

# 12º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



## **TÍTULO DO TRABALHO:**

**FRACIONAMENTO DE FIBRA DE COCO VERDE EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS E LIGNINA PEGUILADA**

## **AUTORES:**

Cleitiane da Costa Nogueira, Mariza Gabryella Brito dos Santos, José Dário Silva Fidelis, Lucas Felipe Simões Silva, Jadna Lúcia de Freitas Silva, Gleyson Batista de Oliveira, José Demétrio Nery Cavalcante, Jackson Araújo de Oliveira, Domingos Fabiano de Santana Souza, Carlos Eduardo de Araújo Padilha

## **INSTITUIÇÃO:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

**FRACIONAMENTO DE FIBRA DE COCO VERDE EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS E LIGNINA PEGUILADA****Resumo**

Entraves na tecnologia de etanol de segunda geração (E2G) limitam sua competitividade frente ao etanol de primeira geração. Pré-tratamentos sobre a biomassa devem ser efetivos para desestruturar a lignocelulose e garantir o acesso das enzimas aos polissacarídeos. No mesmo sentido, há uma corrente da literatura que sugere melhor aproveitamento da biomassa no sentido de gerar mais produtos da cadeia de produção, principalmente a partir da lignina. Essa necessidade surge do subaproveitamento desse polímero aromático e dos seus potenciais usos como precursor de materiais funcionais. Neste cenário, o presente estudo investigou o desempenho do pré-tratamento organosolv ácido baseado em polietilenoglicol (PEG) como rota para obter biomassa pré-tratada enriquecida de celulose e produtos à base de lignina. A fibra de coco verde (GCF) foi selecionada como matéria-prima e o pré-tratamento organosolv consistiu em dois passos: (1) incubação em PEG 400 acidificado por 1% (m/m) ácido sulfúrico sob 121 °C por 2 h; e (2) adição de 0.4 M hidróxido de sódio para recuperar lignina. As frações sólida (GCF pré-tratada) e líquida foram processadas e caracterizadas. A GCF pré-tratada também foi levada para hidrólise enzimática e seus resultados foram comparados com outras biomassas. A GCF pré-tratada apresentou redução do conteúdo de lignina de 32.2% para 29.7% e redução de conteúdo de hemicelulose de 23.5% para 15.3%, enquanto que a celulose aumentou quase duas vezes (de 27.4% para 47.4%). Em conformidade com perda de componentes amorfos, o índice de cristalinidade da GCF aumentou de 31.2% para 47.4%. A GCF pré-tratada organosolv apresentou maior digestibilidade enzimática do que GCF não-tratada, pré-tratada ácida (sem PEG) e pré-tratada ácida com adição de PEG durante a hidrólise. Sob carga de sólidos de 20% (m/v), a liberação de glicose alcançou 26.61 g/L, o que corresponde a produção de 13 mg/g e conversão celulósica de 26.35%. Após precipitação ácida, a lignina foi obtida da fração líquida, proporcionando recuperação de 33.5% da lignina inicial. A lignina organosolv apresentou textura e hidrofobicidade incomum comparado a lignina alcalina e a análise termogravimétrica confirmou o enxerto de PEG na estrutura do polímero. Baseado nesses resultados, o pré-tratamento organosolv com PEG se mostrou atrativo para desenvolver uma biorrefinaria com a GCF.

Palavras-chave: pré-tratamento, hidrólise enzimática, aditivo.

**Abstract**

Obstacles in second-generation ethanol technology limit its competitiveness compared to first-generation ethanol. Pretreatments on biomass must be effective to breakdown lignocellulose and guarantee access for enzymes to polysaccharides. In the same sense, there is a stream of literature that suggests better use of biomass in order to generate more products in the production chain, mainly from lignin. This need arises from the underutilization of this aromatic polymer and its potential uses as a precursor to functional materials. In this scenario, the present study investigated the performance of polyethylene glycol-based organosolv pretreatment as a route to obtain pretreated biomass enriched in cellulose and lignin-based products. Green coconut fiber (GCF) was selected as raw material and organosolv pretreatment consisted of two steps: (1) incubation in PEG 400 acidified by 1% (w/w) sulfuric acid under 121 °C for 2 h; and (2) addition of 0.4 M sodium hydroxide to recover lignin. The solid (pretreated GCF) and liquid fractions were processed and characterized. The pretreated GCF was also taken for enzymatic hydrolysis and its results were compared with other biomasses. Pretreated GCF

showed a reduction in lignin content from 32.2% to 29.7% and a reduction in hemicellulose content from 23.5% to 15.3%, while cellulose increased almost twice (from 27.4% to 47.4%). In line with loss of amorphous components, the crystallinity index of GCF increased from 31.2% to 47.4%. Organosolv pretreated GCF showed higher enzymatic digestibility than untreated GCF, acid pretreated (without PEG) and acid pretreated with addition of PEG during hydrolysis. Using 20% solids (w/v), glucose release reached 26.61 g/L, which corresponds to a production of 13 mg/g and cellulose conversion of 26.35%. After acid precipitation, lignin was obtained from the liquid fraction, providing recovery of 33.5% of the initial lignin. Organosolv lignin showed unusual texture and hydrophilicity compared to alkaline lignin and thermogravimetric analysis confirmed the grafting of PEG into the polymer structure. Based on these results, organosolv pretreatment with PEG proved to be attractive for developing a biorefinery with GCF.

Keywords: pretreatment, enzymatic hydrolysis, additives.

## **Introdução**

Etanol celulósico ou etanol de segunda geração é produzida a partir resíduos agroindustriais, principalmente resíduos lignocelulósicos. O uso desse recurso permite evitar a competição com a produção de alimentos e pode auxiliar na segurança energética em tempos com elevada penalidade por emissões de carbono. Neste contexto, a região Nordeste do Brasil dispõe de alguns potenciais resíduos lignocelulósicos com potencial para etanol celulósico, como é o caso da fibra de coco verde. A fibra de coco verde é um material com abundância em regiões litorâneas, uma vez que os produtos à base de coco são apreciados pela comunidade e a casca de coco verde compreende a 80% da massa do fruto. De acordo com o site NationMaster, a geração anual de resíduos de coco está estimada em 50 megatoneladas (NationMaster, 2019). Ainda assim, a conversão da fibra de coco verde em etanol requer a aplicação de pré-tratamentos para melhorar a liberação de açúcares. Pré-tratamentos químicos consistem na incubação do resíduo lignocelulósico com catalisador e/ou solventes orgânicos e eles são amplamente usados para solubilizar componentes da lignocelulose e melhorar a acessibilidade da celulose, o que é fundamental para romper a natureza recalcitrante da fibra de coco verde. Dentre as variedades de pré-tratamentos químicos, o pré-tratamento organosolv se destaca por sua versatilidade e possibilidade de geração de mais correntes de valor agregado.

Estudos sobre etanol celulósico têm mostrado o aproveitamento das correntes do processo, inclusive, um movimento de conversão da lignina em produtos de valor agregado. O desenvolvimento de surfactantes à base de lignina a partir de correntes da cadeia de etanol celulósico têm surgido na literatura, incluindo lignosulfonatos e ligninas modificadas com polietilenoglicol (PEG). Os lignosulfonatos são surfactantes aniônicos historicamente usados como dispersantes em indústrias químicas e eles já apresentaram êxito na hidrólise enzimática de lignoceluloses (Padilha et al., 2021). Recentemente, o interesse em usar a lignina como precursor de materiais termoplásticos também tem se intensificado. Em Nge et al. (2018) e Yamada et al. (2024), os autores obtiveram ligninas com propriedades termoplásticas a partir de cedro japonês via pré-tratamento organosolv ácido seguido de adição de base forte. A técnica foi desenvolvida com enfoque na lignina solubilizada na fração líquida e nas propriedades adquiridas pelo enxerto do solvente orgânico na lignina. Contudo, não foi explorado o potencial da biomassa pré-tratada (a fração sólida do pré-tratamento) para produção de etanol celulósico. Essa técnica também não foi aplicada para outras biomassas, sobretudo melhores fontes de lignina como é o caso da GCF.

Neste contexto, o presente trabalho investigou o pré-tratamento organosolv como rota para fracionamento da fibra de coco verde para enriquecimento de celulose e para obtenção de lignina. O pré-tratamento consistiu de uma etapa acidificada seguido por uma incubação com hidróxido de sódio usando polietilenoglicol 400 como solvente orgânico. Testes de hidrólise enzimática foram realizados sob diferentes cargas de sólidos e dosagens enzimáticas e comparações foram realizadas com outros tipos de pré-tratamento. A lignina isolada do pré-tratamento organosolv de GCF foi comparada com a lignina alcalina da mesma biomassa.

### Metodologia

#### *Reagentes químicos*

Ácido cítrico, citrato de sódio, D-glucose, etanol, azide de sódio, hidróxido de sódio, polietilenoglicol 400 (PEG 400), ácido sulfúrico foram adquiridos pela Synth (São Paulo, Brazil). Ácido 3,5-dinitrossalicílico, acetonitrila, kit enzimático glucose oxidase-peroxidase (GOD-POD) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (MO, USA) Todos os reagentes usados no presente trabalho apresentaram grau analítico (pureza > 95%).

#### *Biomass and enzymes*

Cascas de coco verde foram coletadas em áreas urbanas de Natal, uma cidade do Nordeste do Brasil. O material foi cortado com facão e os pedaços foram lavados com água corrente e em seguida secos a 50 °C por 72 h em estufa de ar circulante (TECNAL TEM-394/I, Brazil). Os pedaços de coco verde serão triturados em um moinho de facas (TECNAL TE-680, Brazil) para ~0.85 mm (20 mesh) e estocadas em sacos plásticos para uso futuro. O coquetel enzimático Cellic Ctec2 (~120 filter paper unit/mL; ~120 FPU/mL) foi usado nos experimentos de hidrólise enzimática de materiais ricos em celulose.

#### *Fracionamento de fibra de coco verde por pré-tratamento com PEG*

A Figura 1 descreve o passo a passo adotado para o fracionamento da fibra de coco verde (GCF), baseado em Nge et al. (2018). Inicialmente, 10 g de GCF (em base seca) e 100 g de solução de ácido sulfúrico em PEG 400 (0.3% w/w) foram misturados em Erlenmeyer de 500 mL e o frasco foi colocado em autoclave a 130 °C por 120 min. O *slurry* resultante foi misturado com 125 mL de solução de 0,4 M hidróxido de sódio por 5 min em temperatura ambiente (~25 °C) e, em seguida, as frações sólidas e líquidas foram separadas via filtração com pano. Para adequar a fração sólida para hidrólise enzimática, o material foi lavado seis vezes com 100 mL de água de torneira em cada rodada e posteriormente seco a 60 °C. No sentido de aumentar o rendimento da lignina, a primeira água de lavagem foi adicionada juntamente com a fração líquida como fonte de lignina. O líquido foi previamente centrifugado a 1,500 × g (usando SL-700 centrifuge) em tubos cônicos de 50 mL para remoção de sólidos que passaram pela abertura do pano e, em seguida, 5 M ácido sulfúrico foi adicionado ao líquido para deslocar o pH para 2.0 e a mistura foi deixada em agitação magnética por 30 min. A lignina glicolada foi separada da fase líquida usando a centrífuga SL-700 (SOLAB, Brazil) a 1,500 × g, lavada três vezes com água acidificada (pH 2.0) e seca em estufa de circulação de ar a 60 °C por 24 h. Um pré-tratamento controle, o pré-tratamento ácido, foi realizado substituindo PEG 400 por água e sem incubação com hidróxido de sódio. A remoção de componentes amorfos da GCF foi calculada a partir da Equação 1:

$$\text{remoção(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{conteúdo}_{\text{pré-tratado}} \times \text{rendimento}}{\text{conteúdo}_{\text{pré-tratado}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

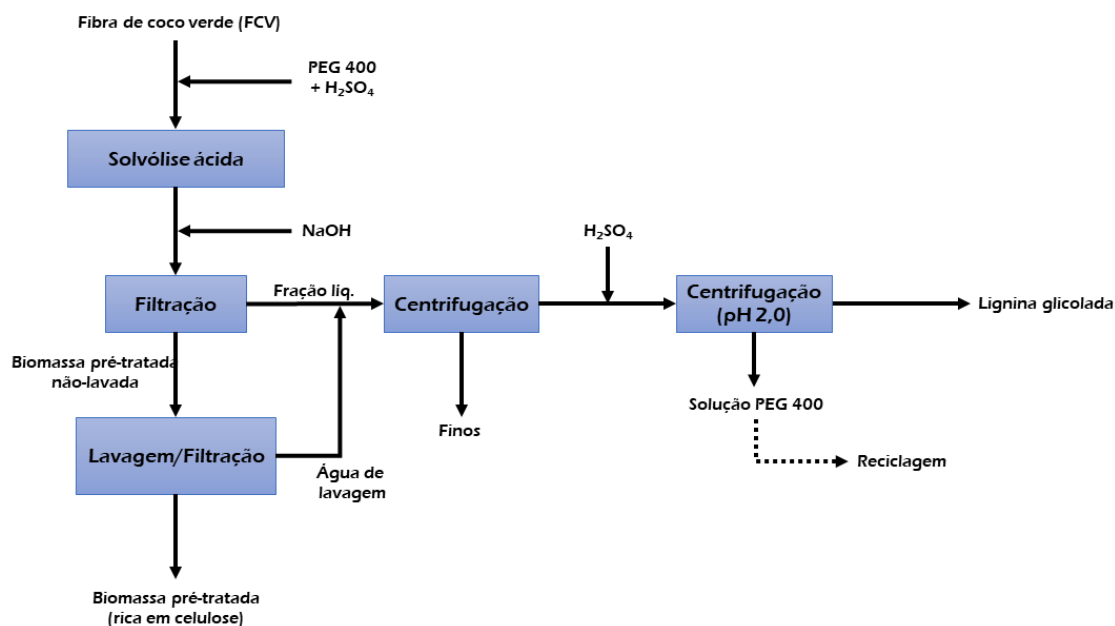


Figura 1. Representação do fracionamento da fibra de coco verde.

### *Hidrólise enzimática de fibra de coco verde pré-tratada organosolv*

A produção de açúcares fermentescíveis a partir de GCF pré-tratada foi realizada usando hidrólise enzimática. Em Erlenmeyers de 25 mL (em duplicata), GCF pré-tratado (com 5 mL de volume útil), tampão citrato (50 mM, pH 5.0) e azida de sódio (0.01%, w/v) foram adicionados ao meio reacional em conjunto com 20 FPU/g de celulasas Cellic Ctec 2. Os frascos foram incubados em um agitador rotatório a 50 °C e 150 rpm por 48 h. Amostras foram coletadas a 0 e 48 h e as enzimas foram prontamente desativadas por aquecimento antes da quantificação de açúcares redutores e glicose no sobrenadante. Os experimentos foram realizados sob cargas de sólidos iguais a 10% e 20% (w/v) de GCF pré-tratada. No sentido de comparar o aumento de digestibilidade pelo pré-tratamento com PEG 400, experimentos também foram realizados usando GCF não-tratado e pré-tratado ácido (sem etapa com hidróxido de sódio) como substratos. Particularmente, nos experimentos com GCF não-tratado e pré-tratado ácido, Tween 80 e PEG 400 foram adicionados ao meio reacional na dosagem de 0.1 g por g de substrato.

### *Métodos analíticos*

As composições químicas da GCF não-tratada e pré-tratada foram determinadas em termos de celulose, hemicelulose, lignina Klason, lignina ácida solúvel, cinzas e extraíveis. As metodologias usadas foram adaptadas de Sluiter et al. (2008a, 2008b, 2012). A cristalinidade das amostras de GCF foram determinadas a partir da metodologia descrita por Nogueira et al. (2021) usando os valores de intensidade no plano 002 (~22.6°) e no vale entre os planos 001 e 002 (~18,7°).

A quantificação de glicose nos hidrolisados de GCF foi realizada pelo kit GOD-POD e a conversão celulósica foi calculada a partir da Equação 1.

$$\text{conversão celulósica (\%)} = \frac{\text{glicose liberada (g/L)} \times V(L)}{\text{celulose (g)} \times 1,11} \times 100 \quad (1)$$

A lignina recuperada da fração líquida foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e termogravimetria. A análise de FTIR foi realizada em um PerkinElmer Frontier (Perkin Elmer, Estados Unidos) na faixa de número de onda de 400-4000 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. A decomposição térmica das amostras de lignina (lignina alcalina de GCF e lignina organosolv) foi realizada em um equipamento SDT600 (TA Instruments, Estados Unidos) sob ambiente inerte (gás nitrogênio) e aquecimento de 5 °C/min. A massa inicial das amostras foi fixada em 5 mg e a faixa investigada de temperatura foi de 20-800 °C.

### Testes estatísticos

No sentido de avaliar a significância de efeitos nos experimentos de hidrólise enzimática, testes de Tukey foram realizados usando o software Statistica 7.0 (StatSoft/USA), a 95% de nível de confiança ( $p < 0.05$ ).

## Resultados e Discussão

O pré-tratamento organosolv foi efetivo para modificar a composição química da GCF. O conteúdo de lignina Klason reduziu de 35,7% para 29,7% (remoção de lignina de 43,1%) e o conteúdo de extraíveis reduziu de 16,5% para 4,1%, como pode ser observado na Tabela 1. Os extrativos consistem de proteínas, açúcares, lipídeos e inorgânicos dispersos na matriz lignocelulósica e eles são susceptíveis à solubilização/quebra após a combinação de incubação ácida e alcalina realizada no pré-tratamento organosolv proposto. A solubilização da lignina é favorecida pela presença de PEG 400, que é um bom solvente em conjunto com água, e pelo ambiente alcalino ao final do processo, o qual favorece a quebra de ligações éter internas da lignina e entre lignina e polissacarídeos. Quanto à hemicelulose, o pré-tratamento organosolv (conteúdo de 15,3%) foi menos eficaz do que o pré-tratamento ácido (conteúdo de 10,2%), mas ainda assim levou a perda de 33,7% do polissacarídeo. Devido a perda dos componentes amorfos, o percentual de celulose na GCF pré-tratada aumentou fortemente de 28,8% para 45,4%. O aumento da celulose observado no presente estudo se assemelha ao desempenho mostrado em Ebrahimi et al. (2019) e Padilha et al. (2019). Para corroborar o enriquecimento da celulose, a cristalinidade da GCF pré-tratada organosolv aumentou de 31,2% para 43,4%. Possivelmente, esse valor foi superior à cristalinidade da GCF pré-tratada ácida devido à forte deslignificação promovida no pré-tratamento organosolv.

Tabela 1. Composição química e cristalinidade de fibra de coco verde não-tratado e pré-tratado.

| Amostra                    | Rendimento (%) | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina Klason (%) | Extrativos (%) | Cinzas (%) | CrI (%) |
|----------------------------|----------------|--------------|------------------|--------------------|----------------|------------|---------|
| GCF não-tratado            | -              | 28,8 ± 1,1   | 15,8 ± 1,4       | 35,7 ± 1,3         | 16,5 ± 0,1     | 3,2 ± 0,2  | 31,2    |
| GCF pré-tratado ácido      | 67,7           | 33,4 ± 4,4   | 10,2 ± 1,1       | 45,6 ± 0,2         | 3,2 ± 0,5      | 2,6 ± 0,1  | 36,1    |
| GCF pré-tratado organosolv | 68,4           | 45,4 ± 1,8   | 15,3 ± 2,7       | 29,7 ± 0,4         | 4,1 ± 0,8      | 2,5 ± 0,1  | 43,4    |

CrI – índice de cristalinidade

A Figura 2 apresenta o desempenho de liberação de glicose na hidrólise enzimática de diferentes amostras de GCF. O aumento da carga de sólidos de 10% para 20% implicou no aumento da liberação de glicose, o que pode ser atribuído a maior disponibilidade de celulose no ambiente. A adição de tensoativo nas condições na GCF não-tratada e pré-tratada de fato melhoraram o desempenho da hidrólise pelo efeito de bloqueio da lignina, porém a concentração de glicose ainda é inferior a GCF pré-tratada organosolv. A liberação de glicose alcançou 14,03 g/L para 10% (m/v) sólidos e 26,61 g/L glicose para 20% (m/v) sólidos, o que implica em aumento de mais de 280% em comparação com GCF não-tratada. Esse resultado foi obtido devido ao rompimento da matriz lignocelulósica e deslignificação da biomassa. De acordo com Schutyser et al. (2018), pré-tratamentos organosolv também podem promover o enxerto do solvente orgânico na estrutura da lignina residual da biomassa pré-tratada, o que leva a menor perda de celulases por adsorção não-produtiva.

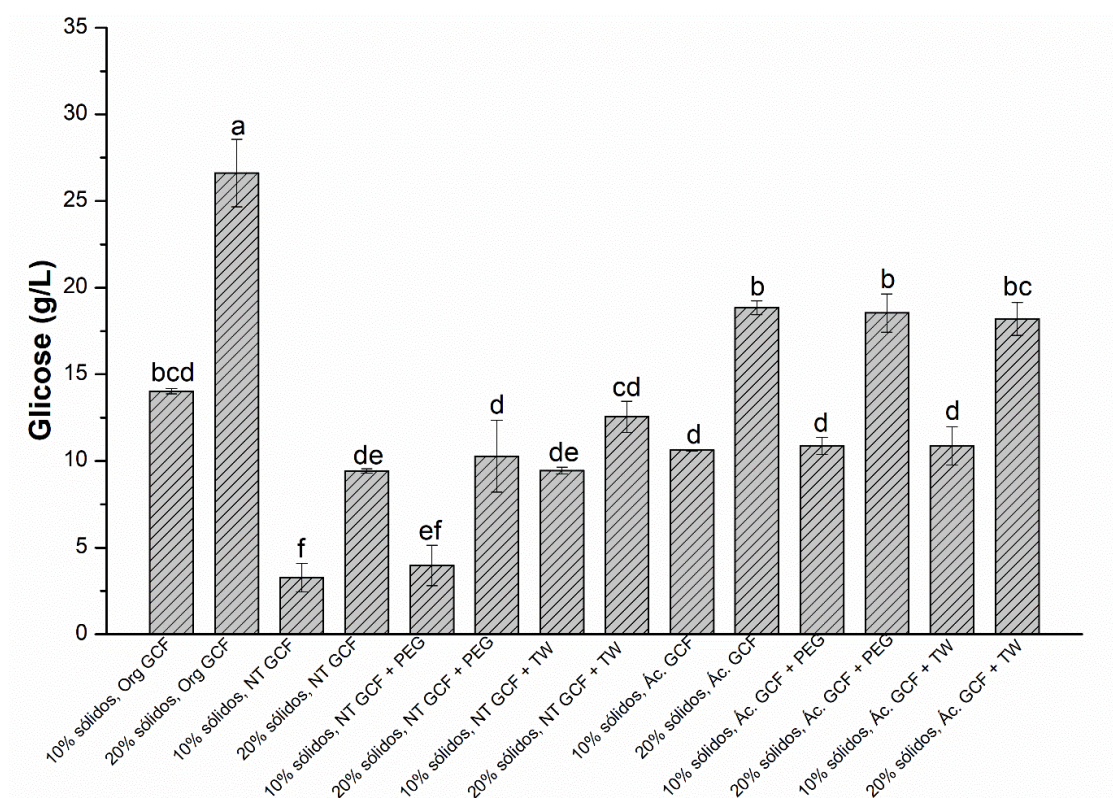


Figura 2. Liberação de glicose durante hidrólise enzimática de amostras de não-tratadas e pré-tratadas de fibra de coco verde (GCF). As abreviaturas Org, NT e Ác correspondem ao pré-tratamento organosolv, não-tratado e pré-tratado ácido, respectivamente. As abreviaturas PEG e TW correspondem aos aditivos polietilenoglicol 400 e Tween 80, respectivamente. Os testes foram realizados na temperatura de 50 C, rotação de 120 rpm e tempo de 48 h. Letras iguais indicam que não há diferenças estatísticas entre as condições experimentais na significância de 5%.

A lignina isolada do pré-tratamento organosolv é mostrada na Figura 3A. Essa lignina possui coloração marrom típica do polímero, mas não apresentou característica quebradiça, mas sim deformável assim como PEG de elevados pesos moleculares. No sentido de assegurar o enxerto de PEG, as análises de FTIR e termogravimetria foram realizados e os resultados são mostrados nas Figuras 3B e 3C. Diferentemente da lignina alcalina, a lignina organosolv apresentou picos nas regiões de 1110 e



1252  $\text{cm}^{-1}$ , ambas relativas da ligação C-O éter. Alterações significativas foram observadas no espectro nas regiões de 946 (ligação C=C), 1070 (ligação C-O de álcool primário) e 1350  $\text{cm}^{-1}$  (ligação O-H) (InstaNANO, 2024). A lignina organosolv apresentou perda de massa severa a partir de 200 C, que é uma região típica da degradação de PEG, como pode ser observado em Akhtar et al. (2018).

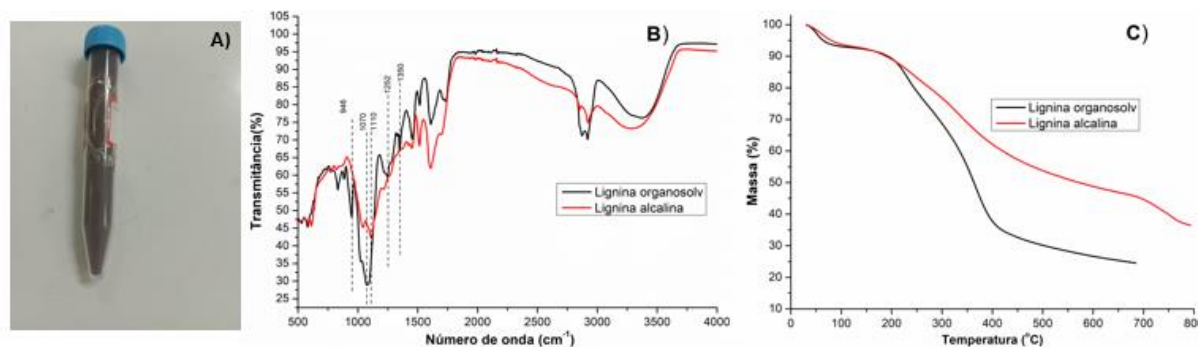


Figura 3. Imagem da lignina isolada de pré-tratamento organosolv de GCF (A); Análise termogravimétrica de amostras de lignina (B); (C)

## Conclusões

O pré-tratamento organosolv foi eficiente no fracionamento de GCF. A GCF pré-tratada organosolv apresentou maior conteúdo de celulose e menor conteúdo de lignina do que GCF pré-tratada ácida e GCF não-tratada, o que também refletiu no melhor desempenho na hidrólise enzimática. As análises físico-químicas reforçam o isolamento de lignina com propriedades particulares, reforçando a ocorrência de enxerto de PEG na estrutura (PEGuilação). Trabalhos futuros podem se concentrar na aplicação da lignina PEGuilada em hidrogéis e na recuperação de alguma fração de lignina solúvel na fração líquida do pré-tratamento.

## Agradecimentos

Os autores são gratos a UFRN pela infraestrutura disponível para realização da pesquisa e gratos a ANP, CAPES e CNPq pelo apoio nas bolsas de pesquisa. A pesquisa faz parte do projeto 314746/2023-4, da bolsa produtividade CNPq.

## Referências Bibliográficas

Akhtar, S., An, W., Niu, X., Li, K., Anwar, S., Maaz, K., ... & Gao, L. Toxicity of PEG-Coated CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with treatment effect of curcumin. *Nanoscale Research Letters*, 13, 1-8. 2018.



FTIR, “Functional Group Table with Search,”. InstaNANO Disponível em:

<<https://instanano.com/all/characterization/ftir/ftir-functional-group-search/>>. Acesso em: 26 de jul. 2024.

NationMaster (2019) – Coconuts Production. Disponível em:

<<https://www.nationmaster.com/nmx/ranking/coconuts-production>>. Acesso em: 28 de ago. 2024.

Nge, T. T., Tobimatsu, Y., Takahashi, S., Takata, E., Yamamura, M., Miyagawa, Y., ... & Yamada, T. Isolation and characterization of polyethylene glycol (PEG)-modified glycol lignin via PEG solvolysis of softwood biomass in a large-scale batch reactor. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 6(6), 7841-7848. 2018.

Nogueira, C.C.; Padilha, C.E.A.; Santos, E.S. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of green coconut fiber under high concentrations of ethylene oxide-based polymers. **Renewable Energy**, 163, 1536-1547. 2021.

Padilha, C. E. D. A., Nogueira, C. D. C., Alencar, B. R. A., de Abreu, Í. B. S., Dutra, E. D., Ruiz, J. A. C., ... & dos Santos, E. S. Production and application of lignin-based chemicals and materials in the cellulosic ethanol production: An overview on lignin closed-loop biorefinery approaches. **Waste and Biomass Valorization**, 12(12), 6309-6337. 2021.

Schutyser, W., Renders, A. T., Van den Bosch, S., Koelewijn, S. F., Beckham, G. T., & Sels, B. F. Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. **Chemical society reviews**, 47(3), 852-908. 2018.

Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D Determination of Ash in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renew. Energy Lab**. 1-5. 2008a.

Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report NREL/TP-42618. **National Renew. Energy Lab**. 1-15. 2012.

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. Determination of Extractives in Biomass. Technical Report NREL/TP-42619. **National Renew. Energy Lab**. 1-9. 2008b.

Yamada, T., Tobimatsu, Y., Nge, T. T., Matsumoto, Y., & Yamada, T. Acid-Catalyzed Solvolysis of Softwood in Caprylyl Glycol to Produce Lignin Derivatives. **ACS Omega**. 2024.