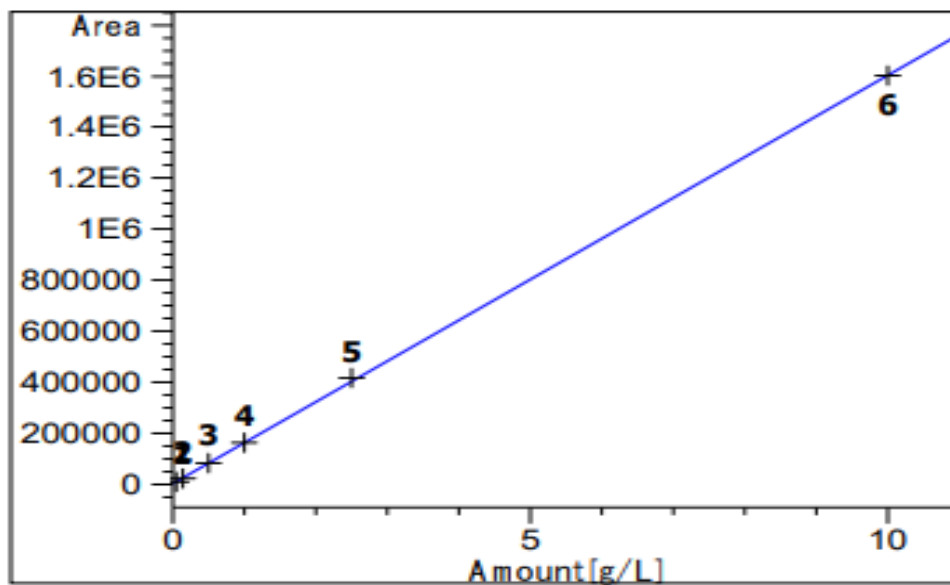
WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 75-90, 1988.

ANEXO I

Gráfico 6 - Curva de calibração de Glicose em função da absorbância em 540nm.

ANEXO II

Gráfico 7 - Curva calibração de Glicose do HPLC.



RT: 12.851

RID1 A,

Refractive Index Signal

Intervalo da curva: 0,05 – 10 (g/L)

Correlation: 0.99996

Residual Std.

Dev.: 6009.01684

Formula: $y = mx + b$

m: 160201.62747

b: 3326.40923

x: Amount[g/L]

y: Area