

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAPHAEL SARRAF MARTINS TORRACA

**PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM FOLHAS DE
MANDIOCA PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

POÇOS DE CALDAS/MG

2019

RAPHAEL SARRAF MARTINS TORRACA

PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM FOLHAS DE
MANDIOCA PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melina Savioli Lopes.

Coorientador: Dr. Rogério Adelino de Sousa.

Poços de caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

T688p Torraca, Raphael Sarraf Martins.

Pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática em folhas de mandioca para a obtenção de etanol de segunda geração / Raphael Sarraf Martins Torraca. -- Poços de Caldas/MG, 2019.

57 f. –

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.

Bibliografia.

1. Etanol. 2. Mandioca. 3. Celulose. 4. Hidrólise. 5. Biocombustíveis.
I. Lopes, Melina Savioli. II. Título.

CDD – 660

RAPHAEL SARRAF MARTINS TORRACA

**PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM FOLHAS
DE MANDIOCA PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 12 de novembro de 2019.



Prof(a.) Dr(a). Melina Savioli Lopes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Michelle da Cunha Abreu Xavier

Instituição: Universidade Federal do Tocantins - UFT



Prof(a.) Dr(a). Grazielle Santos Silva Andrade

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Dedico este trabalho ao meu irmão e minha tia,
por todo amor (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dra. Melina Savioli Lopes e o Dr. Rogério Adelino de Sousa por todo o auxílio prestado durante esta pesquisa, pela paciência e compreensão.

Aos técnicos Bruno, Alessandra, Eveline e Valéria, pela disposição durante o período em que permaneci realizando a pesquisa.

A Ana Luiza pelo companheirismo durante os momentos em que trabalhamos juntos nos experimentos.

Ao professor Rafael Firmani por ceder o uso de equipamentos necessários aos ensaios.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas pela colaboração.

A banca examinadora da qualificação, professores Dr^a. Grazielle Santos e Dr. Rodrigo Basso, pelas sugestões.

Todos os funcionários da UNIFAL que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

As mulheres da minha vida, minha mãe Glória, minha avó Jeanete, minha irmã Elaine e a minha esposa Andréia, por sempre estarem ao meu lado, as quais são os meus pilares.

Ao meu irmão e minha tia (*in memoriam*), por todo o incentivo e apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

Este trabalho propõe o uso das folhas das plantas da mandioca como meio de obtenção de Açúcares Redutores Totais (ART) para a produção de etanol de segunda geração. Para tanto, realizaram-se a caracterização da biomassa ao determinar os teores de cinzas, extrativos e de lignina, o pré-tratamento ácido e em seguida a hidrólise enzimática. A determinação dos Açúcares Redutores obtidos durante o pré-tratamento foi realizado através do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e por Cromatografia líquida de alta eficiência por detecção amperométrica pulsada para os carboidratos. Inicialmente, realizou-se um planejamento experimental a partir de um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para determinar as condições do pré-tratamento. As variáveis independentes estudadas por meio do DCCR foram as concentrações de ácido sulfúrico (1 a 3%) e a carga de sólidos (5 a 20%) e a variável resposta ART. Em seguida, utilizou-se de modelagem estatística para calcular os efeitos das variáveis, a elaboração dos modelos preditivos e a ANOVA, sendo que o nível de confiança para o modelo é de 95%. Por meio da análise da superfície de resposta e a curva de contorno, obteve-se o ponto ótimo de 3% H₂SO₄ e 20% de sólidos, os quais foram utilizados para a realização de um novo pré-tratamento na condição ótima e em seguida para a hidrólise enzimática, determinando-se os ART via metodologia DNS. As concentrações obtidas de Açúcares Redutores Totais foram de 55,2g/L para o pré-tratamento ácido e de 8,89g/L para a hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Etanol. Mandioca. Celulose. Hidrólise. Biocombustíveis.

ABSTRACT

This work proposes the use of cassava leaves as a means of obtaining Total Reducing Sugars (TRS) for the production of second generation ethanol. For this, the biomass characterization was performed by determining the ash, extractive and lignin contents, the acid pretreatment and then the enzymatic hydrolysis. The determination of reducing sugars obtained during pretreatment was performed by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) and by high performance liquid chromatography by pulsed amperometric detection for carbohydrates. Initially, an experimental design was carried out from a Central Composite Rotational Design (CCRD) to determine pretreatment conditions. The independent variables studied by CCRD were sulfuric acid concentrations (1 to 3%) and solids loading (5 to 20%) and the TRS response variable. Then, statistical modeling was used to calculate the effects of variables, the elaboration of predictive models and ANOVA, and the confidence level for the model is 95%. Through the analysis of the response surface and the contour curve, the optimum point of 3% H₂SO₄ and 20% solids was obtained, which were used to perform a new pretreatment in the optimal condition and then to enzymatic hydrolysis, determining the TRS by DNS methodology. The concentrations obtained from Total Reducing Sugars were 55.2g/L for acid pretreatment and 8.89g/L for enzymatic hydrolysis.

Keywords: Ethanol. Cassava. Cellulose. Hydrolysis. Biofuels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição geral da biomassa lignocelulósica	14
Figura 2 - Região aérea da planta da mandioca.....	18
Figura 3 - Estrutura da celulose.....	21
Figura 4 - Representação estrutural da hemicelulose	22
Figura 5 - Constituintes da lignina	23
Figura 6 - Diagrama de Pareto	40
Figura 7 - Superfície de resposta para a concentração de ART	41
Figura 8 - Curva de contorno mediante as variáveis independentes	42
Figura 9 - Curva padrão de glicose.....	56
Figura 10- Cromatograma para a composição de açúcares	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das variáveis codificadas	34
Tabela 2 - Matriz do delineamento central composto rotacional	35
Tabela 3 - Percentual das partículas da biomassa retido nas peneiras	38
Tabela 4 - Teores de alguns componentes pertencentes às folhas	38
Tabela 5 - ART liberados mediante planejamento experimental	39
Tabela 6 - ANOVA do modelo	41
Tabela 7 - Resultados obtidos por meio da cromatografia	43
Tabela 8 - Concentrações de carboidratos nas amostras	44
Tabela 9 - Comparativo dos ART obtidos de diferentes biomassas	46
Tabela 10 - Concentrações de glicose e as respectivas Absorbâncias (Abs)	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
2G	Etanol de segunda geração
Abs	Absorbância
ART	Açúcares Redutores Totais
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FPU	Filter-paper units
g	grama
HCl	Ácido clorídrico
HPLC-PAD	High-performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detector
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
L	Litro
mL	Mililitro
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
NREL	National Renewable Energy Laboratory

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	ASPECTOS GERAIS DA MANDIOCA	17
3.1.1	Folhas da Mandioca	19
3.2	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	20
3.2.1	Celulose	20
3.2.2	Hemicelulose	21
3.2.3	Lignina	22
3.2.4	Outros componentes e extrativos	23
3.3	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	24
3.3.1	Pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica	25
3.4	HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	27
3.4.1	Hidrólise enzimática	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	MATÉRIA-PRIMA	29
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	27
4.2.1	Determinação da umidade	29
4.2.2	Determinação granulométrica	30
4.2.3	Determinação de cinzas	30
4.2.4	Determinação dos extrativos	31
4.2.5	Determinação da lignina	32
4.2.5.1	Lignina insolúvel	32
4.2.5.2	Lignina solúvel.....	33
4.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
4.4	PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO	35
4.5	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	36
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	36
4.6.1	Determinação de açúcares por HPLC-PAD	36
4.6.2	Determinação de ART por DNS	37

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA FOLHA DE MANDIOCA	38
5.2	ANÁLISE DOS ART LIBERADOS NO PRÉ-TRATAMENTO.....	39
5.3	DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATOS TOTAIS VIA HPLC-PAD.....	43
5.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	45
6	CONCLUSÃO	47
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE A – Curva padrão de glicose	55
	APÊNDICE B – Cromatograma	57

1 INTRODUÇÃO

A matriz energética mundial ainda é muito dependente das fontes não renováveis. As fontes como petróleo, gás natural e carvão compreendem aproximadamente 81,1% de todo o consumo para obtenção de energia e apenas 9,8% para as fontes provenientes da biomassa de acordo com a Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2018).

No Brasil, o uso em grande escala do etanol como substituto da gasolina iniciou-se quando o presidente Geisel anunciou em 1975 a criação do Programa Nacional do Álcool – Pró-álcool, determinando que na composição da gasolina houvesse 20% de álcool, a qual foi atingida em todo território brasileiro em 1983. No período no qual este programa foi criado, a produção nacional era de 160 mil barris de petróleo por dia, o que representava 20% do consumo do produto no País, portanto o consumo de combustíveis provenientes do petróleo era muito dependente das importações brasileiras, que consumia 50% dos recursos em dólares. Os altos preços do petróleo juntamente com a expansão da agricultura e os baixos preços do açúcar, foram os motivadores para a criação do Pró-álcool (GOLDENBERG, 2008).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2019 foram destinadas 9.812.110 hectares para o plantio da cana-de-açúcar referente à safra de 2019. A safra de cana-de-açúcar de 2018/2019 resultou em uma produção de 33,14 bilhões de litros de etanol, ou seja, um aumento de 21,7% em comparação com o período anterior, conforme a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019). As perspectivas para o etanol de acordo com a sua oferta até o ano de 2030 descrevem uma taxa de crescimento entre 2,9 a 4,8% com uma variação da oferta compreendendo 13,4 bilhões de litros a 24,7 bilhões (EPE, 2018).

As pesquisas para a produção de bicombustíveis provenientes da biomassa, como etanol de segunda geração, estão se tornando cada vez mais comuns. A química verde está estimulando a utilização de fontes renováveis a fim de promover uma maior sustentabilidade, diminuindo a quantidade de resíduos e os impactos ambientais (VAZ JUNIOR, 2017).

Para a produção nacional de etanol de segunda geração, existem duas plantas comerciais da Granbio e Raízen e uma em aplicação no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), as quais produzem, respectivamente, 82, 42 e 3

milhões de litros por ano e até o ano de 2030 estima-se que a produção no Brasil chegue a 2 bilhões de litros (EPE, 2018).

Ao reaproveitar a biomassa, podem-se valorizar os recursos naturais e agregar valores aos subprodutos da agroindústria. Essa matéria-prima reduz a emissão de carbono para a atmosfera quando comparada aos combustíveis fósseis, diminuindo o efeito estufa e também são tidos como ecologicamente favoráveis, uma vez que liberam 50% menos material particulado e 98% menos enxofre (NUNES *et al.*, 2013).

A produção de biocombustíveis pode ser realizada a partir de matérias-primas de origem vegetal, como plantas (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho) e de origem animal, como o sebo bovino, o qual é utilizado na produção de biodiesel; além de outras fontes residuais da indústria agropecuária ou florestal (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Biomassas provenientes da agricultura da cana-de-açúcar, mandioca, milho, batata; podem disponibilizar carboidratos que podem ser utilizados como fonte de produção de energia para biocombustíveis (NUWAMANYA *et al.*, 2011). Estudos recentes buscam uma forma mais coerente para a produção de etanol de segunda geração, dentre eles a utilização de bagaço de laranja (NOGUEIRA, 2016), bagaço do pendúculo de caju (LIMA, 2012) e bagaço de cana-de-açúcar (FERREIRA, 2016).

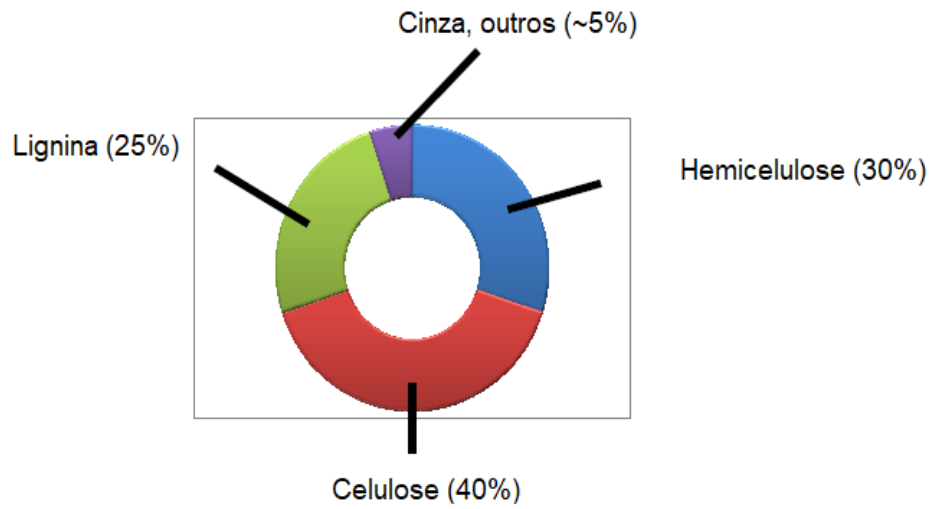
Dentre as mencionadas, a mandioca possui um alto rendimento de produtividade e fácil adaptabilidade em diversos solos, tornando-se assim, um candidato para a produção de etanol de segunda geração (NUWAMANYA *et al.*, 2011).

Nas células vegetais, o biopolímero que mais está presente na parede celular é a celulose (Figura 1). Vários pesquisadores estudam os meios para obtenção de etanol a partir da celulose, o qual demanda vários processos, a citar: pré-tratamento da biomassa, que pode incluir a quebra da parede celular (para um melhor aproveitamento da celulose disponível), isolamento dos açúcares e lignina e, posteriormente, ocorre o processo de fermentação (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

A necessidade da realização de vários processos para a obtenção de etanol de segunda geração decorre da alta resistência da biomassa lignocelulósica à liberação de açúcares fermentescíveis originários com a distribuição topoquímica das estruturas da lignina, hemicelulose e da pouca porosidade da parede celular, devido ao alto grau de organização dessas estruturas (CARVALHO, 2014).

O presente trabalho visa estudar a possibilidade de produção de etanol 2G proveniente da biomassa adquirida da mandioca.

Figura 1 - Composição geral da biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de Xu *et al.* (2014).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é estudar a liberação de Açúcares Redutores Totais a partir do pré-tratamento ácido e da hidrólise enzimática nas folhas da mandioca visando à obtenção de etanol de segunda geração.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterização física e química da matéria-prima *in-natura*;
- b) Realizar o planejamento experimental no pré-tratamento para as variáveis independentes de concentração de ácido sulfúrico (1 a 3%) e a carga de sólidos (5 a 20%) a fim de estabelecer as melhores condições;
- c) Proceder com a hidrólise enzimática a partir da condição ótima prevista no planejamento experimental para o pré-tratamento, a fim de determinar os açúcares redutores totais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A perspectiva para a demanda de biocombustíveis no Brasil será entre 37,4 a 70,7 bilhões de litros em 2030, ou seja, podendo chegar a 114% acima da produção de 2018, sendo essa estimativa decorrente de fatores macroeconômicos e políticos. O crescimento da demanda pode acarretar uma expansão da área plantada da cana-de-açúcar entre 1,2 a 5 milhões de hectares (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2019).

Estima-se que o potencial para a produção brasileira de etanol de segunda geração de acordo com os tipos de investimentos, como adaptação, expansão e construção de novas usinas, terá como resultante a produção de 6,75 bilhões de litros até o ano de 2025 de acordo com *United Nations Conference on Trade and Development* (UNCTAD, 2016).

O crescimento de biocombustíveis está vinculado com as diferentes formas de obtenção, utilização e a respectiva tecnologia empregada na matéria-prima para a conversão final. Sendo assim, podem ser de primeira geração quando é realizada a extração direta dos açúcares e gorduras, de segunda geração para a biomassa lignocelulósica e de terceira geração quando algas unicelulares são utilizadas (FERREIRA, 2016).

Neste panorama de produção de etanol de segunda geração, de acordo com Mota e Monteiro (2013), a resistência a degradação é um fator importante para a produção do etanol celulósico, para o qual há a necessidade de separar e concentrar as partes constituintes individuais da biomassa, sendo estas a lignina, a celulose e a hemicelulose.

Os desafios decorrentes da recalcitrância são determinantes para a competição com os combustíveis provenientes do petróleo, a viabilidade econômica e a sustentabilidade. Sendo assim, as etapas dos processos devem ser bem consolidadas a fim de alcançar teores mais altos de etanol e evitar a degradação por subprodutos (SCULLY; ORLYGSSON, 2014).

Após a realização do pré-tratamento, a biomassa ainda pode passar por processos de hidrólise utilizando ácidos ou enzimas. Os métodos utilizando enzimas são muito promissores, ocasionando na liberação de glicose pelas enzimas celulase. No entanto podem ocorrer interações entre as enzimas utilizadas e os componentes da lignina, tornando o processo improdutivo e dificultando a produção de etanol na etapa de fermentação, a qual pode ser realizada utilizando uma variedade de

microorganismos, como por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae* (HUANG *et al.*, 2015).

3.1 ASPECTOS GERAIS DA MANDIOCA

De acordo com a classificação taxonômica, a mandioca pertence à classe das Dicotiledôneas, à subclasse *Archichlamydeae*, à ordem *Euphorbiales*, família *Euphorbiaceae*, tribo *Manihotae*, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT, 1983).

Em torno de 100 espécies foram classificadas quanto ao gênero *Manihot*; e o único a ser cultivado comercialmente é a *Manihot esculenta* (Crantz), possuindo diversos sinônimos como, yuca, mandioca, tapioca, cassava, dentre outros (CIAT, 1983).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) possui a sua origem na América, podendo ser encontrada desde a Argentina até os Estados Unidos. No Brasil ela teria sido domesticada na região do Amazonas após surgir da área central do território brasileiro e atualmente é cultivada em todo território nacional (MORALES, 2015).

De acordo com as pesquisas mais atuais do IBGE, 19.392.827 toneladas na safra de 2018 e para uma perspectiva de 20.212.143 toneladas para 2019, ou seja, um acréscimo de 4,2% (IBGE, 2019).

A mandioca pertence à família *Euphorbiaceae*, a qual compreende também a mamona e a seringueira. Seu nome provém de origem tupi cuja derivação está vinculada a palavra *manioc*, sendo reconhecida como *Manihot esculenta* Crantz de acordo com a sua denominação científica, apresentando cerca de 180 espécies abrangendo diversos grupos como a mandioca de mesa, mansas, doces e as mandiocas bravas (SALLA, 2008).

Sua planta é um arbusto perene, possuindo de 5 a 20 raízes tuberosas, cuja polpa pode possuir cores diversas como branca, creme, amarela, alaranjada ou rosada, apresentando amidos em seu interior. O caule é ereto, de cor cinza, prata ou parto-amarelada; as folhas possuem de 3 a 11 lóbulos; com flores e sementes que contêm óleo (MORALES, 2015).

A *Manihot esculenta* Crantz é uma espécie vantajosa para o cultivo, pois é facilmente adaptável quando introduzida em áreas com baixos índices fluviais e

solos pobres, característica decorrente à perda das suas folhas e o bloqueio dos estômatos durante períodos de seca, permitindo que a planta controle a perda de água e a continuação da fotossíntese ao absorver dióxido de carbono (MORALES, 2015).

Na Figura 2 é possível visualizar a região aérea da planta da mandioca, sendo que a parte mais utilizada da planta como matéria-prima na indústria são as raízes, podendo ser comercializada *in natura*, pré-cozida ou congelada. As suas folhas e hastes podem ser empregadas na alimentação animal na forma de silagem ou feno (TIRONI *et al.*, 2015).

No entanto, a parte aérea da mandioca é pouco aproveitada economicamente, normalmente sendo descartada após o plantio (SOARES *et al.*, 2016). Tal aproveitamento econômico pode ser alcançado de maneira sustentável ao interligar a produção de energia à produção de alimentos. Estes meios de subsistência diversificados exigem uma maior compreensão da sociedade em termos de consumo de energia e a investigação de novas possíveis fontes de energia a partir de recursos disponíveis. Diante disso, as áreas não comestíveis da mandioca podem desempenhar um papel significativo na produção de energia, uma vez que produzem quantidades relativamente elevadas de biomassa, os quais podem ser utilizados como fonte de matéria lignocelulósica para a geração de etanol (NUWAMANYA *et al.*, 2011).

Figura 2 - Região aérea da planta da mandioca



Fonte: CIAT (1983, p. 10).

3.1.1 Folhas da Mandioca

As *Euphorbiaceae* apresentam com maior diversidade nos trópicos através do globo terrestre, possuindo 307 gêneros em torno de 7.500 espécies dos quais 72 gêneros e 1.100 espécies estão presentes no Brasil em diferentes biomas (RODRIGUES, 2007).

Assim como em outras plantas, as folhas da mandioca são organismos nos quais a radiação solar é transformada em energia química, sendo o total de folhas produzidas, a longevidade e a taxa de produção, dependentes das condições do meio ambiente. A formação foliar inicia-se nos pecíolos, sendo laminada e dividida em lóbulos variáveis em tamanho e comprimento e com cores roxas, verde escuro ou verde claro (CIAT, 1983).

As folhas também possuem diferentes variedades, assim como com a idade da planta, sendo maiores no quarto mês após o plantio. A taxa de crescimento foliar está intimamente relacionada com a produtividade, sendo a área foliar individual em torno de 50 a 600 cm² e a área foliar total 1,24 a 3,38 m² (ALVES, 2006).

Há poucas pesquisas relacionadas à quantificação de carboidratos presentes nas folhas de mandioca, sendo mais comuns estudos publicados sobre a caracterização protéica e sua possível utilização como complemento alimentar na pecuária e no combate a desnutrição humana. Apesar do alto descarte desse material, é possível a sua utilização sustentável tanto para a alimentação humana quanto a possível produção de energia.

O artigo de Ortega-Flores (2003) demonstrou a composição de carboidratos presentes nas folhas de mandioca desidratadas em 10,06g/100g e Bohnenberger (2008) descreveu o teor de cinzas de 4,62 a 8,3 g/100g de matéria seca.

Fonseca (1996) ao estudar sobre cinco cultivares de mandioca obteve em seus resultados valores para os açúcares redutores variáveis entre 11,3 a 13,3g/kg de folhas desidratadas.

Os açúcares redutores são monossacarídeos, por exemplo, a glicose e a frutose, os quais apresentam grupos carbonílicos e cetônicos livres, podendo ser oxidados através de agentes oxidantes em meio às soluções alcalinas (SILVA *et al.*, 2003). Essa oxidação pode ser realizada por íons cúpricos (Cu²⁺) ou por férricos (Fe³⁺) onde o grupo carbonila é oxidado em uma carboxila e o íon cúprico reduzido a cuproso (FRANCISCO JUNIOR, 2008).

Um estudo realizado por Nuwamanya *et al.* (2011) para obtenção de açúcares redutores a partir da planta da mandioca por meio de hidrólises com HCl, NaOH e enzimas (celulase), as quais ocorreram de forma única e separadas sem realizar um pré-tratamento nas folhas, apresentou valores de açúcares fermentescíveis de 20% para a hidrólise em meio alcalino, 18 e 2% para a hidrólise ácida e enzimática, respectivamente. Demonstrou também que ao fim de 5 horas, os valores obtidos para as hidrólises com ácido clorídrico e hidróxido de sódio, podem ser proporcionais.

Ao fazer a caracterização química da farinha das folhas de mandioca, Trombini e Leonel (2017) obtiveram 22,27g/100g de carboidratos totais.

3.2 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

3.2.1 Celulose

A celulose é um biopolímero encontrado nos vegetais, sendo o polissacarídeo mais abundante do mundo, compreendendo, aproximadamente, 40% da parede celular vegetal. Constituída de cadeias de unidades repetidas (monômeros) de D-glicose ($C_6H_{12}O_6$), unidas por ligações B(1→4), gerando um polímero linear e não ramificado. Os monômeros sofrem um giro de 180° em relação ao monômero anterior, favorecendo a formação de um grande número de pontes de hidrogênio em suas cadeias dispostas entre si (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

A unidade repetitiva da celulose é denominada celobiose, a qual possui hidroxilas que formam interações de ligações de hidrogênio intra e intermolecular. Essas ligações promovem a formação de cristais, tornando a celulose insolúvel em água e em solventes orgânicos (SILVA *et al.*, 2009).

A celulose (Figura 3) é um componente importante na composição da parede celular vegetal. Primeiramente as moléculas de celulose se interligam entre si linearmente formando as microfibrilas. Em seguida, as microfibrilas se entrelaçam dando origem as fibrilas de celulose. Por fim, as fibrilas formam um sistema constituído por uma matriz amorfa, formada por hemicelulose, pectinas e lignina, dando origem a estrutura lignocelulósica (MELEIRO, 2017).

As regiões que possuem uma ordem dentro das microfibrilas, são denominadas regiões cristalinas e as regiões que possuem um grau de organização

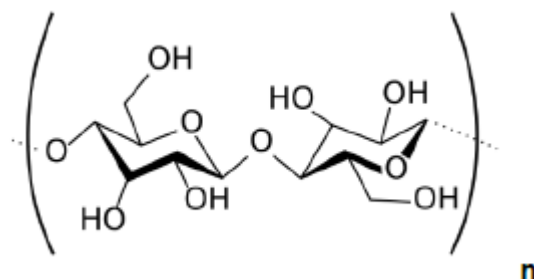
menor, são denominadas amorfas, podendo ocorrer estas configurações de regiões em proporções características em celuloses de diferentes origens, onde o ataque enzimático pode ser preferencial em um dos tipos de estrutura (RABELO, 2010).

Quando colocadas em contato com a água e certos tipos de solventes orgânicos, as fibras de celulose sofrem intumescimento, em que sua extensão pode ser intercrystalino ou intracrystalino. No intumescimento intercrystalino, as regiões amorfas da microfibrila são penetradas pelo agente intumescedor, sendo um exemplo neste caso, é o inchamento da celulose em água (RABELO, 2010).

O intumescimento intracrystalino, as regiões cristalinas das microfibrilas são penetradas pelo agente, o qual pode ser realizado por soluções concentradas de ácidos e bases fortes e por soluções de alguns sais (RABELO, 2010).

Essas ligações também fazem com que a celulose seja altamente resistente a hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, sendo então a principal influência sobre as propriedades físicas da mesma (SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura da celulose



Fonte: MELEIRO (2017. p. 27).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um dos constituintes da parede celular vegetal, possuindo cadeias ramificadas com polímeros de cadeia curta, podendo variar de acordo com a espécie da planta. Juntamente com a lignina, formam estruturas hemicelulose-lignina por meio de ligações covalentes (ZHANG *et al.*, 2015).

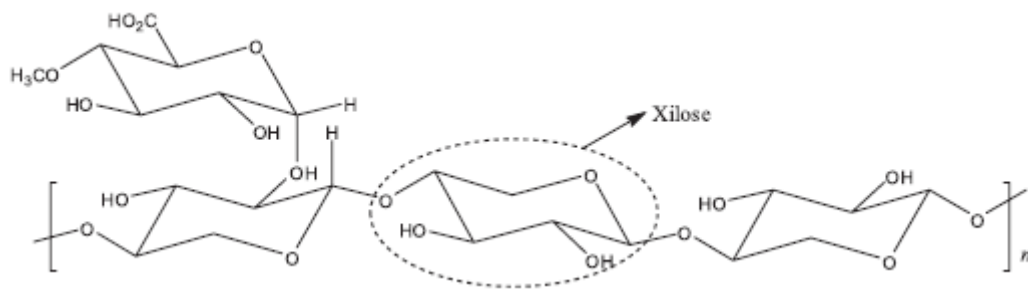
Na parede celular dos vegetais, cerca de 30% referem-se à hemicelulose, portanto, é um polissacarídeo muito abundante na natureza (RABELO, 2010).

Quimicamente, a fração hemicelulósica (Figura 4) é constituída principalmente por polímeros de xilana, provenientes de unidades de xilose, e que são facilmente hidrolisadas por ácidos minerais. Nas suas cadeias podem ocorrer substituições em algumas ramificações por grupos de 4-O-metilglucurônico, ácido glucurônico, acetil e arabinose. Esses grupos substituídos dependem dos materiais encontrados na natureza, por exemplo, a substituição por meio de arabinose é encontrada em madeiras de coníferas e os grupos de ácidos glucurônicos são encontrados em madeiras folhosas (BRAGATTO, 2010).

A constituição por diferentes unidades de açúcares nas suas cadeias curtas e ramificadas é a característica que diferem as hemiceluloses da celulose (RABELO, 2010).

Devido à sua maior acessibilidade por ácidos minerais, a hemicelulose é mais susceptível à hidrólise ácida (SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 4 – Representação estrutural da hemicelulose



Fonte: SANTOS *et al.* (2012, p. 1005).

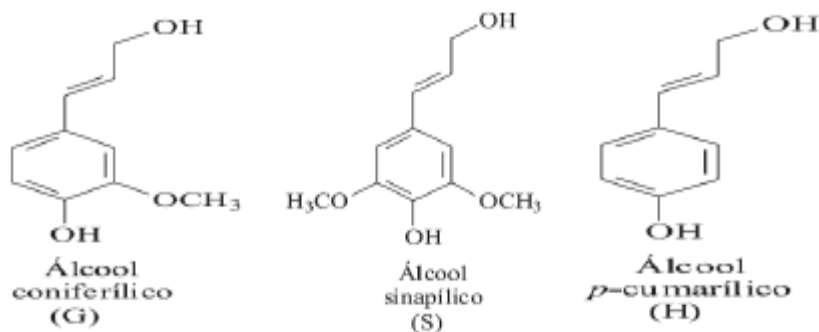
3.2.3 Lignina

A lignina é um dos principais componentes da parede celular vegetal. A sua importância está vinculada ao transporte de água e nutrientes, além de conferir resistência mecânica aos vegetais e impedir contra ataques de microrganismos (SALIBA *et al.*, 2001), podendo ser encontrada na lamela média e também na parede secundária (NOGUEIRA, 2016).

Constituída por três diferentes unidades de fenilpropanos, álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico (Figura 5), podendo haver variação na composição e organização dos constituintes da lignina de uma espécie, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (SANTOS *et al.*, 2012). Estas unidades

determinam a solubilidade da lignina em meios ácidos, neutros ou alcalinos, no entanto, sua solubilidade também depende das condições empregadas na hidrólise. A característica hidrofóbica da estrutura tridimensional está relacionada às ligações da lignina com éster, a qual representa 2/3 das ligações; éter e carbono-carbono (BRAGATTO, 2010).

Figura 5 - Constituintes da lignina



Fonte: BRAGATTO (2010, p. 34).

A formação da lignina nas plantas está intimamente ligada pela falta de um sistema excretório, surgindo então, de um mecanismo de desintoxicação de substâncias fenólicas, as quais reagem entre si por via metabólica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

3.2.4 Outros componentes e extrativos

Os extrativos são substâncias que não fazem parte da parede celular, os quais podem ser extraídos por solventes polares e não polares (BARBOSA, 2015). A concentração e o tipo de extrativo variam significativamente através das espécies, podendo ser encontrados de 3 a 10% nas madeiras folhosas e de 5 a 8% nas coníferas. Há também variações nos diversos tecidos do corpo vegetal; as cascas da maioria das espécies arbóreas contem maiores concentrações de extrativos do que a madeira (BRAGATTO, 2010).

Dentro dos compostos pertencentes a este grupo, incluem gorduras, ácidos graxos, alcoóis, hidrocarbonetos, proteínas, flavonóides e fenóis (LIMA, 2012; MARABEZI, 2009). Esses componentes podem acarretar alguns problemas ao

processar a celulose, ocorrendo o seu acúmulo nos equipamentos a partir do fracionamento da biomassa de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2010).

As cinzas, resíduos inorgânicos, carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, assim como as suas devidas proporções referente à espécie, idade, condições de crescimento, constituem as frações não extraídas via utilização de solventes. No entanto, podem ser mensurados a partir da queima da biomassa em altas temperaturas, representando aproximadamente 2% do peso seco das madeiras (RABELO, 2010).

3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O pré-tratamento da biomassa é uma etapa de extrema importância, pois as problemáticas envolvidas no processo de obtenção de açúcares estão intimamente interligados aos desafios técnicos referentes à recalcitrância da matéria-prima, ou seja, a sua resistência à degradação (MOTA; MONTEIRO, 2013).

O objetivo dessa etapa é fornecer carboidratos com a liberação de açúcares na fração líquida obtida, requerer uma demanda energética baixa, diminuir os custos dos investimentos operacionais (SANTOS *et al.*, 2012), fornecer um substrato mais acessível às enzimas utilizadas na etapa de hidrólise enzimática, evitar a formação de subprodutos e compostos inibidores nas etapas posteriores (MORI, 2015), por exemplo, a formação de furfural e hidroximetilfurfural pode acarretar a diminuição da produção de etanol e causar danos moleculares nas leveduras (SANTOS *et al.*, 2016). Portanto, considera-se o pré-tratamento uma etapa de operação unitária fundamental para a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol (MEDINA, 2013).

Basicamente, os processos de pré-tratamento podem ser:

Físicos: este método utiliza-se da moagem para obter uma redução granulométrica da biomassa lignocelulósica bruta. Com isso, aumenta-se a área superficial e também reduz a cristalinidade da celulose (BRAGATTO, 2010). Como exemplos de moagem destacam-se a moagem úmida, moagem a seco, moagem por compressão ou no moinho de bolas vibratório (MORI, 2015). No entanto, para realizar a moagem de materiais lignocelulósicos, são necessários equipamentos que consomem valores altos de energia (BRAGATTO, 2010).

Químicos e Físico-químicos: um método muito utilizado para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é o de explosão a vapor, o qual consiste em um tratamento utilizando vapor com alta pressão, ocasionando no aumento da superfície de contato e na degradação da hemicelulose e da lignina, sendo possível a utilização de alguns catalisadores como ácido sulfúrico, sulfatos ou dióxido de carbono (BRAGATTO, 2010).

Outros métodos comumente utilizados são os que utilizam reagentes como hidróxido de sódio, utilizado para a extração da lignina na parede celular vegetal, ácido perclórico, ácido peracético, ácido sulfúrico, fosfórico e clorídrico, utilizados para a extração da hemicelulose, e solventes orgânicos (MORI, 2015). Ao utilizar ácidos inorgânicos, dentre eles o ácido sulfúrico, e por meio de altas temperaturas, ocorre a hidrólise da hemicelulose com a liberação de hexoses e pentoses, contudo, podem surgir furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida após o pré-tratamento e necessita-se de equipamentos resistentes a corrosão (SANTOS *et al.*, 2016).

Biológicos: esta etapa do processo consiste em utilizar fungos de degradação para a decomposição da biomassa lignocelulósica, os quais podem ser de degradação branca, parda e branca, ocasionando a decomposição e liberando a celulose para a subsequente etapa de hidrólise enzimática (MORI, 2015). Dentre os fungos mais utilizados, encontram-se os *Pleurotus*, *Pycnoporus*, *Ishcnoderma* e o *Phlebia*, os quais são conhecidos como bolor branco, causando a deslignificação e a redução da polimerização da celulose e hemicelulose (RABELO, 2010).

Com a separação dos componentes presentes na parede celular, podem-se obter compostos orgânicos de valor econômico, além dos comumente estudados como açúcares e álcoois, podem ser obtidos também ácidos orgânicos, furfural, fenóis e outros compostos aromáticos (MORI, 2015).

3.3.1 Pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica

Os pré-tratamentos com ácidos podem ser realizados utilizando temperaturas baixas ou elevadas para que ocorra a solubilização da fração hemicelulósica, promovendo um acesso mais eficaz à celulose através das enzimas na etapa posterior. Ao ser realizado em altas temperaturas e baixa concentração ácida, caracterizar-se-á como um pré-tratamento com ácido diluído. Porém, caso seja

realizado a temperaturas baixas e com alta concentração ácida, entende-se como uma pré-tratamento com ácido concentrado (MARQUES, 2016).

O pré-tratamento mais realizado utiliza o ácido sulfúrico diluído, embora existam pesquisas com uma variedade de ácidos (clorídrico, fosfórico, nítrico, acético), sendo comumente empregado por ser um ácido barato e que apresenta bons resultados. Este método decorre do alto grau de solubilização e recuperação das hemiceluloses melhorando a etapa subsequente de hidrólise enzimática (GAMBARATO, 2014).

Os teores de lignina e hemicelulose em uma biomassa lignocelulósica dependem de fatores como a espécie da planta e idade, portanto não há um método singular para os vários materiais lignocelulósicos. Utilizando-se do método com ácido diluído, ocorre a hidrólise da fração hemicelulósica, solubilizando-a diretamente em açúcares fermentescíveis (FREITAS, 2016).

As porções dos componentes da biomassa se comportam de formas diferentes em meio ácido. Com os açúcares, ocorrem os rompimentos das ligações glicosídicas iniciando-se na interação do ácido com o oxigênio glicosídico, este interligado nas duas unidades de açúcar, formando um ácido conjugado. Posteriormente há uma clivagem da ligação C-O formando um carbocátion cíclico, o qual em seguida se torna estável após a inserção de uma molécula de água (CANDIDO, 2011).

No processo de hidrólise, os furanos são hidrolisados mais rapidamente devido à sua conformação das unidades nos anéis dos átomos quando comparados aos anéis piranosídicos livres de tensão. Isso faz com que as hemiceluloses sejam hidrolisadas bem mais rapidamente em meio ácido do que a celulose (CANDIDO, 2011). Com este processo há formação de xilose provenientes da xilana. No entanto, alguns subprodutos também podem ser obtidos nesta etapa tanto para as hemiceluloses, formando furfural e ácidos urônicos, ácido etanóico e metanóico, e enquanto para a celulose podem ocorrer a formação de subprodutos a partir da glicose hidrolisada da matriz, como ácido levulínico, hidroximetilfurfural e ácido fórmico, os quais, em ambos os casos, podem inibir processos fermentativos ao prejudicar o crescimento de microrganismos (PIETROBON, 2008).

A lignina é degradada por meio de reações de substituição e rompimento de ligações, podendo ser acompanhada por reações de condensação, as quais podem

ocorrer ao nível da cadeia propânica lateral, no anel aromático, no grupo metoxila e nas hidroxilas fenólicas (CANDIDO, 2011).

3.4 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Atualmente são realizadas três técnicas principais para a sacarificação da celulose, as quais utilizam ácido concentrado, ácido diluído e enzimas para realizar a hidrólise, assim como os métodos que envolvam transformações termoquímicas e fluidos sub e supercríticos (LACERDA, 2012).

A hidrólise realizada com ácido concentrado é feita com temperaturas mais brandas, em torno de 30°C, possui a vantagem de grandes liberações de hexoses e pentoses, no entanto a sua desvantagem está na demanda de energia para a recuperação dos ácidos utilizados, tornando-a muito cara e também por necessitar de equipamentos resistentes a corrosão. Ao utilizar um ácido diluído e temperaturas mais elevadas, os açúcares são liberados no meio reacional, no entanto podem ocorrer a formação de sub-produtos (OGEDA; PETRI, 2010).

A hidrólise feita a partir de enzimas, foco deste trabalho, é feita utilizando as celulasas, as quais reduzem a formação de subprodutos indesejados durante a reação, evitando a degradação da glicose por ser seletiva. No entanto, seu uso requer alguns cuidados, pois são sensíveis e possuem um alto custo, apesar de serem operadas em condições brandas de pressão, temperatura e pH (MORI, 2015).

3.4.1 Hidrólise enzimática

A utilização das enzimas para promover a ruptura das ligações glicosídicas presentes na matriz lignocelulósica, a fim de promover a liberação de monômeros, é uma técnica utilizada visando um maior rendimento do processo e uma menor geração de produtos indesejáveis (COSTA, 2016).

Para a realização desse procedimento, podem ser utilizadas três classes principais de celulasas: as exoglucanases, as endoglucanases e as β -glicosidases. Essas enzimas possuem um melhor rendimento quando atuam sinergicamente, ou seja, em conjunto, em vez de atuarem isoladamente (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2009). Este processo consiste na liberação dos monômeros que constituem a celulose a partir da atuação nas fibras. Por ser uma região muito heterogênea, a

qual apresenta regiões ordenadas constituídas por ligações de hidrogênio intra e intermolecular e por regiões amorfas, necessita-se de várias atividades específicas e coordenadas para que a maior parte do carboidrato seja hidrolisado (FREITAS, 2016).

As endoglucanases tornam a fibra lignocelulósica mais exposta ao realizar uma clivagem das ligações glicosídicas internas, sendo assim, elas reduzem o grau de polimerização da fibra ao gerar regiões amorfas, melhorando a ação de enzimas por não possuírem pontes de hidrogênio tão fortes, e liberando oligossacarídeos, além de terminais redutores e não redutores. As celulases que atuam nas regiões externas são denominadas exoglucanases, as quais realizam uma ruptura física do substrato, a desestratificação da estrutura fibrilar e um aumento das regiões amorfas, tendo como produto a celobiose. Por fim, a celobiose é hidrolisada em glicose através da ação da enzima β -glicosidases (SANTOS, 2015).

Há também a utilização da xilanase para converter os xilooligômeros, pois esses inibem de maneira mais fraca a hidrólise. Essa enzima obtida, por exemplo, através do fungo *Thermomyces lanuginosus*, poderá melhorar a eficiência da etapa de hidrólise no meio reacional (MORI, 2015).

No entanto a hidrólise enzimática pode ser afetada por algumas variáveis, as quais são mais representativas na característica da supra-estrutura e na arquitetura da matriz lignocelulósica. A remoção das estruturas de hemicelulose e lignina presentes na parede celular que recobrem as cadeias de celulose são determinantes para uma boa eficiência na etapa de hidrólise enzimática da celulose (SANTOS, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

A coleta das folhas de mandioca foi realizada nos meses de Dezembro de 2017 e Janeiro de 2018 em plantios de fazendas localizadas em Bom Jesus do Oeste, distrito pertencente à Conceição da Aparecida.

Para a caracterização das amostras, utilizou-se do laboratório do Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas, localizado em Poços de Caldas-MG.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.2.1 Determinação da umidade

Inicialmente após a coleta, as amostras foram secas até massa constante em estufa a uma temperatura de 60°C com o objetivo de evitar o surgimento de fungos e degradação por outros microorganismos. Em seguida as amostras foram trituradas utilizando um mixer da marca Sugar para aumentar a superfície de contato.

Posteriormente, separaram-se as amostras em triplicatas para determinar o teor de umidade, onde pesou-se 1g da amostra em cadinhos, previamente pesados, os quais foram colocados em estufa de marca Nova Ética por 24h a 60°C.

Após o término do período em que estavam na estufa, as amostras foram retiradas e colocadas em um dessecador para esfriarem, repetindo o procedimento durante 1 hora até que o peso das amostras se tornasse constante por meio da Equação 1.

$$\text{Umidade \%} = \left(1 - \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}\right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

M1 a massa do cadinho vazio (g);

M2 a massa do cadinho contendo a biomassa úmida;

M3 a massa do cadinho contendo a biomassa seca.

4.2.2 Determinação granulométrica

A fim de determinar o tamanho das partículas na biomassa, seguiu-se o procedimento do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – *National Renewable Energy Laboratory*) para a determinação do tamanho das partículas da biomassa. No entanto, apesar do procedimento descrever o uso das peneiras de acordo com o mesh de 12,16, 24, 32, 42, 60 e 80, as únicas peneiras disponíveis para a realização do procedimento eram as de 10, 14, 20, 35, 42, 60 e 80 mesh, sendo estas as utilizadas durante o experimento.

Para a realização do procedimento, 80g das folhas de mandioca foram previamente trituradas em um mixer e depois inseridas na primeira bandeja, sendo a ordem das mesmas, começando pela bandeja inferior de 80, 60, 42, 35, 20, 14, e 10, permanecendo no agitador durante 15 minutos. Para a determinação da fração retida nas peneiras, utilizou-se da Equação 2.

$$\text{Fração}_N \% = \frac{M_N}{M_T} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

M_N : massa (g) retida da biomassa pela peneira N (N compreendendo a respectiva bandeja);

M_T : massa total.

Embora a realização desta metodologia, optou-se por usar toda a biomassa sem distinção do tamanho das partículas.

4.2.3 Determinação de cinzas

A fim de determinar o teor de cinzas, utilizou-se o método padrão do NREL, com o objetivo de avaliar o material inorgânico na biomassa, estrutural ou extraível, como parte da composição total.

Inicialmente, pesou-se $1,00 \pm 0,001$ g em triplicata das amostras secas a 105°C em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. Em seguida, a

biomassa foi inserida em forno mufla a 400°C durante 1 hora e após este período, a temperatura foi elevada para 800°C, permanecendo durante 2 horas neste valor.

Ao término deste período, os cadinhos foram resfriados em um dessecador e posteriormente foram pesadas para a realização do cálculo do teor de cinzas descrito na Equação 3.

$$\text{Cinzas \%} = \left(\frac{M3-M1}{M2-M1} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

M1 massa do cadinho calcinado vazio (g);

M2 a massa do cadinho contendo a biomassa seca a 105 °C;

M3 a massa do cadinho contendo as cinzas.

4.2.4 Determinação dos extrativos

A determinação dos extrativos foi fundamentada no procedimento padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – *National Renewable Energy Laboratory*), a fim de quantificar os extrativos para a posterior caracterização química da biomassa e retirar o material não estrutural antes da quantificação da lignina e dos carboidratos para que não haja interferência nestas etapas analíticas.

Antes de realizar o procedimento, foi determinado o teor de umidade das amostras de folha de mandioca como descrito anteriormente. Adicionou-se aproximadamente 4,00g da amostra em cartuchos de extração, os quais foram levados até o extrator e inseridos no tubo de extração do Soxhlet. Nos balões do extrator, foram inseridos 200 mL de água destilada e em seguida iniciou-se o aquecimento. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho se tornasse incolor.

Na etapa subsequente, realizou-se o mesmo procedimento com as amostras, porém a extração foi realizada com álcool etílico até que todo o solvente ao redor do cartucho se tornasse incolor.

Finalizado o procedimento de extração, os sólidos foram transferidos e lavados com 100 mL de etanol, filtrados a vácuo, secos em estufa a 105°C e seus pesos foram avaliados até atingirem massa constante.

A determinação de extrativos é realizada através da seguinte Equação 4.

$$\text{Extrativos \%} = \left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \times 100 \quad (4)$$

Sendo:

M1: massa da biomassa seca (g);

M2: massa da amostra sem extrativos (g).

4.2.5 Determinação da lignina

Para a realização da determinação de lignina das folhas da mandioca, seguiu-se o procedimento do NREL, realizando uma hidrólise em duas fases, a inicial onde foram pesados 0,3g de biomassa livre de extrativos em tubos de ensaio, nos quais foram também inseridos 3mL de ácido sulfúrico com concentração de 72%. Em seguida, os tubos foram vedados com Parafilm® e então incubados em banho termostático a 30°C durante 1 hora e homogeneizadas em intervalos de 10 minutos por meio de um bastão de vidro. Ao cessar esta hidrólise, todo conteúdo presente nos tubos de ensaio foram transferidos para um frasco reagente de 250mL, com tampas e anel de vedação, no qual adicionaram-se 84mL de água destilada, obtendo uma concentração final de 4% e levados à autoclave a uma temperatura de 121°C durante 1 hora. Após o término da hidrólise, o material contido no interior dos frascos foi filtrado em papel filtro qualitativo previamente tarado e a fase líquida foi retirada para análise de lignina solúvel.

O teor de lignina é determinado através da Equação 5.

$$\text{Lignina \%} = \text{Lignina}_{\text{insolúvel}}\% + \text{Lignina}_{\text{solúvel}}\% \quad (5)$$

4.2.5.1 Lignina insolúvel

Após realizar a filtração, todo material retido foi lavado para a sua neutralização utilizando-se 1,5L de água deionizada, sendo depois levado à uma estufa a 105°C até massa constante. Em seguida, a fração da biomassa retida no papel filtro foi levada ao forno mufla a 400°C durante 1 hora e a 800°C por mais 2

horas. O cálculo do conteúdo de lignina insolúvel foi realizado pela diferença entre o peso do material insolúvel que permaneceu no papel filtro e o conteúdo de cinzas da biomassa. A massa foi analisada durante cada processo em uma balança analítica e o teor de lignina insolúvel presente nos resíduos foi calculado a partir da seguinte Equação 6.

$$\text{Lignina}_{\text{insolúvel}}\% = \left(\frac{M_1 - \text{MPF}}{M_0} \times 100 \right) - \text{Cinzas II}(\%) \quad (6)$$

Sendo:

M1: massa do papel filtro mais a lignina insolúvel depois da secagem (g);

MPF: massa do papel de filtro (g);

M0: massa inicial da amostra (g);

Cinzas II: teor de cinzas após a calcinação dos sólidos retidos no papel de filtro.

4.2.5.2 Lignina solúvel

A determinação da lignina solúvel foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela EMBRAPA (2010), na qual são realizadas leituras da absorvância da fração líquida em comprimentos de onda de 215nm a 280nm. Para a realização das leituras, a amostra deve ser diluída com ácido sulfúrico 4% até que a absorvância seja menor do que 1,0.

A partir dos valores obtidos, utiliza-se a Equação 7 para obter a concentração de lignina solúvel (C_{LS}), onde A_{215} e A_{280} representam, respectivamente a absorvância nos comprimentos de onda de 215nm e 280nm, determinadas pelo espectrofotômetro *LT-2900*.

$$C_{LS} = \frac{4,53 \times A_{215} - A_{280}}{300} \quad (7)$$

Em seguida pode-se calcular massa de lignina solúvel (M_{LS}) na solução por meio do volume da amostra, o qual é utilizado para a determinação do teor de lignina solúvel ($T\%_{LS}$) na Equação 8.

$$T\%_{LS} = \frac{M_{LS}}{M_A} \times 100 \quad (8)$$

Sendo:

M_A : a massa inicial da amostra.

Neste procedimento descrito pela EMBRAPA, é sugerida a realização de um segundo cálculo (Equação 9) do teor de lignina solúvel ($T\%_{LS}$ corrigido) para a correção dos valores por meio do teor de extrativos ($T\%_E$) e do teor de umidade ($T\%_U$).

$$\text{Lignina Solúvel corrigido \%} = \frac{T\%_{LS} \times [100 - (T\%_E + T\%_U)]}{100} \quad (9)$$

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho, realizou-se um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), utilizando duas variáveis independentes (Tabela 1) para um planejamento fatorial 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, para definir o erro puro através da variabilidade verificada dentro de cada grupo que compõe a amostra, que por fim totalizam onze experimentos. O DCCR foi selecionado mediante a escolha dos fatores a serem estudados, os quais são as concentrações de ácido sulfúrico e carga de sólidos, para a possibilidade de analisar a variável dependente que após o pré-tratamento liberou várias concentrações de Açúcares Redutores Totais (ART). As concentrações de ácido sulfúrico foram variadas em 1% a 3% (m/v) e a carga de sólidos 5% a 20% (m/v).

De acordo com Rodrigues e lemma (2009), a adição dos pontos axiais torna o planejamento muito útil e a escolha foi realizada utilizando os pontos tipo $\pm\alpha$, sendo $\alpha = (2^K)^{1/4}$ e $K = 2$.

Tabela 1 - Relação das variáveis codificadas

Variável Codificada	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Conc. de ácido sulfúrico (%)	1	1,3	2	2,7	3
Carga de sólidos (%)	5	7,1967	12,5	17,8	20

Fonte: Do autor.

A matriz do planejamento está representada na Tabela 2, com os respectivos experimentos, todos realizados em triplicada, e as variáveis codificadas.

Tabela 2 - Matriz do delineamento central composto rotacional

Ensaio	Conc. de ácido sulfúrico (%)	Carga de sólidos (%)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9(C)	0	0
10(C)	0	0
11(C)	0	0

Fonte: Do autor.

4.4 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

A realização do pré-tratamento ácido foi realizado com ácido sulfúrico entre 1% a 3% (m/v).

Inicialmente para o preparo das soluções de 1 litro de H₂SO₄, considerou-se a sua pureza de 98% e em seguida a quantidade necessária para cada solução foi adicionada aos balões volumétricos de 1 litro contendo água destilada e aferiu-se o volume.

Em seguida as amostras de folha de mandioca referentes a cada ensaio da matriz do delineamento, previamente secas, foram inseridas em frascos do tipo Scott Duran de 250mL com o auxílio de funil juntamente com as suas respectivas soluções. Feito isso, vedou-se parcialmente cada frasco para a hidrólise em autoclave durante 1 hora com temperatura de 120°C.

Com o término do procedimento em autoclave, os frascos foram colocados em banho de gelo a fim de cessar a reação. As amostras então foram filtradas utilizando uma peneira de 120 mesh e a fração líquida foi diluída de 1mL para 100mL. Para cada amostra, retirou-se 5mL que foram dispostas em tubos de ensaio e completou-se o volume até 10mL e em seguida, adicionou-se o reagente DNS.

4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Ao finalizar o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, todo material foi filtrado e posteriormente lavado para a completa remoção do ácido sulfúrico até que o pH da água atingisse a ordem de 6,0. Toda a fração sólida foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL juntamente com 100 mL de solução tampão de citrato a 0,05mol/L e pH = 4,8, sendo então mantidas em refrigeração (4 °C) durante 36 horas para que houvesse a completa adsorção das partículas na biomassa (RABELO, 2010).

A solução tampão de citrato a 0,05mol/L foi preparada a partir de 9,605g de ácido cítrico anidro, os quais foram dissolvidos em 250 mL de água destilada. Em seguida, toda a solução foi transferida para um balcão volumétrico de 1,00 L e aferiu-se o volume. Por fim, adicionou-se hidróxido de sódio até que o pH da solução atingisse 4,8.

Ao término do prazo de 36 horas, os erlenmeyers foram incubados em um shaker orbital a temperatura de 50°C com uma rotação de 180 rpm durante 1 hora a fim de garantir um equilíbrio térmico adequado para a adição da enzima e em seguida, a rotação foi alterada para 150 rpm por um período de 72 horas.

No presente trabalho, a enzima utilizada para a hidrólise foi a *Celluclast*[®] 1,5L, produzida pela empresa *Novozymes*, em uma carga de 15 FPU/g de biomassa seca. De acordo com o fabricante, a *Celluclast*[®] possui uma atividade enzimática de 65 FPU/mL.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Determinação de açúcares por HPLC-PAD

Para a realização da análise via cromatografia, uma alíquota de 500µL de cada amostra obtida após o pré-tratamento foi centrifugada em microtubo de 1,5mL a 10.000 rpm durante dez minutos em uma centrífuga *MiniSpin Eppendorf* e posteriormente filtrada em uma membrana *Sartorius Minisart 13* de éster de celulose com 0,45µm de tamanho dos poros, sendo posteriormente diluída para 50 vezes com água ultrapura.

Em seguida, retirou-se uma alíquota de 10 μ L de cada amostra, as quais foram injetadas em um HPLC *Dionex ICS3000*, o qual possui um eletrodo de ouro para detecção eletroquímica de carboidratos, uma bomba quaternária, injetor automático e modulo dosador de reagente pós-coluna.

A separação dos analitos foi realizada em uma coluna *ThermoFisher CarboPac PA1* de 2x250mm com uma pré-coluna, previamente condicionada a 27°C e submetida a eluição com um gradiente binário de solução de NaOH a 200mM e água no fluxo de 0,3mL/min e tempo de corrida de 60min.

A detecção dos carboidratos foi otimizada com adição pós-coluna de uma solução de NaOH 450mM, com fluxo de 0,3mL/min.

As determinações da galactose, glicose, xilose, manose, frutose e celobiose, foram realizadas a partir dos padrões dos seus respectivos carboidratos com alto grau de pureza injetadas nas mesmas condições.

4.6.2 Determinação de ART por DNS

Após a realização do pré-tratamento, para cada amostra, adicionou-se ao meio as quantidades de 1mL de DNS. As soluções foram então aquecidas em banho maria a 100 °C durante 5 minutos. Resfriaram-se os tubos de ensaio em banho de gelo e adicionou 16,0mL de solução de tartarato duplo de sódio e potássio. As amostras foram, então, analisadas em um espectrofotômetro *Kasuki IL-226-NM* a 540nm de comprimento de onda, devidamente zerado com branco e em triplicatas utilizando cubetas de vidro.

O mesmo procedimento foi realizado para a quantificação dos ART presentes nas amostras após a hidrólise enzimática.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA FOLHA DE MANDIOCA

A umidade média da folha da mandioca utilizada foi de $2,64 \pm 0,43\%$.

A partir da determinação granulométrica das amostras, os maiores percentuais para o tamanho das partículas (Tabela 3) estão compreendidos nas peneiras com aberturas de 35 e 42 mesh (50,07%) e aproximadamente 1% das folhas trituradas foram retidas nos poros da peneira de 10 mesh, ou seja, o tamanho das partículas é de $\geq 1,7$ mm.

Tabela 3 - Percentual das partículas da biomassa retido nas peneiras

Mesh	Partículas % \pm D.padrão
10	$0,96 \pm 0,0003$
14	$2,28 \pm 0,0034$
20	$4,66 \pm 0,04$
35	$26,68 \pm 0,67$
42	$23,39 \pm 0,84$
60	$15,56 \pm 1,30$
80	$12,62 \pm 0,07$
-80	$13,85 \pm 0,34$

Fonte: Do autor.

Para a análise quantitativa das frações referentes à composição da folha de mandioca, optou-se em seguir os protocolos disponibilizados pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL).

No presente trabalho, os valores encontrados para o teor de cinzas e extrativos correspondem, respectivamente, a 7,97% e 9,68%, demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teores de alguns componentes pertencentes às folhas

Componente	% \pm D.padrão
Lignina	$17,61 \pm 2,52$
Cinzas	$7,97 \pm 0,09$
Extrativos	$9,68 \pm 0,26$

Fonte: Do autor.

De acordo com a literatura, para as folhas de mandioca, os teores de cinzas encontrados variam entre 4,62 e 10,23%, demonstrando que o teor encontrado no presente trabalho está dentro da faixa apontada por outros autores, como Bohnenberger (2008) e Trombini e Leonel (2014). O teor de extrativos também está de acordo com a faixa mencionada na literatura 3,30 a 16,00% (BOHNENBERGER, 2008; MODESTI, 2006). Para o teor de lignina, Melo *et al.* (2007) obteve um teor de lignina de 16,80%, ou seja, valor próximo ao encontrado neste trabalho. As faixas dos teores de cinzas e extrativos, assim como dos outros componentes, podem sofrer variações dependendo do lugar de origem, condições de crescimento e a idade da planta (BOHNENBERGER, 2008; EICHLER *et al.*, 2015).

5.2 ANÁLISE DOS ART LIBERADOS NO PRÉ-TRATAMENTO

Ao final do pré-tratamento ácido na biomassa lignocelulósica, as amostras foram analisadas em triplicadas e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - ART liberados mediante planejamento experimental

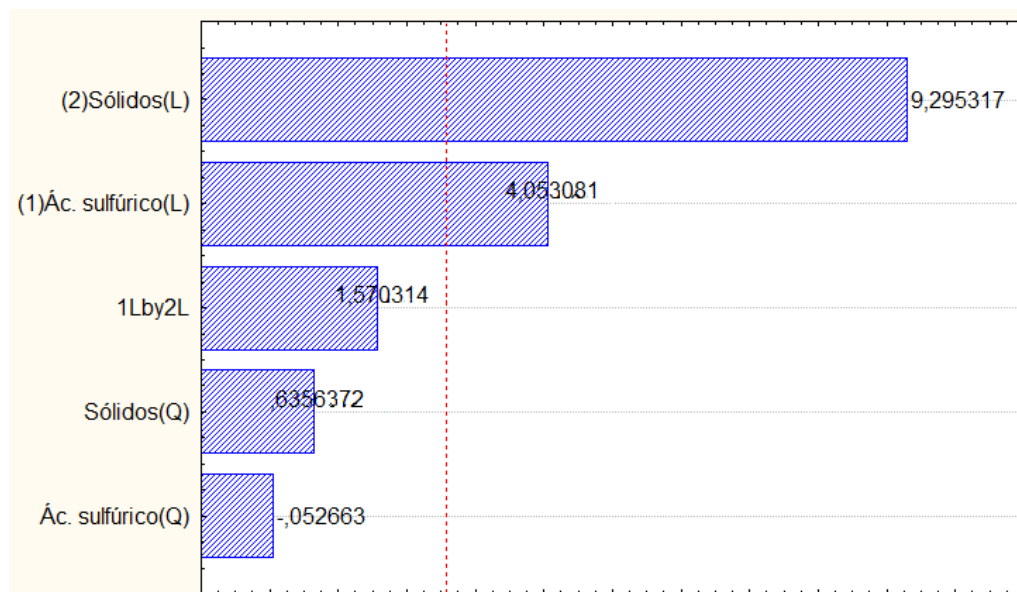
Ensaio	Conc. de ácido sulfúrico (%)	Carga de sólidos (%)	ART (g/L)
1	-1	-1	19,20±0,003
2	+1	-1	27,48±0,01
3	-1	+1	35,38±0,07
4	+1	+1	53,32±0,36
5	-1,41	0	27,87±0,02
6	+1,41	0	34,33±0,06
7	0	-1,41	19,14±0,04
8	0	+1,41	46,60±1,09
9(C)	0	0	32,46±0,54
10(C)	0	0	32,89±0,73
11(C)	0	0	31,07±0,03

Fonte: Do autor.

De acordo com a tabela acima, é possível visualizar que as maiores concentrações de Açúcares Redutores Totais foram obtidas por meio do ensaio 4, o qual possuía 2,7% de ácido e 17,8% de carga de sólidos, e o ensaio 8 (2% e 20%). No entanto, o ensaio 7, nas condições de 2% de concentração de ácido sulfúrico e 5% da carga de sólidos, obteve as menores concentrações de ART.

Através da visualização do Diagrama de Pareto (Figura 6), somente os efeitos lineares da concentração de ácido sulfúrico e da carga de sólidos foram estatisticamente significativos para um p-valor inferior a $\alpha = 0,05$. Sendo assim, a carga de sólidos foi a variável que possuiu o maior efeito no pré-tratamento, demonstrando uma proporcionalidade entre a quantidade de açúcares fermentescíveis e a massa de biomassa utilizada, seguido pela concentração de ácido sulfúrico.

Figura 6 - Diagrama de Pareto



Fonte: Do autor.

Através da construção da tabela da ANOVA (Tabela 6), foi possível realizar os cálculos da Soma quadrática da Regressão, a qual representa a soma dos desvios das previsões feitas pelo modelo, a Soma quadrática Residual representando a soma das diferenças entre os valores observados e previstos e a Soma quadrática Total, a partir dos desvios dos valores observados por meio da média global. No presente trabalho, para as somas de quadrados da regressão, resíduos e o total foram, respectivamente, de 1000,2, 47,28 e 1047,48. A Média quadrática é a razão entre a Soma de quadrados pelo Grau de liberdade.

O F calculado é de 21,1548, ou seja, o valor obtido está em torno de 4,18 vezes maior que o F tabelado (5,05) (BRANDÃO, 2007), sendo assim, conclui-se que o modelo foi preditivo a 95% de confiança e a possibilidade de gerar a superfície

de resposta e a curva de contorno. O coeficiente de variação (R^2) obtido foi de 95,48%, demonstrando que o modelo se ajusta.

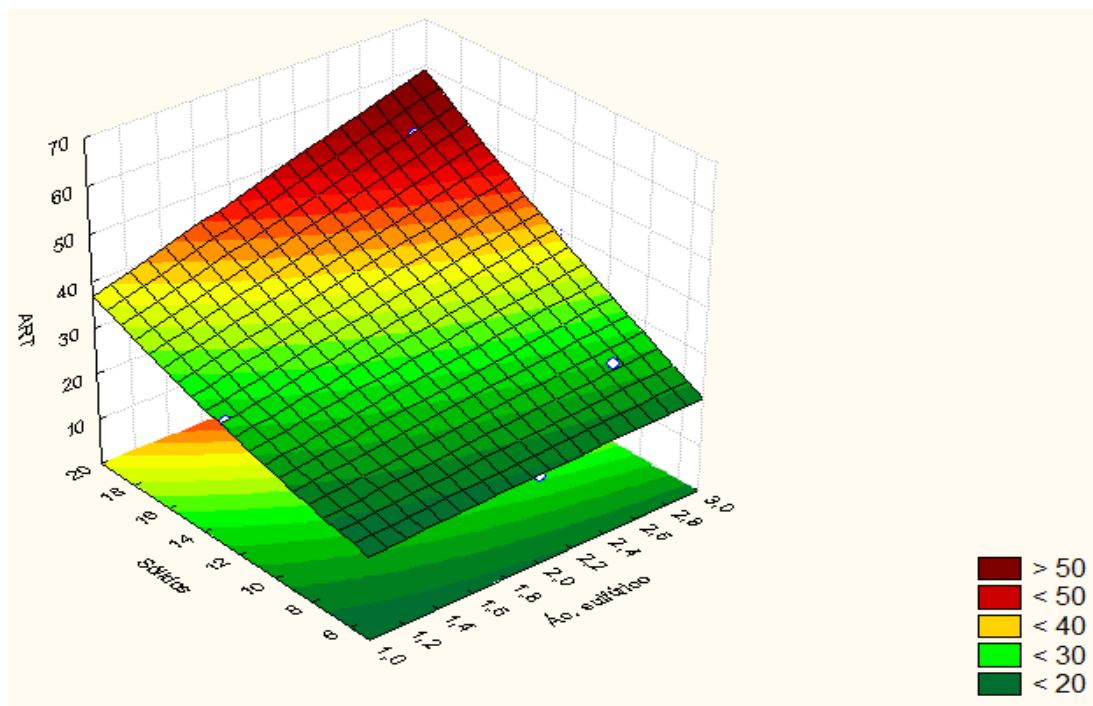
Tabela 6 - ANOVA do modelo

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
Regressão	1000,2	5	200,04	21,1548	0,0036
Resíduos	47,28	5	9,456		
Falta de ajuste	45,48				
Erro puro	1,8				
Total	1047,48	10			

Fonte: Do autor.

Por meio do planejamento experimental, avaliou-se a concentração dos açúcares redutores presentes na biomassa para as condições avaliadas. A superfície de resposta (Figura 7) e a curva de contorno (Figura 8) demonstraram que a máxima concentração de ART está nas condições de 3% de ácido sulfúrico e 20% de biomassa, dentro das condições estudadas. A Equação 10 representa o modelo gerado através da aplicação do planejamento experimental.

Figura 7 - Superfície de resposta para a concentração de ART



Fonte: Do autor.

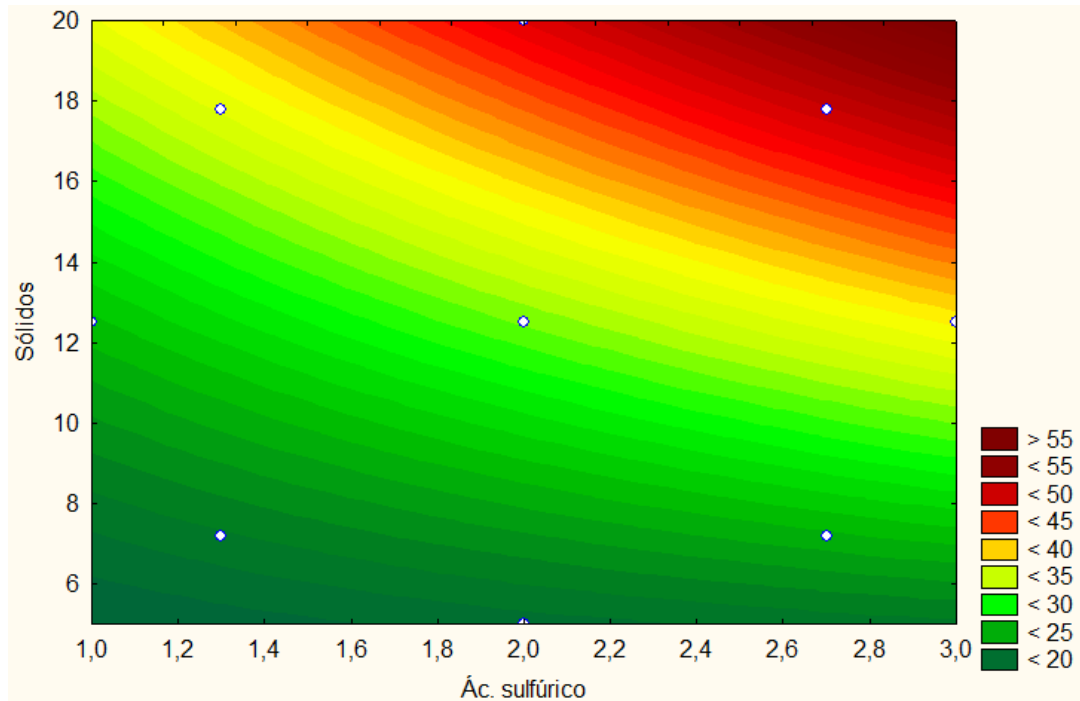
$$\text{ART} = 16,10 - 1,32x - 0,14x^2 - 0,13y + 0,03y^2 + 0,65xy \quad (10)$$

Sendo:

X: concentração de ácido sulfúrico (%)

Y: a carga de sólidos (%)

Figura 8 - Curva de contorno mediante as variáveis independentes



Fonte: Do autor.

Realizou-se também o teste de Shapiro-wilk a fim de verificar a normalidade dos dados obtidos, obtendo um valor de W calculado de 0,9210, maior que o W tabelado de 0,85, validando a normalidade das 11 amostras para um nível de significância $\alpha = 0,05$.

Após a realização do delineamento e ao obter o ponto ótimo demonstrado na curva de contorno, o qual foi definido para 3% de ácido sulfúrico e 20% da carga de sólidos, fez-se a validação do modelo através de um novo pré-tratamento nessas condições.

A quantidade de açúcares redutores totais foi determinada pela metodologia DNS conforme a sua descrição no item 4.6.2. A partir do pré-tratamento na condição ótima, foram obtidos 55,2g/L ou 5,6% (g de ART/ g de biomassa) de ART referentes a uma média de absorvância de $0,41 \pm D.p 0,0006$, sendo que para a equação do

modelo no ponto ótimo o valor estipulado é de 59,11g/L de ART, ou seja, o valor determinado equivale a 93,38% do valor previsto pelo modelo.

Miranda Neto (2018) obteve as concentrações dos açúcares redutores entre 1,31 a 1,59g/L após realizar o pré-tratamento hidrotérmico na palha de arroz ao alterar a faixa de pressão (2 a 7 kgf.cm⁻²).

Santos (2014) determinou os percentuais dos ART para a palha e sabugo de milho sob diversas condições do pré-tratamento com ácido sulfúrico. Os teores encontrados variam de 7,3 a 59,4% para a palha de milho e 5,6 a 61,5% para sabugo de milho.

Silva (2014) realizou pré-tratamento ácido de três matérias-primas obtidas através do descarte do bagaço de laranja, resíduo da graviola e do maracujá. Os percentuais encontrados de açúcares redutores totais nessa pesquisa foram de 26,37-65,52% para o bagaço de laranja, 15,96-35,62% para a graviola e 4,57-50,19% para o maracujá.

5.3 DETERMINAÇÃO DOS CARBOIDRATOS TOTAIS VIA HPLC-PAD

A partir das análises realizadas por HPLC-PAD, foram obtidas as concentrações dos açúcares constituintes da biomassa lignocelulósica demonstrados no cromatograma do Apêndice B referentes a cada amostra (Tabela 7), onde estão descritos os tempos de retenção e as áreas pertencentes à Arabinose, Galactose, Glicose, Sacarose, Xilose, Manose, Frutose e Celobiose.

Tabela 7 - Resultados obtidos por meio da cromatografia

Carboidratos	Tr	Área (%)	Concentração (ppm)
Arabinose	12,69	35,53	3629,39
Galctose	16,46	22,85	2159,04
Glicose	19,46	30,02	2716,18
Sacarose	22,32	1,69	372,8
Xilose	23,66	4,94	490,22
Manose	26,23	1,39	144,87
Frutose	31,26	1,34	272,65
Celobiose	46,95	0,1	18,12
Total		97,86	9803,27

Fonte: Do autor.

De acordo com os valores descritos na tabela acima, a Arabinose possui o menor tempo de retenção (Tr) em relação aos outros componentes, assim como a maior área e concentração detectadas entre os açúcares totais presente na amostra. No entanto a Celobiose possui o maior Tr e os valores menores para a área e a concentração.

De acordo com a Tabela 8, a amostra que possui os maiores valores para a concentração de carboidratos totais se encontram na amostra 4, a qual foi submetida ao pré-tratamento utilizando 2,7% de ácido sulfúrico e 17,8% de carga de sólidos, sendo que na mencionada amostra as concentrações de glicose, xilose e arabinose são de, respectivamente, 2,71g/L, 0,49g/L e 3,62g/L.

Grossi (2015) ao estudar a produção de etanol de segunda geração a partir de filtros de cigarro, no qual um dos constituintes é a celulose, realizou a hidrólise utilizando H_2SO_4 a 5%, obtendo uma concentração de 8,48g/L de glicose.

Lorencini (2013) realizou o pré-tratamento na biomassa de cana-de-açúcar utilizando 6% de Ácido clorídrico, obtendo as concentrações para a glicose de 1,22g/L, xilose de 6,07g/L e arabinose de 0,71g/L.

Fangkum e Reungsang (2010) determinaram as concentrações de monossacarídeos a partir do bagaço da cana-de-açúcar por meio da realização do pré-tratamento com 2% de H_2SO_4 . As concentrações descritas por esses autores são de 2,74g/L de glicose, 5,89g/L de xilose e 0,44g/L de arabinose.

Na Tabela 8 é possível verificar todas as concentrações obtidas para as amostras analisadas em um HPLC-PAD, incluindo as concentrações não quantificadas (N.Q).

Tabela 8 - Concentrações de carboidratos nas amostras

Amostras	Concentração (ppm)								Total
	Arabinose	Galactose	Glicose	Sacarose	Xilose	Manose	Frutose	Celobiose	
1	1330,4	675,62	724,9	169,26	127,09	23,74	76,78	34,66	3162,45
2	1625,27	1715,61	1676,5	N.Q	612,72	173,62	N.Q	2,33	5806,03
3	2181,65	656,15	1582,7	885,03	105,15	51,55	799,06	N.Q	6261,27
4	3629,39	2159,04	2716,2	372,8	490,22	144,87	272,65	18,12	9803,27
5	1479,52	331,87	936,89	585,06	27,4	16,32	214,93	N.Q	3591,99
6	2036,34	1808,73	1664,2	37,92	465,53	121,67	73,32	9,72	6217,40
7	1080,53	1056,54	1012,2	N.Q	327,52	94,72	19,55	4,21	3595,30
8	3231,19	1450,06	2358,2	1003,94	292,66	92,93	762,84	N.Q	9191,79
9	2221,67	1383,03	1320,7	202,27	261,28	79,41	73,14	9,77	5551,28

Fonte: Do autor.

A fim de verificar a normalidade dos dados, realizou-se o teste de Shapiro-wilk onde o W calculado foi de 0,892 para um W tabelado 0,842 para um nível de significância de $\alpha = 0,05$, validando a normalidade da distribuição para o conjunto das amostras.

5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A concentração de ácido sulfúrico e a carga de sólidos obtidos na condição ótima descrita pelo planejamento experimental, ou seja, 3% H_2SO_4 e 20% de carga de sólidos foram utilizadas para a realização do pré-tratamento seguido pela hidrólise enzimática de acordo com a metodologia do item 4.5.

Após a realização da hidrólise, os teores de açúcares redutores totais foram mensurados por meio do reagente DNS, como mencionado no item 4.6.2. Sendo assim, a concentração encontrada para ART foi de 8,9g/L, ou seja, 10,87% (ARTg/ g de biomassa).

Miranda Neto (2018) ao realizar a hidrólise enzimática da palha de arroz utilizando a enzima *CellicCTec2*, obteve as concentrações de açúcares redutores totais entre 1,51-3,49g/L, sendo que o maior resultado obtido encontra-se após um período de 72 horas.

Santos (2014) realizou o pré-tratamento com H_2SO_4 para os ART entre 6,1 a 19,6g/L para biomassas provenientes da palha e sabugo de milho. Os resultados obtidos para a palha de milho foram de 19,6g/L e para o sabugo de milho de 6,1g/L sob condições de 120°C durante 15 minutos e 5% de ácido sulfúrico do pré-tratamento. Para as condições de 110°C, durante 7 minutos e H_2SO_4 a 2%, as concentrações para os açúcares foram de 10,4g/L e 8,7g/L para a palha e sabugo respectivamente.

Silva (2014) obteve diversos teores de açúcares redutores ao alterar as faixas de concentração do ácido e da biomassa e o tempo na realização do pré-tratamento. Para o bagaço de laranja, o teor de ART variou entre 4,2 a 9,29% para condições de 15-120 minutos, concentrações de ácido sulfúrico entre 1-5% e concentração de biomassa entre 1 a 9%. A partir dos resíduos de graviola e maracujá, os teores de açúcares redutores totais sob as mesmas condições descritas para o bagaço de laranja, permaneceram entre 11,36-26,39% para a graviola e 3,48-7,76% para o maracujá.

A Tabela 9 possibilita a visualização dos valores mencionados acima em comparação com os valores encontrados para as folhas de mandioca.

Tabela 9 - Comparativo dos ART obtidos de diferentes biomassas

Referência	Biomassa	Pré-tratamento		Hidrólise Enzimática	
		ART (%)	ART (g/L)	ART (%)	ART (g/L)
Autor	Folha de mandioca	5,6	55,2	10,87	8,89
MIRANDA NETO, 2015.	Palha de arroz		1,31-1,59		1,51-3,49
SANTOS, 2014.	Palha de milho	7,3-59,4			10,4-19,6
SANTOS, 2014.	Sabugo de milho	5,6-61,5			6,1-8,7
SILVA, 2014.	Bagaço de laranja	26,37-65,52		4,2-9,29	
SILVA, 2014.	Resíduo de graviola	15,96-35,62		11,36-26,39	
SILVA, 2014.	Resíduo de maracujá	4,57-50,19		3,48-7,76	

Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

A caracterização da biomassa determinou as composições dos teores de lignina, extrativos e cinzas, os quais possuem valores próximos aos esperados de acordo com a literatura.

Ao realizar o pré-tratamento ácido na biomassa lignocelulósica, foram obtidos diferentes valores para os teores de açúcares provenientes da celulose e hemicelulose. Tais valores correspondem aos percentuais de ácido sulfúrico e carga de sólidos utilizados. O pré-tratamento ácido resultou na liberação de açúcares redutores entre 19,14-53,32g/L determinados por meio do método DNS e de carboidratos entre 3,16-9,8g/L via HPLC-PAD, os quais demonstraram ser similares aos encontrados por outras biomassas descritas por diferentes autores. Do mesmo modo ocorreu para os ART provenientes da hidrólise enzimática, ou seja, a concentração obtida após a utilização da enzima *Celluclast*[®] foi de 8,9g/L.

A partir do planejamento experimental e a análise por ANOVA, foi possível verificar se o modelo é preditivo por meio das variáveis independentes estudadas. Para a ANOVA, o F calculado demonstrou ser 4,18 vezes maior em relação ao F tabelado. Ao analisar a superfície de resposta e a curva de contorno, determinou-se o ponto ótimo do planejamento experimental e a validação do modelo, a partir do qual foram obtidos 55,2g/L de ART, isto é, a maior concentração de açúcares.

Sendo assim, conclui-se que as folhas de mandioca podem fornecer uma biomassa com potencial para a produção de bioetanol ao fornecer açúcares fermentescíveis.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A fim de complementar as atividades realizadas neste trabalho, os itens a seguir podem esclarecer outras características da biomassa visando à obtenção de etanol de segunda geração:

- a) Caracterização dos teores de carboidratos totais, fufural e hidroximetilfurfural da matéria-prima *in natura* e pré-tratada;
- b) Determinação dos carboidratos via HPLC-PAD do hidrolisado;
- c) Processo de fermentação após a etapa de hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE JUNIOR, M. A. U. *et al.* Exploring future scenarios of ethanol demand in Brazil and their land-use implications. **Energy Policy**, Amsterdam, v. 134, p. 1-11, mar. 2019.
- ALVES, A. A. C. Fisiologia da mandioca. *In*: EMBRAPA. **Mandioca e fruticultura tropical: aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, 2006. Cap.7, p.138-169.
- BARBOSA, K. L. **Produção de etanol 2G através de *Opuntia ficus-indica* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus***. 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Energia da Biomassa) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2015.
- BOHNENBERGER, L. **Concentrado protéico de folhas de mandioca como complemento alimentar para tilápias do Nilo**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Meio Ambiente) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2008.
- BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de *Eucalyptus* spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 156f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BRANDÃO, K. S. R. **Otimização do processo de produção de biodiesel metílico e etílico do óleo de mamona (*Ricinus Communis* L.) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR)**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade do Maranhão, São Luiz, 2007.
- CANDIDO, R. G. **Utilização da celulose de resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de alto valor agregado**. 2011. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.
- CARVALHO, F. M. M. **Caracterização ultraestrutural e hidrólise enzimática de cana-de-açúcar e bagaço pré-tratados quimio-mecanicamente**. 2014. 156f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 181-188, nov. 2009.
- CENTRO INTERNATIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT. **Morphology of the Cassava Plant**. Cali, Colômbia, 1983.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Boletim da safra de cana-de-açúcar**. Brasília/2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 8 jun. 2019.

COSTA, T. H. F. **Estudo da deposição de hemicelulose na parede celular de gramíneas e seu efeito sobre a recalcitrância**. 2016. 121f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

EICHLER, P. *et al.* Produção do biometanol via gaseificação de biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 828-835, 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Brasília, DF, mar. 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Procedimento para análise lignocelulósica**. Campina Grande, PB, dez. 2010.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE. **Petróleo, gás e biocombustíveis**. 2018. Disponível em: <http://epe.gov.br/pt/areas-de-atuacao/petroleo-gas-e-biocombustiveis>. Acesso em: 3 ago. 2019.

FANGKUM, A.; REUNGSANG, A. Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. **Hydrogen Energy**, Thailand, v. 36, n. 14, p. 8687-8696, jul. 2010.

FERREIRA, A. D. **Produção eficiente de Etanol de 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimizando condições de cultivo e operacionais**. 2016. 153f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

FONSECA, H. M. T. **Composição química de folhas de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) tolerantes e suscetíveis ao estresse hídrico**. 1996. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

FRANCISCO JUNIOR, W. E. Carboidratos: estrutura, propriedades e funções. *In*: ENCONTRO DE DEBATES SOBRE ENSINO DE QUÍMICA, 28, 2008, Canoas. **Anais** [...]. Canoas: Química Nova na Escola, 2008. p. 8-13.

FREITAS, W. L. C. **Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos**. 2016. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

GAMBARATO, B. C. **Isolamento e caracterização de ligninas de palha de cana-de-açúcar**. 2014. 108f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

GOLDENBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia do estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. Imprensa oficial do Estado de São Paulo, São Paulo: 2008.

GROSSI, E. C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química e Biológica) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

HUANG, Y. *et al.* Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulose from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 77, p. 53-63, mar. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola - LSPA**. Brasília/2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 22 jan. 2019.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2000.

LACERDA, T. M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais**. 2012. 258f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LIMA, E. E. **Estudo da hidrólise ácida do bagaço de pedúnculo de caju e fermentação alcoólica do licor hidrolisado para a produção do álcool etílico**. 2012. 150f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. 2009. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARQUES, C. C. **Projeto preliminar de uma unidade de produção de bioetanol a partir da biomassa florestal**. 2016. 122f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Escola Superior de Tecnologia de Tomar, Instituto Politécnico de Tomar, Tomar, 2016.

MEDINA, K. J. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético**. 2013. 171f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MELEIRO, L. P. **Relação estrutura-função de uma β -glucosidase estimulada por glicose e xilose do fungo termófilo *Hemicola insolens*: estudos de evolução dirigida**. 2017. 307f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

MELO, D. S. *et al.* Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 420-428, mar./abr. 2007.

MIRANDA NETO, M. **Desenvolvimento de processo hidrotérmico e enzimático para a obtenção de açúcares redutores a partir da palha de arroz – BRS AG**. 2018. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

MODESTI, C. F. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca submetido a diferentes tratamentos**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MORALES, C. F. G. **Avaliação do desempenho agrônomo e culinário de genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em pelotas, RS e Cruz das Almas, BA**. 2015. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

MORI, N. R. **Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar: pré-tratamentos e conversão biotecnológica não convencionais**. 2015. 199f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

MOTA, C. J. A; MONTEIRO, R. S. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p. 1483-1490, set. 2013.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL). Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures. 2017. Disponível em: <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html>. Acesso em: 3 jul. 2017.

NOGUEIRA, D. P. **Estudo da obtenção de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja (*Citrus Sinenses*) por hidrólise ácida diluída e enzimática**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

NUNES, R. M. *et al.* Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, Jul/dez. 2013.

NUWAMANYA, E. *et al.* Bio-Ethanol Production from Non-Food Parts os Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Ambio**, Swedish, v. 41, p. 262-270, 2011.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática da biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, jul. 2010.

ORTEGA-FLORES, C. I. *et al.* Avaliação da qualidade protéica da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*). **Soc. Bras. Alim.** São Paulo, v. 25, p. 47-59, jun. 2003.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RODRIGUES, A. S. **As tribos Dalechampiae Mull. Arg. e Mnioteae Melchior (Euphobiaceae) no Distrito Federal, Brasil**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

SALIBA, E. O. S. *et al.* Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SALLA, D. A. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho**. 2008. 185f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008.

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

SANTOS, M. S. R. **Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. 2014. 68f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

SANTOS, V. T. O. **Ação do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em híbridos de cana-de-açúcar e seus efeitos na conversão enzimática da glucana**. 2015. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SANTOS, L. V. *et al.* Second-Generation Ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, New York, v. 12, n. 1, p. 40-57, feb. 2016.

SCULLY, S. M.; ORLYGSSON, J. Recent advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. **Energies**, Switzerland, v. 8, p. 1-30, dec. 2014.

SILVA, C. E. F. **Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2G**. 2014. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.

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

SILVA, R. N. *et al.* Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-341, set./dez. 2003.

SIQUEIRA, L. N *et al.* Rendimento de hidrólise e produção de etanol lignocelulósico a partir de biomassa de capim elefante. **J. Bioen. Food Sci.**, Tocantins, v. 3, n. 4, p. 191-196, dez. 2016.

SOARES, I. A. *et al.* Concentrado protéico obtido das folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de três variedades comerciais. **Acta Ambiental Catarinense**, Joinville, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2016.

TIRONI, L. F. *et al.* Desempenho de cultivares de mandioca em ambiente subtropical. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 1, p. 58-66, nov. 2015.

TROMBINI, F. R. M.; LEONEL, M. Composição físico-química e propriedades tecnológicas da farinha de folhas de Mandioca. **Revista Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 29, n. 1, p. 76-81, jan./mar., 2014.

UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT - UNCTAD. **Second generation biofuel markets: state of play, trade and developing, country perspectives**. 2016. Disponível em: <https://unctad.org/en/pages/PublicationWebflyer.aspx?publicationid=1455>. Acesso em: 10 ago. 2019

VAZ JUNIOR, S. Rumo a uma química renovável brasileira a partir da biomassa vegetal. **Revista Virtual de Química**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 238-247, fev. 2017.

XU, C. *et al.* Lignin depolymerisation strategies: towards valuable chemicals and fuels. **Chemical Society Reviews**, England, v. 43, n. 22, p. 7485-7500, out. 2014.

ZHANG, P. *et al.* Fractionation of corn stover into cellulose, hemicellulose and lignin using a series of ionic liquids. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 76, p. 688-696, 2015.

APÊNDICE A – Curva padrão de glicose

Antes de proceder com a determinação dos açúcares redutores constituintes da biomassa lignocelulósica, realizou-se a construção de uma curva de calibração utilizando D-glicose e o DNS (ácido dinitrosalicílico), o qual baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, segundo o método de MILLER, 1959.

O preparo da solução padrão de D-glicose foi realizada utilizando 0,1g de soluto em um béquer que posteriormente foi solubilizado em 20mL de água destilada sob agitação com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100,0mL e aferiu o volume com água destilada.

Para o preparo do reagente DNS, utilizou-se 10,6g de ácido dinitrosalicílico e 19,8g de NaOH em 1416mL de água destilada. Logo após, 7,6mL de fenol fundido a 50°C e 8,3g de metabissulfito de sódio foram adicionados, homogeneizando o frasco âmbar que em seguida foi armazenado a 4°C (EMBRAPA, 2013).

O preparo da solução de tartarato duplo de sódio e potássio foi realizado com 15,1g do sal, o qual foi transferido para um balão volumétrico de 1,00L e completou-se o volume com água destilada.

A curva padrão foi construída variando a concentração de glicose de 0,05 a 0,5g/L.

Após serem realizadas as diluições, 1ml de reagentes DNS foram adicionados em cada tubo de ensaio, devidamente numerados, e então, foram aquecidas em banho maria por 5 minutos a temperatura de 100°C, sendo resfriadas posteriormente. Em seguida, adicionaram-se 16mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio.

Ao fim do procedimento, realizou-se a leitura das absorbâncias, em triplicata, em um espectrofotômetro *Kasuki IL-226-NM* a 540nm, devidamente zerado com o branco, o qual não possui a solução padrão de glicose.

A partir dos dados obtidos através da absorbância (Tabela 10) gerou-se a curva de calibração da D-glicose.

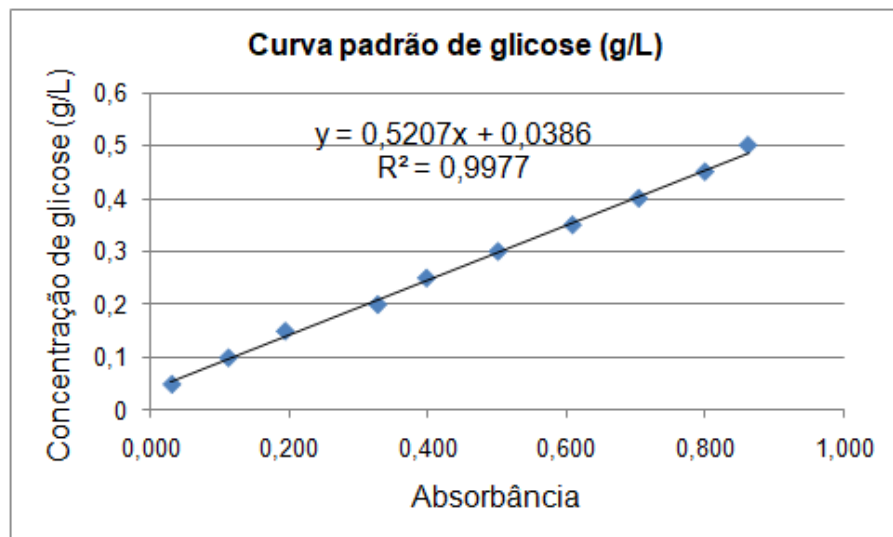
Tabela 10 - Concentrações de glicose e as respectivas Absorbâncias (Abs)

D-glicose (g/L)	Abs1	Abs2	Abs3	Média±D. padrão
0,05	0,029	0,03	0,032	0,030±0,001
0,1	0,109	0,113	0,114	0,112±0,002
0,15	0,186	0,197	0,199	0,194±0,006
0,2	0,383	0,301	0,299	0,327±0,039
0,25	0,389	0,401	0,404	0,398±0,006
0,3	0,499	0,502	0,503	0,501±0,002
0,35	0,604	0,61	0,613	0,609±0,004
0,4	0,7	0,706	0,708	0,704±0,003
0,45	0,776	0,804	0,821	0,800±0,019
0,5	0,826	0,874	0,887	0,862±0,026

Fonte: Do autor.

Por meio dos dados obtidos através da tabela acima, construiu-se um gráfico (Figura 9) para determinar a equação da reta (Equação 11), relacionando a concentração de glicose com a absorbância média das triplicatas. O coeficiente de regressão linear entre os pontos no gráfico de dispersão resultou em um valor de 99,77% entre as variáveis.

Figura 9 - Curva padrão de glicose



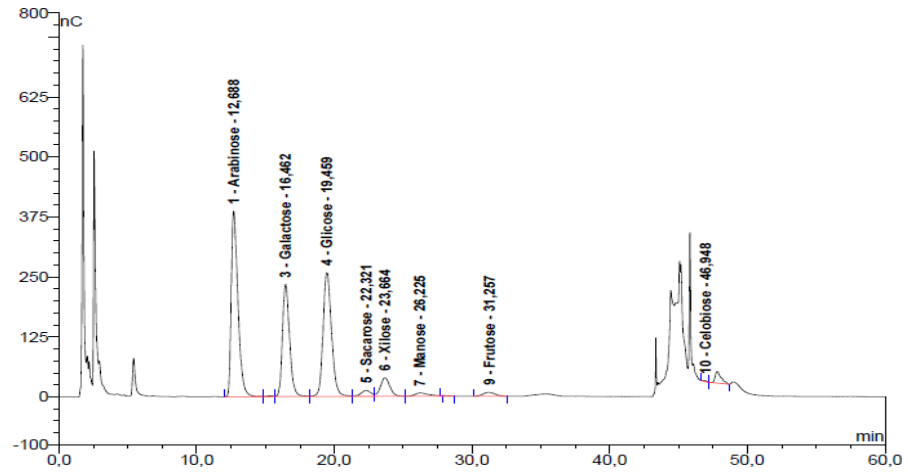
Fonte: Do autor.

$$\text{Glicose (g/L)} = (0,5207 \times \text{Abs}) + 0,0386 \quad (11)$$

A referida Equação 11 foi utilizada posteriormente para a análise da conversão dos açúcares redutores após o pré-tratamento ácido na biomassa.

APÊNDICE B – Cromatograma

Figura 10 - Cromatograma para a composição de açúcares



Fonte: Do autor.