
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Pedro Henrique Ciconello Ghiraldi

**Efeito de pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar:
Análises de acessibilidade enzimática.**



Rio Claro
2016

PEDRO HENRIQUE CICONELLO GHIRALDI

Efeito de pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar: Análises de acessibilidade enzimática.

Orientador: Professor Dr. Michel Brienzo

Supervisor: Professor Dr. Jonas Contiero

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2016

547.758 Ghiraldi, Pedro Henrique Ciconello
G425e Efeito de pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar :
análises de acessibilidade enzimática / Pedro Henrique
Ciconello Ghiraldi. - Rio Claro, 2016
40 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Michel Brienzo

1. Enzimas. 2. Bagaço. 3. Acessibilidade enzimática. 4.
Pré-tratamento. I. Título.

Resumo

Esse trabalho foi desenvolvido com biomassa de cana-de-açúcar e pseudocaule de bananeira, os quais foram submetidos a pré-tratamentos hidrotérmicos para avaliação da acessibilidade enzimática. Esta análise possibilitou o conhecimento da acessibilidade do material à ação enzimática, etapa necessária na produção de etanol de segunda geração, referente à quebra de celulose em glicose. O uso de tratamentos hidrotérmicos, com adição de ácido (H_2SO_4) e álcali (NaOH), foi responsável pela desestruturação do material lignocelulósico, permitindo assim uma maior acessibilidade e consequente aumento da digestibilidade enzimática da celulose. O tratamento oxidativo, com peróxido de hidrogênio, também se mostrou eficaz na remoção/solubilização de lignina e hemicelulose, tornando assim a produção de glicose mais eficiente. Para avaliar o efeito de cada pré-tratamento foram utilizados dois corantes: o Direct Blue, de baixa massa molecular e baixa afinidade com a celulose, penetrando nos poros e estruturas internas da biomassa; e o Direct Orange, com maior massa molecular e afinidade pela celulose, adsorvendo na superfície externa da mesma. Os resultados mostraram que quanto maior a adsorção de corante, maior é a digestibilidade do material (rendimento em glicose na etapa de hidrólise enzimática). Quanto aos pré-tratamentos, foi observado que o alcalino (em ambas biomassas) foi mais eficiente na remoção da lignina, porém removeu também maior parte de hemicelulose, causando perda de material e afetando ligeiramente as condições de hidrólise enzimática. Quanto à acessibilidade enzimática, o pré-tratamento ácido se mostrou mais eficiente devido a menor perda de material durante o pré-tratamento por alterações na superfície interna do mesmo, aumentando a acessibilidade pelo aumento da porosidade.

Palavras-Chave: bagaço de cana-de-açúcar, pseudocaule de bananeira, acessibilidade enzimática, pré-tratamento ácido diluído, pré-tratamento alcalino, pré-tratamento oxidativo.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	4
1.1 – Compostos da Biomassa	6
1.1.1 – Celulose	7
1.1.2 – Hemicelulose	7
1.1.3 – Lignina	8
1.2 – Pré-tratamentos	9
1.3 – Acessibilidade Enzimática	10
2- OBJETIVOS	11
3- MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1- Preparo do DNS	11
3.2- Biomassa Lignocelulósica	11
3.3- Pré-Tratamento alcalino	12
3.4- Pré-tratamento ácido	12
3.5- Pré-tratamento com ácido diluído	12
3.6 – Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio	13
3.7- Atividade enzimática de celulasas totais	13
3.8-Corantes utilizados	14
3.9- Caracterização química da biomassa de bananeira	15
4- RESULTADOS	15
4.1 - Rendimento em massa dos pré-tratamentos	15
4.2- Rendimento em massa dos pré-tratamentos (bananeira)	16
4.3-Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	16
4.4- Hidrólise enzimática da biomassa de bananeira	18
4.5- Acessibilidade - adsorção de corantes nos materiais pré-tratados em meio ácido, alcalino e oxidativo	20
4.6- Caracterização química da biomassa de bananeira	27
5-Discussão	28
5.1 – Rendimento em massa e caracterização da biomassa	28
5.2 – Hidrólise enzimática: rendimento de glicose	29
5.3 – Acessibilidade – adsorção de corantes	31
6 – Conclusões	32
7 – Referências	34
8- Anexos	36

1-Introdução

As pesquisas relacionadas ao etanol de segunda geração vêm aumentando exponencialmente devido à maior demanda por este produto, cuja produção tende a aprimorar a sustentabilidade e diminuir os prejuízos gerados ao meio ambiente com o mercado exploratório que existe atualmente. Define-se por etanol de primeira geração aquele produzido através do uso da sacarose ou amido, e etanol de segunda geração (2G), que é o foco desse trabalho, aquele realizado com os resíduos da biomassa, como bagaço e palha, que atualmente são utilizados na geração de energia através da queima. A biomassa estudada para a produção do etanol de segunda geração consiste em material lignocelulósico de cana-de-açúcar, que é composto por três moléculas principais: lignina, celulose e hemicelulose.

No Brasil, a produção de etanol é realizada a partir da fração líquida da moagem da cana-de-açúcar, podendo assim destinar porções como o bagaço remanescente e a palha, que antes eram utilizadas para o abastecimento energético da própria usina (através da queima) para a produção de etanol de segunda geração, que tem como objetivo se tornar viável e rentável com o desenvolvimento tecnológico. Além da biomassa derivada da cana-de-açúcar, diversos tipos de biomassa podem ser empregados na produção de etanol 2G. Um dos mais abundantes resíduos agropecuários que pode ser destinado a essa finalidade é o pseudocaule de bananeira, utilizado nesse trabalho em comparação ao bagaço da cana-de-açúcar. O pseudocaule de bananeira, além de possuir grande oferta de mercado, devido à grande produção do pseudofruto e baixo aproveitamento dos seus resíduos, possui em sua composição grande proporção de celulose (aproximadamente 80%) e baixa proporção de lignina (aproximadamente 10 %) [1] o que torna o material viável para a produção de etanol.

Um dos principais problemas encontrados para a autossuficiência energética através do etanol 2G são os altos custos para o processamento da biomassa, uma vez que os açúcares do material lignocelulósico, alvo de hidrólises para a obtenção de monossacarídeos fermentáveis, (matéria-prima para a fermentação) se encontram na forma de polissacarídeos (celulose e hemicelulose). O grande desafio é que estes polissacarídeos estão envoltos por uma macromolécula aromática complexa (lignina) provendo resistência a microfibrila celulósica e assim a parede celular vegetal, o que dificulta a desestruturação da mesma para a hidrólise dos polissacarídeos em monossacarídeos.

Outra grande dificuldade é a baixa acessibilidade enzimática a celulose, que confere condições de baixa digestibilidade enzimática [2]. Cada material possui uma porosidade que caracteriza a acessibilidade de acordo com suas frações [3] e pode ser desestruturado com tratamentos físicos e químicos. Entende-se por acessibilidade enzimática, o poder de

penetração e adesão das enzimas responsáveis pela hidrólise da biomassa. Devido ao alto grau de complexidade dos cristais de celulose, fortificados pela ação estrutural da lignina, a acessibilidade *in natura* desses materiais se mostra baixa, sendo necessário o uso de pré-tratamentos para desorganizar a estrutura do material. Tanto o pré-tratamento por meios ácidos quanto por meios básicos tem por finalidade a desestruturação da biomassa, aumentando a superfície de contato e assim melhorando o rendimento em glicose pela ação de enzimas hidrolíticas. O aumento na acessibilidade resulta em maior quantidade de açúcar fermentável e assim maior produção de etanol. A acessibilidade é medida através de estudos de adsorção de corantes, onde se quantifica o total de corante adsorvido na biomassa pré-tratada. Para isso são utilizados corantes com diferentes massas moleculares, permitindo a quantificação de material adsorvido internamente à celulose, o que mostra o potencial de ação enzimático, e externamente, medindo a superfície de contato entre a celulose que pode ser alcançada por enzimas para hidrólise.

Os corantes mais utilizados para essa função, são os mesmos utilizados nesse trabalho; são eles o Direct Blue e o Direct Orange; O Direct Blue possui uma fórmula conhecida (figura 1), peso molecular de 992,82. Sua molécula ocupa uma área de 3,6 nm² (o que equivale a 1 mm de diâmetro). O corante Direct Orange é um produto condensado do ácido 5-nitro-*o*-toluenosulfônico em solução aquosa alcalina. Essa condensação forma um polímero complexo (figura 1) de fórmula e estrutura não totalmente definidas. Apesar do corante laranja possuir moléculas de diversos tamanhos, sabe-se que todos os seus componentes são maiores do que o corante azul, permitindo assim analisar a acessibilidade conferida pela superfície interna (Direct Blue) e externa (Direct Orange). Normalmente, se usa como estimativa da acessibilidade a soma da adsorção de Direct Orange e Blue.

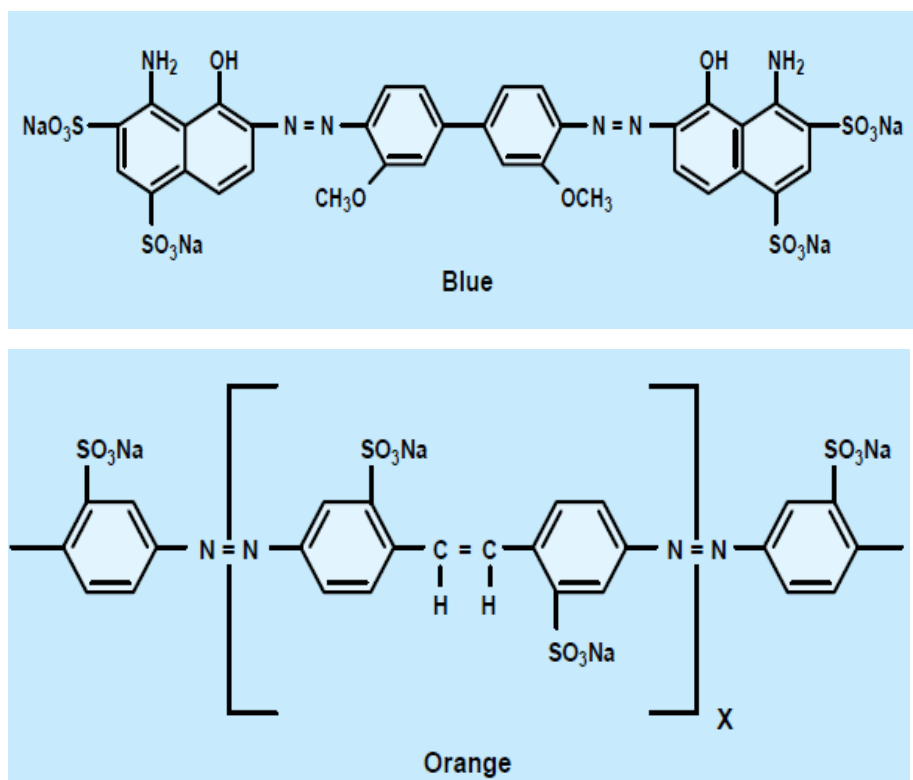


Figura 1: Estrutura química dos corantes Direct Blue e Direct Orange.[4]

1.1 Composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa utilizada para o estudo é o bagaço de cana de açúcar e o pseudocaule de bananeira, os quais são materiais lignocelulósicos composto por três frações (celulose, hemicelulose, lignina) que constituem aproximadamente 90% do material [5]. Esse material é alvo de estudos para que futuramente possa ser utilizado na produção de etanol de segunda geração (2G) em larga escala. Na figura 2 está demonstrada a estrutura de cristais de celulose, intermeadas por moléculas de lignina, que confere resistência ao conjunto.

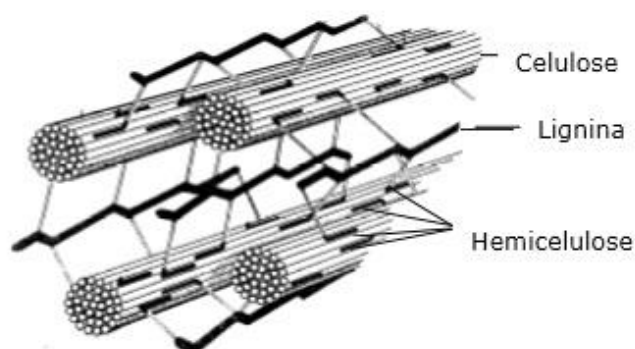


Figura 2 – esquema estrutural simplificado de uma fibrila lignocelulósica [6]

1.1.1 – Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo mais abundante da parede celular vegetal, e pode atingir um valor de até 60% da composição da biomassa geral [5]. A celulose é composta por D-glicoses unidas por ligações glicosídicas. Sua estruturação linear na molécula permite a formação de agregados, o que confere resistência a degradação e tensão à mesma [7]. A figura 3 representa uma molécula de celulose (polissacarídeo), que pode ser hidrolisada em moléculas de glicose (monossacarídeo).

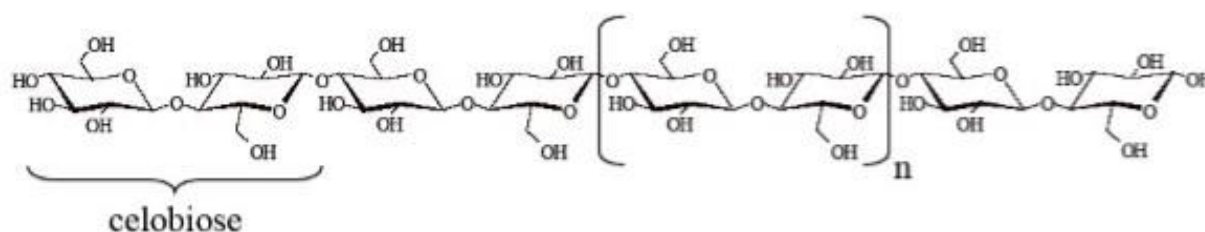


Figura 3 – representação das cadeias lineares da celulose, formadas por unidades de celobiose [8].

1.1.2 – Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo complexo formado por açúcares como pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-O-metil-glucurônico e galacturônico). A hemicelulose apresenta cadeias laterais ou ramificações, que promovem maior interação com as moléculas de celulose e lignina, e confere flexibilidade e ao mesmo tempo estabilidade a parede vegetal [9]. Na estrutura lignocelulósica, a hemicelulose representa uma proporção de 15-30% do total de matéria seca e age como estrutura de ligação entre as moléculas de celulose, conferindo estabilidade a molécula como um todo.

O exemplo mais comum de hemicelulose encontrado na maioria dos materiais lignocelulósicos é a xilana, que corresponde a aproximadamente um terço da fonte de material de energia renovável do planeta [10]. Esta é a hemicelulose característica de gramíneas (bagaço de-cana-de-açúcar). A Hemicelulose característica do pseudocaule de bananeira possui frações de hemicelulose composta em sua maior proporção por xilana, com porção de monômeros de glicose [8]. Abaixo, na figura 4, estão presentes os principais componentes da hemicelulose.

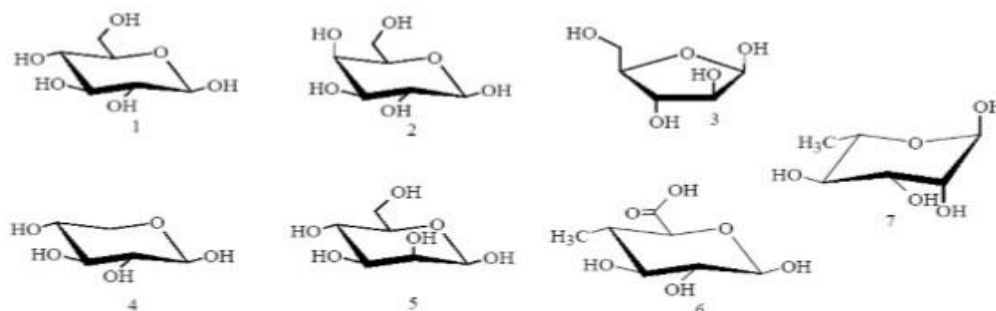


Figura 4: Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-glicose (1), D-galactose (2), L-arabinose (3), D-xilose (4), D-manose (5), 4-O-metil-D-glucurônico (6), L-ramnose (7) [8].

1.1.3– Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa formada pela polimerização radicalar de unidades de fenil-propano e constitui a maior fração das substâncias não polissacarídicas presente no material lignocelulósico [5]. Constituinte de aproximadamente 15-35% do material, a lignina confere enrijecimento e assim proteção e estruturação para a planta, e consequentemente para o material lignocelulósico [7]. Logo, sabe-se que a retirada total ou parcial da lignina aumenta a taxa de digestibilidade enzimática [11], permitindo que o processo de hidrólise/quebra dos polissacarídeos em monossacarídeos seja aprimorado.

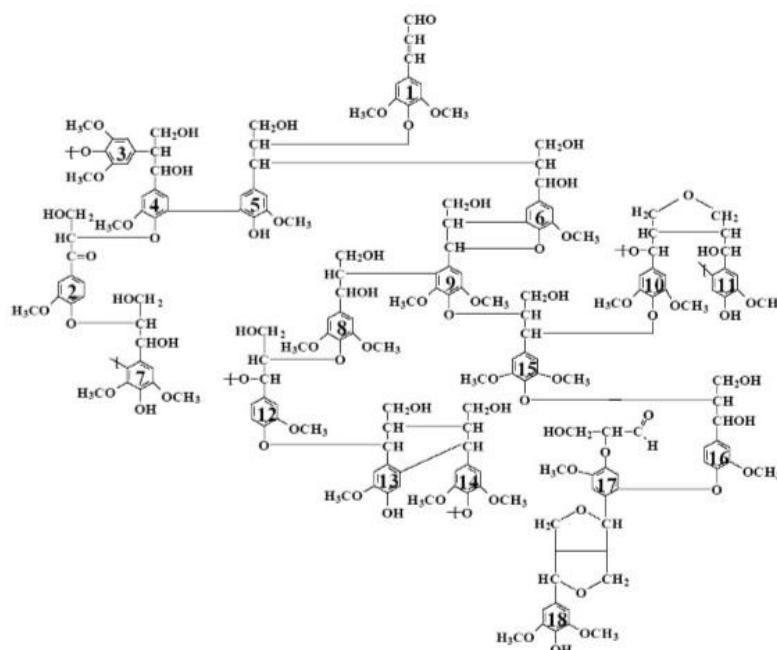


Figura 5- Estrutura da lignina de *Fagus sp* [12].

1.2- Pré-tratamentos

A produção do etanol de segunda geração através do material *in natura* é inviável devido a alta carga enzimática necessária para as conversões da celulose. Um dos modos de contornar a situação é utilizando pré-tratamentos que desestruturam o material lignocelulósico mudando a sua organização, estrutura e morfologia.

O pré-tratamento pode ser conduzido por estratégias variadas, mas todos têm os mesmos objetivos, que é a retirada total ou parcial da hemicelulose e/ou lignina (ou sua modificação), aumentar a área superfície e diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose aumentando assim a eficiência do processo devido a uma maior digestibilidade pelo aumento da acessibilidade enzimática [5]. O sucesso na etapa de pré-tratamento permite maximização nas etapas seguintes: hidrólise enzimática, liberação de açúcares fermentáveis, e na fermentação para produzir o etanol.

Para superar a baixa porosidade e alta resistência do material, podem ser usados pré-tratamentos químicos (ácidos e básicos) com o intuito de solubilizar/modificar a lignina e/ou parte da hemicelulose, aumentando assim a porosidade da matriz celular. Pré-tratamentos físicos, como a moagem são efetivos para diminuir a cristalização estrutural da molécula de celulose e assim aumentar a área de atividade em que a ação enzimática vai ocorrer. Entretanto, apresentam alto consumo de energia o que inviabiliza a aplicação industrial. Idealmente, um pré-tratamento ótimo deve: proporcionar máxima digestibilidade enzimática ao material pré-tratado, minimizar a perda de açúcares, minimizar a produção de subprodutos, minimizar o uso de energia, reagente e equipamentos e permitir escalonamento para planta industrial [5].

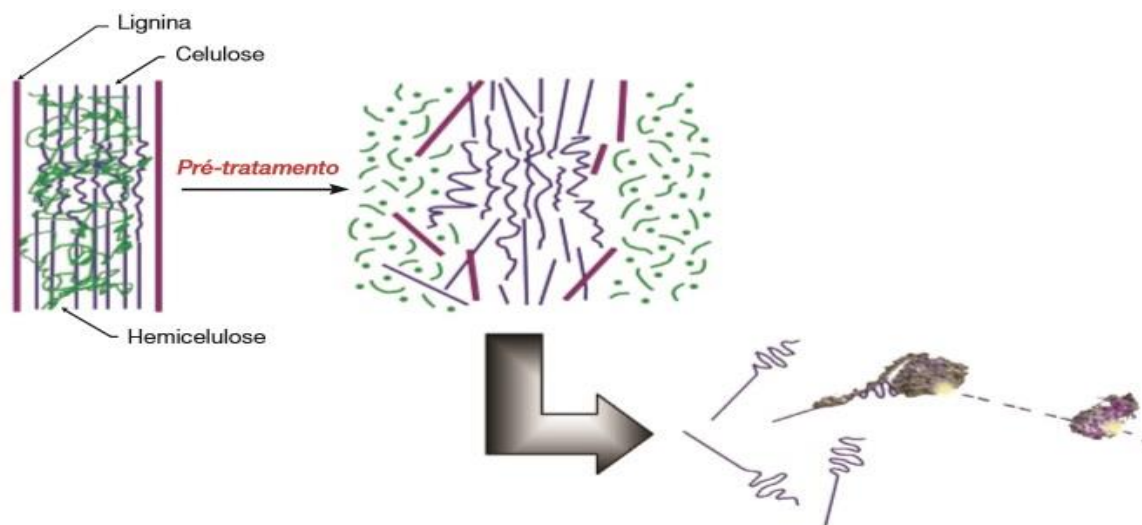


Figura 6 – Esquema de pré-tratamento para desestruturação da biomassa seguido por hidrólise enzimática da celulose para liberação de glicose [5].

1.3- Acessibilidade enzimática

Um fator muito importante para a conversão eficiente de celulose é a facilidade com que os complexos enzimáticos conseguem chegar a fibra de celulose. Esta fibra apresenta uma área superficial, não só externa, mas também interna, onde a enzima age para quebrar os polissacarídeos em monossacarídeos fermentáveis. A tal fato, se dá o nome de acessibilidade enzimática, ou seja, a capacidade de penetração e adesão das enzimas utilizadas para a hidrólise na biomassa [2].

A estrutura físico-química da biomassa, no entanto, dificulta o acesso das enzimas aos seus polissacarídeos. Isso ocorre devido a formação de cristais compactos de celulose envolvidos por hemicelulose e lignina, que conferem rigidez à biomassa. Essa compactação estrutural interfere na eficiência do processo hidrolítico, gerando menos produtos para a fermentação [2,3].

Outro fator determinante para a acessibilidade é a porosidade do material, ou seja, o tamanho dos poros contidos na biomassa determina o tamanho das enzimas que serão eficientes em sua quebra. Geralmente, devido a estrutura química envolta por lignina, os poros não possuem tamanho grande suficiente para a penetração da enzima, sendo necessário a ação dos pré-tratamentos físicos e químicos (como o tratamento ácido e alcalino) para modificar o material quanto a sua estrutura e natureza, removendo as moléculas de lignina e assim aumentando a porosidade e superfície de contato acessível as enzimas. Os melhores resultados aparecem quando grande quantidade de enzima consegue penetrar na biomassa e realizar a quebra das moléculas de polissacarídeo, não excluindo o mesmo processo na superfície externa do material.

Um dos métodos mais utilizados para calcular a acessibilidade enzimática é o método de adsorção de corantes [13], onde a biomassa pré-tratada ou *in natura* é incubada com dois corantes de peso moleculares e afinidades diferentes (um azul de baixo peso molecular, que penetra na superfície interna (poros), e um laranja de alto peso molecular e alta afinidade com a celulose, o qual adsorve na sua superfície, assim atingindo a superfície externa do material [14]). A quantidade de corante adsorvido é utilizado para estimar a superfície interna (azul) e externa (laranja) do material, normalmente expresso como superfície total, ou relação ou taxa externa/interna. Essa análise permite determinar qual a quantidade de material que realmente conseguiriam de forma efetiva ser acessado por enzimas, influenciado de acordo com cada pré-tratamento ou suas condições. Outro método bastante utilizado para aferir a acessibilidade enzimática é o método de porosidade por Mercúrio ou por gás Nitrogênio [12], onde a

biomassa é seca e sua pressão interna avaliada, e é irradiada com mercúrio ou nitrogênio. Após a contaminação da amostra com essas substâncias, a diferença de pressão é calculada, e pode-se obter a quantidade de material adsorvido pela biomassa, quantificando assim o total de mercúrio ou nitrogênio que foi capaz de passar pelos poros, o que indiretamente leva a quantidade e tamanho dos poros presentes.

2-Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo principal avaliar a acessibilidade enzimática em biomassa vegetal (cana-de-açúcar e pseudocaule de bananeira) submetidos a diferentes pré-tratamentos (ácido, alcalino e oxidativo).

3-Materiais e Métodos

3.1- Preparo do DNS

Para obtenção do reagente de DNS, foram utilizados os seguintes materiais e protocolo [15]: Foram dissolvidos 10,6 gramas de ácido 3,5-dinitrosalisílico, 19,8 gramas de hidróxido de sódio, 306 gramas de tartarato de sódio e potássio e 8,3 gramas de bissulfito de sódio em 1 litro de água deionizada, que foi deixado em agitação por 40 minutos para dissolução total dos reagentes. Após isso, foram adicionados 7,6 mL de fenol na solução e o volume foi completado para 1,4 litros de água.

3.2 – Biomassa lignocelulósica

A biomassa de cana-de-açúcar, o bagaço, foi obtida no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba – SP. As amostras foram previamente lavadas, moídas para a extração do suco e seccionadas obtendo o entrenó livre de epiderme. Após isso foram colocadas em uma estufa a 50°C para a secagem completa do material. O último passo foi realizar a moagem para a obtenção de fragmentos selecionados em peneira de 20 mesh. A biomassa de bananeira (pseudocaule - Biomassa 2) foi coletada nos arredores da cidade de Rio Claro e processada como descrito para o bagaço.

3.3 – Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino foi realizado com hidróxido de sódio (NaOH). Primeiramente, foram utilizados frascos de 500 mL, cada um contendo 5 gramas de biomassa. Os frascos foram separados de acordo com as concentrações estipuladas (5%, 10%, 20% e 30% massa/massa). As quantidades de NaOH utilizadas foram relacionadas com a massa de material, por isso a concentração foi obtida em m/m. Para cada concentração, foram utilizados 6 frascos. Após essa etapa, foram colocados 50 mL de água deionizada em cada frasco, para que o substrato sólido fosse suspenso. Após homogeneização os frascos foram levados a uma autoclave vertical, nas condições de 121°C, por 30 minutos à pressão de 1 atm. Ao fim do tempo de reação, os meios foram filtrados em papel de filtro, e lavados com água deionizada. A lavagem ocorreu até que o pH se ajustasse ao pH da água deionizada (entre 4 e 5). O material sólido obtido foi colocado em estufa a 40°C para a secagem.

3.4- Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento foi utilizado para a desagregação/modificação da lignina por processos químicos da biomassa de bananeira, a fim de analisar o seu efeito na acessibilidade enzimática. O pré-tratamento foi realizado com ácido sulfúrico. Primeiramente, foram utilizados 24 frascos de 500 mL cada um contendo 5 gramas de biomassa. Os tubos foram separados de acordo com as concentrações estipuladas (5%, 15%, 20% e 25% massa/massa). As quantidades de ácido que foram utilizadas foram relacionadas com a massa de material, com a intenção de obter as concentrações em m/m. Para cada concentração, foram utilizados 6 frascos com 100 mL de água deionizada, para que o substrato sólido fosse diluído. Após a diluição os frascos foram levados a uma autoclave vertical, nas condições de 121°C, por 30 minutos à pressão de 1 atm. Ao fim do tempo de reação, os meios foram filtrados em papel de filtro, e lavados com água deionizada. A lavagem ocorreu até que o pH se ajustasse ao neutro. O material sólido obtido foi colocado em estufa a 40°C para a secagem.

3.5- Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

O presente pré-tratamento foi realizado através da ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Primeiramente, foram utilizados 24 frascos de 500 mL, cada um contendo 5 gramas de biomassa (no caso de bananeira). Os tubos foram separados de acordo com as concentrações estipuladas (2%, 4%, 6% e 8% massa/massa). As quantidades de H₂O₂ que foram utilizadas foram relacionadas com a massa de material, por isso concentração foi obtida em m/m. Para cada concentração, foram utilizados 6 frascos, totalizando 24 amostras com 100 mL de água

deionizada em cada frasco, para que o substrato sólido fosse suspenso. Após a diluição os frascos foram aquecidos a 50°C, por 30 minutos. Ao fim do tempo de reação, os meios foram filtrados em papel de filtro, e lavados com água deionizada. A lavagem ocorreu até que o pH se ajustasse ao neutro. O material sólido obtido foi colocado em estufa a 40°C para a secagem.

3.6- Pré-tratamento com clorito de sódio

O bagaço foi pré-tratado com clorito de sódio e ácido acético por 3 horas e a reação foi observada da seguinte forma: para cada grama de material moído, foram utilizadas 0,3 gramas de clorito de sódio (0,93%, m/v), 0,1 mL de ácido acético anidro (0,31% v/v) e 32 mL de água. O experimento foi realizado em frascos de 1 L, cada um contendo 15 g de substrato e mantidos em banho maria a 70°C. Para resultados mais efetivos para o processo de deslignificação, uma adição da carga de clorito foi realizada a cada hora da reação. Sabendo disso, a cada hora, um dos frascos foi retirado do banho maria e a mesma quantidade de clorito de sódio e ácido acético adicionados aos outros frascos que continuaram em reação. Esse procedimento foi repetido por 3 horas, gerando assim diferentes níveis de ação do pré-tratamento. A ordem de retirada dos frascos obedeceu a seguinte cronologia: o 1º frasco foi retirado após 30 minutos de reação; o 2º frasco foi retirado após 1 hora de reação; o 3º frasco foi retirado após 2 horas de reação e finalmente o 4º frasco foi retirado após 3 horas de reação. Após todos os frascos serem retirados, e a reação interrompida, os materiais obtidos foram filtrados e lavados com cerca de 1 L de água para neutralização do pH. As partes sólidas foram removidas e colocadas em estufas a 40°C para secarem.

3.7- Atividade enzimática de Celulases totais

A atividade enzimática de celulases totais foi determinada pelo método descrito por Ghose [16] que consiste em realizar hidrólises enzimáticas tendo como substrato tiras de papel de filtro Whatman nº 1 e determinar a quantidade de açúcares redutores através de método de DNS [16]. Para tal, foram cortadas tiras de papel de filtro Whatman com dimensões de 1x6 cm (o que equivale a 50 mg de substrato) e cada tira foi inserida em um tubo de ensaio junto com 1 mL de tampão acetato de sódio (50 mM com pH igual a 4,8) e 0,5 mL de extrato enzimático comercial (Novozymes). Os tubos foram incubados a 50 °C por 60 minutos e após isso, a reação enzimática foi interrompida por 3 mL de DNS. Os tubos foram colocados em banho térmico a 100 °C por 5 minutos e em seguida diluídos com adição de 20 mL de água deionizada, para então ter a sua absorbância lida em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm. Para zerar o aparelho foi utilizado uma amostra contendo

apenas tampão e DNS; Para cada concentração foi realizado um ensaio controle adicionando a solução de DNS antes do extrato enzimático (não permitindo assim o início da ação enzimática) para descontar possíveis erros de açúcares não produzidos durante a ação enzimática. A solução padrão utilizada foi a solução de glicose (Merck).

3.8- Adsorção de corantes - acessibilidade

Para determinar a acessibilidade enzimática proveniente de cada pré-tratamento, foram utilizados 2 corantes: o Direct Blue (Azul) e o Direct Orange 15 (laranja) [4]. O corante azul foi diluído em 100 mL de água e armazenado pois já apresentava as características desejadas. O corante laranja foi diluído em 200 mL de água deionizada e filtrado a vácuo para a obtenção de moléculas de alta massa, descartando assim a solução resultante da filtração. Ambos os corantes foram preparados na concentração de 10 mg de corante por mL de água deionizada.

O experimento de adsorção de corante foi montado com 6 tubos contendo 50 mg de biomassa previamente pesada em cada tubo, seguida da adição dos corantes para formar 6 concentrações diferentes (0,06; 0,25; 0,37; 0,5; 0,75 e 1 mL de corante azul e vermelho) para cada amostra. O experimento foi realizado tanto para a cana-de-açúcar quanto para o material de bananeira. Foram adicionados 1 mL de tampão fosfato de sódio em cada tubo, a fim de manter o pH ideal ($\text{pH} = 6$) para a adsorção ocorrer e o volume foi completado para 5 mL de solução com água deionizada. As amostras foram levadas a um shaker e mantidas por 6 horas a 70°C com rotação de aproximadamente 120 rpm. Após o tempo, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos para a separação da fase sólida e líquidas. A fase sólida foi descartada e a fase líquida teve sua absorbância determinada a 455 e 624 nm. A acessibilidade enzimática foi analisada de acordo com a quantidade de corante adsorvida na superfície interna e externa do material lignocelulósico, sendo calculada a partir da absorbância obtida para calcular a concentração do corante restante em solução. A fórmula utilizada para o cálculo de concentração dos corantes é [17]:

$$A_{455\text{nm}} = \text{EO}/455\text{LCO} + \text{EB}/455\text{LCB}$$

$$A_{624\text{nm}} = \text{EO}/624\text{ LCO} + \text{EB}/624\text{ LCB}$$

Onde:

A é a leitura obtida nos comprimentos de onda de 455 e 624 nm;

L é o comprimento do percurso percorrido pela luz (nesse caso é 1cm);

EO/455, EO/624, EB/455 e EB/624 são dados pré-obtidos através de uma leitura padrão (dos corantes sem a biomassa) efetuada nessas faixas do espectrofotômetro.

$$\text{EO}/455 = 35,63 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}.$$

$$EO/624 = 0,19 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

$$EB/455 = 2.59 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

$$EB/624 = 15.64 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Após a obtenção da concentração restante, bastou subtrair o valor da concentração inicial, previamente obtida para saber a quantidade de corante adsorvida. A proporção de corante absorvido foi diretamente relacionada com os dados de digestibilidade enzimática, baseado no rendimento em glicose. Após o cálculo da absortividade relativa final, os seguintes passos foram realizados para o cálculo de absortividade máxima:

- O resultado de concentração foi multiplicado pelo valor de diluição de cada amostra (10, 10, 20, 25, 30 e 45 vezes respectivamente dos tubos 1 ao 6); - multiplicado o valor pelo volume de reação (5 mL) para obter a massa do corante absorvido; - dividir os valores obtidos pela massa de material utilizados, para obtermos o valor de miligrama de corante por grama de material; - linearizar os dados (1/valor) e obter um gráfico para cada tratamento e concentrações, obtendo assim uma equação de reta, onde o coeficiente angular foi utilizado para o cálculo de absortividade máxima (1/coeficiente angular).

3.9- Caracterização química da biomassa de bananeira

Para a realização da caracterização química da biomassa de bananeira, foram utilizados os materiais pré-tratados com as seguintes proporções em porcentagem: H_2SO_4 (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 %) NaOH (5, 10, 15, 20, 25 e 30 %) e H_2O_2 (2,4,6 e 8 %); A caracterização foi feita através de um HPLC, onde foram estimados em porcentagem, os valores de cada fração da biomassa (Celulose, Hemicelulose e Lignina).

4 - Resultados

4.1- Rendimento em massa dos pré-tratamentos alcalino e com clorito de sódio com biomassa de cana-de-açúcar.

Após a realização dos pré-tratamentos, foi quantificada a biomassa resultante após a extração de parte da lignina e da hemicelulose através das ações de cada pré-tratamento. Para inferir os resultados, foi usado a seguinte expressão matemática: $R = (\text{MFS}/\text{MIS}) \times 100$, onde R é o rendimento em porcentagem; MSF é a massa final do substrato; MIS é a massa inicial do substrato. Os dados obtidos foram alocados na seguinte tabela (Tabela 1).

Tratamento	Amostra	Rendimento (%)
NaOH (%)	5	60.57
	10	58.20
	20	53.30
	30	46.90
Clorito (carga)	30/1	54.53
	60/1	48.66
	120/2	47.53
	180/3	44.26

Tabela 1: Rendimento em porcentagem nos pré-tratamentos por NaOH e Clorito em biomassa de cana-de-açúcar.

Nota-se na tabela 1 que o rendimento do material pré-tratado com NaOH é maior quando a concentração do reagente é menor. Foi obtido uma diferença de mais de 40% entre as concentrações mínimas e máximas do mesmo (5% e 30%). Isso demonstra, que devido a agressividade do pré-tratamento, uma maior porção de lignina e hemicelulose foram extraídos, podendo haver grande perda também de celulose (objeto de estudo), visto que a quantidade final das amostras foram menores.

Nota-se ainda que a amostra com maior rendimento de massa foi a que empregou menor concentração do reagente. Entretanto, a eficiência com o aumento da concentração não foi tão brusca quanto no pré-tratamento anterior, visto que a diferença em proporção do rendimento obtido com a menor concentração para a maior foi de apenas 10%. Isso também pode demonstrar menor perda de material alvo (celulose);

4.2– Rendimento em massa dos pré-tratamentos com a biomassa de bananeira

Na tabela 2, nota-se que os tratamentos foram mais eficientes de acordo com as maiores concentrações de reagente, em todos os casos indicando assim grande remoção principalmente da lignina.

Tratamento	Amostra	Rendimento (%)
H₂SO₄ (%)	5	60.57
	10	58.20
	15	53.30
	20	46.90
	25	44.90
	30	30.30
	35	31.20
	40	32.10
NaOH (%)	5	46.00
	10	43.50
	15	33.80
	20	29.20
	25	27.60
	30	25.00
H₂O₂ (%)	2	48.60
	4	42.70
	6	39.90
	8	32.40

Tabela 2: Rendimento de massa em porcentagem da biomassa de bananeira

No tratamento alcalino, houve maior eficiência em menor concentração do que nos outros tratamentos, enquanto o tratamento ácido foi o de maior divergência do tratamento menos severo (5 % de ácido rendeu 60,57% da massa inicial) com o mais severo (40 % de ácido resultou em 32,1% da massa inicial), com aproximadamente 30% de diferença.

4.3– Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Como demonstrado na tabela, em comparação com o grupo de controle, a concentração de glicose no pré-tratamento com clorito foi totalmente dependente do tempo de reação uma vez que no primeiro teste, com a carga por 30 minutos, os índices de glicose obtidos foram mais baixos do que os índices do grupo controle, aumentando gradativamente nas reações realizadas por mais tempo.

O pré-tratamento alcalino se mostrou bastante eficiente e dependente da concentração do reagente utilizado. Na menor concentração já foram obtidos índices de glicose maiores do

que no grupo controle, aumentando gradativamente conforme a quantidade de reagente utilizado.

Amostra	Absorbância	Concentração de glicose (mg/mL)
Controle 1	0,61	2,14
Controle 2	0,59	2,10
Clorito 30 minutos	0,41	1,60
Clorito 30 minutos	0,38	1,51
Clorito 1 hora	0,67	2,31
Clorito 1 hora	0,66	2,27
Clorito 2 horas	0,82	2,71
Clorito 2 horas	0,78	2,61
Clorito 3 horas	0,82	2,73
Clorito 3 horas	1,11	3,54
NaOH [5%]	0,75	2,53
NaOH [5%]	0,61	2,15
NaOH [10%]	1,21	3,81
NaOH [10%]	1,17	3,69
NaOH [20%]	1,02	3,28
NaOH [20%]	1,18	3,70
NaOH [30%]	1,22	3,83
NaOH [30%]	1,23	3,85

Tabela 3: Efeitos dos pré-tratamentos na hidrólise enzimática

4.4– Hidrólise enzimática da biomassa de bananeira

Para cada pré-tratamento realizado com a biomassa de bananeira, foi demonstrado a cinética de hidrólise enzimática, sendo o desvio padrão calculado e utilizado para cada um dos resultados.

Na figura 7, pode ser observado que todas as concentrações de ácido utilizadas foram eficientes no tratamento e mostraram índices de glicose obtidas notavelmente maiores do que no grupo controle, chegando próximo dos 80% de rendimento de massa total em glicose nas concentrações de 20 a 35 % (m/m) de reagente sobre amostra. Nesse caso a concentração de reagente se mostrou tão importante quanto o tempo de reação para melhores resultados.

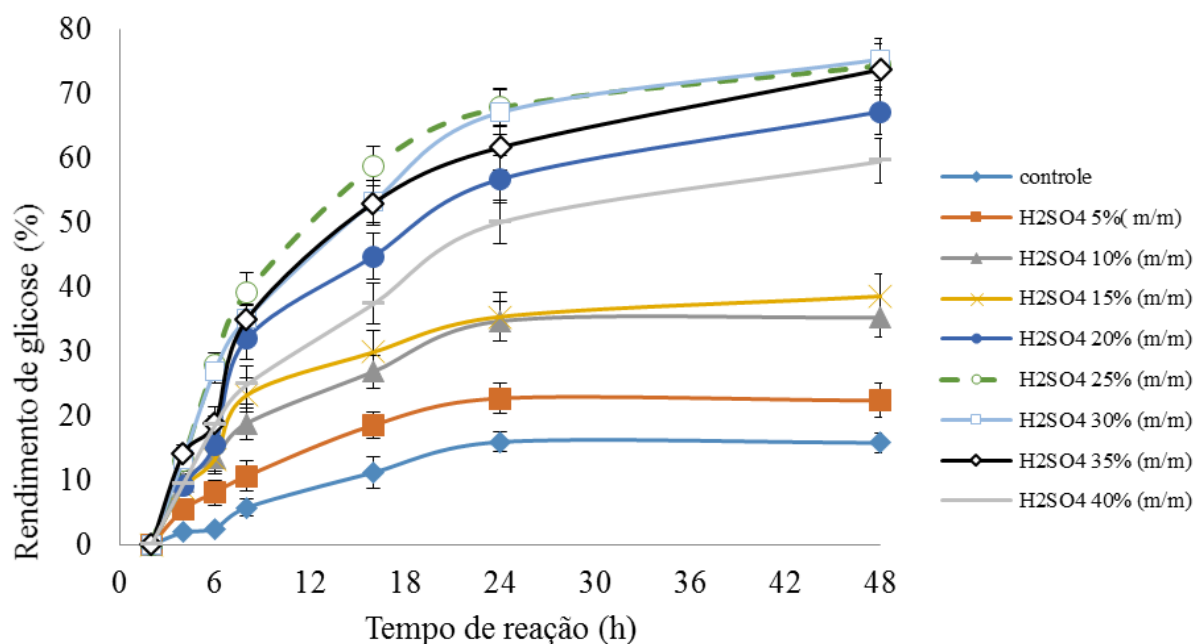


Figura 7: Cinética de hidrólise enzimática (rendimento de glicose) da biomassa de bananeira com pré-tratamento ácido (H_2SO_4).

Na figura 8 pode-se observar que o tratamento alcalino foi eficiente e totalmente dependente da concentração de reagente utilizada uma vez que quanto maior a concentração, mais eficiente foi o rendimento de glicose (%). Nota-se que em todas as concentrações o tratamento mostrou melhores resultados do que os obtidos no grupo controle.

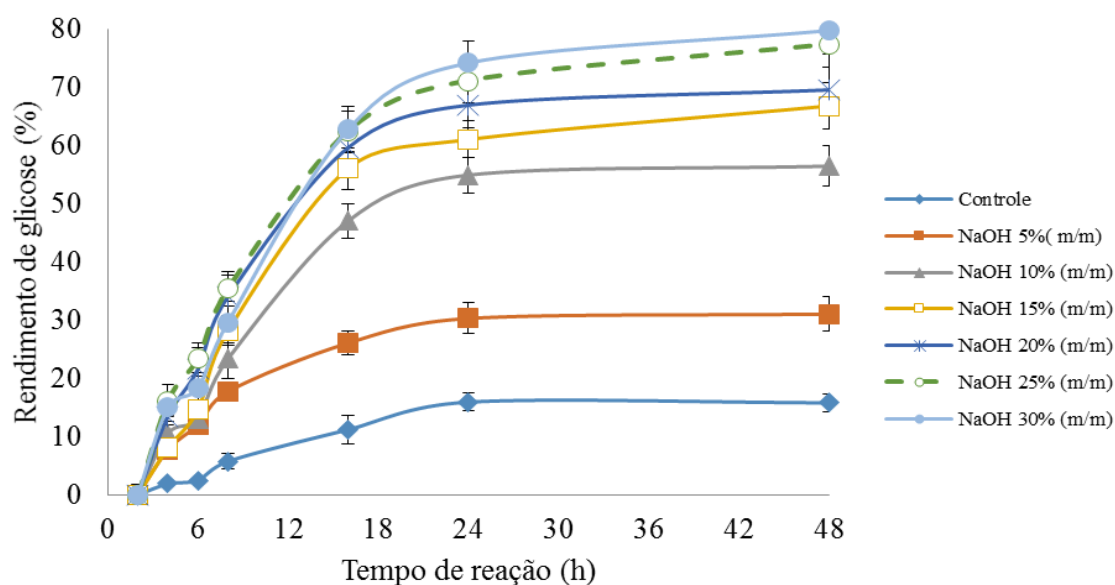


Figura 8: Cinética de hidrólise enzimática (rendimento de glicose) da biomassa de bananeira com pré-tratamento alcalino (NaOH).

A figura 9 nos indica que o tratamento oxidativo foi eficiente em ambas as concentrações de reagentes, porém o fator crucial para os melhores resultados foi o tempo de reação. Os resultados obtidos nas concentrações de 2 a 6% foram semelhantes, enquanto os resultados obtidos na concentração de 8% foi ligeiramente menos eficiente.

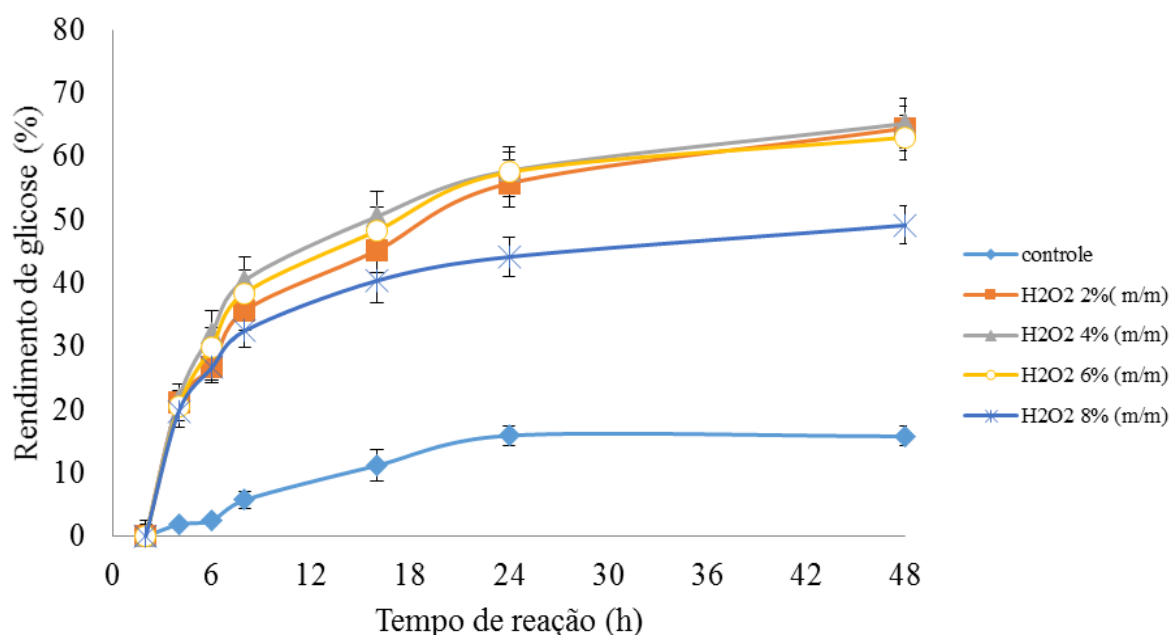


Figura 9: Cinética de hidrólise enzimática (rendimento de glicose) da biomassa de bananeira com pré-tratamento oxidativo (H₂O₂).

4.5– Acessibilidade - adsorção de corantes nos materiais pré-tratados em meio ácido, alcalino e oxidativo

Para cada solução, foram construídos gráficos das diferentes concentrações das quais as absorbâncias tanto do corante azul quanto do laranja geraram equações de retas, e no final foram comparadas entre si para análise de eficiência dos tratamentos como mostrado nos gráficos e tabelas a seguir. De modo geral, os resultados de absorbância das diferentes concentrações aumentam gradativamente até atingir um patamar, representando estabilização da adsorção de corantes. Trabalha-se apenas com a parte crescente, pois é a fase onde obtém-se a máxima absorvidade de corante. Da linearização determina-se a equação da reta, após ajustar os pontos a uma reta, buscando um coeficiente de correlação maior possível, sendo

aceitável superior a 0,8. Para determinação da equação tem-se como fundamento trabalhar com a parte linear de adsorção, independentemente do número de pontos que se ajustam a reta. Os resultados de adsorção de corante no material in natura foram introduzidos nos gráficos de pré-tratamento como controle.

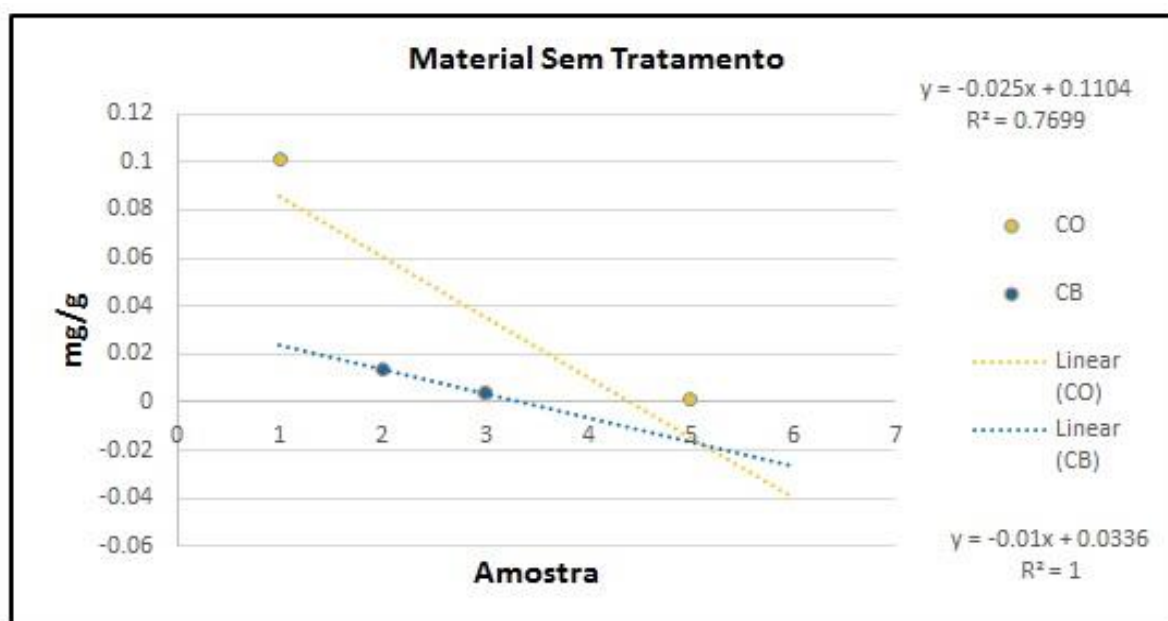


Figura 10: Linearização dos dados de adsorção de corante, expresso em miligrama de corante por grama de material do grupo controle. Os demais dados de linearização dos materiais pré-tratados foram apresentados como anexo.

O material in natura, não pré-tratado, ou denominado de controle, apresenta baixa adsorção de corantes quando comparado ao material pré-tratado. A baixa adsorção de corantes indica pouca acessibilidade, e por consequência baixo rendimento em glicose na hidrólise enzimática (Figuras 7, 8 e 9). O pré-tratamento modifica a estrutura da biomassa, criando poros, e assim permitindo a penetração dos corantes (e também da enzima, o que é relacionado com a adsorção do corante) [3].

Os pré-tratamentos apresentam efeito característico na biomassa: o ácido modifica a lignina e remove parcialmente a hemicelulose; o alcalino remove lignina e hemicelulose; e o oxidativo remove hemicelulose e lignina, e quebra a estrutura da lignina; o clorito de sódio é agente deslignificante [17]. Assim, material com características diferente pode ser obtido aplicando estes pré-tratamentos em diferente severidade. O efeito principal quantificado nesse trabalho, a acessibilidade, mostra o quanto a celulose está exposta, o que ocorre pela ação do

pré-tratamentos em remover/modificar hemicelulose e lignina. De modo geral, a acessibilidade foi diretamente proporcional ao rendimento em glicose na hidrólise enzimática. Este resultado era esperado, e está de acordo com a literatura [1,2,3,4,9,13,14].

O pré-tratamento com clorito de sódio apresentou aumento na adsorção de corantes com o aumento da concentração de reagente empregado (Figura 11). Este pré-tratamento levou ao mais alto índice de adsorção de corante, quando comparado com os demais pré-tratamentos. Esse resultado pode ser explicado devido ao seu efeito específico na remoção de lignina. O pré-tratamento alcalino, de modo semelhante, apresentou aumento na adsorção de corantes com o aumento da concentração de hidróxido de sódio empregado (Figura 12). Destaca-se que com concentrações maiores que 20% de hidróxido de sódio ocorreu predomínio da superfície interna, quantificada pelo corante azul. Porém, esse comportamento não foi observado para biomassa de bananeira. A adsorção de corantes diminuiu nas altas concentrações de hidróxido de sódio (Figura 12). Para esta biomassa, tais concentrações podem ter levado a perda de celulose, o que ocorre devido reações indesejáveis, que clivam a cadeia de celulose [17]. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio apresentou comportamento semelhante aos demais pré-tratamentos quanto a adsorção de corantes. Porém, destaca-se a predominância inicial da superfície interna, quantificada pelo corante azul (Figura 14). Para a concentração de 8% de peróxido de hidrogênio, a predominância foi da superfície externa, determinado pelo corante laranja. O pré-tratamento ácido, por outro lado, iniciou com predomínio da superfície externa até a concentração de 20% de ácido (m/m) (Figura 15). Na concentração de 25 % (m/m), houve maior adsorção de corante azul, indicando predomínio da superfície interna.

Os pré-tratamentos apresentam efeitos diferentes nas propriedades do material, aumentando a acessibilidade a celulose (Figura 16 – que compara todos os resultados). Essa acessibilidade é um indicativo da digestibilidade do material, quantificada pelo rendimento em glicose liberado na hidrólise enzimática (Figuras 7, 8 e 9). Assim, a conversão do material em etanol de segunda geração pode ser estimada através do rendimento em glicose na hidrólise enzimática, a qual pode ser estimada pela sua acessibilidade ou adsorção de corantes.

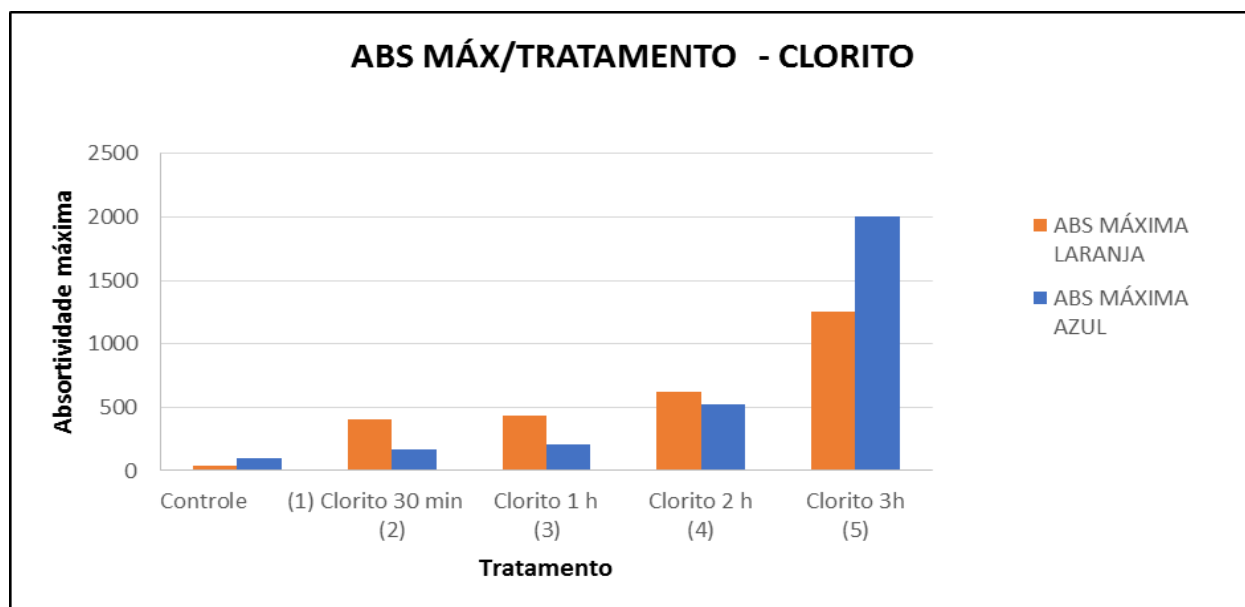


Figura 11: Absortividade máxima (em mg/g) dos corantes em diferentes concentrações no pré-tratamento com clorito de sódio da biomassa de cana-de-açúcar.

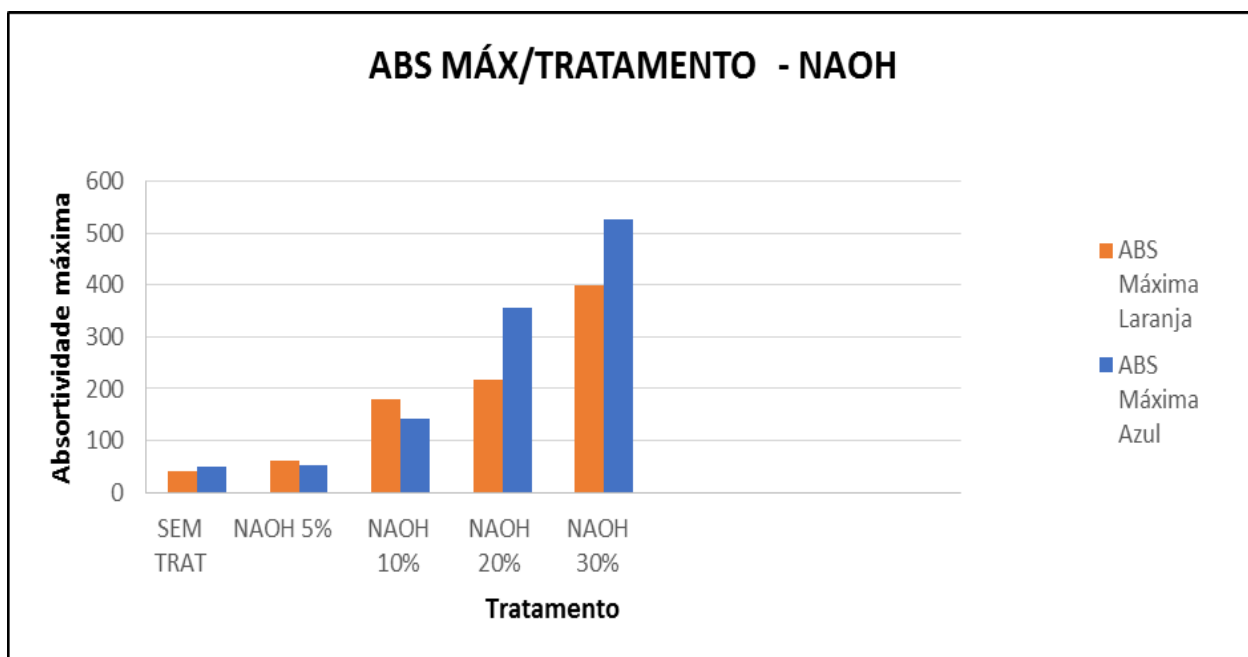


Figura 12: Absortividade máxima (em mg/g) dos corantes em diferentes concentrações no pré-tratamento com NaOH da biomassa de cana-de-açúcar.

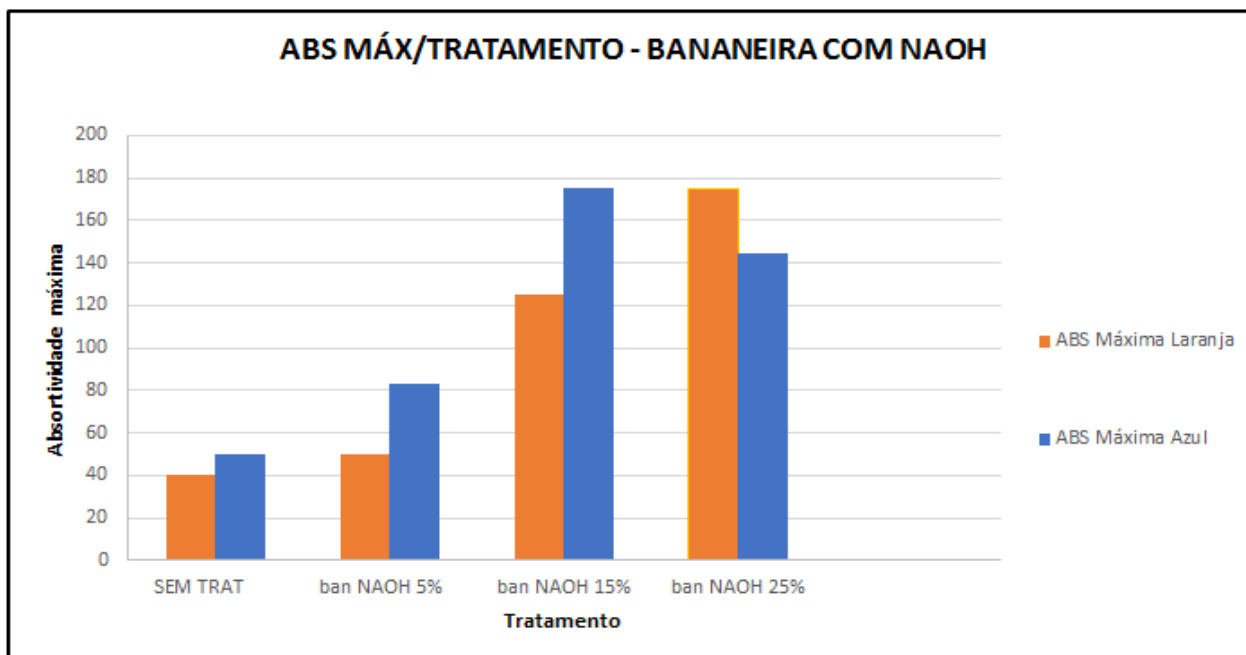


Figura 13: Absortividade máxima (mg/g) dos corantes em diferentes concentrações no pré-tratamento com NaOH na biomassa de bananeira.

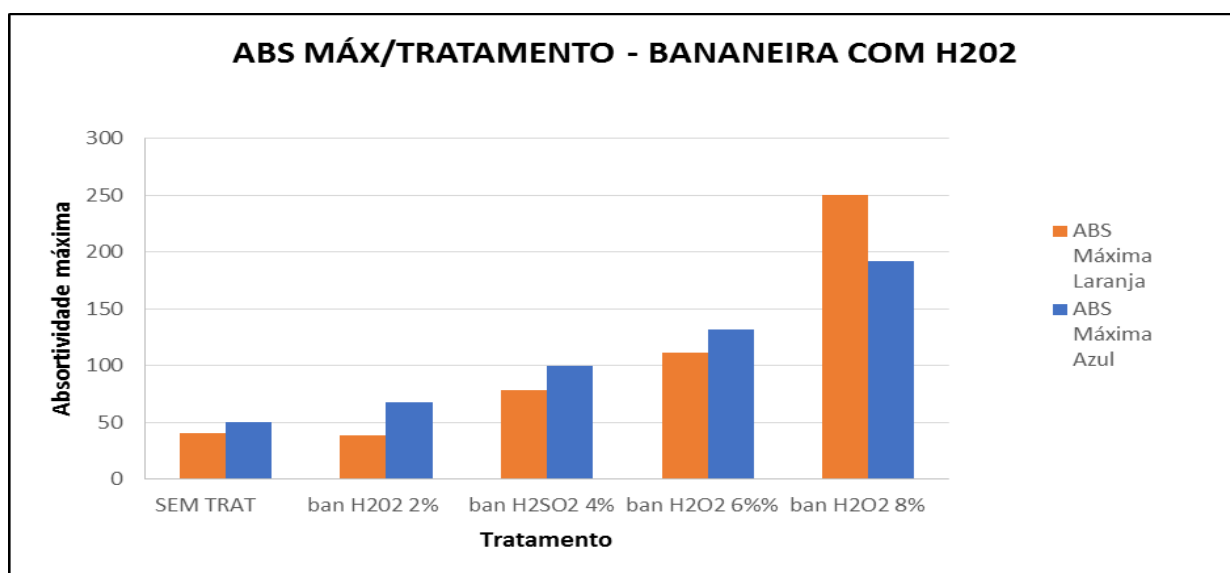


Figura 14: Absortividade máxima (em mg/g) dos corantes em diferentes concentrações no pré-tratamento com H₂O₂ na biomassa de bananeira.

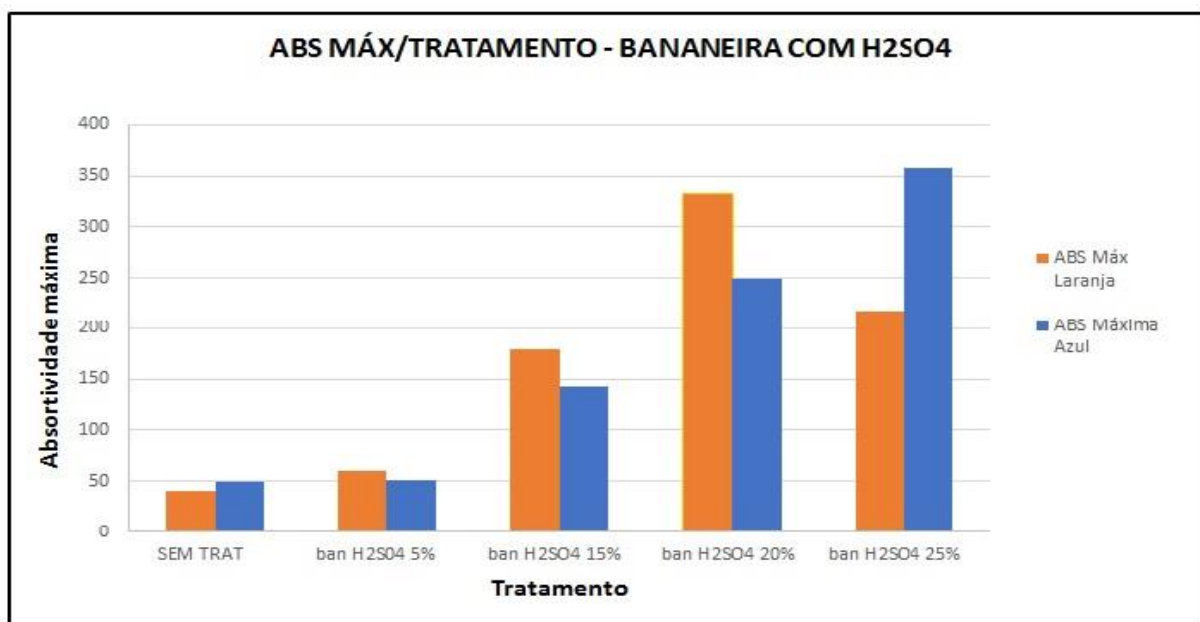


Figura 15: Absortividade máxima (em mg/g) de corantes em diferentes concentrações no pré-tratamento com H₂SO₄ na biomassa de bananeira.

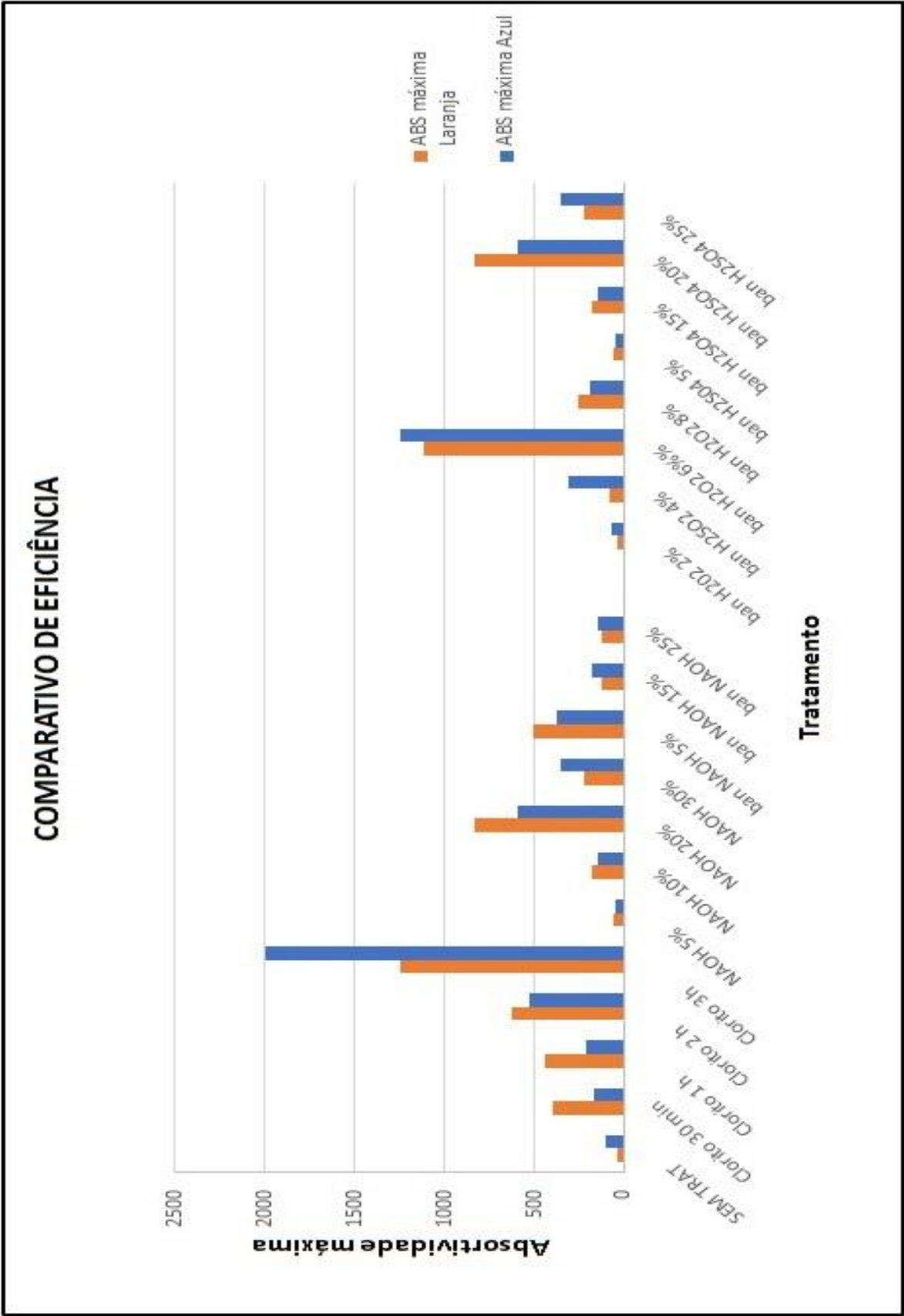


Figura 16 – Comparativo de adsorção dos corantes entre os pré-tratamentos em meio ácido, alcalino e oxidativo

4.6 – Caracterização química da biomassa de bananeira

Através de análises químicas, notou-se algumas diferenças na estrutura química que compõem a biomassa devido as ações dos pré-tratamentos. Os dados obtidos podem ser encontrados na próxima tabela (tabela 4). O aumento na concentração de catalisador (ácido, álcali e oxidativo) provoca modificação na composição química do material.

Pré-tratamento	Amostra	Composição (% massa seca)		
		Celulose	Hemicelulose	Lignina
Controle	In Natura	60.84 (1.64)	17.26 (0.53)	17.26 (0.31)
H₂SO₄ (%)	5	59.68 (1.14)	12.57 (0.53)	26.28 (0.37)
	10	61.62 (1.26)	11.66 (1.99)	25.66 (2.06)
	15	63.76 (1.23)	8.29 (2.45)	29.16 (1.54)
	20	63.37 (1.71)	4.13 (0.10)	30.08 (0.63)
	25	66.28 (0.68)	3.97 (0.50)	31.15 (2.99)
	30	65.11 (1.68)	-	36.22 (1.15)
	35	62.26 (0.89)	-	36.47 (2.07)
	40	60.76 (1.32)	-	39.99 (2.35)
NaOH (%)	5	59.65 (2.76)	14.02 (1.02)	17.11 (2.36)
	10	64.32 (1.59)	12.31 (0.49)	13.10 (1.18)
	15	61.63 (3.94)	11.47 (1.05)	11.09 (1.08)
	20	70.01 (3.83)	9.68 (2.55)	10.78 (1.67)
	25	76.52 (1.61)	5.35 (0.56)	6.24 (0.83)
	30	75.48 (1.89)	4.38 (0.36)	7.65 (0.97)
H₂O₂ (%)	2	61.77 (3.02)	15.93 (1.03)	14.19 (2.17)
	4	66.91 (2.39)	14.17 (1.68)	10.49 (0.70)
	6	70.99 (1.99)	11.31 (1.54)	9.29 (1.24)
	8	74.37 (2.57)	8.68 (0.77)	7.17 (0.48)

Tabela 4: Análise química da composição do material de bananeira pré-tratado. Os números entre parênteses representam o desvio padrão. (-) não detectado.

5– Discussão

5.1 – Rendimento em massa dos pré-tratamentos e caracterização da biomassa

Em relação aos dados demonstrados nas tabelas 1 e 2, nota-se um padrão de eficiência elevada em todos os pré-tratamentos com notáveis diferenças entre os mesmos. Em relação ao pré-tratamento alcalino realizado com a biomassa de cana-de-açúcar, pode-se inferir que o rendimento de massa disponível ao final do mesmo é menor em maiores concentrações do reagente. Comparativamente, a menor concentração (5%) rendeu uma quantidade de massa de 64,53% da massa inicial, enquanto a maior concentração (30%) rendeu aproximadamente 23% da massa final, mostrando uma diferença de mais de 40% na eficiência do tratamento devido a maior agressividade, resultando assim em uma maior remoção da lignina. Segundo Chang et al. [18] a principal função do hidróxido de sódio é a remoção da lignina do material, exatamente o que os dados obtidos indicam. Na tabela de composição química observa-se redução na porcentagem de hemicelulose e lignina.

Comparando os resultados da cana-de-açúcar com o pseudocaule de bananeira, verificou-se que já nas concentrações menores (5%) o resultado é mais eficiente (46% da massa inicial) e isso é mantido até nas maiores concentrações do reagente (30%) em que o rendimento foi de 25% da massa inicial. Isso pode ser explicado pela conformação físico-química da biomassa, que facilita o acesso do reagente ao material a ser pré-tratado e como pode ser visto na tabela 4, a composição da biomassa tem um acréscimo esperado na concentração de celulose e diminuição na concentração de lignina, com uma porcentagem relativamente baixa de perda de hemicelulose.

Quanto ao pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com o clorito de sódio, também pode-se notar uma maior eficiência conforme aumentou-se a concentração de reagente. Segundo os dados obtidos, a menor concentração de clorito, foram obtidos 54,53% da massa inicial e a maior concentração rendeu aproximadamente 44,25% da massa inicial tratada. De modo geral, o comportamento foi o mesmo para as diferentes biomassas, porém com diferente resposta as condições de pré-tratamento.

Conforme mostrado por Brienzo, et al [3], o material se mostrou menos susceptível do que o esperado. Isso pode ser explicado por grandes divergências de estruturais da biomassa utilizada, o que seria comprovado mediante a uma caracterização química da mesma. Todavia, o tratamento alcalino não só corroborou com os resultados do trabalho citado, como se

mostrou ainda mais eficiente em relação a deslignificação, principalmente na palha da cana-de-açúcar.

Conforme a tabela 2, os tratamentos ácido e oxidativo com a biomassa de bananeira também foram bastante eficientes. Ocorreu uma diferença de quase 30% entre as concentrações mínimas e máximas de H₂SO₄ (60,57% de biomassa obtida com a menor concentração e 32.1 % de biomassa resultante com a maior concentração). Porém, como observado na tabela 4, não houveram mudanças significativas na concentração de celulose e ao contrário do desejado, houve grande acréscimo na concentração de lignina. A fração de hemicelulose foi reduzida a valores insignificantes, o que mostra que esse não é o pré-tratamento mais indicado para esse tipo de material.

O pré-tratamento oxidativo se mostrou o menos eficiente em termos de quantidade de biomassa obtida, sendo a diferença entre as maiores e menores concentrações (2% e 8%) de aproximadamente 16% (48.60% e 32.4% respectivamente). Entretanto, a caracterização do material mostra que o pré-tratamento pode ser utilizado para um bom rendimento das frações, pois foi observado um aumento significativo na concentração de celulose e um decréscimo na concentração de lignina. A hemicelulose teve sua concentração alterada, mas os valores obtidos não chegaram a ser pouco significativos como no tratamento alcalino (aproximadamente 8% no pré-tratamento oxidativo).

Os resultados da caracterização da biomassa de bananeira podem ser comparados com os dados sobre cana-de-açúcar obtidos por Pietrobon et al. [19] onde as concentrações foram semelhantes aos três componentes no material in natura, porém nos materiais pré-tratados em meios ácido e alcalino se mostram menos eficiente na cana-de-açúcar do que na bananeira, se tratando na remoção da lignina. Isso demonstra que a bananeira é mais susceptível a tratamentos mais severos do que a cana-de-açúcar

5.2 – Hidrólise enzimática: rendimento de glicose

A cinética enzimática, com rendimento em glicose permitiu análises comparativas entre os materiais pré-tratados e o controle, podendo assim inferir a eficiência na proporção de glicose obtida através da hidrólise enzimática (com enzimas hidrolíticas CTEC). Com a biomassa de cana-de-açúcar foi utilizado o método de linearização por DNS, onde os valores de absorbâncias obtidos foram transformados em concentrações (mg/mL) de glicose, como demonstrados na tabela 3. A biomassa de bananeira, após os pré-tratamentos foram hidrolisadas por diferentes tempos e foram analisados por cromatografia líquida para

quantificação das frações de glicose e xiloses como demonstrados nas curvas de rendimento (figuras 7,8 e 9).

Os pré-tratamentos tem por objetivo a retirada/modificação da lignina e parte da hemicelulose para que ocorra melhor a hidrólise enzimática (ÖHGREN et al). Isso ocorre devido ao fato da lignina atuar fisicamente como um bloqueio as enzimas, assim realizando grande adsorção das mesmas, que não realizam a hidrólise do material e diminuem a concentração de glicose resultante (PALONEN et al.). A propriedade responsável pelo sucesso da hidrólise enzimática é a acessibilidade [9].

Durante os experimentos, verificou-se eficiência nos pré-tratamentos, em especial o alcalino, que resultou em altas concentrações de glicose obtidas mesmo nas baixas concentrações de reagente no pré-tratamento. Diferentemente, o clorito de sódio, nos menores tempos de reação, resultou em valores de glicose abaixo do grupo controle. Duas interpretações são possíveis: No caso do clorito de sódio, o tempo de reação foi um fator crucial para a hidrólise ocorrer, pois como observado, no tratamento de 30 minutos, a média de miligrama de glicose por mL ficou em 1,55 e no tempo máximo de reação (180 minutos) a média ficou em torno de 3,1 o que é muito acima do grupo controle; A outra observação é que a concentração de NaOH foi determinante para a hidrólise, uma vez que na menor concentração a média ficou em torno de 2,3 mg/mL, o que já é mais alto do que o controle, comprovando assim sua eficiência e na maior concentração a média de glicose foi de 3,84 mg/ml. Isso indica que ambos os tratamentos são eficientes, porém, mais uma vez o pré-tratamento alcalino superou o ácido.

Na biomassa de bananeira, podemos observar em todos os pré-tratamentos uma grande eficiência na liberação de glicose. Podemos notar que nos pré-tratamentos ácido e alcalino, tanto o tempo quanto a concentração dos reagentes foram fatores de extrema importância para melhores resultados de hidrólise. Observa-se que até o tempo de reação de 24 horas ambos possuem grandes aumentos em suas concentrações de glicose, e após isso a concentração sobe de maneira mais branda, tornando principalmente a concentração de reagente responsável pelo fim da hidrólise. Esse comportamento é explicado devido a recalcitrância do material que aumenta durante a hidrólise enzimática. Ao mesmo tempo que a celulose é removida por ação de enzimas, a lignina aumenta em porcentagem, originando um material mais resistente [20].

No tratamento oxidativo, apesar das concentrações serem diferentes até o tempo de reação de 18 horas, todas as amostras renderam quantidade de glicose semelhantes, tornando então o tempo de reação o principal responsável pelas concentrações obtidas. Enquanto nos tratamentos alcalino e ácido as menores concentrações resultaram em menores valores de

rendimento de glicose, no tratamento oxidativo as menores concentrações de H_2O_2 agiram de forma mais eficientes do que a maior concentração (8%). Isso demonstra que a agressividade do tratamento pode inferir de forma negativa nos resultados, modificando a estrutura da biomassa de maneira a deixar muita hemicelulose, o que aparenta ser prejudicial para o rendimento enquanto nos dois primeiros tratamentos a maior agressividade e assim maior remoção de hemicelulose e lignina acarretam em melhores resultados referentes a concentração de glicose obtidas. Tratamentos severos, com alta concentração de reagentes pode afetar as propriedades físico-químicas do material, melhorando a digestibilidade, mas pode levar a perda de celulose [9].

5.3 – Acessibilidade – adsorção de corantes

Nas análises de absorvidade máxima, podemos comparar tanto as condições de pré-tratamento, quanto os materiais analisados. Em relação ao bagaço de cana-de-açúcar, ambos os tratamentos foram eficientes em aumentar a acessibilidade, porém o tratamento com clorito durante 180 minutos foi o que levou a maior acessibilidade, o que indica a possibilidade de ocorrer maior ação enzimática, tornando assim o processo mais eficiente. Nota-se que os tratamentos por clorito a 60 e 120 minutos são praticamente indiferentes, o que nos mostra que o tempo de reação é crucial. O clorito de sódio é um reagente específico para remoção de lignina, e foi utilizado nesse trabalho como parâmetro para os demais pré-tratamentos. Assim, seu uso é para fins analíticos, diferente dos pré-tratamentos ácido diluído, alcalino e oxidativo.

O tratamento com hidróxido de sódio, na menor concentração (5%), a ação do pré-tratamento foi imparcial, enquanto que com maiores concentrações o tratamento se mostrou bastante efetivo, o que demonstra, assim como na hidrólise enzimática, que a concentração do reagente é o principal fator para uma melhor acessibilidade. Quanto maior a concentração de reagentes, maior a adsorção de corantes, que indica maior acessibilidade e por consequência maior o rendimento de glicose na hidrólise enzimática. Esse comportamento é o esperado quando se trabalha com diferente severidade, por exemplo, diferentes concentrações de ácido ou base [2,3].

Para amostras de bananeira, em todos os casos os pré-tratamentos foram efetivos e renderam bons resultados de adsorção de corantes, ou seja, acessibilidade. As amostras pré-tratadas com hidróxido de sódio mostraram um melhor resultado com uma concentração de 25% do que com a de 30% e isso provavelmente se explica pelo fato que alta severidade pode levar a perda de celulose. Seria esperado que quanto mais severo o pré-tratamento, mais poros ou desestruturação do material, e por consequência maior acessibilidade. Por outro lado,

componentes da biomassa podem ser degradados. Assim, deve existir um equilíbrio em maximizar a acessibilidade para melhor digestibilidade, com a perda de componentes da biomassa (Tabela 4).

Em todos os pré-tratamentos pode-se inferir que a menor concentração de reagente é a menos viável pois demonstra resultados praticamente indiferentes do material sem pré-tratamento. No pré-tratamento oxidativo, temos uma maior quantidade de corante laranja adsorvido, o que demonstra maior potencial de ação enzimática superficial, enquanto no material pré-tratado por meio ácido, inferimos uma maior quantidade de corante azul adsorvida, o que mostra maior potencial enzimático de ação interna ao material. No bagaço de cana-de-açúcar, os resultados mais satisfatórios mostram um maior potencial de ação enzimático interno ao material (maior concentração de corante azul adsorvido) como o esperado, conferindo maior acessibilidade enzimática ao material. Comparando os materiais analisados, os resultados foram melhores para bagaço de cana-de-açúcar em ambos pré-tratamentos. Isso pode ter ocorrido devido as diferentes características dos materiais, como propriedades físico-químicas e composição [2]. Como observado por Pietrobon et al. [19] em comparação a esse trabalho, a cana de açúcar apresenta menor porcentagem de lignina em sua composição do que a bananeira, o que pode facilitar a remoção da mesma pelos tratamentos e a ação enzimática.

6 – Conclusões

- Os pré-tratamentos aplicados resultaram em bons rendimentos, tanto em massa, quanto digestibilidade enzimática (rendimento em glicose na etapa de hidrólise enzimática) para ambos os materiais estudados. Ainda, a concentração de reagente (ácido, álcali e oxidativo) foi claramente um fator fundamental, e proporcional ao efeito provocados na biomassa.
- Comparativamente, os resultados em rendimento de massa foram semelhantes em relação aos pré-tratamentos, visto que a biomassa de cana-de-açúcar quando pré-tratada com NaOH, foi a mais deslignificada, com cerca de 22% de massa inicial obtido, seguido pela biomassa de bananeira pré-tratada por NaOH, que chegou a 25% de massa inicial resultante. Isso indica que para a deslignificação, o pré-tratamento alcalino nas condições aplicadas nesse trabalho foi o mais eficiente.

- Em relação a atividade hidrolítica, apesar da grande semelhança entre os resultados obtidos entre os pré-tratamentos ácido e alcalino (o pré-tratamento oxidativo na bananeira foi ligeiramente menos eficiente) os resultados do tratamento alcalino se mostrou mais uma vez mais eficazes do que os resultados do pré-tratamento ácido. Esse comportamento foi observado para ambos os materiais analisados.
- Os resultados de rendimento de glicose foram mais altos e semelhantes nos pré-tratamentos com hidróxido de sódio do que no pré-tratamento com clorito de sódio, em ambos os materiais, o que mais uma vez demonstra a melhor eficiência do pré-tratamento alcalino.
- Em relação a acessibilidade, o pré-tratamento de maior eficácia foi o ácido em ambos os materiais, por ter provocado maior acessibilidade para ambos os corantes. Destaca-se maior efeito na estrutura interna da biomassa, devido maior adsorção do corante azul. Sendo assim, quando o objetivo de menor perda de material, e maior acessibilidade, o melhor pré-tratamento foi o ácido diluído.
- De modo geral, o pré-tratamento alcalino se mostrou eficiente, apresentando maior proporção de celulose na biomassa de bananeira e boa deslignificação. Todavia o tratamento ácido se mostrou mais eficiente para a melhoria de acessibilidade enzimática à celulose. Todos aos pré-tratamentos apresentam pontos positivos, e seu uso pode ser definido em função das condições de reação, maximizando assim o efeito desejado sobre o material.

7- Referências:

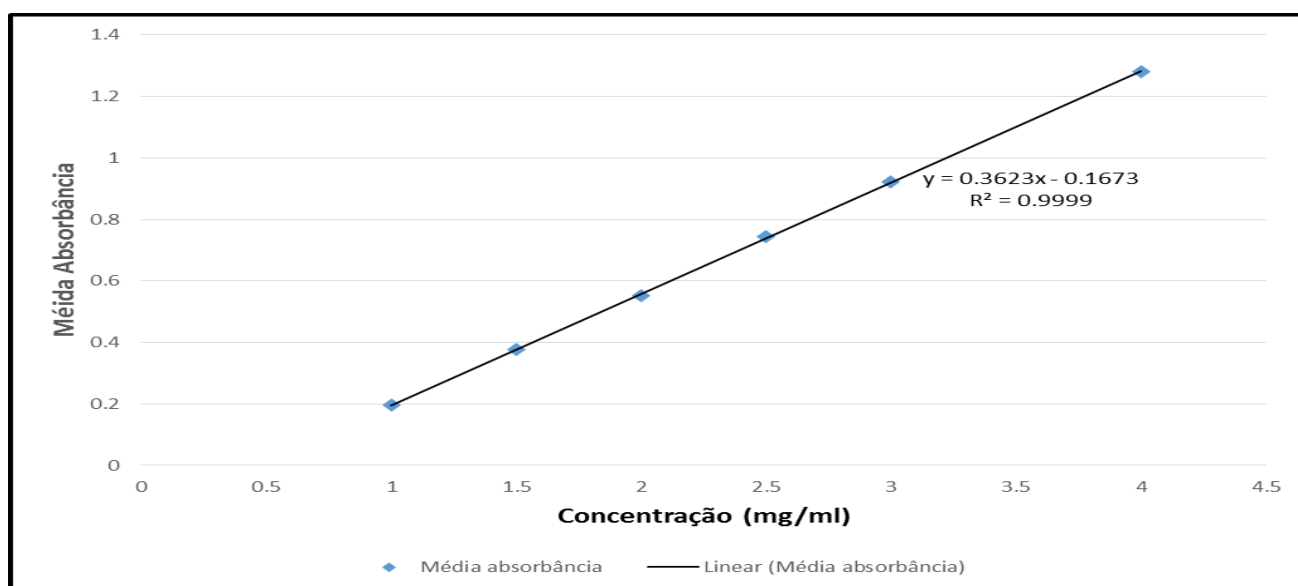
- [1] Chittibabu, S., Rajendran, K., Santhanmuthu, M., & Saseetharan, M. (2011). Optimization of microwave assisted alkali pretreatment and enzymatic hydrolysis of banana pseudostem for bioethanol production. *Int. J. Environ. Sci. Technol*, 67-71.
- [2] Brienzo, M., Tyhoda, L., Benjamin, Y., & Görgens, J. (2015). Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. *New biotechnology*, 32(2), 253-262.
- [3] Brienzo, M., Ferreira, S., Vicentim, M. P., de Souza, W., & Sant'Anna, C. (2014). Comparison study on the biomass recalcitrance of different tissue fractions of sugarcane culm. *BioEnergy Research*, 7(4), 1454-1465.
- [4] Yu, Xiaochun, and Rajai H. Atalla. "A staining technique for evaluating the pore structure variations of microcrystalline cellulose powders." *Powder Technology* 98.2 (1998): 135-138.
- [5] Canilha, L., Milagres, A. M. F., Silva, S. S., Silva, J. B. A., Felipe, M. G. A., Rocha, G. J. M., ... & Carvalho, W. (2010). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Revista Analytica*, 44, 48-54.
- [6] Carvalho, L.G. Produção de biocombustíveis a partir da biomassa de dendê (*Elaeis guineensis*). / Leonard Guimarães Carvalho – Rio de Janeiro, 2009.
- [7] Monte, J,R, do; Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [8] Martins, L. F. (2005). Caracterização do complexo celulásico de *Penicilium echinulatum*. *Curitiba: Universidade Federal do Paraná*, 2005. 121 p.
- [9] Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26(6), 863-871.
- [10] Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.
- [11] Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., & da Silva, S. S. (2012). Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *BioMed Research International*, 2012.

- [12] Fengel, D., & Wegener, G. (Eds.). (1983). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- [13] Yu, X., Minor, J. L., & Atalla, R. H. (1995). Mechanism of action of Simons' stain. *Tappi journal*. [14] Meng, X., & Ragauskas, A. J. (2014). Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current opinion in biotechnology*, 27, 150-158.
- [15] EMBRAPA - Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS:
http://www.cnph.embrapa.br/paginas/serie_documentos/publicacoes2013/cot_85.pdf
- [16] Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- [17] Chandra, R., Ewanick, S., Hsieh, C., & Saddler, J. N. (2008). The characterization of pretreated lignocellulosic substrates prior to enzymatic hydrolysis, part 1: a modified Simons' staining technique. *Biotechnology progress*, 24(5), 1178-1185.
- [18] Chang, V. S., Nagwani, M., & Holtzapple, M. T. (1998). Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74(3), 135-159..
- [19] Pietrobon, V. C., Monteiro, R. T. R., Pompeu, G. B., Lopes, M. L., Amorim, H. V. D., Cruz, S. H. D., & Viégas, E. K. D. (2011). Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with acid or alkali. *Brazilian archives of biology and technology*, 54(2), 229-233.
- [20] Wallace, J., Brienzo, M., García-Aparicio, M. P., & Görgens, J. F. (2016). Lignin enrichment and enzyme deactivation as the root cause of enzymatic hydrolysis slowdown of steam pretreated sugarcane bagasse. *New biotechnology*, 33(3), 361-371.
- [21] Palonen, H., Thomsen, A. B., Tenkanen, M., Schmidt, A. S., & Viikari, L. (2004). Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied biochemistry and biotechnology*, 117(1), 1-17.
- [22] Öhgren, K., Bura, R., Saddler, J., & Zacchi, G. (2007). Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource technology*, 98(13), 2503-2510.

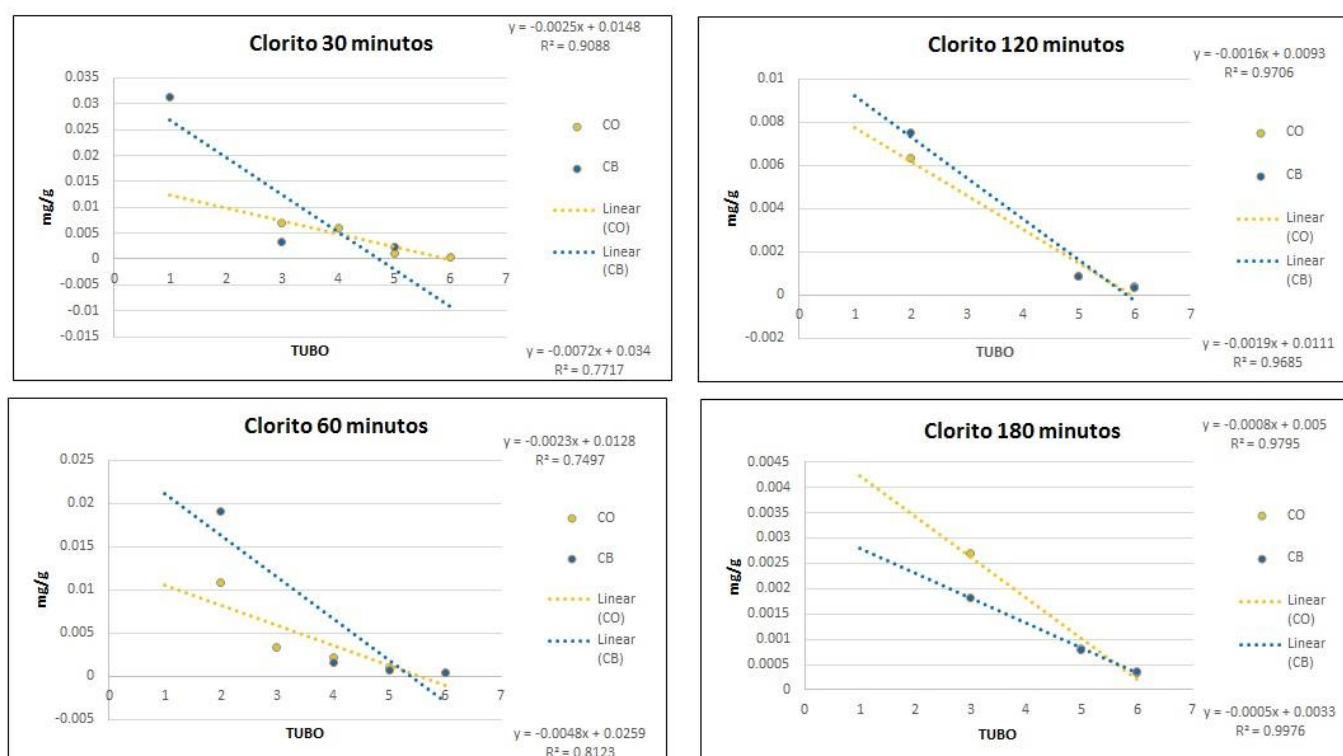
8-Anexos

Anexo 1 – Curva padrão de glicose

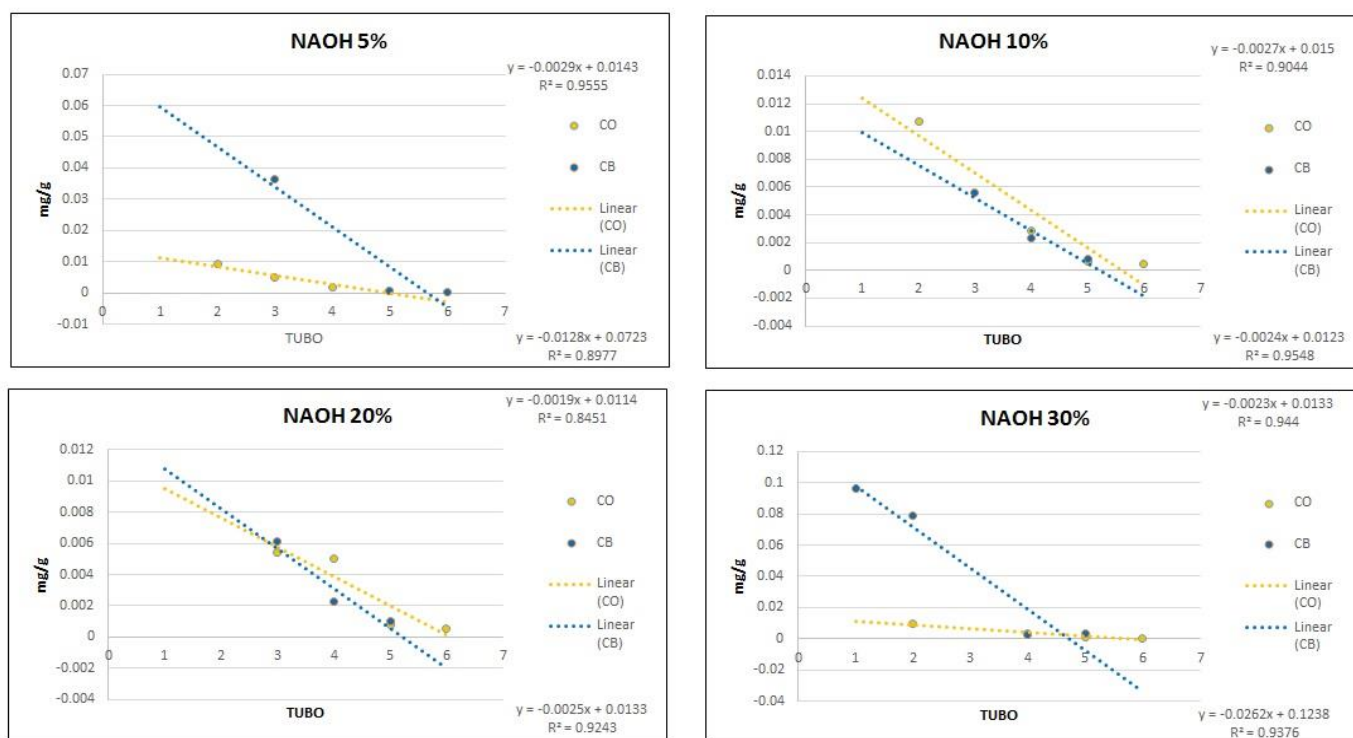
Curva padrão utilizada na quantificação da atividade enzimática, para determinação da concentração de glicose gerada na hidrólise enzimática quando utilizado o método de DNS.



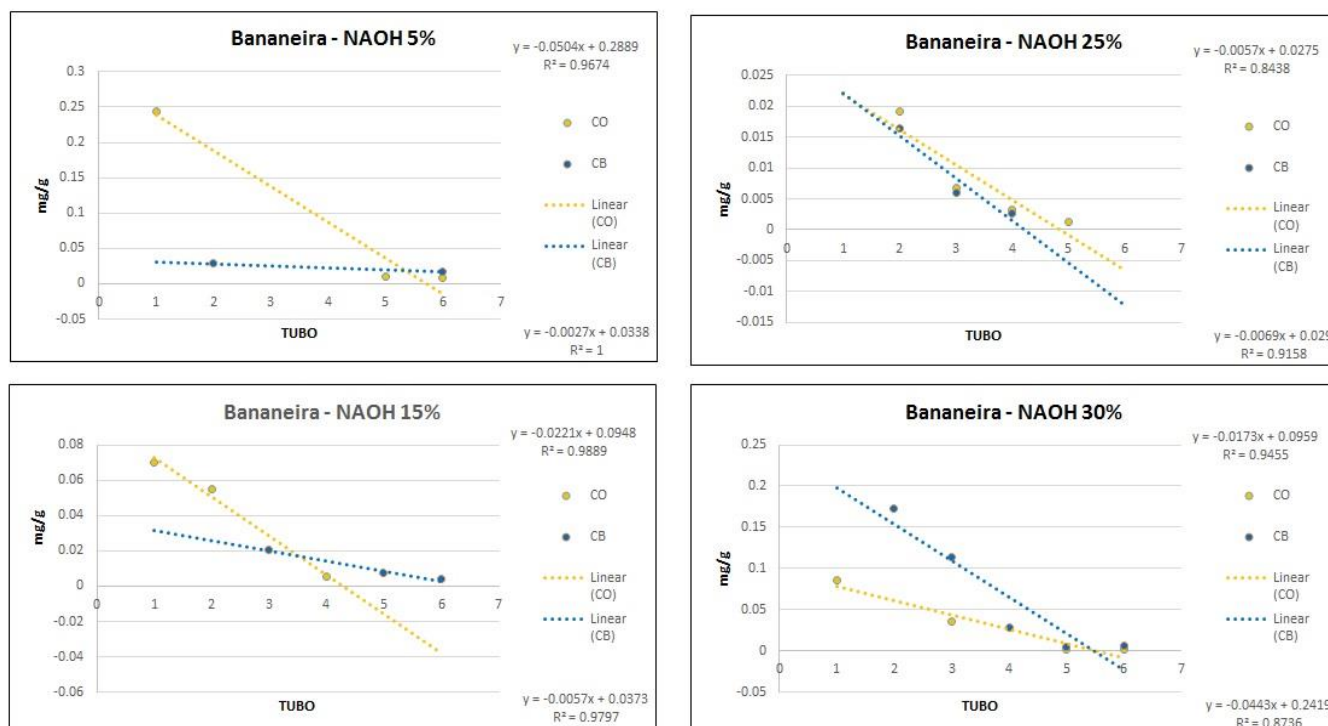
Anexo 2 – Linearização dos dados de adsorção de corantes na cana-de-açúcar pré-tratada por Clorito



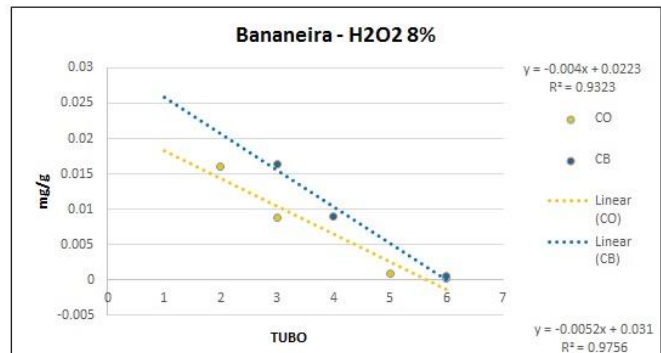
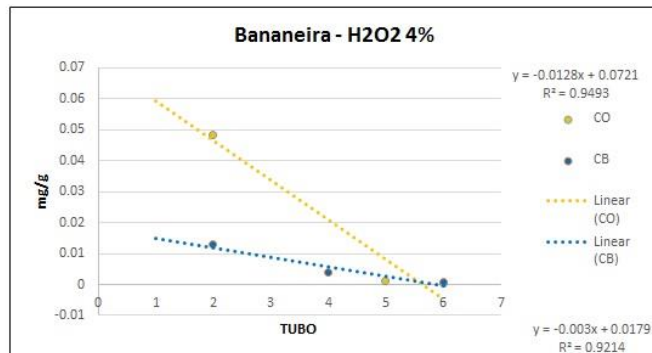
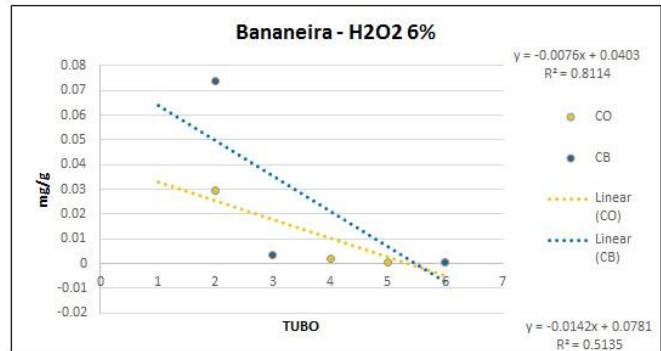
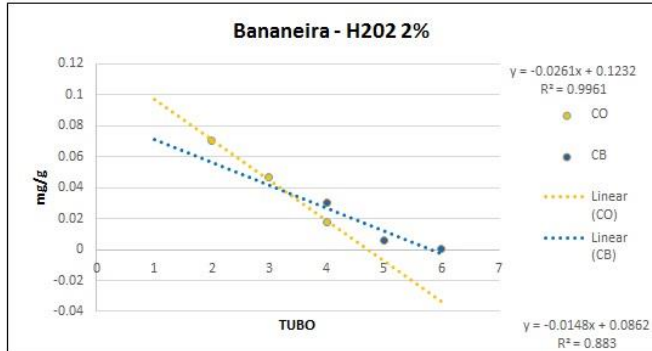
Anexo 3: Linearização dos dados de adsorção na cana-de-açúcar pré-tratada por NaOH



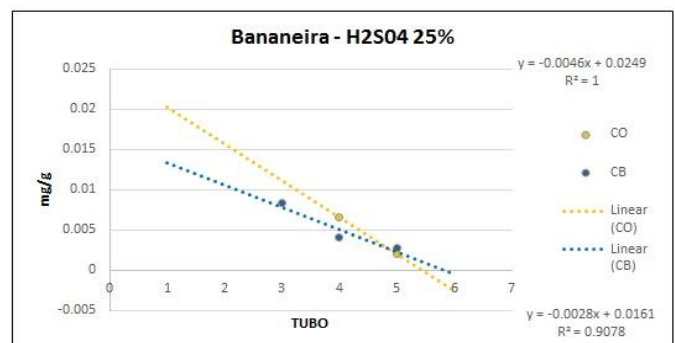
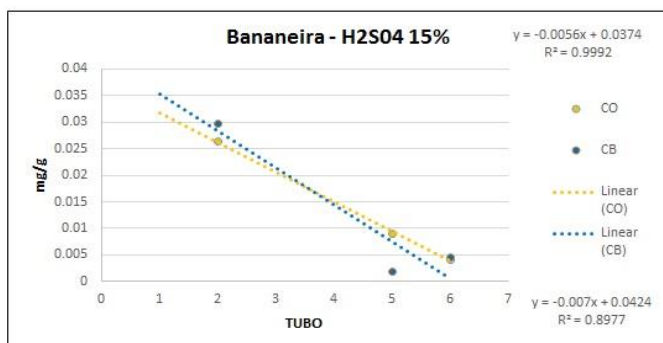
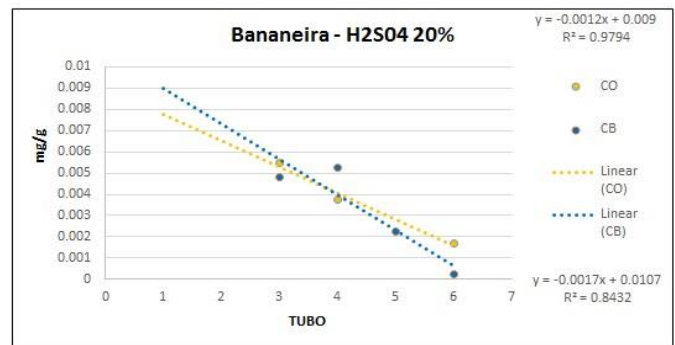
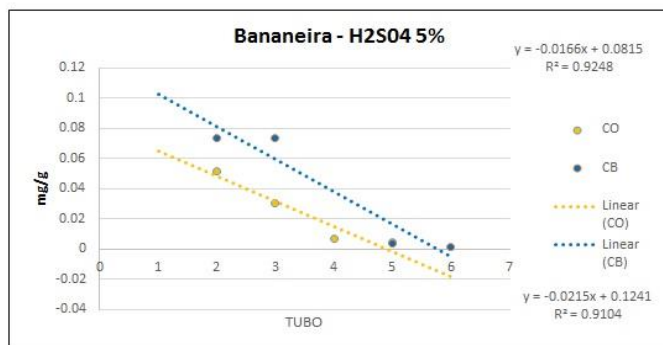
Anexo 4: Linearização dos dados de adsorção de corantes na biomassa de bananeira pré-tratada por NaOH



Anexo 5: Linearização dos dados de adsorção de corantes na bananeira pré-tratada por H₂O₂



Anexo 6: Linearização dos dados de adsorção de corantes na bananeira pré tratada por H₂SO₄



Rio Claro, ____ de _____ de _____.

Pedro Henrique Ciconello Ghiraldi

De acordo ____/____/____.

Prof. Dr. Michel Brienzo

De acordo ____/____/____.

Prof. Dr. Jonas Contiero