**AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO COM DESCROMPRESSÃO RÁPIDA SEGUIDO DE REAÇÕES DE DESLIGNIFICAÇÃO ALCALINA NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE AÇÚCAR**

**Thiago Alves Lopes Silva[[1]](#footnote-1)*\**; Hernán Dário Zamora Zamora2; Leandro Henrique Ribeiro Varão1; Milla Alves Baffi1; Daniel Pasquini1**

**Resumo**

Neste estudo avaliou-se o efeito do pré-tratamento hidrotérmico com descompressão rápida e catalisado por ácido cítrico (AC) e hidróxido de sódio (NaOH), seguido de reações de deslignificação alcalina nas propriedades químicas e estruturais do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), bem como sobre o processo de hidrólise enzimática. O pré-tratamento hidrotérmico catalisado com AC e NaOH foi realizado em reator de 1,4 L sob temperatura de 180 °C com tempo de retenção de 5 min. A etapa de deslignificação alcalina com NaOH (2% m:m) foi realizada a 120 °C, sob refluxo de 4h. A caracterização química e estrutural do BCA *in natura* e pré-tratado foi realizada por metodologias de referência para caracterização de materiais lignocelulósicos. A hidrólise enzimática (HE) foi realizada com volume final de 20 mL, constituído de 3% de BCA, tampão de citrato de sódio 50 mM (pH=5,0) e 10 FPU do complexo enzimático Cellic® CTec 3, sob agitação de 150 rpm, 50ºC por 72 h. A concentração de açúcares fermentescíveis foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Após o pré-tratamento com AC (BHH), obteve-se uma biomassa com menor quantidade de hemiceluloses (16,16%), enquanto o BCA pré-tratado com NaOH (BHOH) apresentou completa desestruturação da fibra, remoção de 65% da lignina e preservação da fração hemicelulósica. Depois de submeter o BCA *in natura* e os materias pré-tratados ao processo de deslignificação alcalina (DA), notou-se uma completa desestruturação da matriz lignocelulósica e a solubilização de 85-90% da lignina. O índice de cristalinidade da biomassa após os pré-tratamentos teve um aumento quando comparado ao BCA, podendo este ser associado à remoção de componentes amorfos. A maior concentração de D-glicose (30,16 ± 1,54 g.L-1) e consequentemente conversão de celulose (97,55%) foi obtida para o BHH-D, o qual apresentou elevada remoção de lignina e hemiceluloses.

PALAVRAS-CHAVE: Biomassa lignocelulósica; Pré-tratamento ácido e alcalino; Lignina; D-glicose.

**Introdução**

Um dos principais obstáculos tecnológicos para conversão da biomassa lignocelulósica em etanol de 2ª geração, consiste na elevada recalcitrância das fibras lignocelulósicas proveniente das complexas interações formadas entre a lignina, hemiceluloses e celulose (LANGAN et al., 2014).

Dessa forma, a utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para produção de combustíveis e químicos verdes, está condicionada a realização de uma etapa de pré-tratamento, que objetiva romper a estrutura da parede celular da biomassa deixando os carboidratos mais acessíveis ao ataque enzimático e, consequentemente promove o aumento do rendimento de açúcares fermentescíveis (PAL et al., 2016).

A escolha de um pré-tratamento eficaz para melhoria da digestibilidade da biomassa lignocelulósica, mostra-se de extrema importância, visto que mais de 40% dos custos totais do processo produtivo do etanol celulósico, são advindos da etapa de pré-tratamento. (SHINDHU; BINOD; PANDEY, 2016). Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico com descompressão rápida e catalisado por ácido cítrico (AC) ou hidróxido de sódio (NaOH) seguido de reações de deslignificação alcalina, nas propriedades químicas e estruturais do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), bem como sobre o processo de hidrólise enzimática.

**Metodologia**

1. ***Pré-tratamentos hidrotérmico e de deslignificação alcalina***

O pré-tratamento hidrotérmico com descompressão rápida do BCA foi realizado em reator térmico de escala laboratorial com volume de 1,4 L e equipado com controlador de temperatura e válvula de despressurização modelo abre e fecha com diâmetro interno de 2,0 cm de diâmetro. O BCA e a solução aquosa geradora de vapor (ácido cítrico ou NaOH) foram adicionados manualmente no reator, considerando um razão de 1:20 (m/v) e temperatura de 180ºC. Ao atingir a temperatura de trabalho, a mistura reacional foi mantida por 5 min (tempo de retenção) e subitamente despressurizada. Após a despressurização o BCA pré-tratado foi lavado com água até pH neutro e seco em estufa de circulação de ar a 105ºC por 12 h.

O rendimento do pré-tratamento hidrotérmico foi calculado pela equação 1.

(1)

Onde **R** é rendimento do pré-tratamento; **Mf** a massa final da biomassa após o pré-tratamento (base seca) e **Mi** a massa inicial da biomassa *in natura* (base seca).

O BCA *in natura* e o pré-tratado hidrotermicamente foram submetidos ao processo de deslignificação alcalina (DA) com NaOH 2% (m/m) sob refluxo, considerando uma razão sólido/líquido de 1:20 e tempo reacional de 4 h. Após tempo reacional o BCA deslignificado foi lavado com água até pH neutro e seco em estufa de circulação de ar a 105ºC por 12 h.

O rendimento da DA, também, foi calculado, conforme equação 1, no entanto considerando como **Mi** a massa da biomassa pré-tratada hidrotermicamente. Já o rendimento combinado entre os dois pré-tratamentos foi determinado conforme equação 2.

(2)

Sendo **Rc** o rendimento combinado; **RH** o rendimento do pré-tratamento hidrotérmico e **RDA** o rendimento da deslignificação alcalina.

1. ***Caracterização físico-química do BCA in natura e pré-tratado***

Os teores de celulose , hemiceluloses e lignina total no BCA in natura e após os pré-tratamentos foram determinados por metodologias de referência para caracterização de matérias lignocelulósicos, sendo: lignina Klason insolúvel e solúvel (TAPPI T13M-54), holocelulose pelo método do clorito ácido e celulose por extração alcalina (BROWNING, 1967) e hemiceluloses por medida indireta da diferença entre os teores de holocelulose e celulose.

A análise das alterações dos grupos funcionais do bagaço in natura e após os pré-tratamentos foi obtida utilizando um espectrofotômetro Shimadzu IRPrestige 21. As amostras foram pastilhadas com KBr na proporção mássica de 1:100 e os espectros foram obtidos na região de 4500 a 400 cm-1 , resolução de 4 cm-1 e 32 varreduras.

Os padrões de difração de raios-X foram obtidos utilizando um difratômetro Shimadzu XRD - 6000 LabX com intervalo de 4 a 45° (2θ), velocidade de varredura de 2°/min, potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA e radiação CuKa ( 1,5406 Å) . O índice de cristalinidade foi determinado pela equação 3, proposta por Segal et al., 1959.

(3)

Onde **ICr** expressa o grau de cristalinidade relativo; **I200** refere-se a intensidade máxima, em unidades arbitrárias, no pico cristalino à aproximadamente 2θ = 22° e **Iam** é a intensidade da região amorfa em 2θ = 18°.

Para análise da superfície do BCA sem tratamento e pré-tratado, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo de Carl Zeiss EVO 10 MA. As micrografias eletrônicas foram obtidas com ampliação de 500X e tensão de aceleração de 5.0 kV.

1. ***Hidrólise Enzimática***

A hidrólise enzimática foi realizada com volume final de 20 mL, constituído de 3% de BCA (massa seca), tampão de citrato de sódio 50 mM (pH=5,0), 10 FPU do complexo enzimático Cellic® CTec 3/g de celulose. A mistura reacional foi incubada em um shaker Novatecnica a 50ºC, 150 rpm por 72 h.

A determinação da concentração de D-glicose, foi realizada por cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado com detector de índice de refração (RID-6A) e coluna Agilent Aminex® HPX-87H mantida a 55ºC, utilizando solução aquosa de ácido sulfúrico (5 mmol L-1) com vazão de 0,6 mL min-1.A conversão enzimática da celulose em glicose foi calculada conforme equação 4 (PERRONE et al., 2016).

(4)

Em que **Ccelulose (%)** é a conversão de celulose em glicose; **C** é a concentração de glicose no hidrolisado (g.L-1); **V** (L) é o volume da hidrólise enzimática e **m** a massa de celulose (g) presente na biomassa.

**Resultados e Discussões**

A composição do BCA *in natura*, apresentada na Tabela1, encontra-se na faixa reportada por Shafiei; Kumar; Karimi, (2015). Nota-se na Tabela 1 que o tratamento hidrotérmico com AC (BHH) promoveu a solubilização de 6,83% da celulose, 41,45% das hemiceluloses e 14,33% da lignina, enquanto no tratamento hidrotérmico com NaOH (BHOH) a solubilização de celulose e lignina correspondeu a 21,84% e 65%, não ocorrendo remoção da fração hemicelulósica.

Os efeitos do pré-tratamento hidrotérmico com AC e NaOH, assemelham ao reportados por Karp et al. (2013).

Com a realização da DA, o BCA *in natura* (BCA-D) teve uma remoção de celulose, hemiceluloses e lignina, correspondente a 30,61%, 4,20% e 85%. Já o BCA pré-tratado hidrotermicamente com AC (BHH-D) e NaOH (BHOH-D) e seguidamente deslignificados apresentaram, respectivamente, uma solubilização de celulose, hemiceluloses e lignina de 41,90% e 32,06%; 44,97% e 2,72%; 90,71% e 85,55%.

Os espectro de infravermelho tanto para biomassa *in natura* como pré-tratada apresentam bandas características de materias lignocelulósicos (Figura 1A). As bandas na região de 3380 e 2906 cm-1 representam, respectivamente, os estiramentos – OH e C-H (YANG et al., 2012) presentes nas estruturas nucleares da celulose e hemiceluloses e lignina. Nota-se que para o BHH, BHOH, BCA-D, BHH-D e BHOH-D ocorreu o aumento da intensidade na região 3380 cm-1, provavelmente pela maior exposição das hidroxilas da celulose, hemiceluloses e da lignina remanescente, após a realização dos pré-tratamentos. As bandas com absorção em 1600 cm-1 e 1510 cm-1 são características da vibração do anel aromático da lignina (GARCÍA et al., 2012), já a região de 833 cm-1 representa a vibração C-H fora do plano das unidades de p-Hidroxifenil, o qual é um dos percussores da lignina (HOAREAU et al., 2004). Analisando os espectros nota-se uma drástica redução na intensidade das bandas 1600 cm-1, 1510 cm-1 e 833 cm-1 no BHOH, enquanto no BCA-D, BHH-D e BHOH-D nota-se o desaparecimento do sinal em 833 cm-1 e em 1610 cm-1, e uma maior redução do pico em 1510 cm-1 quando comparado a redução observada no BHOH, confirmando assim a elevada solubilização da lignina (85 – 90%) descrita na caracterização química (Tabela 1). A ausência da banda em 1735 cm-1 (alongamento da carbonila (C=O) em hemiceluloses (CHEN et al., 2016) e/ou ao estiramento da ligação carbonil éster da unidade monomérica de ácido p-cúmarico presente na lignina (NAZIR et al., 2013)), observada nos espectros do BHOH e das amostras deslignificadas pode ser atribuída a quebra da ligação carbonil éster entre hemiceluloses e lignina.

Os difratogramas de raios-X, apresentado na Figura 1B, são característicos de materiais semicristalinos, apresentando um alo amorfo e picos cristalinos característicos de celulose tipo I. O ICr (valores inserido na Figura 2B) aumentou após os pré-tratamentos, devido a remoção de componentes amorfos da biomassa (ASADA et al., 2015).

As micrografias eletrônicas de varredura indicam que no BHH ocorreu a formação de sulcos superficiais, enquanto no BHOH nota-se a completa desestruturação da fibra lignocelulósica, podendo esta ser atribuída a remoção de 65% da lignina. Após o processo de DA, observa-se que em todas as amostras ocorreu à desestruturação da matriz lignocelulósica, podendo esta ser atribuída pela ruptura das ligações entre o complexo lignina-carboidratos (Figura 2).

Na HE do BCA pré-tratado hidrotermicamente, obteve-se a maior conversão de celulose para o BHOH, possivelmente devido a elevada remoção de lignina dessa amostra. Já após a 2ª etapa de pré-tratamento, a maior conversão de celulose foi obtida pelo BHH-D, devido a elevada solubilização de hemiceluloses no tratamento hidrotérmico seguida de alta remoção de lignina na DA (Tabela 1). Desse forma, nota-se que as hemiceluloses e a lignina atuam como fatores limitantes ao processo de HE. A conversão de celulose encontrada para o BHH-D (97,55%) mostra-se superior ao estudo de Hemansi et al. (2020) (59,23%) que utilizou pré-tratamento ácido seguido de alcalino.

**Conclusões**

Diante dos resultados apresentados pode-se afirmar que o pré-tratamento hidrotérmico com AC promoveu a remoção de hemiceluloses, enquanto o com NaOH atuou na solubilização de lignina. Após a realização dos pré-tratamentos estudados observou-se modificações na estrutura superficial do BCA e o aumento do ICR, os quais estão associados a remoção de componentes amorfos, como a lignina, hemiceluloses e a fração amorfa da celulose.

Os valores da concentração de glicose e conversão de celulose obtidos após os pré-tratamentos sequenciais foram aumentados, sendo este fato atribuído a elevada remoção de lignina da biomassa, a qual atua como barreira para complexo enzimático e com isso reduz a conversão dos carboidratos em açúcares fermentescíveis. Por fim, cabe ressaltar que o BHH-D, após a HE, apresentou maior concentração de glicose (30,16 ± 1,54 g.L-1) e conversão de celulose (97,55%), possivelmente devido elevada remoção da lignina e de uma fração de hemiceluloses, que ocorreu durante o ataque ácido e alcalino que o BCA foi submetido.

**Agradecimentos**

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e UFU.

**Referências**

ASADA, C. et al. Chemical characteristics and enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass treated using high-temperature saturated steam: comparison of softwood and hardwood. Bioresource Technology, v. 182, p. 245-250, 2015.

BROWNING, B. L. Methods of Wood Chemistry. New York: Interscience Publishing, 1967. 384p.

CHEN, L. et al. Integrated chemical and multi-scale structural analyses for the processes of acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, n. 5, p. 1-9, 2016.

GARCÍA, A. et al. Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. **Biochemical Engineering Journal**, v.67, p.173-185, 2012.

HEMANSI, et al. Sequential dilute acid and alkali deconstruction of sugarcane bagasse for improved hydrolysis: Insight from small angle neutron scattering (SANS). **Reneable Energy**, v. 147, p. 2091-2101, 2020.

HOAREAU, W. et al. Sugarcane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, p. 567-576, 2004.

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n.4, p. 679-689, 2013.

LANGAN, P. et al. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. Green Chemistry, v. 16, n.1, p. 63-68, 2014.

NAZIR, M. S. et al. Eco-friendly extraction and characterization of cellulose from oil palm empty fruit bunches. BioResources, v. 8, n.2, p. 2161-2172, 2013.

PAL, S. et al. Effect of mixed acid catalysis on pretreatment and enzymatic digestibility of sugarcane bagasse. **Energy Fuels**, v. 30, n. 9, p. 7310-7318, 2016.

PERRONE, O. M. et al. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology, v.** 218, p. 69-76, 2016.

SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v.29, n.10, p.786-794, 1959.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 76-82, 2016.

SHAFIEI, M.; KUMAR, R.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: KARIMI, K. **Lignocellulose:** based bioproducts. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. ch. 3, p. 85-154.

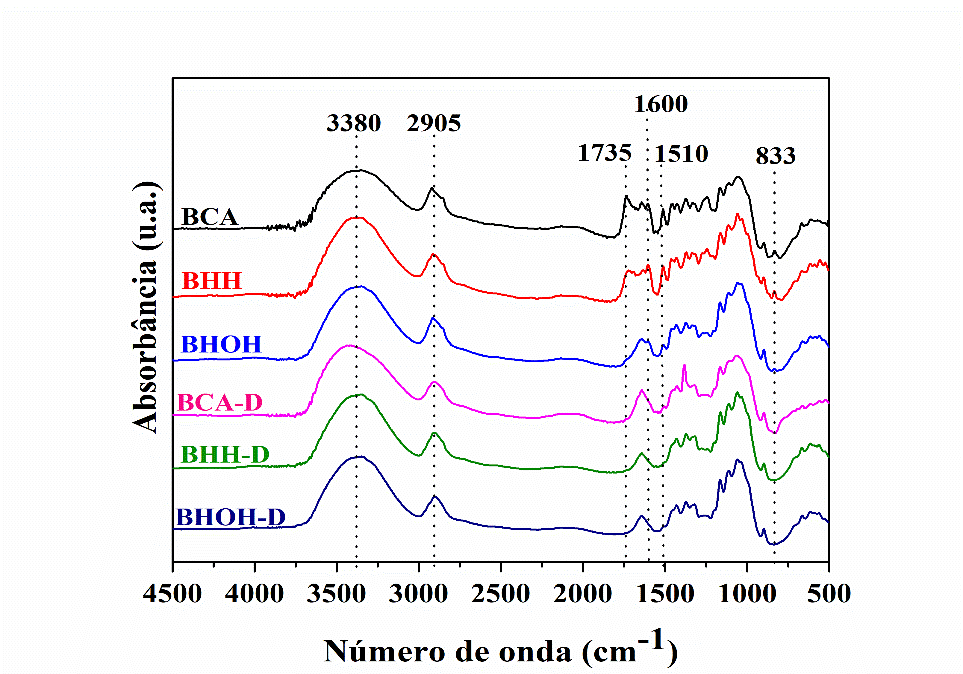
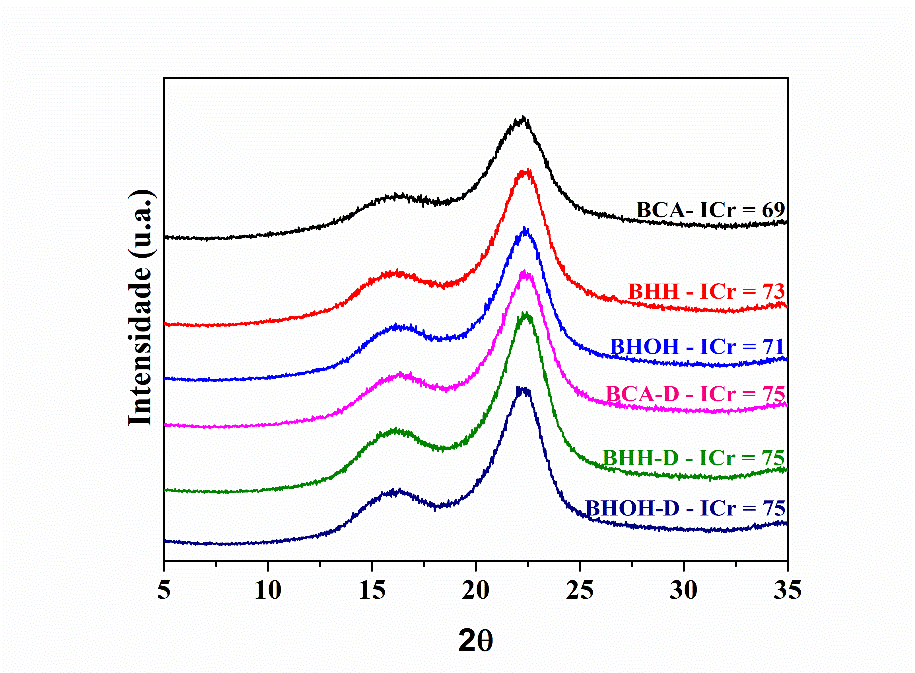
YANG, H. Y. et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of triploid poplar following stepwise acidic pretreatment and alkaline fractionation. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 619–625, 2012.

**Tabela 1 –** Composição química e hidrólise enzimática do BCA *in natura* e pré-tratado.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Amostras** | **R(%)a** | **R(%)b** | **R(%)c** | **Lignina total** | **Hemiceluloses** | **Celulose** | **D-glicose (g.L-1)** | **Conversão de celulose**  **(%)** |
| **BCA** | 100,00 | - | - | 24,22 ± 0,36 | 27,61 ± 0,07 | 42,77 ± 0,29 | 2,04 ± 0,01 | 8,86 |
| **BHH** | 76,18 | - | - | 20,75 ± 0,18 | 16,16 ± 0,42 | 39,85 ± 0,44 | 7,70 ± 0,06 | 26,50 |
| **BHOH** | 71,82 | - | - | 8,48 ± 040 | 27,85 ± 0,19 | 33,43 ± 0,08 | 15,26 ± 1,00 | 58,90 |
| **BCA-D** | - | 60,82 | 60,82 | 3,64 ± 0,03 | 26,47 ± 0,43 | 29,69 ± 0,28 | 18,69 ± 0,26 | 68,92 |
| **BHH-D** | - | 58,63 | 44,66 | 2,21 ± 0,15 | 15,22 ± 0,04 | 24,85 ± 0,16 | 30,16 ± 1,54 | 97,55 |
| **BHOH-D** | - | 81,27 | 58,37 | 3,49 ± 0,01 | 26,86 ± 0,20 | 29,06 ± 0,25 | 24,18 ± 0,66 | 87,43 |

**Fonte:** Autores. **a**Rendimento do pré-tratamento hidrotérmico;**b**Rendimento do pré-tratamento de deslignificação alcalina; **c** Rendimento combinado dos pré-tratamentos hidrotérmico e deslignificação alcalina.

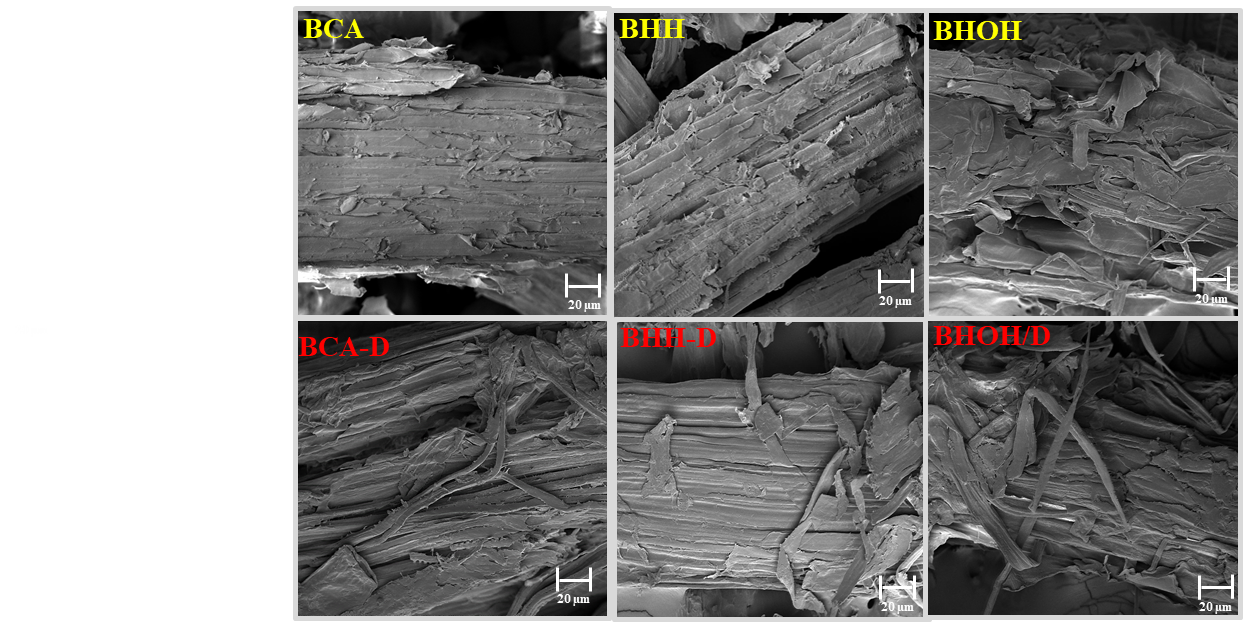
**Figura 1 –** Espectros de infravermelho (A) e difratogramas de raios-X (B) do BCA *in natura* e pré-tratado.



**B**

**A**

**Fonte:** Autores.

**Figura 2 –** Micrografias eletrônicas de varredura do BCA *in natura* e pré-tratado.

**Fonte:** Autores.

1. 1. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Uberlândia, Minas Gerais (MG), Brasil. \*thiago\_1209@hotmail.com

   2. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Programa de Pós-graduação em Bioenergia, Rio Claro, São Paulo (SP), Brasil. [↑](#footnote-ref-1)