



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Uso de Líquidos iônicos 1,2,3-Triazólicos não Comerciais para o Pré-Tratamento do Bagaço de Cana-de-Açúcar

Táisa Nogueira Morais<sup>1\*</sup>, Ingrid Santos Miguez<sup>1\*</sup>, Leonardo Vitor Belo Pazutti<sup>1</sup>,  
Arturene M. L. Carmo<sup>2,3</sup>, Pedro H. F. Stroppa<sup>2</sup>, Adilson D. Silva<sup>2</sup>, Viridiana S. Ferreira-  
Leitão<sup>1,4</sup>, Ayla Sant'Ana da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI), Laboratório de Biocatálise, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>3</sup> Instituto Federal do Norte de Minas (IFNMG), Campus Januária, Januária, MG, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\* Os autores contribuíram igualmente para este trabalho

#### RESUMO

*Este trabalho avaliou o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar empregando três líquidos iônicos (LI) 1,2,3-triazólicos não comerciais, a saber: iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI-83), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1H-1,2,3-triazol (LI-100), brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI-112). As amostras pré-tratadas foram hidrolisadas com enzimas comerciais e comparadas com amostras de bagaço in natura, pré-tratadas hidrotermicamente (HT) e com o LI comercial acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio [Bmim][Ac]. O rendimento de conversão da celulose em glicose nas hidrólises enzimáticas das amostras in natura e pré-tratadas com LI-112, [Bmim][Ac], HT, LI-83 e LI-100, em 6 horas de reação, foram de 16,8%, 90,8%, 88,1%, 41,5%, 21,6% e 18,2%, respectivamente. O LI-112 teve desempenho equivalente ao LI comercial [Bmim][Ac], aumentando significativamente a taxa inicial de hidrólise em comparação ao pré-tratamento HT, enquanto os LI-83 e LI-100 não foram efetivos. Análises complementares de DRX e MEV indicaram que o LI-112 promoveu alterações na cristalinidade e na morfologia da biomassa, justificando sua maior eficiência.*

Palavras-chave: pré-tratamento, líquidos iônicos, bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática.

#### INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, a partir de seu caldo, produz-se açúcar e etanol de primeira geração. Nesse processo, há grande geração de resíduos lignocelulósicos (bagaço e palha), que podem ser aproveitados para a obtenção de açúcares a partir da hidrólise dos polissacarídeos celulose e hemicelulose a açúcares monoméricos (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010). Os açúcares obtidos a partir da hidrólise da biomassa podem ser utilizados para a produção de etanol celulósico (segunda geração) ou para outros bioprodutos. O processo de transformação da biomassa em açúcares consiste em pelo menos duas etapas: o pré-tratamento e a hidrólise enzimática, sendo o pré-tratamento crucial para aumentar a acessibilidade das enzimas ao substrato durante a hidrólise, uma vez que a biomassa lignocelulósica é um material recalcitrante e de difícil desconstrução (SILVEIRA *et al.*, 2015). O pré-tratamento melhora a eficiência da hidrólise enzimática através de diferentes efeitos, tais como: redução da cristalinidade da celulose, extração de um componente (hemicelulose ou lignina), aumento da porosidade, entre outros.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Nos últimos 30 anos, diversos métodos de pré-tratamentos foram desenvolvidos, incluindo processos biológicos, físicos, químicos e físico-químicos (ALVIRA *et al.*, 2010). O pré-tratamento com líquidos iônicos (LIs) tem sido apresentado como uma alternativa promissora e inovadora por sua capacidade em reduzir a recalcitrância da biomassa. Alguns estudos já reportaram que os rendimentos e produtividade de hidrólise de biomassas pré-tratadas com LIs são muito superiores aos das biomassas submetidas a pré-tratamentos convencionais (SILVA *et al.*, 2011). Com isso, o objetivo deste trabalho é investigar a eficácia de novos LIs 1,2,3-triazólicos não comerciais (CARMO *et al.*, 2014), comparando-os a um LI imidazólico comercial de eficácia já conhecida e com pré-tratamento hidrotérmico, que é um processo convencional utilizado para pré-tratamento de biomassas.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Pré-tratamentos e caracterização química do bagaço *in natura* e pré-tratado

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi cedido pela COAGRO (Cooperativa Agroindustrial do Estado do Rio de Janeiro), de Campos dos Goytacazes, RJ. A amostra foi moída em moinho de facas e peneirada. Os LIs utilizados foram sintetizados e cedidos pela Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo estes iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI-83), brometo de 4-hidroximetil-3-propil-1-propil-1H-1,2,3-triazol (LI-112), iodeto de 4-hidroximetil-3-metil-1-hexil-1H-1,2,3-triazol (LI-100), além do LI comercial acetato de 1-butil-3-metil-imidazólio [Bmim][Ac], (Sigma-Aldrich). O pré-tratamento com LI foi realizado utilizando uma proporção de 1:15 (m/m) de bagaço:LI a 120 °C por 120 minutos, seguido de lavagem com água para remoção de resíduos de LI da amostra. Também foram utilizadas amostras de bagaço pré-tratado hidrotérmicamente a 190 °C por 12 minutos, que foram gentilmente cedidas pela empresa INBICON S/A, Dinamarca. As determinações de sólidos totais, umidade, cinzas, extrativos, carboidratos estruturais e lignina foram realizados de acordo com Sluiter e colaboradores (2011).

#### Ensaio de hidrólise enzimática

As atividades de FPase e  $\beta$ -glicosidase das enzimas comerciais Celluclast 1.5 L e Novozyme 188 foram determinadas conforme Ghose (1987). As hidrólises foram realizadas em frascos de 20 mL, com massa total do ensaio de 10 g, contendo 1% de biomassa, a mistura de enzimas, tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 e azida de sódio a 0,02%. A carga de FPase foi de 20 FPU/g de biomassa com relação de 1:3 de FPase/ $\beta$ -glicosidase. Os ensaios foram incubados em shaker a 50 °C, 200 rpm e alíquotas foram retiradas em 0, 1, 2, 4, 6, 24, 48 e 72 h e analisada por HPLC para quantificação dos açúcares.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da caracterização das biomassas pré-tratadas, verificou-se que os pré-tratamentos realizados com os LIs triazólicos LI-83 e LI-100 não promoveram variações significativas no conteúdo de carboidratos estruturais e lignina em relação ao bagaço *in natura*, variando o teor de glucana de 37,8% (*in natura*) para 40,9% e 38,7% nas amostras pré-tratadas com LI-83 e LI-100, respectivamente. Já o LI-112 foi capaz de reduzir o conteúdo de hemicelulose do material de 22,7% (*in natura*), para 11,9%, indicando que este LI foi capaz de alterar a estrutura do bagaço de maneira significativa. O pré-tratamento com



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

LI comercial [Bmim][Ac] contribuiu para a remoção parcial da lignina, ação característica de LIs imidazólicos contendo o íon acetato, enquanto o bagaço pré-tratado hidrotermicamente sofreu grande redução do conteúdo de hemicelulose (dados não apresentados).

A Figura 1a apresenta o rendimento das hidrólises dos bagaços *in natura* e pré-tratados com os diferentes LIs e hidrotermicamente, comparando suas eficiências. Ao se avaliar a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados com os diferentes LIs, observou-se que o emprego dos LIs [Bmim][Ac] e LI-112 na etapa de pré-tratamento resultou em um aumento apreciável nas taxas de hidrólise nas primeiras horas. O [Bmim][Ac] e o LI-112 resultaram em um aumento de até cinco vezes no rendimento de hidrólise, atingindo mais de 95% de conversão da celulose em glicose em apenas 24 h de hidrólise, enquanto a hidrólise do bagaço *in natura* atingiu 18,4% de conversão. O LI-83 e o LI-100 não foram eficientes para o pré-tratamento do bagaço, uma vez que os resultados de hidrólise foram semelhantes aos obtidos para o bagaço *in natura*. A partir dos resultados apresentados na Figura 1a, é possível observar que em 72 h as amostras pré-tratadas hidrotermicamente atingiram percentuais de conversão da celulose em glicose superiores a 90%. No entanto, a taxa inicial de hidrólise das amostras tratadas com [Bmim][Ac] e LI-112 foram muito superiores às das amostras tratadas hidrotermicamente.

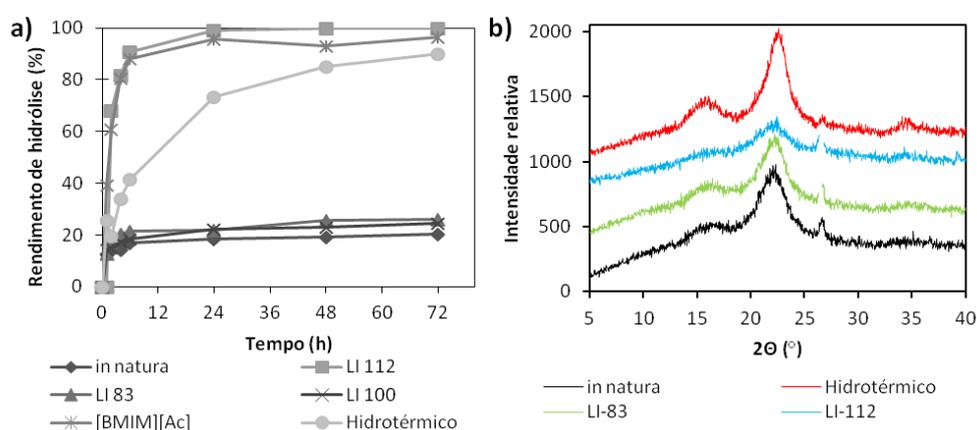


Figura 1. (a) Rendimento de conversão da celulose em glicose ao longo da hidrólise enzimática. (b) Difractogramas das amostras de bagaço *in natura* e pré-tratadas com LI-83, LI-112 e hidrotermicamente.

Através da análise de difração de raios X (DRX) na Figura 1b, verifica-se que o perfil e a intensidade de difração do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com LI-83 foi muito parecido com a do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, condizendo com o resultado encontrado após a caracterização química. Já o perfil de difração obtido na análise do bagaço pré-tratado com o LI-112 demonstrou uma redução na cristalinidade, o que sugere que a ação deste líquido iônico na desestruturação da rede cristalina de celulose, através do rompimento de interações inter e intramoleculares (SILVA *et al.*, 2011). O perfil de difração do bagaço pré-tratado hidrotermicamente apresentou cristalinidade superior à da biomassa *in natura*, justificado pela remoção da hemicelulose durante o pré-tratamento, parte essencialmente amorfa do complexo lignocelulósico, o que demonstra que um pré-tratamento pode ser eficiente apesar de não alterar diretamente a estrutura da celulose.

Foram realizadas análises complementares de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (imagens não apresentadas). A desorganização estrutural foi claramente percebida



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

nas imagens das amostras pré-tratadas com LI-112 e o [Bmim][Ac], corroborando com os resultados obtidos na hidrólise enzimáticas e nas análises de DRX.

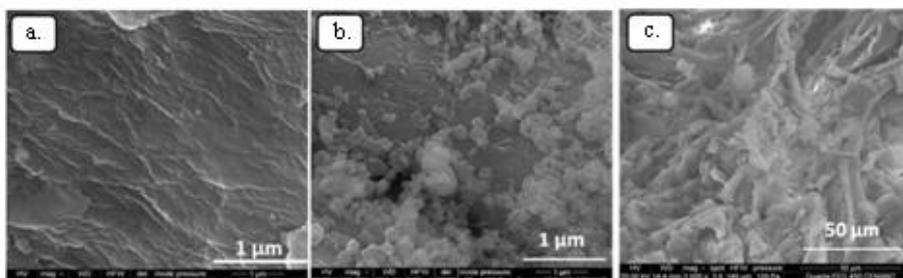


Figura 2. Imagens obtidas por MEV do bagaço de cana-de-açúcar: (a) in natura (50000x); (b) pré-tratado LI-112 (50000x), (c) pré-tratado [Bmim][Ac] (2000x).

### CONCLUSÕES

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com um dos líquidos iônicos triazólicos testados (LI-112) promoveu um aumento de aproximadamente duas vezes na produtividade da hidrólise do bagaço pré-tratado em relação ao bagaço pré-tratado hidrotermicamente e teve eficiência comparada ao LI imidazólico comercial utilizado. O desempenho desse LI pode ser atribuído à presença na sua estrutura do íon Br<sup>-</sup> de alta eletronegatividade, que em função de sua basicidade, foi capaz de romper as ligações de hidrogênio e reduzir drasticamente a cristalinidade da celulose. Dessa forma, este estudo abre perspectivas para o design de novos LIs para o pré-tratamento da biomassa, que sejam eficientes e potencialmente mais baratos, aumentando assim a possibilidade futura de aplicação industrial desses reagentes.

### AGRADECIMENTOS

Projeto FAPERJ E-26/111.087/2014 e Programa PIBITI/CNPq/INT.

### REFERÊNCIAS

- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Biores Technol* 101:4851-4861.
- Carmo AML, Stroppa PHF, Corrales RCNR, Barroso ABN, Ferreira-Leitão VS, Silva AD. 2014. Synthesis of 1,2,3-triazolium-based ionic liquid and preliminary pretreatment to enhance hydrolysis of sugarcane bagasse. *J Braz Chem Soc* 25:2088-2093.
- Ferreira-Leitão VS, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Nepomuceno AL, Molinari HBC, Bon EPS. 2010. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valor* 1:65-76.
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59:257-268
- Silva AS, Lee S-H, Endo T, Bon EPS. 2011. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][Ac]) *Biores Technol* 102:10505-10509.
- Silveira MHL, Morais ARC, Lopes AM, Oleksyszyn DN, Bogel-Lukasik R, Andreus J, Ramos LP. 2015. Current pretreatment Technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem* 8:3366-3390
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass sugar, by-products in liquid fraction process samples. NREL Laboratory Analytical Procedures, Golden, CO.