

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO POR DR - X E FTIR E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDO A DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL

L. P. DE SOUZA¹, P. V. F. DANTAS¹, A. DE A. GUILHERME¹, E. S. DOS SANTOS¹, F. A. N. FERNANDES², G. R. DE MACEDO¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Ceará - Departamento de Engenharia Química

Contato: alexandrearaujoguilherme@gmail.com

RESUMO: este trabalho teve como objetivo a análise por DR-X e FT-IR e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido diferentes pré-tratamentos visando à produção de etanol. Os pré-tratamentos foram realizados com uso de ácidos, álcalis, peróxido de hidrogênio e auto hidrólise. De acordo com os resultados de DR-X foi possível observar um aumento na cristalinidade das estruturas pré-tratadas de acordo com a remoção de lignina e hemicelulose e, por FTIR, foi possível observar uma modificação nos grupos orgânicos, principalmente nos radicais fenólicos, o que pode ter favorecido o processo de hidrólise enzimática. Usando hidróxido de sódio como pré-tratamento obteve-se 55% de recuperação de biomassa em base seca com um rendimento global de 3,13 g de glicose por 100 g de bagaço *in natura*, sendo estes os melhores resultados de forma a reduzir custos de processo.

1. INTRODUÇÃO

Os pré-tratamentos são utilizados para se aumentar a conversão do material lignocelulósico em açúcares redutores como celobiose e glicose (Sun e Cheng, 2002) através do processo de hidrólise enzimática. Eles atuam desestruturando a matriz lignocelulósica, reduzindo as quantidades de lignina e hemicelulose e modificando a estrutura cristalina da celulose de forma a deixá-la mais susceptível ao ataque enzimático (Silverstein *et al.*, 2007).

Pré-tratamentos ácidos envolvendo ácido sulfúrico, nítrico ou clorídrico podem solubilizar parte da hemicelulose expondo ainda mais a celulose ao ataque enzimático (Schellet *et al.*, 2003). O pré-tratamento hidrotérmico ou autohidrólise da biomassa vegetal é baseado no uso de água (água líquida no reator de alta pressão ou vapor de água) e de calor (150 a 230°C). Este processo permite a obtenção de hidrolisados essencialmente de derivados da hemicelulose e uma fração sólida composta de celulose e lignina. A vantagem deste tratamento é a prevenção da corrosão do equipamento observado na hidrólise ácida e na ausência de reciclagem e de neutralização do ácido utilizado, o que simplifica a condução do processo (Boussarsaret *et al.*, 2009).

Pré-tratamentos alcalinos se referem ao uso de soluções alcalinas como hidróxido de sódio, dentre outras, usadas basicamente para remover lignina e diminuir o grau de

cristalinidade da celulose (Chang e Holtzaple, 2000). Pré-tratamentos com peróxidos em pH alcalino aumentam a eficiência enzimática através da deslignificação oxidativa e diminuição da cristalinidade da celulose (Gould, 1985).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar por DR-X e FTIR o bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos bem como avaliar o rendimento em açúcares (celobiose, glicose e xilose) após hidrólise enzimática visando uma futura produção de etanol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Enzimas e bagaço de cana-de-açúcar

As enzimas utilizadas neste trabalho foram (NS22074) que corresponde às celulasas, (NS50010) que é β -glicosidase, cedidas pela Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). O substrato utilizado neste trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar cedido gentilmente pela Usina Estivas (Arês – RN, Brasil) e submetido a diferentes pré-tratamentos.

2.2 Pré-tratamento no bagaço de cana

Quatro diferentes métodos de pré-tratamentos foram estudados neste trabalho, todos realizados com partículas de 0,84 mm de diâmetro. Para cada pré-tratamento o rendimento foi calculado, conforme a Equação 1.

$$(\%) \text{ Rendimento} = \frac{\text{quantidade final (g)}}{\text{quantidade inicial (g)}} \times 100 \quad (1)$$

O pré-tratamento ácido alcalino (AA) foi realizado utilizando bagaço na quantidade de sólidos de 20% (p/v) imerso em uma solução de ácido sulfúrico 2% (v/v) submetido a uma temperatura de 121°C por 30 minutos, segundo Guo *et al.*, (2009). Em seguida, a fração sólida foi lavada com água até o valor do pH ficar próximo ao pH da água de lavagem. Após o pré-tratamento ácido, o material foi submetido a um pré-tratamento alcalino para a deslignificação onde foi utilizada uma quantidade de 20% (p/v) do material sólido submerso em solução de hidróxido de sódio 4% (p/v) submetido a uma temperatura de 121°C por 30 minutos, segundo Vasquez *et al.*, (2007). Em seguida, o pH foi corrigido para 7,0 utilizando ácido clorídrico para posterior lavagem. O pré-tratamento AA visa à remoção de parte da hemicelulose (Schell *et al.*, 2003), lignina e redução do grau de cristalinidade da celulose (Chang e Holtzaple, 2000). O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento AA foi denominado de BAA.

O pré-tratamento hidrotérmico alcalino (HA) foi realizado em duas etapas, uma primeira etapa que foi o pré-tratamento hidrotérmico foi realizado utilizando um reator de alta pressão (Reator Inox PARR 4520 – 1 L, Series 4520 Bench Top Reactors 1 L, Parr Instruments Company USA), 10% de sólidos, 100 rpm, 20 bar de pressão inicial com

Nitrogênio, 170°C de temperatura de processo chegando a 35 bar, tempo de subida da temperatura 40 minutos, tempo de processo 40 minutos e tempo de resfriamento 15 minutos. Esta etapa do processo visa à redução da hemicelulose (Boussarsar *et al.*, 2009). Após o pré-tratamento hidrotérmico, o material foi submetido a um pré-tratamento alcalino da mesma forma como foi realizado no pré-tratamento AA. O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento HA foi denominado de BHA.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em pH alcalino (PHA) foi realizado utilizando 4% (p/v) de bagaço *in natura* imerso em uma solução de peróxido de hidrogênio a 7,35% (v/v), agitado a 100 rpm com agitador mecânico (mod TE – 139, Tecnal, São Paulo/Brasil) na temperatura ambiente, conforme Rabelo *et al.*, (2011). Entretanto, como a reação é exotérmica, foi detectado temperaturas de até 80°C durante o processo. O tempo de residência foi de 1 h. O pH da solução de peróxido de hidrogênio foi ajustado para 11,5 com hidróxido de sódio antes de entrar em contato com o bagaço de cana. Após o término da reação a fração líquida foi descartada e os sólidos lavado com água (Rabelo *et al.*, 2011). Este pré-tratamento visa à redução da lignina e redução do grau de cristalinidade da celulose (Chang e Holtzapple, 2000), entretanto não há uma grande remoção de hemicelulose, favorecendo uma maior recuperação da xilose para fermentações. O bagaço submetido ao pré-tratamento PHA foi denominado de BPHA.

O pré-tratamento alcalino (A) foi o realizado da mesma forma que a etapa alcalina do pré-tratamento AA e tem como objetivo a comparação com os outros processos realizados visando à redução de custo com reagentes e números de etapas. O bagaço de cana submetido ao pré-tratamento A foi denominado de BA.

2.3 Caracterização por DR-X e FTIR

As análises de FTIR foram feitas variando o comprimento de onda de 4000 a 650 cm⁻¹, em espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (Spectrun 65 FT-IR, Perkin Elmer, USA). Com as análises de FTIR é possível detectar a presença dos principais grupos orgânicos contidos na estrutura lignocelulósica na forma *in natura* e pré-tratada e com isso, pode-se avaliar o grau de modificação química que um pré-tratamento promove na biomassa vegetal principalmente em relação aos componentes lignina e hemicelulose.

A cristalinidade da fibra de celulose foi avaliada por Difração de Raio – X (XRD-6000, Shimadzu, Japão). Foi utilizada uma radiação K α de cobre, 30,0 kV de voltagem e 15 mA de corrente elétrica, velocidade de 2,0 graus por minuto, numa varredura contínua de ângulo 2 θ de 4,0 a 70,0. O Índice de Cristalinidade (IC) foi obtido através da razão entre a máxima intensidade do pico 002 (I_{002} , 2 θ = 22,5) e o mínimo da depressão (I_{am} , 2 θ = 18,5) entre os picos 001 e 002 (Segal *et al.*, 1959 e Rodrigues *et al.*, 2007) de acordo com a Equação 2.

$$(\%) IC = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{am}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo que I_{002} é a intensidade máxima no pico 002 e I_{am} é referente à mínima depressão da estrutura amorfa.

Com esta análise é possível detectar a remoção da parte amorfa da biomassa lignocelulósica, bem como a possível modificação da estrutura cristalina da celulose.

2.4 Ensaios enzimáticos

Os ensaios foram realizados em incubador rotatório (TE – 421, Tecnal, São Paulo/Brasil) a 150 rpm e 50°C utilizando Erlenmeyers de 250 mL e 30 mL de volume reacional com tampão citrato 50 mM em pH 4,8. Para este estudo usou-se o bagaço de cana pré-tratado na quantidade que representasse 4,0% (p/v) de celulose no meio reacional. Uma solução de azida de sódio 1% (v/v) na proporção de 1:100 foi usada para prevenir o crescimento de micro-organismos. A carga enzimática inicial foi de 27 FPU/g de celulose da enzima (NS22074), e 4 CBU/g de celulose da enzima (NS50010) conforme estudos anteriores. Os ensaios foram realizados em triplicata por 48 horas e as amostras coletadas para quantificação de celobiose, glicose, xilose por CLAE. A quantidade de celulose digerida (conversão de celulose em glicose) foi determinada de forma indireta segundo o protocolo de avaliação de digestibilidade da biomassa lignocelulósica do NREL (Selig *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão os resultados obtidos em FTIR para os bagaços *in natura* e pré-tratado. O componente sólido da lignina é um fator chave para o sucesso da sacarificação, pois a lignina é considerada um adsorvente das enzimas celulolíticas, capaz de desativá-las (Guo *et al.*, 2009). Segundo Pan (2008) os grupos fenólicos hidroxil apresentam um efeito inibitório em enzimas celulasas. De acordo com Guo *et al.* (2009), as bandas onde se encontram os grupos fenólicos hidroxil estão entre 1375 e 1325 cm^{-1} , bandas estas que foram encontradas em menor intensidade no bagaço *in natura* e BA e em maior intensidade nos outros materiais. Ao que parece, os pré-tratamentos mais severos AA, HA e PHA deixam os grupos fenólicos hidroxil mais expostos o que pode diminuir o rendimento da hidrólise enzimática aqui estudada.

A cristalinidade de biomassa lignocelulósica representa a quantidade relativa de celulose cristalina total no componente sólido. Os resultados de cristalinidade foram de 49,32, 63,54, 69,96, 60,59 e 55,51% para os bagaços *in natura* e BAA, BHA, BPHA e BA respectivamente. Pode-se observar que o bagaço *in natura* possui a menor cristalinidade relativa 49,32%, pois o mesmo tem um maior teor de hemicelulose e lignina, dois compostos amorfos. A cristalinidade é fortemente influenciada pela composição da biomassa vegetal, quantidade relativa de lignina, hemicelulose e celulose que variam de acordo com a natureza da biomassa (Corrales *et al.*, 2012). Outro fator que pode modificar a cristalinidade da

biomassa lignocelulósica é o uso de pré-tratamentos alcalinos que age na região cristalina da celulose transformando-a em estruturas amorfas (Chang e Holtzaple, 2000).

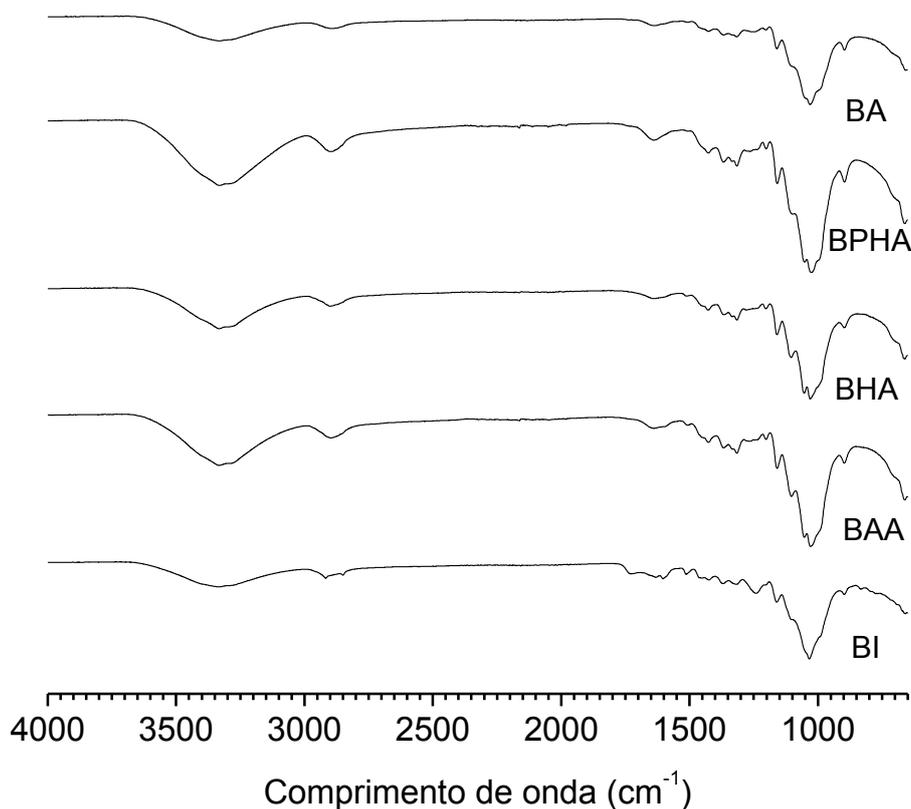


Figura 1 - Resultados de FTIR para o bagaço *in natura* e pré-tratado.

Como não existe uma etapa de lavagem após a etapa hidrotérmica no pré-tratamento HA, o rendimento em material 33,4% ficou maior quando comparado ao resultado para o bagaço submetido ao pré-tratamento AA 26,44%, pois na etapa de lavagem parte do material pode ser perdida. Apesar de o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio ser apenas de uma etapa, seu rendimento 21,47% foi o mais baixo sendo observado o maior rendimento no pré-tratamento A 55,33%.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de conversão (celulose a glicose), bem como, a produção de açúcares redutores após a hidrólise enzimática realizada no bagaço de cana submetido aos diferentes pré-tratamentos. Como pode ser observado, a maior conversão e produção de glicose foram para o ensaio enzimático utilizando o bagaço BPHA seguido dos ensaios utilizando os bagaços BA, BAA e BHA. Considerando a produção de xilose, os maiores resultados foram para os ensaios utilizando-se o bagaço BA seguido dos ensaios utilizando-se os bagaços BPHA, BAA e BHA.

Tabela 1: Resultados de conversão e açúcares redutores formados após a hidrólise enzimática.

Bagaço	Conversão (%)	Glicose (g/L)	Celobiose (g/L)	Xilose (g/L)
BAA	47,01 ± 1,43	20,89 ± 0,87	1,04 ± 0,09	2,39 ± 0,65
BHA	34,25 ± 2,65	15,22 ± 1,56	0,58 ± 0,03	1,26 ± 0,05
BPHA	76,22 ± 1,79	33,87 ± 0,54	3,76 ± 0,34	3,73 ± 0,78
BA	58,03 ± 3,45	25,79 ± 3,21	10,29 ± 1,45	15,58 ± 2,34

O alto valor do IC para o bagaço BHA pode ter influenciado negativamente no rendimento da hidrólise enzimática quando comparado aos resultados da hidrólise do BAA.

Foi observado uma produção de 10,29 (g/L) de celobiose para a hidrólise enzimática do bagaço BA o que pode ocasionar uma inibição da hidrólise enzimática nas enzimas celulases por formação do produto final, entretanto, os resultados em glicose foram superiores aos ensaios enzimáticos que utilizaram os bagaços BAA e BHA. Nas análises de FTIR, Figura 1, foi possível ver que o BA possui uma menor quantidade de OH fenólicos quando comparado com os outros materiais pré-tratados, o que pode ter favorecido o processo de hidrólise mesmo o BA tendo menor quantidade relativa de celulose e maior de hemicelulose.

Pelos resultados pode-se observar que a hidrólise enzimática não foi influenciada negativamente pela presença de hemicelulose na biomassa vegetal, pois os melhores rendimentos em glicose foram encontrados nos bagaço BPHA e BA que possuem maior teor deste biopolímero. Pode-se concluir, também, que o pré-tratamento PHA deixa a celulose bem mais susceptível ao ataque enzimático. Tais resultados são compatíveis com a literatura (Maeda *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Rabelo *et al.*, 2011; Asgher *et al.*, 2013)

As quantidades de glicose produzida por grama de bagaço de cana foi de 0,07, 0,05, 0,09 e 0,06 (g/g) para os bagaços BAA, BHA, BPHA e BA respectivamente. Combinando esses resultados com os resultados de rendimento de cada pré-tratamento pode-se observar o seguinte resultado para o cálculo de processo, para cada 100 g de bagaço *in natura* pode-se obter após cada pré-tratamento e hidrólise enzimática, 1,85, 1,67, 1,93 e 3,13 g de glicose. Desta forma, o processo que consiste no pré-tratamento com hidróxido de sódio seguido da hidrólise enzimática se mostrou o mais vantajoso tanto em relação à produção de glicose como de xilose que posteriormente pode ser utilizado para produção de etanol ou outros produtos.

4. CONCLUSÃO

Avaliando a ação dos diferentes pré-tratamentos estudados, é possível concluir que a estratégia que consiste no pré-tratamento com hidróxido de sódio seguido da hidrólise enzimática apresentou os melhores resultados em rendimento de xilose e glicose. Com isso é possível reduzir o número de etapas realizadas no processo de pré-tratamento, reduzir a gasto com energia, reduzir a quantidade de reagentes utilizados e de resíduos gerados, produzindo

quantidades significativas de glicose e xilose para posteriores processos biotecnológicos como a produção de etanol.

5. REFERÊNCIAS

ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H.M.N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 44, p. 488-495, 2013.

BOUSSARSAR, H.; ROGE, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6537-6542, 2009.

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 84-86, p. 5-37, 2000.

CORRALES, R.C.N.R.; MENDES, F.M.T.; PERRONE, C.C.; SANT'ANNA, C.; SOUZA, W.; ABUD, Y.; BON, E.P.S.; FERREIRA-LEITÃO, V. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO₂ and SO₂. *Biotechnology for Biofuels*, v. 5, p. 36, 2012.

GOULD J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnol Bioeng*, v. 27, p. 225-231, 1985.

GUO, G. L.; HSU, D. C.; CHEN, W. H.; CHEN, W.H.; HWANG, W. S. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme Microb Technol*, v. 45, p. 80-87, 2009.

MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. M. S.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA, N. Jr.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* celulasas. *Process Biochem.* v. 46, p. 1196-1201, 2011.

PAN X. J. Role of functional groups in lignin inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose. *J Biobased Mater Bioenergy*, v. 2, p. 25-32, 2008.

RABELO, S.C.; FONSECA, N.A.A.; ANDRADE, R.R.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 2600-2607, 2011.

RODRIGUES FILHO, G.; DE ASSUNÇÃO, R. M. N.; VIEIRA, J. G.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; BARUD, H. S.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Characterization of methylcellulose produced from sugar cane bagasse cellulose: Crystallinity and thermal properties. *Polymer Degrad Stability*, v. 92, p. 205-210, 2007.

SCHELL, D. J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J. D. Dilutesulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor – investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 105, p. 69-85, 2003.

SELIG, M.; WEISS, N.; JI, Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report, NREL, 2008. p. 8.

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONCALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, p. 809-817, 2011.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D. J. O. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour Technol*, v. 98, p. 3000-3011, 2007.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; WANG, S. Q.; ZHU, W. Characterization of lignins from wheat straw by alkaline peroxide treatment. *Polym Degrad Stab*, v. 67, p. 101-109, 2000.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, v. 83, p. 1-11, 2002.

VASQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B. Jr.; PEREIRA, N. Jr. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 136-140, p. 141-154, 2007.