



Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para a co-produção de glicose e nanocelulose

Helena C. R. Barbieri, Eupídio Scopel e Camila A. Rezende

Laboratório de Química e Morfologia da Biomassa, Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Nanofibrilas de celulose (CNFs) são estruturas obtidas por meio da desconstrução da parede celular vegetal por tratamentos mecânicos. Para facilitar o isolamento dessas nanoestruturas, tratamentos químicos e enzimáticos podem ser utilizados para reduzir o gasto energético dos processos de fibrilação. Neste trabalho, avaliou-se a produção integrada de CNFs e glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar submetido a processos sequenciais de deslignificação, hidrólise enzimática com o coquetel comercial Cellic® CTec2 e tratamentos mecânicos por ultrassonicação. A combinação de tratamentos organossolve, utilizando etanol e água como solventes, e de branqueamentos com peróxido de hidrogênio alcalino reduziu o teor de lignina nas amostras de 21 para 5% e possibilitou a obtenção de um sólido rico em celulose (82%). Por sua vez, a ação das celulasas no substrato pré-tratado levou à obtenção de uma fração líquida contendo glicose (93% de conversão) e de um sólido celulósico residual. Após a separação do sólido residual por centrifugação, sua dispersão em água e ultrassonicação, foram obtidas CNFs com diâmetro médio de $8,8 \pm 3,1$ nm. Assim, esse estudo indica perspectivas promissoras quanto ao aproveitamento do substrato celulósico para a co-produção de nanoceluloses e açúcares fermentáveis, que podem ser aplicados em diversos segmentos industriais.

Palavras-Chave: Nanocelulose; Glicose; Celulasas.

1. Introdução

A celulose é um dos biopolímeros renováveis mais abundantes no planeta Terra e um dos substitutos mais promissores para materiais e combustíveis atualmente advindos de fontes fósseis. A estruturação nativa desse biopolímero possibilita o isolamento de estruturas nanométricas por meio da desconstrução da parede celular vegetal utilizando tratamentos químicos, biológicos e mecânicos¹.

As fibras da celulose presentes na biomassa lignocelulósica podem ser fragmentadas até a escala nanométrica para obtenção de nanofibrilas de celulose (CNFs)^{2,3}. As CNFs são estruturas com diâmetro entre 5 e 50 nm e comprimento na escala de micrômetros^{4,5}. Essas nanoestruturas podem ser utilizadas na fabricação de compósitos, filmes finos, membranas e géis, que podem ser aplicados em segmentos da indústria de saúde, beleza e alimentícia. De modo geral, as CNFs são obtidas em 3 etapas: 1) Obtenção de um substrato rico em celulose⁶; 2)

Modificações do substrato rico em celulose por tratamentos químicos ou biológicos para facilitar a fibrilação e reduzir gastos energéticos⁷; e 3) Utilização de processos mecânicos para a fibrilação e obtenção das CNFs^{8,9}.

Para a obtenção de um substrato rico em celulose é necessário extrair os demais componentes do substrato *in natura*, principalmente hemicelulose e lignina, utilizando tratamentos com ácidos¹⁰ e bases diluídos¹¹, solventes orgânicos (organossolve)¹², líquidos iônicos¹³, dentre outros. O tratamento organossolve utilizando etanol (em água) como solvente é promissor para o processamento da biomassa lignocelulósica por permitir a reutilização do solvente¹⁴ e por extrair lignina pura, que pode ser recuperada para a produção de energia, materiais ou insumos químicos¹⁵.

Como os tratamentos mecânicos utilizados para fibrilação são energeticamente custosos, uma alternativa para reduzir esses gastos é o uso de

tratamentos com enzimas celulases antes da etapa mecânica¹⁶. Os tratamentos enzimáticos apresentam a vantagem de ocorrerem em condições relativamente brandas de temperatura e pressão, quando comparados a outros tratamentos comumente empregados para facilitar os processos de fibrilação, além de não gerar subprodutos tóxicos¹⁷.

As enzimas apresentam um mecanismo sinérgico em que promovem a delaminação dos retículos cristalinos da celulose e o rompimento das ligações glicosídicas entre as unidades de anidroglicose¹⁸. Neste processo, uma parte da celulose é convertida à glicose e o substrato celulósico residual é utilizado para a produção de CNFs. Isso possibilita a produção integrada desses dois produtos celulósicos, o que agrega valor ao processamento da biomassa.

Uma biomassa promissora para ser utilizada como fonte de celulose neste processo é o bagaço de cana-de-açúcar, devido à sua alta disponibilidade como um resíduo agroindustrial e seu elevado potencial para a produção de glicose e CNFs, conforme já reportado na literatura^{9,19}. Assim, neste trabalho, avaliou-se a produção integrada de CNFs e glicose a partir de bagaço de cana-de-açúcar para o aproveitamento da fração celulósica desta biomassa.

2. Metodologia

O processo para a co-produção de glicose e CNFs a partir de bagaço de cana-de-açúcar está esquematizado na Figura 1, indicando os tratamentos químicos, enzimáticos e mecânicos utilizados.

2.1 Tratamentos químicos

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (amostra IN) previamente moído até passar por uma peneira de 20 *mesh* foi submetido a extrações organossolve com uma solução de etanol em água 80% v/v, a 200 °C por 120 min (amostra Org). Após isso, essa amostra foi submetida a um branqueamento com uma solução de NaOH 5% m/v e H₂O₂ 24% v/v, a 60 °C por 40 min realizado por duas vezes (amostra Org-B). Os teores de celulose, hemicelulose e lignina das amostras foram quantificados de acordo com metodologia estabelecida pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL)²⁰.

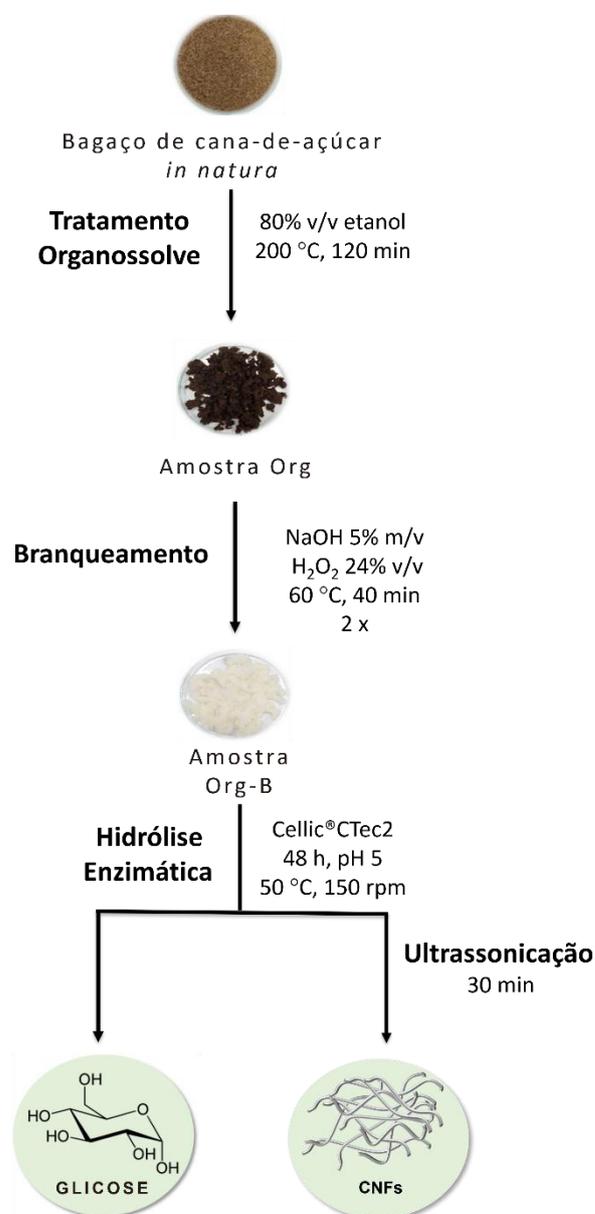


Figura 1. Descrição do processo de obtenção de CNFs e glicose a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

2.2 Tratamento enzimático

O substrato Org-B foi submetido à hidrólise enzimática com o coquetel Cellic®CTec2 em tampão citrato de sódio (0,05 M e pH=5) a 50 °C e 150 rpm (Figura 1). Para a reação, utilizaram-se 10 mg de enzima/g de substrato a uma razão sólido/líquido de 1% m/v por 48 h. Ao término da reação, o sistema foi aquecido a 95 °C por 5 min para desnaturar as enzimas²¹. Após centrifugação (3500 rpm, 10 min), o sobrenadante foi recolhido para a quantificação de glicose por HPLC²², enquanto o sólido foi lavado por centrifugação com água destilada e utilizado para a produção das CNFs²³.

2.3 Tratamentos mecânicos (ultrassonicação)

O sólido obtido após centrifugação foi disperso em 50 mL de água e a suspensão obtida foi homogeneizada utilizando um agitador mecânico (Ultraturrax) por 5 min a 5000 rpm. Em seguida, as fibras foram submetidas à sonicação em ultrassom de ponteira por 30 min a 330 W, no modo não pulsado²⁴. A dispersão obtida, contendo CNFs, foi caracterizada por microscopia óptica e microscopia de força atômica.

2.4 Caracterizações morfológicas

Microscopia óptica (OM)

As dispersões obtidas após tratamento mecânico foram depositadas em lâminulas de vidro e observadas em um microscópio óptico E 800 Nikon, com lentes objetivas com magnificação de 4 e 10 vezes.

Microscopia de força atômica (AFM)

As dispersões obtidas após a ultrassonicação foram analisadas por AFM (equipamento Shimadzu SPM-9600) para a caracterização da morfologia das CNFs. A análise foi realizada no modo de não-contato e em condições ambientais, usando ponteiros de silício (NCHR Pointprobe, Nanoworld) com constante de mola de 42 N.m⁻¹ e ressonância nominal de 318 kHz²⁵. O tratamento das imagens e a contagem das partículas foi realizado no *software* gratuito Gwyddion (gwyddion.com).

3. Resultados e Discussão

3.1 Atuação dos tratamentos químicos no substrato

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina dos substratos *in natura* (IN) e após os tratamentos organossolve e branqueamento está descrita na Tabela 1. A extração organossolve aumentou em 49 e 23% os teores de celulose e hemicelulose nas amostras, respectivamente, e reduziu em torno de 25% o teor de lignina em comparação com a amostra IN. Já a etapa de branqueamento levou a uma redução significativa no teor de lignina e aumentou em cerca de 50% o teor de celulose na amostra Org-B quando comparado com a amostra não-branqueada (Org). Tais resultados indicaram, portanto, a eficiência na utilização destes tratamentos químicos na obtenção de um sólido rico em celulose, que pode ser utilizado para a

investigação da ação enzimática na produção integrada de glicose e CNFs.

Tabela 1. Quantificação dos componentes majoritários da biomassa nas amostras *in natura* (IN) e após os tratamentos químicos.

Amostra	Componente (% m/m)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
IN	37,8±0,1	22,2±0,2	21,1±1,0
Org	56,3±2,2	27,4±1,0	15,8±0,3
Org-B	81,6±0,7	13,2±0,2	5,0±2,4

3.2 Produção integrada de glicose e CNFs

A caracterização do sobrenadante após a hidrólise enzimática indicou que a atuação das enzimas celulases converteu 93% da celulose presente no substrato em glicose. Por sua vez, as CNFs foram obtidas como uma dispersão aquosa após a fibrilação do sólido residual, conforme apresentado na Figura 2a. A caracterização dessa dispersão por OM (Figuras 2b e 2c) indicou a ausência de fibras micrométricas, o que é uma evidência de que essas estruturas maiores foram convertidas a CNFs pelo tratamento mecânico. De fato, a caracterização por AFM (Figura 2d) permitiu identificar um material com propriedades típicas de CNFs, com forma alongada e diâmetro de $8,8 \pm 3,1$ nm (Figura 2e).

Outros trabalhos da literatura também obtiveram CNFs com diâmetro médio semelhante utilizando tratamento enzimático. Por exemplo, Wang e colaboradores²⁶ obtiveram CNFs com diâmetro entre 5 e 10 nm a partir da hidrólise enzimática de polpa de eucalipto que apresentava composição química similar à amostra Org-B. De modo similar, Tibolla *et al.*²⁷ obtiveram CNFs com diâmetro médio de 8,8 nm a partir de casca de banana após 24 h de hidrólise enzimática com xilanases.

O rendimento das CNFs obtidas foi de 7%, o que é um valor inferior ao reportado na literatura em alguns trabalhos. Por exemplo, Liu e colaboradores²⁸, por exemplo, obtiveram CNFs a partir de polpa de eucalipto com diâmetro médio similar ao reportado neste trabalho (9,1 nm), mas com um rendimento de 75%. Para isso, as condições utilizadas na etapa de hidrólise enzimática foram mais brandas do que as utilizadas aqui, mas as condições de fibrilação mecânica foram mais agressivas (2 h). Isso reduziu a conversão de celulose em glicose, o que aumenta o rendimento de CNFs, mas requer um gasto energético relativamente elevado.

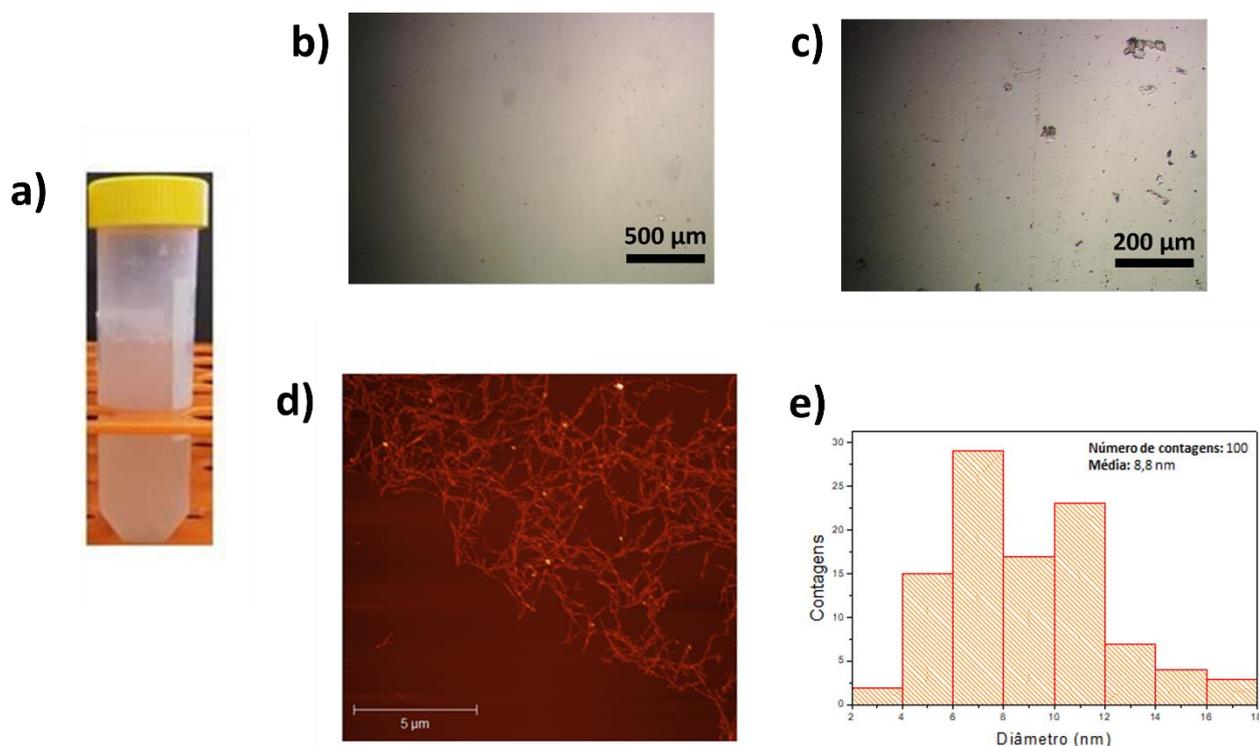


Figura 2. Representações visuais da amostra após duas etapas de branqueamento (Org-B), hidrólise enzimática (48 h) e sonicação (30 min); a) suspensões obtidas, b) e c) microscopias ópticas, d) microscopia de força atômica, e) histograma de diâmetro médio obtido pela medida de 100 nanofibrilas.

Assim, condições mais brandas de hidrólise enzimática do que as utilizadas neste trabalho podem ser adotadas para aumentar o rendimento de CNFs. Isso permitiria um controle do balanço entre a quantidade de glicose e de CNFs produzidas, o que é bastante interessante. A glicose obtida nesse processo pode ser utilizada para produção de etanol, ácido levulínico, ácido láctico e outros insumos químicos. Por outro lado, as CNFs podem ser utilizadas como modificadores reológicos, para a produção de emulsões, hidrogéis e aerogéis, que possuem aplicações médicas, cosméticas e em outros setores da engenharia de materiais.

4. Conclusões e perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho até o momento mostraram que foi possível produzir simultaneamente glicose e CNFs por meio de tratamentos químicos e enzimáticos, seguidos por fibrilação. As próximas etapas deste trabalho serão focadas principalmente na modulação de condições de hidrólise enzimática e fibrilação que aumentem o rendimento de CNFs. Isso permitirá que, em um cenário real, o processamento do sólido celulósico possa favorecer a produção de glicose ou de CNFs, conforme a demanda

de cada produto, apenas pela alteração da condição de hidrólise enzimática.

Agradecimentos

À FAPESP, pelo financiamento do projeto e pelas bolsas (processos 2020/06446-4, 19/19360-3 e 2018/23769-1).

5. Referências

1. T. Li, C. Chen, A. H. Brozena, J. Y. Zhu, L. Xu, C. Driemeier, J. Dai, O. J. Rojas, A. Isogai, L. Wågberg and L. Hu, *Nature*, 2021, **590**, 47–56.
2. F. V. Ferreira, C. G. Otoni, K. J. De France, H. S. Barud, L. M. F. Lona, E. D. Cranston and O. J. Rojas, *Materials Today*, 2020, **37**, 126–141.
3. P. Squinca, S. Bilatto, A. C. Badino and C. S. Farinas, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2020, **8**, 2277–2286.
4. G. L. Berto and V. Arantes, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, **127**, 637–648.
5. N. Lavoine and L. Bergström, *J. Mater. Chem. A*, 2017, **5**, 16105–16117.
6. H. P. Vu, L. N. Nguyen, M. T. Vu, M. A. H. Jahir, R. McLaughlan and L. D. Nghiem, *Science of The Total Environment*, 2020, **743**, 140630.

7. V. Arantes, I. K. R. Dias, G. L. Berto, B. Pereira, B. S. Marotti and C. F. O. Nogueira, *Cellulose*, 2020, **27**, 10571–10630.
8. O. Nechyporchuk, M. N. Belgacem and J. Bras, *Industrial Crops and Products*, 2016, **93**, 2–25.
9. B. R. Rossi, V. O. A. Pellegrini, A. A. Cortez, E. M. S. Chiromito, A. J. F. Carvalho, L. O. Pinto, C. A. Rezende, V. R. Mastelaro and I. Polikarpov, *Carbohydrate Polymers*, 2021, **256**, 117510.
10. P. F. Ávila, J. P. L. Franco Cairo, A. Damasio, M. B. S. Forte and R. Goldbeck, *Food Research International*, 2020, **128**, 108702.
11. F. R. Paz-Cedeno, L. R. Henares, E. G. Solorzano-Chavez, M. Scontri, F. P. Picheli, I. U. Miranda Roldán, R. Monti, S. Conceição de Oliveira and F. Masarin, *Renewable Energy*, 2021, **165**, 1–13.
12. J. A. Ferreira and M. J. Taherzadeh, *Bioresource Technol*, 2020, **299**, 122695.
13. Z. Usmani, M. Sharma, P. Gupta, Y. Karpichev, N. Gathergood, R. Bhat and V. K. Gupta, *Bioresource Technology*, 2020, **304**, 123003.
14. P. P. Thoresen, L. Matsakas, U. Rova and P. Christakopoulos, *Bioresource Technology*, 2020, **306**, 123189.
15. A. Eraghi Kazzaz and P. Fatehi, *Industrial Crops and Products*, 2020, **154**, 112732.
16. X. Han, R. Bi, V. Khatri, H. Oguzlu, M. Takada, J. Jiang, F. Jiang, J. Bao and J. N. Saddler, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2021**, *9* (3), 1406-1413.
17. M. C. N. Picot-Allain and M. N. Emmambux, *Food Reviews International*, 2021, **0**, 1–29.
18. C. L. Pirich, G. F. Picheth, A. M. Fontes, M. Delgado-Aguilar and L. P. Ramos, *Cellulose*, 2020, **27**, 5457–5475.
19. R. Terán Hilaes, M. P. Swerts, M. A. Ahmed, L. Ramos, S. S. da Silva and J. C. Santos, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2017, **56**, 3833–3838.
20. A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton and D. Crocker, *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, 2008, 1617 (1), 1-16.
21. X. Han, R. Bi, H. Oguzlu, M. Takada, J. Jiang, F. Jiang, J. Bao and J. N. Saddler, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2020, **8**, 14955–14963.
22. E. Scopel and C. A. Rezende, *Industrial Crops and Products*, 2021, **163**, 113336.
23. J. Hu, D. Tian, S. Renneckar and J. N. Saddler, *Sci Rep*, 2018, **8**, 3195.
24. H. Kargarzadeh, M. Mariano, D. Gopakumar, I. Ahmad, S. Thomas, A. Dufresne, J. Huang and N. Lin, *Cellulose*, 2018, **25**, 2151–2189.
25. L. O. Pinto, J. S. Bernardes and C. A. Rezende, *Carbohydr Polym*, 2019, **218**, 145–153.
26. W. Wang, M. D. Mozuch, R. C. Sabo, P. Kersten, J. Y. Zhu and Y. Jin, *Cellulose*, 2015, **22**, 351–361.
27. H. Tibolla, F. M. Pelissari, M. I. Rodrigues and F. C. Menegalli, *Industrial Crops and Products*, 2017, **95**, 664–674.
28. X. Liu, Y. Jiang, L. Wang, X. Song, C. Qin and S. Wang, *Industrial Crops and Products*, 2020, **146**, 112201.