

PRÉ-TRATAMENTO SOB PRESSÃO ATMOSFÉRICA VISANDO AO AUMENTO DA DIGESTIBILIDADE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR USANDO GLICEROL EM MEIO ÁCIDO

M. P. SWERTS; P. J. ESTEVES, W. CARVALHO; S. S. SILVA; J. C. dos SANTOS*

Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, Departamento de Biotecnologia

*E-mail para contato: jsant200@usp.br

RESUMO – O pré-tratamento da biomassa vegetal visando-se ao aumento de sua digestibilidade enzimática está entre os temas de pesquisa de maior interesse mundial. Para este fim, o uso de condições amenas de processo pode resultar em redução em seu custo global. Neste trabalho, avaliou-se o uso do glicerol em meio ácido para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar sob pressão atmosférica. Experimentos foram realizados em diferentes temperaturas empregando-se meio reacional contendo 5% m/v de bagaço e 0,5% m/v de H₂SO₄, além de solução de glicerol 95%, sendo também realizados testes em autoclave e meio isento de glicerol. O material pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática empregando preparado comercial de celulase, a 50°C por 24h. Os resultados obtidos demonstraram que a hidrólise da celulose variou de 11% (material não tratado) até 41,7%, valor observado com o material pré-tratado a 121°C em meio contendo glicerol. Em todos os casos, observou-se que o pré-tratamento resultou em valores médios de hidrólise enzimática superiores aos obtidos com o material não tratado. Esta superioridade foi mais notória a 121°C, em especial quando glicerol foi empregado no meio. Nesta temperatura, o uso de glicerol resultou em um percentual de celulose hidrolisada de cerca de 40% em comparação a 27% de hidrólise empregando-se meio isento deste composto.

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos constituem-se em fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial de uso como matéria prima em processos industriais não apenas como fonte de energia e combustíveis, mas também de alimentos, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (Cherubini, 2010). Especificamente com relação à produção de combustíveis, a fração carboidrato destes materiais tem sido empregada na produção de etanol, um importante substituto para a gasolina em veículos de transporte (Sarkar *et al.*, 2012).

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, além de outros componentes em menor quantidade. As frações de celulose e hemicelulose são polímeros de carboidratos e uma fonte potencial de açúcares fermentáveis (Medina, 2013).

Uma das limitações para o aproveitamento integral de todas as frações dos resíduos lignocelulósicos, no entanto, é a própria estrutura da biomassa. Geralmente, é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose ou a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento e deslignificação. Sem este tratamento preliminar a biomassa é difícil de ser aproveitada em processos industriais, pois a associação de suas frações constituintes lhe confere grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos (Agbor *et al.*, 2011). Diversas opções de pré-tratamento têm sido estudadas, incluindo métodos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (Alvira *et al.*, 2010; Agbor *et al.*, 2011; Modenbach e Nokes, 2012).

Um método de pré-tratamento promissor é o chamado organossolve, o qual pode ser conduzido empregando-se uma variedade de solventes orgânicos em mistura com água, com ou sem a adição de um catalisador como ácidos clorídrico ou sulfúrico. Entre as vantagens das técnicas organossolve, a presença de solventes pode facilitar a penetração dos reagentes na biomassa, aumentando a eficiência na remoção da lignina e a redução na redeposição desta sobre os outros componentes após o processo (Oliet *et al.*, 2001).

O glicerol é um solvente orgânico cuja disponibilidade tem aumentado nos últimos anos, devido ao aumento na produção de biodiesel e sua consequente geração como subproduto. Assim, sua produção mundial tem sido crescente e tem superado a demanda (Sun e Chen, 2008; Zhang *et al.*, 2013a). Neste contexto, no presente trabalho, avaliou-se o uso do glicerol em meio ácido para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar sob pressão atmosférica. Ácido sulfúrico foi empregado no meio reacional, tendo sido realizadas reações em meio isento deste solvente para a geração de dados de comparação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo da Matéria Prima

O material foi seco ao sol até que atingisse um teor de umidade de cerca de 10% para evitar contaminação microbiana durante a estocagem no laboratório. Após a secagem, o bagaço foi moído em um moinho de martelo marca Benedetti, modelo dupla 270 (Moinho Benedetti Ltda., Pinhal – SP), até que pelo menos 90% das partículas passassem por uma peneira padrão Tyler 10 MESH (abertura 1,65 mm). O material foi então caracterizado com relação a sua composição em extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, sendo então empregado nos experimentos de pré-tratamento.

2.2. Pré-tratamento da Biomassa

Os ensaios foram executados em duas diferentes temperaturas, 90° e 121°C, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo um total de 100 g de meio reacional, conforme explicado a seguir: colocou-se a quantidade desejada de bagaço no frasco Erlenmeyer, adicionando-se água ou solução aquosa de glicerol e aquecendo-se a mistura à temperatura desejada através da imersão do frasco em uma cuba com óleo colocada sobre a placa de aquecimento. Quando a temperatura foi atingida, adicionou-se o ácido, agitou-se o meio com um bastão de vidro e aguardou-se o tempo de reação (10 min), durante o qual o meio não foi agitado. Ao final,

retirou-se o frasco do banho de óleo e resfriou-se o mesmo em banho de gelo. Uma opção testada para os experimentos a temperatura de 121°C foi o uso de autoclave. O meio reacional era composto por 5% m/v de bagaço e 0,5% m/v de H₂SO₄, adicionados em água ou a uma solução de glicerol 95%. O sólido pré-tratado foi caracterizado quanto a seus componentes (celulose, hemicelulose, lignina) e submetido à etapa de hidrólise enzimática.

2.3. Hidrólise Enzimática

A hidrólise do sólido obtido no pré-tratamento foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio reacional constituído por suspensão aquosa 2% de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (massa seca), 50 mM tampão citrato pH = 4,5, 10 FPU enzimas/g de bagaço pré-tratado, empregando-se coquetel enzimático comercial Dyadic® Cellulase CP CONC (Dyadic International, Inc., Jupiter, Flórida, USA). Os experimentos foram realizados em incubadora de movimento rotatório (Quimis Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos, Diadema, SP, Brasil), sob condições de 50° C e 150 rpm, por 24 horas. A mistura líquida obtida foi caracterizada com relação ao teor de açúcares empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O rendimento da hidrólise foi definido como a razão entre a massa de celulose transformada em glicose e a massa total desta fração do material.

2.4. Métodos Analíticos

Caracterização composicional do bagaço: Tanto o bagaço *in natura* quanto pré-tratado foram caracterizados quanto a seus componentes (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), seguindo a metodologia padrão do NREL - National Renewable Energy Laboratory (Sluiter *et al.*, 2010). O bagaço *in natura* foi também caracterizado com relação à quantidade de extrativos, conforme descrito por Masarin *et al.* (2011).

Concentração de açúcares, ácido acético e etanol: As análises dos teores de açúcares, ácido acético e etanol foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, Estados Unidos). As amostras foram previamente filtradas em filtro *Sep Pak* C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel ácido sulfúrico 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do Material *in natura* e Após o Pré-tratamento

O bagaço moído foi caracterizado quanto a seus componentes (celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas), sendo que os dados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Os valores apresentados na Tabela 1 estão dentro da faixa comumente relatada na literatura para o bagaço de cana-de-açúcar, embora a composição seja variável de acordo com a origem da amostra. Estas diferenças podem ser atribuídas a diversos fatores relacionados às

características específicas de cada amostra de bagaço, como variedade, idade, condições de cultivo e tempo de estocagem.

Tabela 1 - Caracterização química da matéria prima

<i>Componente</i>	<i>Fração mássica</i>
Celulose (%)	41,3±2,1
Hemicelulose(%)	29,2±1,3
Lignina(%)	21,7±0,6
Extrativos(%)	4,5±0,4
Cinzas(%)	3,7±0,2
Total(%)	100,4±2,6

Os experimentos de pré-tratamento foram feitos em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 g de meio reacional: 5% m/v de bagaço e 0,5% m/v de H₂SO₄ diluído em água ou em uma solução de glicerol 95%, sendo utilizadas duas diferentes temperaturas: 90°C e 121°C. Os resultados das composições dos bagaços pré-tratados estão representados na Figura 1.

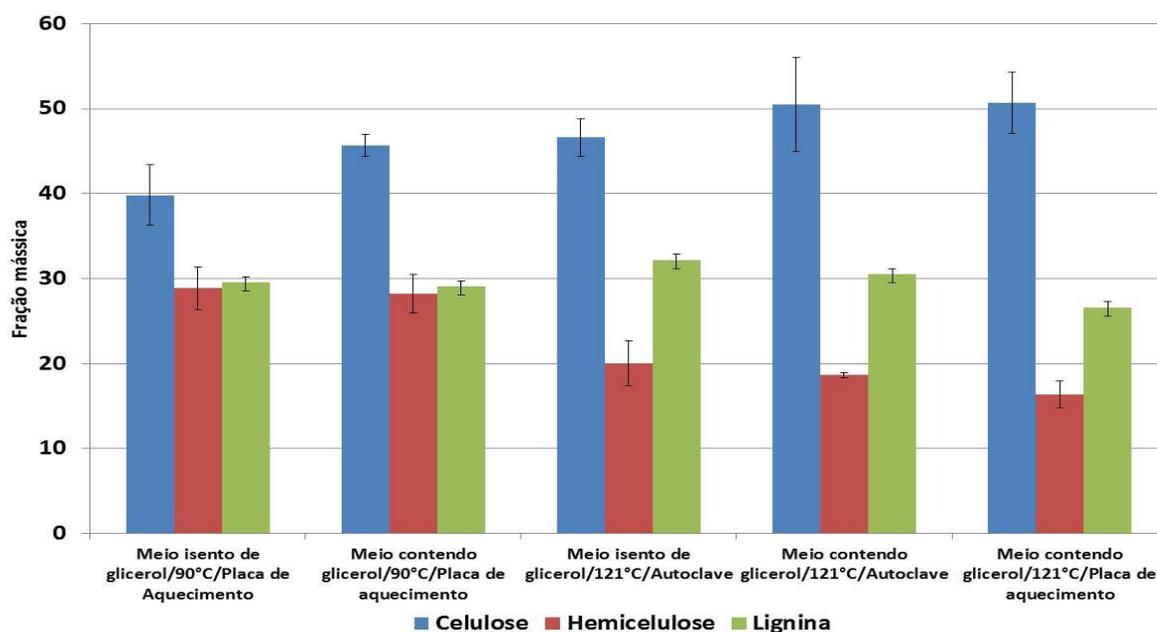


Figura 1 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em diferentes temperaturas, meios reacionais e formas de aquecimento (as barras de erro correspondem ao desvio padrão).

De acordo com os dados obtidos, é possível observar variações nos teores de celulose, hemicelulose e lignina dos bagaços pré-tratados em função do pré-tratamento. Os teores percentuais de celulose variaram de 39,8 a 50,7% em fração mássica, enquanto a variação no teor de lignina foi de 26,6 a 32,2%. O componente que mais sofreu variação relativa à composição da matéria-prima (Tabela 1) foi a hemicelulose, variando de 16,3 a 28,8%.

De forma geral, houve aumento nos teores de celulose e lignina das amostras pré-tratadas quando comparados aos da matéria prima, o que está relacionado à remoção da hemicelulose pela ação do ácido sulfúrico diluído (Esteves, 2011). De fato, o pré-tratamento com ácido diluído tem como característica a quebra das cadeias de hemicelulose, resultando na sua despolimerização (Harrison *et al.*, 2013).

Como pode ser observado na Figura 1, os pré-tratamentos a 121°C resultaram em maior modificação composicional do bagaço, obtendo-se um percentual de hemicelulose mais baixo e um conseqüente percentual mais elevado de lignina e celulose quando comparado ao material não tratado (Tabela 1). Este comportamento pode ser explicado, uma vez que, de acordo com Canilha *et al.* (2011), no pré-tratamento com ácido diluído, a temperatura é o fator que mais influencia na solubilização da hemicelulose, seguido pela concentração de ácido e o tempo de residência. Nas reações a 121°C, pode-se observar também que, quando o glicerol foi usado no meio, o valor médio do percentual de hemicelulose foi reduzido para 16-19% e, em meio isento deste composto, o valor foi de cerca de 20%. Embora os valores obtidos não apresentem diferenças fora da faixa indicada pelo desvio padrão (Figura 1), essa menor proporção de hemicelulose com o uso do glicerol em meio ácido também foi verificada por Zhang *et al.* (2013a). A análise da Figura 1 também revela que, usando temperatura de 121°C, a fração mássica de lignina foi de 32% no material pré-tratado em meio isento de glicerol comparado a um valor de 27-30% quando este poliálcool foi utilizado. A solubilidade de lignina pelo glicerol foi classificada como baixa por Zhang *et al.* (2013b) quando comparada a outros poliálcoois como o etilenoglicol e propilenoglicol. Liu *et al.* (2010) propôs que a lignina, após um pré-tratamento com glicerol em meio ácido, ficasse retida na matriz dos polissacarídeos.

Com relação à forma de aquecimento empregada, observou-se alguma diferença em especial com relação ao teor de lignina, entre o material pré-tratado em placa de aquecimento e usando autoclave. Estas duas formas de aquecimento foram avaliadas a 121°C, pois o meio isento de glicerol não poderia ser aquecido sem um sistema pressurizado. Há diferenças, neste caso, em especial com relação ao tempo e eficiência do aquecimento e resfriamento, uma vez que, na autoclave, deve-se aguardar a despressurização do sistema. Não houve, no entanto, diferença significativa com relação à digestibilidade enzimática, conforme será mostrado a seguir.

3.2. Hidrólise Enzimática

A etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foi feita em experimentos com tempo de 24 h, utilizando 10 FPU/g de preparação comercial de celulase, a 50°C e 150 rpm. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

Conforme mostrado na tabela, a hidrólise da celulose obtida nos experimentos variou de 11% (material não tratado) até 41,7%, valor observado com o material pré-tratado a 121°C em meio contendo glicerol. Em todos os casos, observou-se que o pré-tratamento resultou em valores médios de hidrólise enzimática superiores aos obtidos com o material não tratado. Esta superioridade foi mais notória a 121°C, em especial quando glicerol foi empregado no meio, resultando em digestibilidade enzimática cerca de 4 vezes superior à do material não

tratado. Segundo Esteves (2011), o pré-tratamento com ácido diluído aumenta a digestibilidade enzimática por proporcionar um aumento da área superficial e da porosidade do material.

Tabela 2 - Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado em meio contendo ou não glicerol a diferentes temperaturas e com diferentes sistemas de aquecimento

<i>Sistema/ Condições</i>	<i>Rendimento de Hidrólise (%)</i>
Bagaço não tratado	11,0±2,4
Meio isento de glicerol/90°C/Placa de aquecimento	16,9±2,0
Meio contendo glicerol/90°C/Placa de aquecimento	15,9±1,8
Meio isento de glicerol/121°C/Autoclave	26,6±2,0
Meio contendo glicerol/121°C/Autoclave	36,6±5,5
Meio contendo glicerol/121°C/Placa de aquecimento	41,7±5,5

Os resultados da Tabela 2 foram avaliados empregando teste de Tukey para verificação da significância estatística das diferenças observadas. A Tabela 3 apresenta os resultados desta análise. De acordo com o teste de significância estatística (Tabela 3), os valores de hidrólise da celulose dos materiais pré-tratados a 90°C não apresentaram diferença significativa ($p>0,1$) em relação ao bagaço não tratado. Realmente, o uso de temperaturas mais elevadas tem sido relatado como necessário para aumentar a digestibilidade do material lignocelulósico por celulases. Sun e Chen (2008), empregando pré-tratamento organossolve autocatalítico com solução aquosa de glicerol em palha de trigo, relataram que o rendimento da hidrólise da celulose foi maior em temperaturas mais elevadas.

Tabela 3 - Teste de Tukey para avaliação da significância estatística dos valores de rendimento de hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar não tratado (NT) e pré-tratado em processo em meio ácido: aquoso a 90°C em placa de aquecimento (AP90) ou 121°C em autoclave (AA121); contendo 95% de glicerol a 90°C com placa de aquecimento (GP90) ou a 121°C em placa de aquecimento (GP121) ou autoclave (GA121)

Condições do experimento	NT	AP90	GP90	AA121	GA121	GP121
NT		0,3859	0,5789	0,0022*	0,0002*	0,0002*
AP90	0,3859		0,9990	0,0589**	0,0004*	0,0002*
GP90	0,5789	0,9990		0,0322*	0,0003*	0,0002*
AA121	0,0002*	0,0589**	0,0322*		0,0474*	0,0027*
GA121	0,0002*	0,0004*	0,0003*	0,0474*		0,5382
GP121	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0027*	0,5382	

*significativo ao nível de 95% de confiança; **significativo ao nível de 90% de confiança

No presente trabalho, o uso do material pré-tratado a 121°C resultou em hidrólise da celulose com superioridade estatisticamente significativa em relação ao obtido com o bagaço não tratado ($p < 0,05$). Nesta temperatura, o uso de meio ácido isento de glicerol no pré-tratamento resultou em hidrólise de 27% da celulose na etapa enzimática comparado a uma hidrólise de 17% observada no material tratado em meio isento de glicerol a 90°C. Conforme o teste de Tukey (Tabela 3), a diferença entre estes valores foi estatisticamente significativa ao nível de confiança de 90%.

Essa maior eficiência do pré-tratamento usando o glicerol no meio com relação ao aumento na digestibilidade do material foi relatada também no trabalho de Zhang *et al.* (2013a). Estes autores, empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado durante 60 min com solução aquosa 1,2% de HCl à temperatura de 130°C, obtiveram um rendimento de hidrólise cerca de 3 vezes maior quando o meio possuía glicerol. Segundo Liu *et al.* (2010), o uso do glicerol no pré-tratamento contribui para o aumento da porosidade do material, facilitando o ataque enzimático à fração celulósica.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do emprego de solução aquosa de glicerol no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído e seu efeito na etapa de hidrólise enzimática. Os resultados demonstraram que a temperatura tem um efeito significativo na solubilização da fração hemicelulósica e o uso de 121°C resultou em um maior rendimento na etapa de hidrólise enzimática comparado ao uso de 90°C, empregando-se ou não glicerol no meio. Verificou-se também que o uso do glicerol no meio reacional utilizado para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar proporciona uma maior digestibilidade enzimática em comparação à reação em meio isento de glicerol.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, v.29, p.675–685, 2011.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v.101, p.4581-4861, 2010.

CANILHA, L. ; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A. ; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v.38, p.1467-1475, 2011.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, p. 1412–1421, 2010.

ESTEVEZ, P. J.. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto. 2011. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

GHOSE, T. K; Measurement of cellulase activities. Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Appl. Chem.* v.59, p.257-268, 1987.

HARRISON, M. D.; ZHANG, Z.; SHAND, K.; O'HARA, I. M.; DOHERTY, W. O. S; DALE, J. L.. Effect of pretreatment on saccharification of sugar cane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. *Bioresource Technology* v.148, p.105–113, 2013.

LIU, J.; TAKADA, R.; KARITA, S.; WATANABE, T.; HONDA, Y.; WATANABE, T.. Microwave assisted pretreatment of recalcitrant softwood in aqueous glycerol. *Bioresource Technology*, v.101, p.9355–9360, 2010.

MASARIN, F.; GURPILHARES, D. B.; BAFFA, D. C. F.; BARBOSA, M. H. P.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. *Biotechnology for Biofuels*. 4 : 55, 2011.

MEDINA, K. J. D. . Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico 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. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. *Biotechnology and Bioengineering*, v.109, p.1430 – 1442, 2012.

OLIET, M.; RODRIGUEZ, F.; GARCIA, J.; GILARRANZ, M.A. The effect of autocatalyzed ethanol pulping on lignin characteristics. *J Wood Chem Technol*, v.21, p.81-95, 2001.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*. v. 37, p. 19-27, 2012.

SUN, F.; CHEN, H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*, v.99, p.5474–5479, 2008.

ZHANG, Z.; O'HARA, I. M.; DOHERTY, W. O. S; Pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous polyol solutions. *Cellulose* v.20, p.3179–3190, 2013b.

ZHANG, Z.; WONG, H.; ALBERTSON, P. L.; DOHERTY, O. S.; O'HARA, I. M. Laboratory and pilot scale pretreatment of sugarcane bagasse by acidified aqueous glycerol solutions. *Bioresource Technology*, v.138, p.14–21, 2013a.