

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

Taísa Nogueira Morais^{1*}, Ingrid Santos Miguez^{1*}, Leonardo Vitor Belo Pazutti¹,
Arturene M. L. Carmo^{2,3}, Pedro H. F. Stroppa², Adilson D. Silva², Viridiana S. Ferreira-
Leitão^{1,4}, Ayla Sant'Ana da Silva¹

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

² Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, Juiz de Fora, MG, Brasil

³ Instituto Federal do Norte de Minas (IFNMG), Campus Januária, Januária, MG, Brasil

⁴ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* Os autores contribuíram igualmente para este trabalho

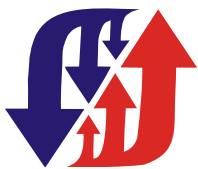
RESUMO

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

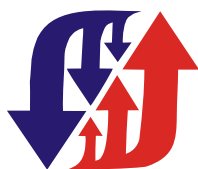
O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi cedido pela COAGRO (Cooperativa Agroindustrial do Estado do Rio de Janeiro), de Campos dos Goytacazes, RJ. A amostra foi moída em moinho de facas e peneirada. Os LIs utilizados foram sintetizados e cedidos pela Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo estes 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 β -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/ β -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.

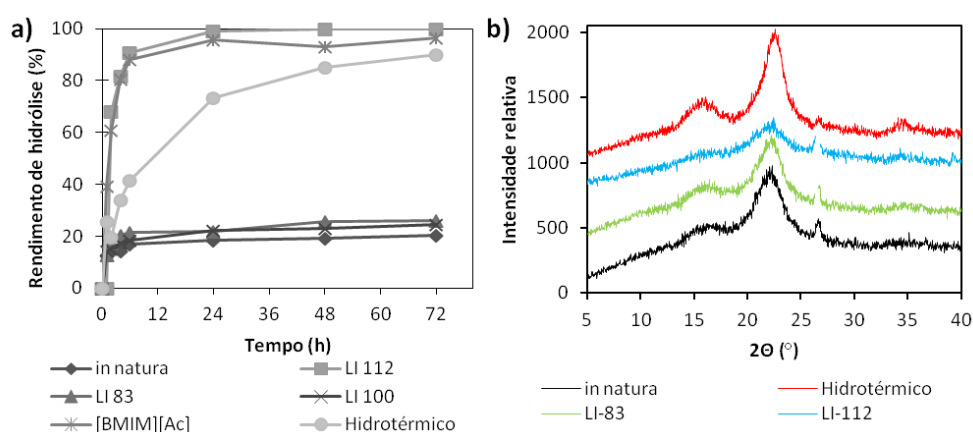
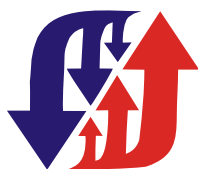


Figura 1. (a) Rendimento de conversão da celulose em glicose ao longo da hidrólise enzimática. (b) Difratoformas das amostras de bagaço *in natura* e pré-tratadas com LI-83, LI-112 e hidrotermicamente.

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.

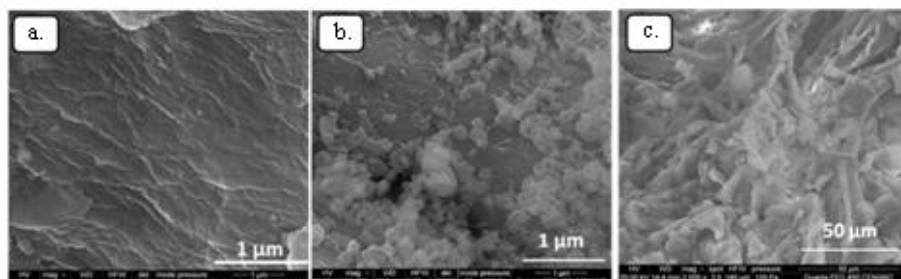


Figura 2. Imagens obtidas por MEV do bagaço de cana-de-açúcar: (a) in natura (50000x); (b) pré-tratado LI-112 (50000x), (c) pré-tratado [Bmim][Ac] (2000x).

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⁻ 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.