

## **AValiação DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO VISANDO-SE AO AUMENTO DA DIGESTIBILIDADE ENZIMÁTICA DA CELULOSE**

L. P. FRASINELLI, C. O. CRISTOVÃO, R. TERÁN-HILARES, SILVIO S. SILVA e  
JÚLIO C. SANTOS

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

E-mail para contato: teranhilares@gmail.com, jsant200@usp.br

**RESUMO** – Visando-se ao aproveitamento do potencial dos materiais lignocelulósicos na obtenção de produtos de interesse econômico e social, é necessário o desenvolvimento de métodos que resultem no aumento de sua digestibilidade enzimática. A técnica avaliada neste trabalho foi o pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar com  $\text{Ca(OH)}_2$ . Os ensaios foram realizados em um meio reacional composto por 5% em massa de bagaço e solução de hidróxido de cálcio na razão mássica  $\text{Ca(OH)}_2$ :bagaço de 0,4, tendo sido avaliada a influência das variáveis tempo (2, 4 e 8 h) e temperatura (50 e 90 °C) na digestibilidade enzimática da celulose presente no material. Os resultados mostraram uma maior remoção da fração de lignina na condição mais severa estudada (8 h a 90 °C) e, conseqüentemente, um maior rendimento de hidrólise do material pré-tratado (46,98%) com celulasas comerciais. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o pré-tratamento com  $\text{Ca(OH)}_2$  é bastante promissor, em especial considerando seu baixo custo quando comparado a outros álcalis.

## **1. INTRODUÇÃO**

A biomassa lignocelulósica, como a de resíduos agroindustriais, constitui-se em matéria prima de baixo custo para a obtenção de produtos químicos e combustíveis. Os principais componentes de materiais lignocelulósicos são: celulose, hemicelulose e lignina. Dentre estas, a fração celulósica corresponde a um polissacarídeo formado por unidades de glicose, açúcar que pode ser empregado na obtenção de uma série de produtos de interesse (Xu *et al.*, 2010). No entanto, as frações lignina e hemicelulose resultam em uma estrutura complexa ao redor da celulose que precisa ser previamente eliminada ou modificada em uma etapa de pré-tratamento para que seja realizado um processo de hidrólise enzimática eficiente, a qual resulta em um meio rico em glicose que pode ser empregado em bioprocessos (Verna, Kumar e Jain, 2011). Processos de pré-tratamento podem ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação entre eles (Laser, 2002). Os pré-tratamentos alcalinos permitem menor degradação de açúcares e formação de derivados do furano quando comparados a pré-tratamentos térmicos e ácidos (Gonzales *et al.*, 1986). Além disso, o pré-tratamento alcalino permite eliminar a fração de lignina da biomassa, melhorando a reatividade dos polissacarídeos restantes e a eliminação de grupos acetila e outros substituintes em hemicelulose (Chen *et al.*, 2011).

Estudos feitos por Rocha *et al.* (2012) para a deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar, demonstraram que o pré-tratamento em meio alcalino (NaOH) a 100 °C por 1 hora permite a remoção de até 92,7 % da fração de lignina. Os processos alcalinos, além de removerem a lignina, também removem até 85% da fração hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar (Aguilar *et al.*, 2010). O hidróxido de cálcio apresenta várias vantagens, sendo de fácil manipulação e apresentando um baixo custo; além disso, a cal pode ser recuperada tratando-se a água de lavagem com gás carbônico (Chang *et al.*, 1998).

Considerando algumas vantagens do uso de hidróxido de cálcio para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar, avaliou-se a influência das variáveis temperatura e tempo de reação no processo de pré-tratamento sobre a digestibilidade enzimática da celulose.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Matéria Prima**

O bagaço de cana-de-açúcar foi adquirido em usina de açúcar do estado de São Paulo. O material foi seco ao sol até que se atingisse um teor de umidade próximo de 10%, sendo então moído em um moinho de martelo Dupla 270 (Moinho Benedetti Ltda., Pinhal- SP). O bagaço seco e moído foi caracterizado em relação a sua composição em extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, de acordo com a metodologia padrão do NREL- National Renewable Energy Laboratory (Sluiter *et al.* 2012).

### **2.2. Pré-Tratamento Alcalino com Hidróxido de Cálcio**

Foram executados experimentos para avaliar os efeitos das variáveis temperatura e tempo de reação sobre a composição do bagaço de cana-de-açúcar e a influência sobre a digestibilidade enzimática do material pré-tratado por processo alcalino. Os ensaios foram executados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo um total de 100 g de meio reacional composto por 5% em massa de bagaço e solução de hidróxido de cálcio na razão mássica  $\text{Ca(OH)}_2$ :bagaço de 0,4. As reações foram realizadas em um banho com agitação (Lindberd/Blue M, SWB1122C-1, Waterbath, Asheville, Estados Unidos) de 110 rpm durante os tempos de 2h, 4h e 8h e temperaturas de 50°C e 90°C. O hidróxido de cálcio empregado foi da marca Geocálcio (Miika Nacional, Caetanópolis/MG), correspondente a uma forma disponível comercialmente em suspensão aquosa, o que facilita a manipulação e utilização do material.

Concluídos os tempos de reação, os meios foram resfriados e, em seguida, o material pré-tratado foi filtrado em um funil de Büchner, sendo lavado com água e solução de ácido acético para solubilizar e remover o hidróxido de cálcio resultante. Finalmente, o bagaço pré-tratado foi separado para serem realizados os procedimentos de hidrólise enzimática e caracterização em relação a seus componentes (celulose, hemicelulose e lignina) de acordo com a metodologia descrita por Sluiter *et al.* 2012.

## 2.3. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio reacional constituído por 0,3 g de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (massa seca) e tampão de citrato de sódio 0,05M (pH=4,8). À suspensão, foi adicionado coquetel enzimático comercial Dyadic® Cellulase CP CONC (Dyadic International, Inc., Jupiter, Flórida, USA), em uma proporção de 10 FPU de enzimas /g de bagaço pré-tratado. A hidrólise foi realizada em incubadora de movimento rotatório Quimis Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos, Diadema, SP, Brasil) sob condições de 50 °C, 150 rpm e 24 h. A fração líquida obtida após a hidrólise foi caracterizada em relação ao teor de açúcares, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme Chandel *et al.* (2013). O rendimento de hidrólise foi definido como a razão entre a massa de celulose transformada em glicose e a massa teórica que seria liberada a partir desta fração do material.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* apresentou um conteúdo de 44,9% de celulose, 23,3% de hemicelulose e 23,7% de lignina, além de 3,1% de extrativos e 3,2% de cinzas. Os resultados estão de acordo a estudos feitos por Benjamin *et al.* (2013), Vallejos *et al.* (2012) e Zhao *et al.* (2007), nos quais reportou-se que o bagaço de cana-de-açúcar apresenta uma composição variável nas frações de celulose (32,6-45,0%), hemicelulose (23,6-35,0%), lignina (14,4-30%), extrativos (3,1-12,4%) e cinzas (0,6-3,4%). Os resultados da composição de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em meio alcalino empregando  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Composição do material pré-tratado em meio alcalino empregando  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  em diferentes tempos e temperaturas (os resultados apresentados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão)

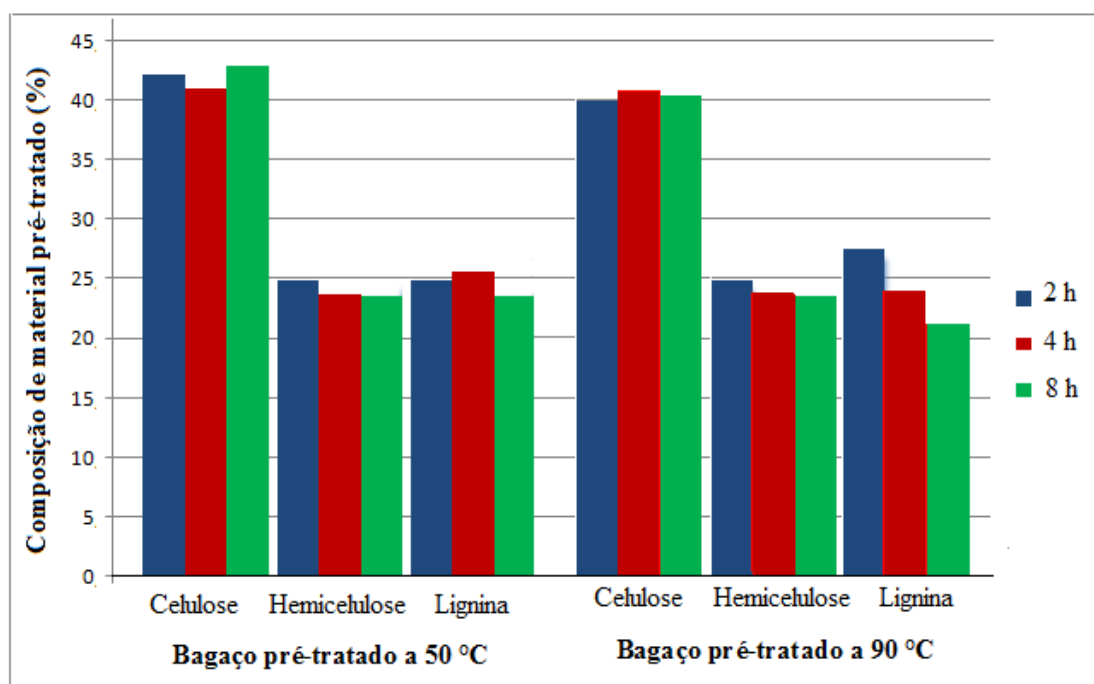
Nº Exp.	Condições de pré-tratamento		Bagaço pré-tratado		
	Temp. (°C)	Tempo (h)	Celulose	Hemicelulose	Lignina
1	50	2	42,17 $\pm$ 0,00	24,87 $\pm$ 0,06	24,97 $\pm$ 0,00
2	50	4	41,06 $\pm$ 0,06	23,70 $\pm$ 0,15	25,61 $\pm$ 0,33
3	50	8	42,99 $\pm$ 4,22	23,68 $\pm$ 0,20	23,57 $\pm$ 5,21
4	90	2	40,01 $\pm$ 0,28	24,85 $\pm$ 0,93	27,50 $\pm$ 2,62
5	90	4	40,96 $\pm$ 1,60	23,92 $\pm$ 0,45	24,00 $\pm$ 0,31
6	90	8	40,49 $\pm$ 0,12	23,64 $\pm$ 0,02	22,99 $\pm$ 1,30

De acordo com resultados mostrados na Tabela 1, o efeito da temperatura e tempo na composição do material pré-tratado em relação ao material de partida foi mais intenso para o Exp. 6, no qual se empregaram os maiores valores de tempo (8 h) e temperatura (90 °C). Neste caso, a fração lignina apresentou uma maior redução em relação ao percentual presente inicialmente no bagaço, apresentando também o menor valor (22,99%) em relação aos outros experimentos, como pode ser melhor visualizado na Figura 1. Observou-se também que o efeito do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na composição dos materiais não foi dependente do tempo de pré-

tratamento, exceção feita à composição em lignina a 90°C. Com relação à celulose, observou-se que o material pré-tratado apresentou um percentual menor em relação ao bagaço *in natura*, indicando possível remoção desta fração, o que pode ocorrer pela degradação de carboidratos em presença de álcalis, produzindo ácidos hidroxicarboxílicos, conforme o reportado por Klinke *et al.* (2002).

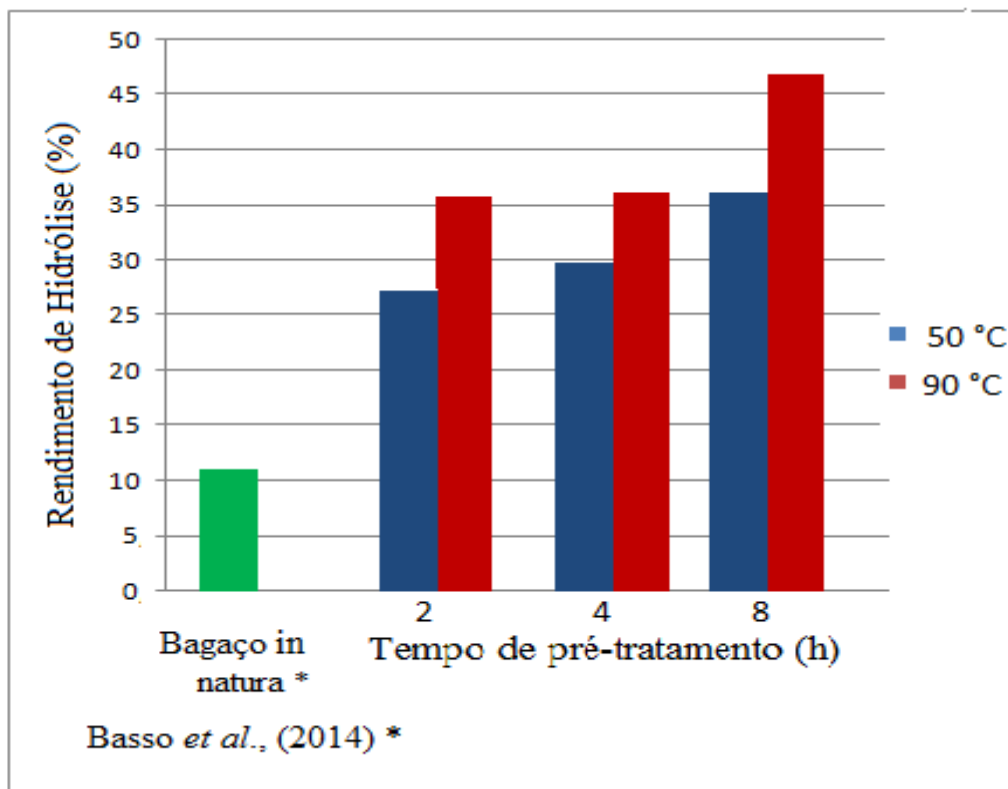
As modificações composicionais devidas ao pré-tratamento com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  foram, no entanto, relativamente pequenas, o que pode ser atribuído à baixa solubilidade deste reagente (Chang *et al.*, 1998), a qual também dificulta os processos posteriores de filtração e lavagem. Contudo, estudos feitos por Playne (1984), reportaram que o hidróxido de cálcio apresenta maior efetividade que o hidróxido de sódio e amônio, para o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar. Neste trabalho, foi alcançado um rendimento de hidrólise de 72% em biomassa pré-tratada a 20°C por 8 dias em relação de um rendimento de hidrólise de 19% da biomassa *in natura*.

**Figura 1-** Composição percentual em celulose, hemicelulose e lignina do material pré-tratado com  $\text{Ca}_2(\text{OH})$  por diferentes tempos e temperaturas



As condições estabelecidas no estudo apresentaram uma influência positiva em relação ao rendimento de hidrólise (Figura 2), observando-se um aumento para na hidrólise da celulose da biomassa pré-tratada, sendo o máximo valor obtido (46,98%) no material pré-tratado por 8 h a 90 °C. O rendimento de hidrólise para o bagaço *in natura* de acordo com estudos feitos por Basso *et al.* (2014), foi de 11%. A digestibilidade do material pré-tratado foi em torno de quatro vezes maior em comparação à obtida com o bagaço *in natura*. Este aumento é devido principalmente a uma maior remoção de lignina e grupos acetil (Santos *et al.*, 2012) e também à elevação da porosidade do material lignocelulósico devido ao aumento da remoção de ligações cruzadas de ésteres da xilana presentes na hemicelulose (Tarkow e Feist, 1969).

**Figura 2-** Rendimento de hidrólise enzimática da celulose do bagaço pré-tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  a 50 e 90 °C por diferentes tempos



Um aspecto importante do emprego do  $\text{Ca(OH)}_2$  em relação aos outros compostos alcalinos é seu baixo custo, o que o destaca como um dos reagentes com grande potencial para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, apesar de sua baixa solubilidade em relação a outros.

#### 4. CONCLUSÕES

O pré-tratamento com hidróxido de cálcio pode facilitar a digestibilidade enzimática, com maior remoção de frações de lignina e grupos acetil, o que permite o aumento da porosidade e ação das enzimas sobre a celulose. Observou-se que as variáveis estudadas influenciaram o rendimento de hidrólise, tornando o pré-tratamento com  $\text{Ca(OH)}_2$  vantajoso em relação a outros tratamentos alcalinos, principalmente em aspectos relacionados a o custo e facilidade da recuperação de reagente após a lavagem.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade de São Paulo e ao CONCyTEC-Perú pelo apoio financeiro.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGUIAR MM, FERREIRA LFR, MONTEIRO RTR. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (5): 1245-1254. 2010.
- BASSO, R., TANAKA, J., MENDONCA DE JESUS, H., SANTOS, J.C., SILVA, S.S. Pré-Tratamento Alcalino do Bagaço de Cana-de-Açúcar sob Condições Amenas de Pressão e Temperatura: Digestibilidade Enzimática e Avaliação do Potencial de Licor Negro Obtido. IV Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina – Brazil. 2014
- BENJAMIN, Y., CHENG, H., GORGENS, J.F. Evaluation of bagasse from different varieties of sugarcane by dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products.* 51: 7-18. 2013.
- CHANDEL, A.K., ANTUNES, F.AF., SILVA, M.B., DA SILVA, S.S. Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. *Biotechnology for Biofuels.* 6: 102-110, 2013.
- CHANG, V., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. Line pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74: 135-159, 1998.
- CHEN WH, YE SC, SHEEN HK. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Appl Energ.* 93: 237-244, 2011.
- GONZALEZ, G., LOPES-SANTIN, J., CAMINAL, G., SOLA, C. Dilute acid hydrolysis of wheat straw hemicellulose at moderate temperature: a simplified kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 288–293, 1986.
- KLINKE, H.L., AHRING, B.K., SCHMIDT, A.S., THOMSEN, A.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* 82, 15-26, 2002.
- LAI, Y.Z. Chemical degradation. In: Hon, D.N-S., Shiraishi, N. (Eds.), *Wood and Cellulose Chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 443-512 (Chapter 10), 2001.
- ROCHA GJM, GONÇALVES AR, OLIVEIRA BR, OLIVARES EG, ROSSELL, CEV. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind Crop Prod.* 35: 274- 279, 2012.
- SANTOS, R. B., LEE, J. M., JAMEEL, H., CHANG, H., & LUCIA, L. A. *Bioresource Technology* Effects of hardwood structural and chemical characteristics on enzymatic hydrolysis for biofuel production. *Bioresource Technology*, 110, 232–238. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.085, 2012.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Disponível na internet em: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>. Consulta em: 24 de fevereiro de 2015.
- TARKOW, H. AND FEIST, W.C. A mechanism for improving digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. In Robert F. Gould (Ed.) *Celluloses and their applications*, *Advances in Chemistry Series*, N° 95, Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., 1969.
- VALLEJOS, M.E., ZAMBON, M.D., AREA, M.C., CURVELO, A.A.S. Low liquid–solid ratio (LSR) hot water pretreatment of sugarcane bagasse. *Green Chem.* 14, 1982–1989, 2012.
- VERMA A, KUMAR S, JAIN PK. Key pretreatment technologies on cellulosic ethanol production. *Journal of Scientific Research*, 55:57-63, 2011.
- XU, J., CHENG, J.J., SHARMA-SHIVAPPA, R.R., BURNS, J.C. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. *Energy Fuels* 24 (3), 2113– 2119, 2010.
- ZHAO, X., WANG, L., LIU, D. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. *J. Chem Technol Biotechnol.* 82: 1115-1121, 2007.