

Artigo

Hidrólise Enzimática de Celulose para Obtenção de Glicose Utilizando Líquido Iônico como Meio Solvente

Andrade, T. C. C.;* Bitencourt, W. C.; Bomtempo, F. V. S.; Alves, F. S.;
Barbosa, R. S.; Guarda, E. A.

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 11 de fevereiro de 2019

<http://rvq.s bq.org.br>

Enzymatic Cellulose Hydrolysis for Glucose Obtainment Using Ionic Liquid as a Solvent Medium

Abstract: Cellulose is one of the main constituents of the wall of a plant cell, and its complete hydrolysis produces glucose. Cellulases are the enzymes responsible for the degradation of cellulose. The condition in which such reactions usually develop occurs in organic solvents and water. In the present work the ionic liquids, substances that are completely constituted by ions and are in the liquid state at room temperature. The enzymes Cellic CTec2 and HTec2 (Noozymes[®]) were used in the hydrolysis reactions of cellulose obtained from three types of biomass: sugarcane bagasse, elephantgrass and wood sawdust (red angelim). All the biomasses were submitted to a pretreatment so that the enzymes had greater accessibility to the cellulose. It was verified the existence of alterations caused by the presence of the ionic liquids in the hydrolysis reaction, being possible to affirm that the use of this methodology in the search of a more advantageous process to obtain glucose did not represent an increase in the glucose contents obtained after the hydrolysis. The most promising ionic liquid was the ([BMIM]⁺ [BF4]⁻) interacted with sugarcane, reaching a yield of 57.7 % for 72 hours of hydrolysis reaction.

Keywords: Lignocellulosic biomass; enzymatic hydrolysis; ionic liquids.

Resumo

A celulose é um dos principais constituintes da parede celular das plantas, sendo que sua hidrólise completa produz glicose. As celulases são as enzimas responsáveis pela degradação da celulose. A condição em que tal reação geralmente se desenvolve ocorre em solventes orgânicos e água. No presente trabalho foi utilizado como meio para a reação, os líquidos iônicos, substâncias que são completamente constituídas por íons e estão em estado líquido à temperatura ambiente. As enzimas Cellic CTec2 e HTec2 (Noozymes[®]) foram utilizadas nas reações de hidrólise da celulose obtida a partir de três tipos de biomassas: bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e serragem de madeira (angelim vermelho). Todas as biomassas foram submetidas a um pré-tratamento para que as enzimas tivessem maior acessibilidade à celulose. Verificou-se alterações causadas pela presença dos líquidos iônicos na reação de hidrólise, sendo possível afirmar que o uso desta metodologia na busca de um processo mais vantajoso para obter glicose não representou um aumento nos teores de glicose obtidos após a hidrólise. O líquido iônico mais promissor foi o ([BMIM]⁺ [BF4]⁻) na interação com a celulose obtida da cana-de-açúcar, atingindo um rendimento de 57,7 % durante 72 horas de reação.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica; hidrólise enzimática; líquidos iônicos.

* Universidade Federal do Tocantins, Departamento de Química, Campus de Palmas, CEP 77001-090, Palmas-TO, Brasil.

 coelho.ambiental@gmail.com

DOI:

Hidrólise Enzimática de Celulose para Obtenção de Glicose Utilizando Líquido Iônico como Meio Solvente

Thaysi C. C. Andrade,* Waldo C. Bitencourt, Fabrícia V. S. Bomtempo, Filipe S. Alves, Robson S. Barbosa, Emerson A. Guarda

Universidade Federal do Tocantins, Departamento de Química, Campus de Palmas, CEP 77001-090, Palmas-TO, Brasil.

* coelho.ambiental@gmail.com

Recebido em 15 de agosto de 2018. Aceito para publicação em 16 de janeiro de 2019

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

- 2.1. Preparação das amostras
- 2.2. Determinação do teor de lignina
- 2.3. Determinação do teor de celulose
- 2.4. Pré-tratamento químico
- 2.5. Síntese dos líquidos iônicos
- 2.6. Hidrólise enzimática
- 2.7. Quantificação da glicose
- 2.8. Análise estatística

3. Resultados e Discussões

- 3.1. Determinação do teor de celulose e lignina
- 3.2. Determinação de glicose e rendimento da hidrólise enzimática
- 3.3. Regressão polinomial

4. Conclusão

1. Introdução

Diante da tendência do esgotamento das fontes de combustíveis fósseis a busca por fontes energéticas renováveis foi impulsionada nas últimas décadas, surgindo assim dentre outros, os biocombustíveis líquidos de segunda geração. Por esta razão, diferentes tecnologias de pré-tratamento, sacarificação (ou hidrólise) e fermentação

vêm sendo estudadas em todo mundo para demonstrar a viabilidade comercial deste processo.¹ Neste sentido, a maior parte destes estudos está orientada ao aumento da acessibilidade química da celulose, buscando reduzir a quantidade de enzimas necessárias para a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis.²

Devido à natureza recalcitrante da biomassa, a hidrólise enzimática é muito

lenta e é difícil atingir elevados rendimentos em açúcar se a biomassa não for previamente pré-tratada. O pré-tratamento é provavelmente a etapa mais crucial, uma vez que tem forte impacto em todas as outras etapas do processo, por exemplo, na hidrólise enzimática e na fermentação, em termos de digestibilidade da celulose e toxicidade da fermentação.³

O pré-tratamento é considerado um dos processos mais importantes para a produção de biocombustíveis, com a função de aumentar a área de superfície da biomassa modificando as microfibras de celulose, ou seja, reduzindo sua cristalinidade, removendo hemicelulose e lignina, para torná-la digerível pelas enzimas. A modificação nas características estruturais da matriz lignocelulolítica pode ser realizada por vários tipos de pré-tratamento, os quais são classificados em físico, químico, físico-químico e biológico.⁴ Tendo em vista que o foco deste trabalho não é o pré tratamento, todas as biomassa passaram pelo mesmo tipo de pré-tratamento combinado.

Atualmente, vários processos industriais empregam enzimas em diferentes meios, inclusive na presença de solventes orgânicos. Uma das principais vantagens na utilização de enzimas como catalisadores é a seletividade observada nas reações. Isto ocorre, devido à preferência elevada por um determinado substrato, ou seja, à capacidade de reconhecer a estrutura de moléculas, além de permitir a execução de processos em condições mais suaves de reação com excelente controle e eficiência do processo. Os líquidos iônicos (LIs), por sua vez, são uma das classes de compostos mais promissores, considerados “solventes verdes”, mostrando-se excelentes substitutos para os solventes orgânicos. O diferencial está na possibilidade de moldagem de suas propriedades de acordo com as necessidades da reação, sendo os LIs imidazólios os mais importantes e utilizados na atualidade.⁵ A possível vantagem da utilização de enzimas em LI pode ser atribuída ao fato de que a combinação destes materiais favorece o aumento da atividade enzimática, quando

comparado aos solventes orgânicos convencionais, que inibem a atividade catalítica,⁶ tendo em vista que os LIs agem como um suporte eficiente da enzima nano-organizando o sistema.⁷

No presente trabalho foram avaliados os efeitos dos LIs ([BMIM⁺] [Br⁻]), ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]), e ([BMIM⁺] [BF₄⁻]) na reação de hidrólise enzimática de celulose obtida de três tipos de biomassa - bagaço de cana-de-açúcar, capim-elefante e serragem de Angelim vermelho - para obtenção de glicose. As biomassas foram submetidas à um pré-tratamento combinado, empregando-se uma etapa física e uma química (meio ácido e básico). O parâmetro utilizado para avaliar o efeito da presença dos LIs sobre a hidrólise enzimática foi o rendimento de glicose obtida.

2. Materiais e Métodos

As biomassas utilizadas neste trabalho foram: cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), e serragem de madeira (*Dinizia excelsa* Ducke). Foi realizado a determinação do teor de celulose e lignina das biomassas antes e após o pré-tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado representado por seis tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema de parcela subdividida, onde nas parcelas foram alocadas as biomassas e nas subparcelas o pré-tratamento e biomassas *in natura*.

2.1. Preparação das amostras

As biomassas foram desidratadas em estufa a 65 °C até peso constante visando a remoção da umidade, trituradas em moinho de facas com peneiras de 1mm de diâmetro e mantidas em dessecador até o momento das análises. Esse tipo de preparo foi realizado

em todas as biomassas, antes de se determinar o teor de celulose e lignina.

2.2. Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi estimado com base nos procedimentos realizados na literatura, com adaptações.⁸ As análises foram realizadas em triplicata para cada biomassa. Após pesadas 1 g das amostras, moídas e secas, foram colocadas em um tubo de ensaio e adicionados 17 mL de ácido sulfúrico 72 %. Após 15 min de agitação vigorosa, digeriu-se as amostras por 24 h. Posteriormente adicionou-se 306 mL de água destilada para diluir o ácido sulfúrico a 4 % e

transferiu-se o conteúdo para um balão que foi mantido sob aquecimento e refluxo por 4 h.

Após o refluxo as amostras foram filtradas a vácuo, sendo lavadas com água destilada, sob agitação constante, para evitar perda de biomassa. O sólido recolhido no funil foi enxaguado com água destilada até que se obtivesse pH próximo à neutralidade. Após o funil foi levado à estufa a 105 °C e seco até adquirir peso constante. Após secagem e estabilização a temperatura ambiente, pesou-se a massa total e finalmente o conjunto foi levado ao forno mufla a 550 °C a fim de obter o teor de cinzas, conforme observado nas Equações 1 e 2:

$$\text{Teor de Cinzas \%} = \left(\frac{\text{MFC}-\text{MF}}{\text{MA}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Teor de Lignina \%} = \left(\frac{\text{MFL}-\text{MF}}{\text{MA}} \times 100 \right) - \text{TC\%} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

MF: massa do funil limpo e seco;

MA: massa da amostra;

MFL: massa do funil + lignina (após secagem em estufa);

MFC: massa do funil + cinzas (após calcinação em mufla);

TC%: teor de cinzas.

2.3. Determinação do teor de celulose

As análises foram realizadas em triplicata para cada biomassa, de acordo com a literatura.^{9,10} Após pesadas 1 g de amostra, moídas e secas, a estas foi adicionado

reagente ácido (72,73 % de ácido acético glacial, 18,18 % de água destilada e 9,09 % de ácido nítrico concentrado) em um tubo de ensaio. A mistura foi levada a banho-maria por 30 min para digestão. Após, adicionou-se álcool etílico aos tubos, filtrou-se a vácuo e o sólido foi lavado com etanol quente, tolueno quente e, finalmente, com éter sulfúrico quente. Em seguida, o material (amostra e papel de filtro) foi transferido para um cadinho previamente calcinado. Esse sistema foi levado à estufa a 105 °C para secar durante 4 h. Depois de transcorrido o tempo, o conjunto (cadinho + celulose + minerais + papel de filtro) foi pesado e incinerado em forno mufla a 550 °C. Foi possível determinar o percentual de celulose aplicando-se a Equação 3:

$$\text{Celulose\%} = \frac{[(M_i - P - M_f)] \times 100}{m_A} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde,

Mi = massa do cadinho + papel + amostra;

P = massa do papel de filtro (papel quantitativo);

Mf = massa do cadinho+ cinzas;

mA = massa da amostra.

2.4. Pré-tratamento químico

Segundo a metodologia,¹¹ as biomassas foram pré-tratadas, em autoclave a 121 °C por 15 min, utilizando 100 g de biomassa (base seca) com 2 L de solução de hidróxido de sódio a 4 %, 1:20 (m/v). O material obtido foi levado a pH 2,0 por 30 min utilizando ácido fosfórico (p.a), e logo neutralizado com hidróxido de sódio. Filtrou-se e em seguida um volume proporcional de água destilada foi adicionado ao volume do material sólido lignocelulolítico e essa mistura foi novamente autoclavada a 121 °C por 15 min. A suspensão foi filtrada e o material sólido desidratado na estufa a 65 °C até massa constante, obtendo assim a biomassa seca pré-tratada.

Após o pré-tratamento químico determinou-se novamente o teor de celulose e lignina das biomassas, tornando-se possível constatar as modificações proporcionadas pelo pré-tratamento.

2.5. Síntese dos líquidos iônicos

A síntese dos líquidos iônicos seguiu metodologia previamente desenvolvida.¹²

Brometo de 1-n-butil-3-metil-imidazol ([BMIM⁺] [Br⁻]): A síntese do brometo de 1-n-butil-3-metil-imidazol ([BMIM⁺] [Br⁻]), foi realizada com a mistura de *n*-bromo-butano e 1-metil-imidazol adicionados na razão molar de 1,1:1 em um balão de fundo chato sob agitação por 48h em temperatura

ambiente. Após o tempo de reação foi obtido o LI.

Acetato de 1-n-butil-3-metil-imidazol ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]): O ([BMIM⁺] [Br⁻]) obtido em etapa anterior foi misturado com acetato de sódio na razão molar de 1:1 na presença de clorofórmio. A reação foi conduzida por 24 h a 40 °C sob agitação. Após o término da reação o acetato de 1-n-butil-3-metil-imidazol ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]) formado foi lavado com éter etílico por três vezes, sendo seco sob vácuo. O produto resultante é um líquido viscoso, amarelado.

Tetrafluorborato de 1-n-butil-3-metil-imidazol ([BMIM⁺] [BF₄⁻]): A síntese do ([BMIM⁺] [BF₄⁻]) foi realizada com a mistura de *n*-bromo-butano, 1-metil-imidazol e Tetrafluorborato de sódio (98 %) adicionados na razão molar de 1:1:1 na presença de clorofórmio em um balão de fundo chato sob agitação por 24 h a 40 °C. Após o tempo de reação foi obtido o LI. O solvente foi extraído sob vácuo, em seguida o LI foi lavado três vezes com éter etílico e posteriormente secado novamente sob vácuo para retirar solvente remanescente.

A obtenção dos Lis foi confirmada por espectrometria de infra vermelho com transformada de Fourie (FT-IR) em espectrômetro Agilent Cary 630 FTIR.

2.6. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com 0,1 g de amostra de cada biomassa, sendo avaliada separadamente na presença de cada um dos Lis em suspensão. Foi utilizado 6,0 mL de solução tampão citrato (pH 5,0) e 1,5 mL de LI, visando manter o pH entre 4,5 a 5,5, faixa de maior rendimento da enzima. As condições de reação foram de 72 h entre 50 a 55 °C e 150 rotações por minuto, empregando uma mistura de 12 µL da enzima celulase comercial (10 µL da Cellic CTec2 e 2 µL da Cellic HTec2), conforme orientação do

fabricante. Tais enzimas são classificadas como um complexo de celulasas agressivas (com alto percentual de β -glucosidase e hemicelulase) que visa obter açúcar fermentescível. A liberação de glicose durante o processo hidrolítico foi monitorada nos tempos de 12, 24, 48 e 72 h, retirando-se alíquotas da reação, que foram centrifugadas e filtradas em membrana de nylon de 0,2 μ m. As alíquotas foram avaliadas em seu teor de glicose por cromatografia líquida de alta eficiência. O monitoramento do processo hidrolítico também foi realizado para as biomassas sem a condição de pré-tratamento e sem a presença de LI.

2.7. Quantificação da glicose

A determinação de glicose foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se equipamento da marca Shimadzu (LC-10 Series Avp; desgaseificador: DGU-14A, integrador: CLASS LC-10), com eluição isocrática, pelo bombeamento (LC-10AD) de uma fase móvel composta de 5 mM de ácido sulfúrico em água ultrapura

$$RH (\%) = \frac{[Gli.]}{[Cel.]} 0,9 \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo:

RH (%): rendimento da hidrólise;

[Gli.]: concentração de glicose da biomassa (g L);

[Cel.]: concentração de celulose da biomassa (g L);

0,9: fator de conversão da celulose.

2.8. Análise estatística

Para os dados referente à fase de pré-tratamento e hidrólise enzimática realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott a 5 % de

(destilada e deionizada). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL min, a 35 °C (forno de coluna CTO-10A), com corrida de tempo total de 25 min, com detector de índice de refração (Shimadzu, modelo RID-10A). Uma alíquota de 20 μ l da amostra foi injetada manualmente (injetor Rheodyne - iL malha 20) em coluna de exclusão iônica da marca Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (300 x 7,8 mm) com conexão direta a um cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchida com material semelhante ao da coluna principal.

Foi determinado o teor de glicose, já que este é o carboidrato fermentescível majoritariamente oriundo da celulose.

Considerando o total de celulose na amostra e sua massa inicial, foi possível calcular o rendimento das reações de hidrólise. Para isso, tomaram-se os valores máximos obtidos da concentração de glicose e o fator de conversão de glicose em celulose.^{13,14,15}

Os cálculos do rendimento da hidrólise foram realizados pela seguinte equação:

significância. Para os tempos foram realizadas análises de regressão através do uso de polinômios ortogonais e uma vez estabelecida a relação funcional entre os tempos e o rendimento foi determinada equação de regressão. As análises estatísticas foram realizadas pelo software Sisvar 5.6 e as curvas de regressão pelo software Origin 2017.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado representado por seis tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema de parcela subdividida, onde nas parcelas foram alocadas as três biomassas (cana-de-açúcar, capim-elefante e serragem), na subparcela as cinco reações de hidrólise (com

biomassa *in natura* sem LI, com biomassa pré-tratada sem LI, e com biomassa pré-tratada na presença dos LIs ([BMIM⁺] [Br⁻]), ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]), e ([BMIM⁺] [BF₄⁻]) respectivamente), e na subsubparcela os tempos de reação (12, 24, 48 e 72 h).

3. Resultados e Discussões

3.1. Determinação do teor de celulose e lignina

Os resultados experimentais da composição química das biomassas lignocelulósicas indicaram a necessidade de desdobramento dos fatores (Tabela 1), sendo atendida a distribuição da curva normal.

Os coeficientes de variação para as parcelas (CV 4.9) e subparcelas (CV 5.2) para celulose foram baixos, assim como para as parcelas e subparcelas da lignina (CV 7.4) e (CV 10), indicando boa precisão do experimento.

Quando avaliado o teor de celulose, o comparativo entre as biomassas *in natura* pré-tratadas revelou que houveram respostas diferentes de cada biomassa ao mesmo pré-tratamento. O capim-elefante e a serragem *in natura* não apresentam diferença significativa no teste Scott Knott a um nível de 5 %, porém mostraram teor de celulose superiores à cana-de-açúcar. Além disso, após o teste, as três biomassas não apresentaram diferença significativa entre si depois de pré-tratadas. A Tabela 2 apresenta os valores das médias de teor de celulose das biomassas *in natura* e pré-tratadas.

Tabela 1. Resumo da análise de variância das biomassas e pré-tratamento quanto ao teor de celulose e lignina

FV	GL	QM de celulose	QM de lignina
Biomassas	2	58.58364*	214.83783*
Resíduo a	9	8.74675	1.22227
Pré-tratamento	1	84.90082*	404.42460*
Interação BM x PT	2	189.70290*	10.54449*
Resíduo b	9	10.01506	2.20701\
Total	23		

FV – Fontes de variação; GL – Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; *Significativo a 5 % de significância pelo teste F

Tabela 2. Médias do teor de celulose das biomassas *in natura* e pré-tratadas

Biomassa	<i>In natura</i> (%)	Pré-tratada (%)
Cana-de-açúcar	53.7675bB	60.3400aA
Capim-elefante	63.5775aA	58.4900aB
Serragem	68.6050aA	55.8350aB

Média seguida de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, são estatisticamente iguais a 5 % de significância pelo teste Scott Knott

Para a cana-de-açúcar a disponibilidade da celulose foi 12,2 % maior após o pré-tratamento devido ao rompimento das fibras de lignina e hemicelulose na parte interna da biomassa e a dissolução desta no ácido do pré-tratamento. Este fato que não se repete para o capim elefante e serragem em que ocorreu redução na disponibilidade de celulose da ordem de 8 % e 18,6 % respectivamente. Isto pode ser atribuído a presença dos ácidos no pré-tratamento químico, que dependendo da concentração podem causar degradação da celulose, já que a utilização de ácidos também é utilizada como uma rota para realização de hidrólise direta.¹⁶ Apesar disso sabe-se que a concentração adequada de ácido utilizada no processo auxilia na retirada da hemicelulose e deslignificação das biomassas.¹ Todavia, a hidrólise ácida da hemicelulose é similar à da celulose, podendo-se também afirmar que para o capim elefante e serragem, o pré-tratamento aplicado não seja o mais

adequado para retirada de hemicelulose, tendo em vista que provocou também a perda de celulose.¹⁶

Embora estatisticamente o teor de celulose das biomassas foram alterados, com o pré-tratamento, diversos autores afirmam que a degradação da celulose só começa a se tornar importante em temperaturas em torno de 220 °C.¹⁶⁻¹⁸

Os valores obtidos para o percentual do teor de celulose das biomassas *in natura* se mostraram similares à faixa reportada em outros trabalhos, como o bagaço de cana-de-açúcar, em torno de 32 a 45 %^{9,19-21} e serragem de madeira, em torno de 37 a 62 %.^{22,23} Para o capim elefante o valor obtido ficou superior à faixa reportada em outros trabalhos onde os valores variam entre 30 a 40,7 %.^{24,25}

A Tabela 3 apresenta os valores das médias de teor de lignina das biomassas *in natura* e pré-tratadas.

Tabela 3. Médias do teor de lignina das biomassas *in natura* e pré-tratadas

Biomassa	<i>In natura</i> (%)	Pré-tratada (%)
Cana-de-açúcar	22.7850aA	12.1800bB
Capim-elefante	12.8725bA	4.8750cB
Serragem	21.1900aA	15.1625aB

Média seguida de pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, são estatisticamente iguais a 5 % de significância pelo teste Scott Knott

De acordo com o teste de média, *in natura*, o capim – elefante foi diferente estatisticamente a um nível de 5 % de significância da cana e da serragem apresentando o menor teor de lignina que os demais. Após o pré tratamento todas as biomassas foram diferentes estaticamente, sendo observado que em ambas houve uma redução no teor de lignina após o pré tratamento. Analisando-se cada biomassa separadamente, o capim elefante antes e

após o pré-tratamento é a biomassa que apresentou menor teor de lignina.

O percentual de lignina observado nas biomassas sem pré-tratamento se mostrou similar aos observados na literatura para todas as biomassas avaliadas, 19 a 24 % para o bagaço de cana-de-açúcar,¹⁹ 8,26 a 10,9 % para o capim elefante,²⁵ e 26,4 a 31,77 % para a serragem.^{23,26} A Tabela 4 apresenta os valores do teor de celulose e lignina para as biomassas *in natura* e pré-tratadas.

Tabela 4. Quantificação do teor de celulose e lignina para as biomassas *in natura* e pré-tratadas

Biomassa	Celulose		Lignina	
	<i>In natura</i>	Pré-tratada	<i>In natura</i>	Pré-tratada
Cana-de-açúcar	53,772 ± 1,58	60,342 ± 4,27	22,789 ± 2,15	12,184 ± 1,09
Capim-elefante	63,581 ± 1,39	58,493 ± 1,78	12,874 ± 1,05	4,879 ± 0,35
Serragem	68,616 ± 4,95	55,839 ± 2,42	21,198 ± 1,36	15,169 ± 1,17

Parte da fração de hemicelulose foi removida no pré-tratamento alcalino, uma vez que os pré-tratamentos alcalinos são geralmente mais eficazes na solubilização de uma maior fração da lignina, deixando parte da hemicelulose insolúvel, sendo esse um dado importante, caso o passo seguinte após o pré-tratamento seja a hidrólise enzimática, uma vez que favorece a reatividade da celulose, que pode ser significativamente aumentada.²⁷

Dessa forma pode-se inferir que o pré-tratamento combinado (ácido e básico) foi favorável para a redução no teor de lignina podendo ser aplicado às três biomassas, o que representa uma vantagem, tendo em vista que a lignina se constitui como uma “barreira” que impede a eficiência da hidrólise enzimática. A redução no teor de lignina das biomassas foi da ordem de 46,53 % para a cana-de-açúcar, 28,45 % para a serragem e 62,16 % para o capim-elefante.

3.2. Determinação de glicose e rendimento da hidrólise enzimática

Foi determinada interação significativa para os diferentes tipos de biomassa, diferentes reações de hidrólise e o tempo de reação, indicando que os efeitos isolados dos fatores não explicam toda a variação encontrada no rendimento da hidrólise enzimática, sendo realizado os desdobramentos e atendida a distribuição da curva normal (Tabela 5).

Na Tabela 6 é apresentado a média do rendimento de glicose para as diferentes reações de hidrólise realizadas. Avaliando-se cada biomassa separadamente e os mesmos tempos dentro das diferentes reações de hidrólise, observa-se que para a cana-de-açúcar o tempo de 12 h apresenta melhor desempenho quando pré-tratada sem a presença de LI. Na presença de LI, o melhor resultado foi a interação com o ([BMIM⁺] [BF₄⁻]), sendo que da interação com os outros dois LI e sem pré tratamento os resultados são igualmente inferiores. Para o tempo de 24 h de reação o melhor resultado permaneceu sendo para a hidrólise com biomassa pré-tratada, seguida da interação com o ([BMIM⁺] [BF₄⁻]). O resultado da interação com o ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]) é considerado igual quando a biomassa é sem pré-tratamento, ficando a interação com o ([BMIM⁺] [Br⁻]) com o pior desempenho. O desempenho para o tempo de 48 e 72 h acompanha os anteriores quanto à biomassa pré-tratada sem a presença de LI e quando interagindo com o ([BMIM⁺] [BF₄⁻]).

Para o capim elefante quando o tempo de reação é de 12 e 24 h os rendimentos de hidrólise são considerados iguais para a biomassa *in natura* e pré-tratada, sendo que para as outras três interações com LI os resultados foram considerados inferiores. Quando avaliado os tempos de 48 e 72 h de reação a biomassa pré-tratada sem a presença de LI obtêm o melhor desempenho, seguida pela biomassa *in natura*. Os resultados com os Lis foram igualmente inferiores.

Tabela 5. Resumo da análise de variância relacionando as biomassas, as diferentes reações de hidrólise e o tempo de reação

FV	GL	QM
Biomassas	2	4567,339937*
Reações de hidrólise enzimática	4	6117,562706*
Tempo	3	1083,564343*
Biomassas x Reações de hidrólise enzimática	8	1606,889237*
Biomassas x Tempo	6	45,799037 ^{ns}
Reações de hidrólise enzimática x Tempo	12	248,902680*
Biomassas x Reações de hidrólise enzimática x Tempo	24	57,074412*
Erro 1	6	12,253779
Erro 2	24	7,325913
Erro 3	90	15,111410
CV 1 (%)	14,41	
CV 2 (%)	11,14	
CV 3 (%)	16,00	
Média geral	24,2982778	

FV: Fontes de variação; GL: Grau de liberdade; QM: Quadrado médio; * e ns: Significativo e não significativo respectivamente pelo teste F a 5 % de significância

Na serragem o melhor rendimento para 12 h de reação é encontrado na interação com ([BMIM⁺] [BF₄⁻]). Quando o tempo de reação é de 24 h todas as interações são consideradas estatisticamente iguais. Com 48 h de reação a biomassa pré-tratada apresentou o melhor desempenho, o que se repete para 72 h de reação, ficando as outras quatro interações igualmente inferiores.

Quando se avaliam as três biomassas em conjunto para o mesmo tempo e mesma reação de hidrólise, a cana-de-açúcar

apresenta melhor desempenho, excetuando-se na interação com o ([BMIM⁺] [Br⁻]) em que a serragem obteve melhor resultado, fato que se repete na interação com ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]) em que a serragem se iguala a cana-de-açúcar. O melhor desempenho do capim-elefante foi observado para biomassa *in natura*, com exceção do tempo de 48 h de reação.

Tabela 6. Médias de rendimento de glicose (%) para os tempos de 12 a 72 h de hidrólise enzimática e as diferentes combinações de reação de hidrólise e biomassas

QUADRO DE MÉDIAS																				
	Sem pré-tratamento				Com pré-tratamento				Biomassa x BMIN Br				Biomassa x BMIN Ac				Biomassa x BMIN BF4			
	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h	12h	24h	48h	72h
Cana-de-açúcar	19,3 aC	21,3 aC	31,3 aC	33,9 aC	56,6 aA	56,9 aA	70,5 aA	72,5 aA	13,6 aC	2,46 bD	3,6 bE	3,1 bE	19,6 aC	14,5 aC	15,1 aD	19 aD	49,3 aB	47,6 aB	56,1 aB	57,7 aB
Capim-elefante	16,1 aA	19,3 aA	24,5 bB	32,2 aB	15,0 cA	19,0 cA	42,3 bA	55,0 bA	6,4 bB	3,2 bB	2,7 bC	7,5 bC	9,0 aB	6,5 bB	6,0 bC	10,6 bC	7,3 cB	7,9 cB	10,1 cC	13,8 cC
Serragem	15,2 aB	21,3 aA	18,7 bB	25,7 bB	23,6 bB	27,3 bA	34,8 cA	51,3 cA	17,6 aB	15,5 aA	21,4 aB	27,9 aB	14,6 aB	20,9 aA	20,9 aB	24,7 aB	33,1 bA	18,6 bA	22,9 bB	25,3 bB

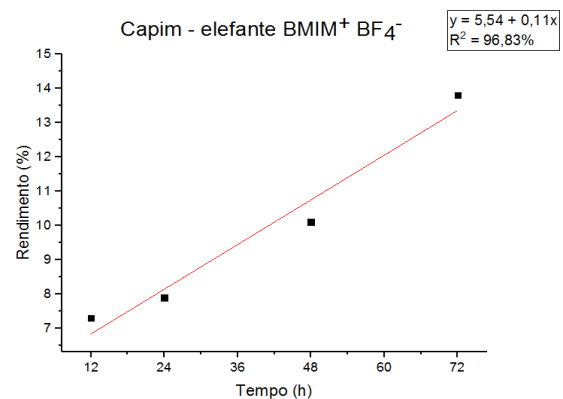
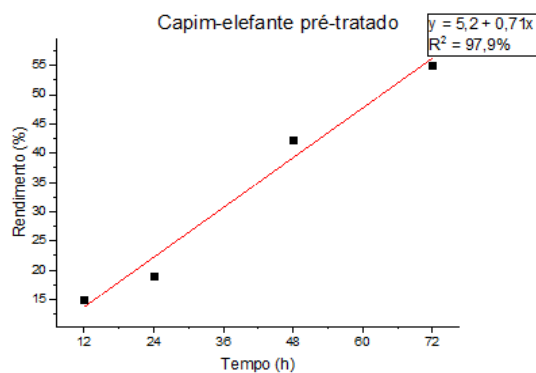
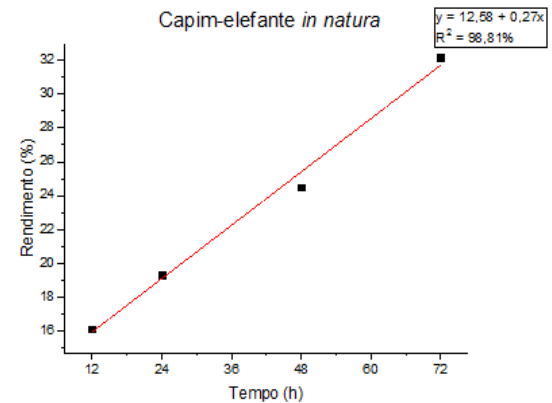
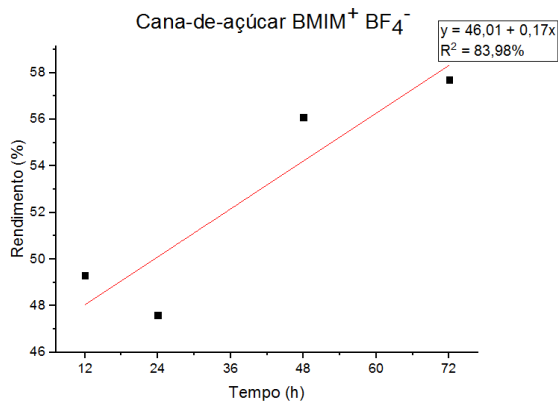
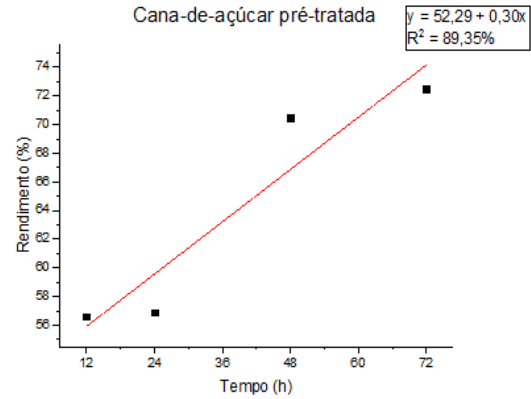
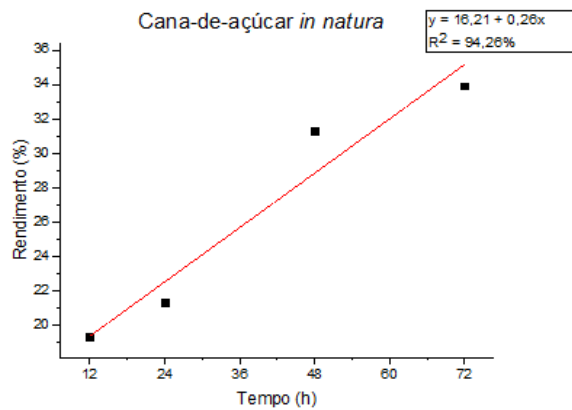
*Médias das diferentes combinações de reações de hidrólise enzimática dentro do mesmo tempo e da mesma biomassa seguidos pela mesma letra maiúscula na linha, pertencem ao mesmo grupo estatístico a 5 % de significância pelo teste de Scott Knott; **Médias das diferentes biomassas dentro do mesmo tempo e da mesma reação de hidrólise enzimática seguidos pela mesma letra minúscula na coluna, pertencem ao mesmo grupo estatístico a 5% de significância pelo teste de Scott Knott

3.3. Regressão polinomial

Para os modelos lineares o rendimento de glicose apresentou incremento linear em função do tempo de reação (Figura 1). Conforme o fabricante das enzimas, o tempo ótimo de reação é de 72 h, sendo que transcorrido esse tempo a tendência é de

saturação do meio, e a produção de glicose tende a diminuir.

Seguindo um modelo quadrático de resposta observou-se que para tais combinações com o tempo de 72 h de reação o rendimento de glicose tende a estabilizar (Figura 2).



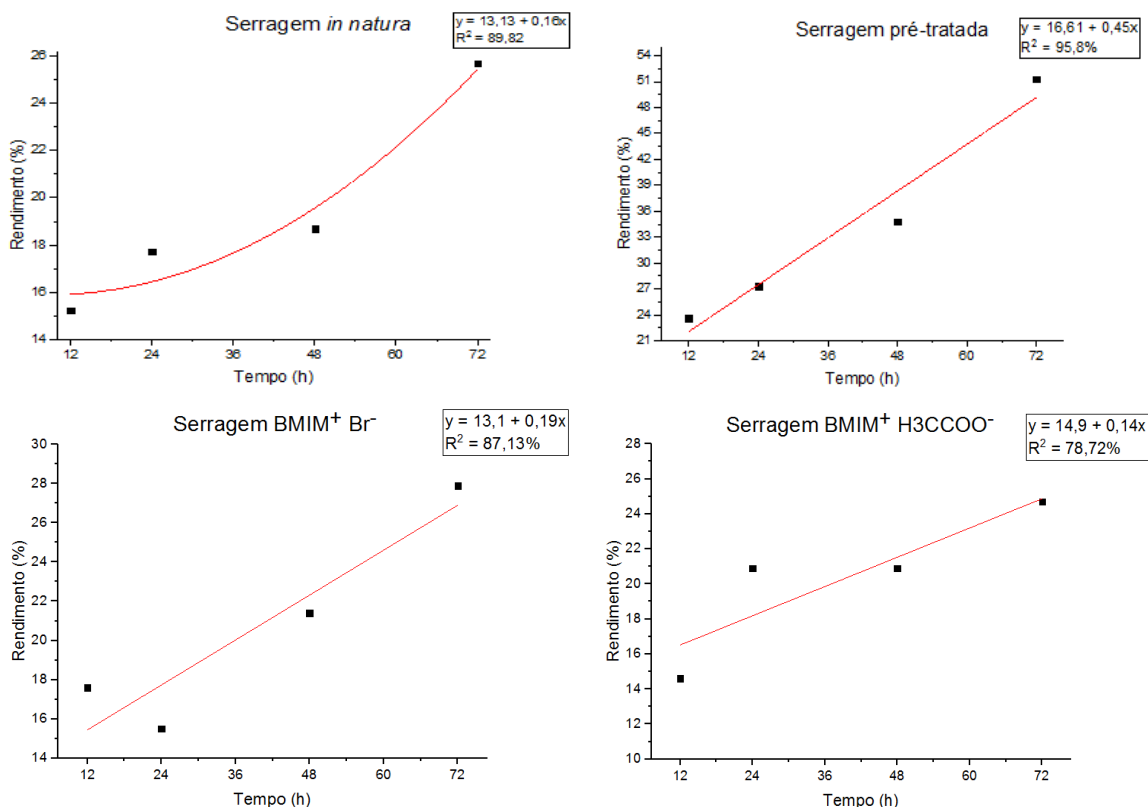


Figura 1. Rendimento médio de glicose em função das biomassas, reações de hidrólise e tempo com modelo linear de resposta. Significativo a 5 % pelo teste F

Observa-se, nestes casos, que o tempo de reação de 12 h parece ser mais viável do que manter o processo hidrolítico por 72 h, uma vez que não ocorre grande incremento no rendimento da hidrólise. Para a cana-de-açúcar e capim-elefante o comportamento do decaimento é parecido quando se utiliza os LI ([BMIM⁺] [Br⁻]) e ([BMIM⁺] [H₃CCOO⁻]). Para a serragem o decaimento ocorre com a interação do LI ([BMIM⁺] [BF₄⁻]).

O fato da concentração de glicose ser alta em 12 h de reação, decair com 24 e 48 h e voltar a crescer próximo a 72 h como pode ser observado em alguns gráficos provavelmente está relacionado com a inibição da enzima, que acontece naturalmente quando o meio reacional já está com uma determinada concentração de glicose (glicose essa produzida pela própria enzima na hidrólise da celulose). Fato relevante a se destacar é que a enzima sofre inibição pela alta concentração dos produtos produzidos por ela mesma, ou seja, quando a

concentração de glicose no meio reacional começa a se elevar, a β -glucosidase começa a inativar.²⁸

Algumas pesquisas apontam que com concentrações menores de LI os resultados referente à quantificação de glicose podem apresentar melhoras, ou seja, quanto menor a quantidade de LI melhor será o rendimento,²⁹ podendo-se atribuir o fato da quantificação menor de glicose em reações com a presença dos LI e sua atuação na desnaturação das enzimas.

Embora diversas publicações apontem para o fato de que o uso de enzimas em LI favorece o aumento da atividade enzimática quando comparado aos solventes orgânicos convencionais (que inibem a atividade catalítica),⁵ o observado no presente trabalho foi que a ação dos LI não promoveram a melhora da ação catalítica da enzima, fato que se repete em outras pesquisas, que apontam que a atividade enzimática diminuiu com concentrações crescentes de LI.²⁸

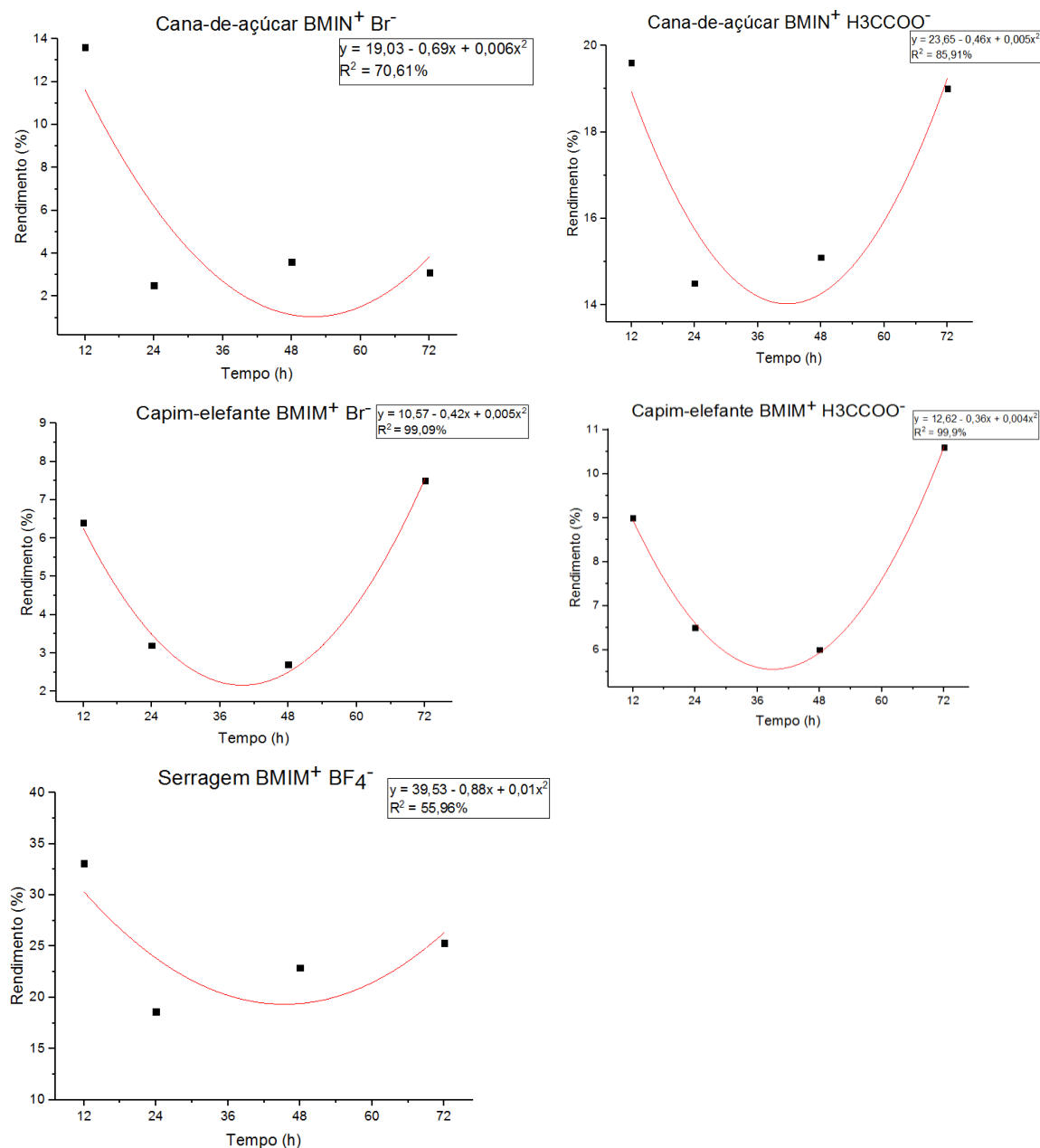


Figura 2. Rendimento médio de glicose em função das biomassas, reações de hidrólise e tempo com modelo quadrático de resposta. Significativo a 5 % pelo teste F

Observa-se ainda a necessidade de se estudar mais profundamente as interações entre as enzimas e os LIs e quais condições podem facilitar o processo catalítico e o rendimento na hidrólise enzimática, como relação de volume de LI a ser aplicado na reação.

Mesmo tendo acesso a todas essas informações é difícil afirmar com precisão o comportamento das enzimas em LI, pois são materiais que começaram a ser estudados mais a fundo a pouco tempo (últimas duas décadas). A presença de íons em solução tem efeito direto na estabilidade da enzima, podendo ser benéfico ou prejudicial à sua estabilidade catalítica, dessa forma com os

dados fornecidos por esse experimento é possível concluir que os LI empregados não facilitaram o acesso da enzima à celulose, ou seja, sua composição contendo um cátion volumoso (imidazol) não foi capaz de acessar os interstícios da biomassa por serem grandes.

Por todos estes motivos, a combinação de Lis e enzimas permite que se possa vislumbrar um futuro energético mais limpo e sem todos os problemas comumente associados nas diferentes formas de catálise, principalmente a ácida e a básica. Sem dúvida, a utilização dos LI para processos enzimáticos é extremamente promissora, apesar de ainda existirem muitos impedimentos tecnológicos associados a tais processos.⁵

4. Conclusão

O melhor desempenho para o rendimento da hidrólise foi o da cana-de-açúcar pré tratada, sem interação com os Lis (72,5 %). O LI mais promissor foi o ([BMIM]⁺ [BF₄]⁻) na interação com a cana-de-açúcar e 72 h de reação com rendimento de 57,7 %.

De modo geral, pode-se concluir que sob as condições apresentadas no presente estudo, o uso de tais Lis não aumentou o rendimento da hidrólise enzimática. A características dos ânions presentes nos Lis, e suas interações com as enzimas, diminuíram a capacidade de catálise. Apesar disto os Lis, pelas suas características de baixa toxicidade, são um meio promissor para novos testes catalíticos nas reações de hidrólise de celulose. Isto fica evidenciado quando analisamos a atuação dos Lis em baixos tempos de reação.

Referências Bibliográficas

¹ Magro, F. G.; Decesaro, A.; Berticelli, R.; Colla, M. L. Bioethanol Production Using Microalgae: A review. *Semina: Ciências*

Exatas e Tecnológicas **2016**, 37, 159. [CrossRef]

² Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapfle, M.; Ladish, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **2005**, 96, 673. [CrossRef]

³ Santos, F. A.; Queiroz, J. H.; Colodette, J. L.; Manfredi, M.; Queiroz, M. E. L. R.; Caldas, C. S.; Soares, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Química Nova* **2014**, 96, 673. [CrossRef]

⁴ Santiago, B. L. S.; Rodrigues, F. A. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: Uma revisão. *The Journal of Engineering and Exact Sciences* **2017**, 3, 1011. [CrossRef]

⁵ Medeiros, G. A.; Gonçalves, S. B.; Rodrigues, D. S.; Neto, B. A. D. Enzimas e líquidos iônicos: Uma combinação promissora para um biodiesel limpo. *Revista Virtual de Química* **2013**, 5, 74. [CrossRef]

⁶ Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Biocatalysis in ionic liquid. *Chemical Reviews* **2007**, 107, 2757. [Link]

⁷ Lai, J.; Hu, Z.; Wang, P.; Yang, Z. Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm][PF₆]. *Fuel* **2012**, 95, 329. [CrossRef]

⁸ Moraes, J. P. S.; Rosa, M. de F.; Marconcini, J. M.; *Procedimentos para análise Lignocelulósica*, Centro Nacional de Pesquisa do Algodão: Campina Grande, 2010.

⁹ Rodrigues, R. C.; *Métodos de análise bromatológica de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos*, Embrapa: Pelotas, 2010.

¹⁰ Pinto, B.; Calloni, G.; Silva, S. A.; *Revista Liberato* **2013**, 14, 1. [Link]

¹¹ Menezes, T. J. B.; Hennies, P. T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. *Coletânea Ital* **1991**, 21, 213.

- ¹² Souza, D. A.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Federal do Tocantins, Brasil, 2014. [[Link](#)]
- ¹³ Lu, J.; Li, X.; Zhao, J.; Qu, Y. Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid HotWater. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2013**, 144, 539. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Oliveira, F. M. V.; *Dissertação de mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010. [[Link](#)]
- ¹⁵ Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química. Nova* **2010**, 33, 1549. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Boonstra, M. J.; Tjeerdsma, B. Chemical analysis of heat treated softwoods. *European Journal of Wood and Wood Products*. **2006**, 64, 204. [[Link](#)]
- ¹⁷ Li, J.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. Carbohydrate reactions during hightemperature steam treatment of aspen wood. *Applied Biochemistry Biotechnology* **2005**, 125, 175. [[Link](#)]
- ¹⁸ Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane baggase. *Bioresource Technology* **2000**, 74, 69. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Alkasrawi, M.; Eriksson, T.; Börjesson, J.; Wingren, A.; Galbe, M.; Tjernedld, F.; Zacchi, G. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, 33, 71. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Gonçalves, A. R.; Moriya, R. Y.; Oliveira, L. R.; Saad, M. B. Xylanase recycling for the economical biobleaching of sugarcane bagasse and straw pulps. *Enzyme and Microbial Technology* **2008**, 43, 157. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Barbosa, L. C.; Pedrazzi, C. P.; Ferreira, E. S.; Schneid, G. N.; Wille, V, K. D. Avaliação dos resíduos de uma serraria para a produção de celulose kraft. *Ciência Florestal* **2014**, 24, 491. [[CrossRef](#)]
- ²² Mainieri, C.; Chimelo, J. P.; *Divisão de Madeiras: Fichas de características das madeiras brasileiras*, Instituto de Pesquisas Tecnológicas: São Paulo, 1990.
- ²³ Leite, R.M.B; Filho, J. L. Q.; Silva, D. S. Produção e valor nutritivo do capim-elefante cultivar Cameroon em diferentes idades. *Agropecuária Técnica* **2000**, 21, 1. [[Link](#)]
- ²⁴ Santos, E. A.; Silva, D. S.; Filho, J. L. Q. Composição Química do Capim-Elefante cv. Roxo cortado em diferentes alturas. *Revista Brasileira de Zootecnia* **2001**, 30, 18. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Castro, J. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2012. [[Link](#)]
- ²⁶ Hamelinck, C.N.; Van Hooijdonk, G.; Faaij, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and Bioenergy* **2005**, 28, 384. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Bubner, P.; Plank, H.; Nidetzky, B. Visualizing cellulose activity. *Biotechnology and Bioengineering* **2013**, 110, 1529. [[Link](#)]
- ²⁸ Medeiros, G., A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasil, 2014. [[Link](#)]