

## XII-079- UTILIZAÇÃO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS FLUTUANTES COMO ALTERNATIVA ENERGÉTICA SUSTENTÁVEL PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

**Elis Regina Dana Shutz** <sup>(1)</sup>

Bióloga pela Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC). Especialista em Embriologia e Citologia pela FACEPAL. Mestranda em Ciência e Biotecnologia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de Videira (UNOESC/VDA). Atualmente é Coordenadora e professora do Curso de Graduação em Ciências Biológicas (UNOESC/VDA).

**Marta Veronica Buss** <sup>(2)</sup>

Tecnóloga em Saneamento Ambiental pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de Videira (UNOESC/VDA). Engenheira Sanitarista e Ambiental (UNOESC/VDA). Mestranda em Ciência e Biotecnologia (UNOESC/VDA) e bolsista da Fundação Parque Tecnológico da ITAIPÚ.

**Sabrina Pinto Salamoni** <sup>(3)</sup>

Bióloga pela universidade federal do rio grande do sul (UFRGS). Mestre e Doutora pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (UFRGS). Atualmente é professora e pesquisadora do programa de Pós Graduação de Ciência e Biotecnologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

**Estela de Oliveira Nunes** <sup>(4)</sup>

Farmacêutica pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Mestre em Engenharia Química (UFSC). Doutorado em Engenharia Química UFSC). Atualmente é pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

**Jean Carlo Salome dos Santos Menezes** <sup>(5)</sup>

Químico pela Universidade de Passo Fundo (UPF). Mestre em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Doutor em Engenharia de Tecnologia Ambiental (UFRGS). Atualmente é professor e integrante do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia (UNOESC/VDA).

**Endereço** <sup>(1)</sup>: Rua Paese, 198, - Universitário - Videira – Santa Catarina - CEP: 89560-000 - Brasil - Tel: (49) 3533-4459, e-mail: elis.schutz@unoesc.edu.br

### RESUMO

A grande dependência de fontes de energia não renováveis e altamente poluentes, como o petróleo e seus derivados, tem levado a sociedade a buscar alternativas para a utilização de combustíveis renováveis. As pesquisas atuais sinalizam como tecnologia emergente a produção de etanol de biomassas alternativas. Dentre as várias matérias-primas disponíveis, as macrofitas surgem como a uma alternativa sustentável devido à elevada produtividade e à possibilidade de cultivo ou obtenção de ambientes eutrofizados. Neste contexto, o presente trabalho objetiva produzir bioetanol a partir da utilização da macrófita *Lemna minuta*. Como resultados desta pesquisa evidencia-se que a biomassa possui um teor de carboidrato de 36,4%. O melhor tratamento é a adição de 5% de HCl em solução com concentração de 60g.l<sup>-1</sup> de *L. minuta*, mantida aquecida à 150°C por 60 minutos. Tendo-se otimizado métodos de ruptura celular e extração de açúcares. O melhor tratamento foi repetido, o hidrolisado obtido foi submetido à correção de pH, esterilização e realizada a fermentação com adição de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados preliminares apresentaram-se positivos à utilização da biomassa, e o projeto mostra-se consistente. Este estudo demonstra que a biomassa de *Lemna minuta* como bicomustível de segunda geração é viável tecnicamente. E muito além disto, mostra que estudos desta natureza devem ser desenvolvidos na busca pela diversificação da matriz energética através de energia renovável.

**PALAVRAS-CHAVE:** Macrófitas, *Lemna minuta*, hidrólise ácida, fermentação, bioetanol.

### INTRODUÇÃO

O Brasil tem hoje o privilégio de ser um dos maiores produtores de álcool no mundo, produzindo etanol a partir da cana de açúcar desde a década de 70. Foram realizados grandes avanços no desenvolvimento tecnológico desde a produção e tratamento da matéria prima até o reaproveitamento dos resíduos (cogeração). Na etapa de produção agrícola, foram introduzidos novos equipamentos de colheita, novas variedades,

tecnologias de manejo da plantação, na etapa industrial foram aperfeiçoados os processos e equipamentos reduzindo os gastos energéticos (TOLMASQUIM, 2008).

Desta forma, os resultados alcançados na produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar demonstram a validade das pesquisas e geram interesses na sua produção a partir de outras fontes de matérias-primas. A biomassa de origem vegetal é considerada por pesquisadores como uma das mais promissoras fontes de energia, demonstrando enorme potencial para a substituição de diversos combustíveis fósseis devido à sua abundância na natureza e às suas características físico-químicas (JOHNSON e KEITH, 2004).

As macrófitas são um grupo de plantas aquáticas que podem ser observadas em ambientes eutrofizados, apresentam alta capacidade de absorção de nutrientes e grande capacidade de adaptação a diferentes tipos de ambientes, o que torna sua ocorrência muito ampla, ou seja, em águas doces, salobras e salgadas, sob fluxos estacionário, lântico e lótico (ESTEVES, 2011).

Portanto as macrófitas podem ser facilmente cultivadas em lagoas abertas quando se objetiva a produção de biomassa. Em corpos hídricos naturais e em ambientes construídos, quando em proliferações excessivas as macrófitas são fisicamente removidas, entretanto, essa biomassa necessita de um tratamento e ambientalmente adequado (THOMAS, 2002).

Estudos recentes têm evidenciado que as macrófitas possuem aplicação em várias áreas como: produção de moléculas com potencial atividade biológica; tratamento de águas residuárias e fitorremediação de ambientes eutrofizados. Soma-se a isso, sua utilização na mitigação do efeito estufa, pela assimilação do CO<sub>2</sub> (CHENG, et al. 2012; GE, et al. 2012; UYSAL, 2013).

Esta pesquisa aponta para a produção de bioetanol de segunda geração a partir de macrófitas, onde a biomassa seca é submetida à hidrólise ácida, transformando unidades celulósicas em glicosídicas que posteriormente são fermentadas para obtenção de álcool etílico (KARIMI et al., 2006; OGEDA e PETRI, 2010). No entanto, há várias questões atuais no que tange a produção e uso do etanol, que incluem o aspecto da segurança alimentar, ou seja, "combustível versus alimento", debate e sustentabilidade (PANAGIOTOU e OLSSON, 2007).

Diante do exposto, este estudo tem por objetivo investigar a obtenção de combustível renovável produzido a partir de biomassa vegetal de macrófitas aquáticas flutuantes da espécie *Lemna minuta*, com intuito de propor alternativa sustentável para a produção de bioetanol, estimulando a inovação e o desenvolvimento biotecnológico nessa área.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras da biomassa *Lemna minuta* foram coletadas em uma Lagoa de água doce eutrofizada (Figura 1), localizada em uma propriedade rural, no interior do município de Videira. As colheitas foram realizadas nas 4 estações do ano (primavera/ verão/ outono e inverno).



Figura 1: Lagoa eutrofizada por *Lemna minuta*, ambiente em que foi coletado a biomassa

Depois de colhidas de forma manual em peneira plástica (Figura 2A), as amostras foram secas ao sol (Figura 2B), peneiradas para a remoção das impurezas, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e embaladas à vácuo para garantir a sua preservação (Figura 2C). As amostras de biomassa foram homogeneizadas e maceradas em cadinho de porcelana, fracionadas em 3 partes para a execução dos experimentos: caracterização do teor de carboidrato; hidrólise e fermentação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata nos laboratórios do Centro Biotecnológico da UNOESC do campus de Videira (SC).

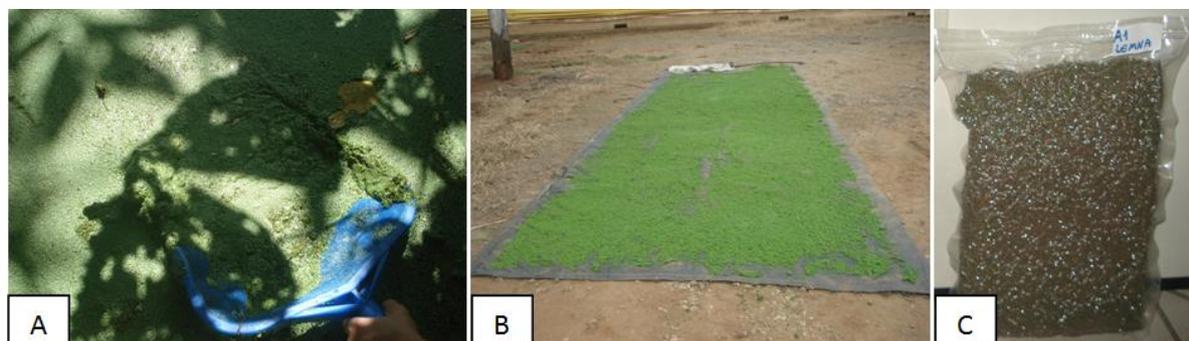


Figura 2: Coleta e preparo da biomassa vegetal: A) Colheita; B) Secagem ao sol; C) Embalagem Final.

### QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Para verificar o potencial de produção de etanol a biomassa foi caracterizada quanto ao teor de carboidratos, pela metodologia clássica adaptada do Instituto Adolfo Lutz (1985). Onde o teor de carboidratos presentes na amostra foi quantificado a partir de hidrólise ácida prévia com titulação posterior pelo método de Fehling. Para tanto, 2g de cada amostra foi pesada e adicionada em baldes de fundo chato com 200ml de água destilada e 5ml de HCl, com digestão térmica por 3 h em sistema de refluxo.

As amostras digeridas foram resfriadas por 30 minutos a temperatura ambiente, foram neutralizados com solução de NaOH 40% para  $\text{pH} \pm 7,0$ , o hidrolisado foi filtrado. O conteúdo líquido filtrado foi titulado em solução de Fehling aquecida em ebulição até o ponto de viragem da solução (de azul para incolor com formação de precipitado vermelho de  $\text{Cu}_2\text{O}$ ). A quantificação do teor de carboidratos foi obtida em porcentagem. A amostra que apresentou maior quantidade de carboidrato foi selecionada para a sequência da pesquisa.

### HIDRÓLISE ÁCIDA

Ensaio de pré-tratamento com hidrólise ácida da biomassa foram realizados segundo uma adaptação do método de HARUN et al. (2010). Para avaliar diferentes condições de pré-tratamento para a hidrólise foi realizado um delineamento fatorial  $2^3$  empregando os parâmetros: temperatura ( $100^\circ\text{C}$ ,  $125^\circ\text{C}$  e  $150^\circ\text{C}$ ), concentração de ácido (5%, 10% e 15% (v/v) e tempo de reação (20', 40' e 60').

Os ensaios foram realizados empregando a concentração  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa diluída em água destilada. As hidrólises foram realizadas com dois ácidos distintos, clorídrico e sulfúrico. Para cada ácido foram realizados 11 tratamentos resultantes da combinação das variáveis e dos níveis (Tabela 1).

Após realizar os tratamentos as soluções hidrolisadas foram resfriadas em banho de gelo por 15' o pH foi ajustado à 7,0 com NaOH 8% e as amostras foram submetidas à centrifugação 10.800 rpm durante 21'. Após centrifugação, no sobrenadante foi determinado a concentração de açúcares pelo método dinitrosalicílico (DNS) conforme Maldonado et al., (2013). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de 540 nm, com curva padrão de glicose previamente determinada.

Tabela 1: Planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>, para as Hidrólises Ácidas

Tratamento	Níveis Axiais			Variáveis		
	A	B	C	Ácido	Temperatura	Tempos
1	-1	-1	-1	5	100	20
2	-1	-1	1	5	100	60
3	-1	1	-1	5	150	20
4	-1	1	1	5	150	60
5	1	-1	-1	15	100	20
6	1	-1	1	15	100	60
7	1	1	-1	15	150	20
8	1	1	1	15	150	60
9	0	0	0	10	125	40
10	0	0	0	10	125	40
11	0	0	0	10	125	40

### ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

A partir dos resultados obtidos nos tratamentos de hidrólise ácida realizados, foi selecionada a condição de pré-tratamento que apresentou o maior percentual de açúcar hidrolizado, este ensaio foi repetido e a amostra hidrolizada, foi submetida à correção para pH 6,00, esterilização e fermentação.

Nos ensaios de fermentação foi empregada uma linhagem de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura foi pré-ativada e após 1 hora foi transferida para frascos contendo a biomassa previamente hidrolizada e esterilizada. A fermentação foi realizada a temperatura de 45°C por 24 horas. Em intervalos regulares à cada 4 horas, uma amostra foi coletada e determinado o consumo de açúcares redutores indicando a potencialidade da referida biomassa para geração de bioetanol.

A quantificação do etanol será realizada em Cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010. Acoplado a um detector quadrupolar de espectrometria de massas Marca QP 2010 Plus (Schimadzu, Kioto, Japão), com injetor split/aplitless, no Laboratório de Análises de Bebidas SENAI, unidade de Pinheiro Preto, Santa Catarina.

Os resultados foram reunidos em médias com seus respectivos desvios-padrão, a estatística descritiva dos dados foi realizada por meio da planilha eletrônica Excel® 2007.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A biomassa de macrófita *Lemna minuta* apresentou teor médio de carboidrato de 36,46 %  $\pm$  1,6 na massa seca (MS). O acúmulo de carboidratos ocorre naturalmente nestes vegetais diminutos, conforme Leng (1999) pode ser aumentado o teor de carboidrato quando os vegetais são cultivados em águas com menor disponibilidade nutricional em termos de nitrogênio amoniacal e de fósforo orgânico, cujos estes dois elementos são os mais facilmente absorvidos pelas. Portanto quanto mais lento o crescimento vegetal maior o acúmulo de carboidrato.

Entretanto para ser fermentado os carboidratos constituintes do tecido da biomassa vegetal devem estar disponíveis. Para promover a quebra destas moléculas as biomassas foram submetidas aos ensaios de hidrólises ácidas. A eficiência das hidrólises foi calculada a partir do teor médio de carboidrato (364,6g.kg<sup>-1</sup>) disponível na biomassa, os resultados obtidos nos 22 tratamentos, bem como as suas respectivas eficiências encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Teor de açúcar disponível na biomassa da *Lemna minuta* a partir das hidrólises ácidas, e eficiência (%) dos tratamentos.

Tratamento	Ácido Clorídrico		Ácido Sulfúrico	
	Açúcar Redutor Total	Eficiência	Açúcar Redutor Total	Eficiência
	Massa Seca (g/kg)	%	Massa Seca (g/kg)	%
1	82,99	22,80	90,49	24,86
2	81,94	22,51	79,21	21,76
3	83,68	22,99	86,05	23,64
4	121,94	33,35	89,54	24,60
5	67,08	18,43	71,20	19,56
6	59,99	16,48	91,44	25,12
7	80,52	22,12	90,93	24,98
8	61,73	16,96	62,64	17,21
9	93,80	25,77	80,95	22,24
10	98,32	27,01	87,21	23,96
11	90,82	24,95	85,83	23,58

Dentre os 11 tratamentos com adição de HCl, as concentrações de açúcares redutores totais (ART) disponibilizadas variaram de 59,99 à 121,94 g ART. kg<sup>-1</sup>. O tratamento 4 (5% HCl, 150° por 60') foi o mais eficiente e disponibilizou 121,94 g de açúcar redutor total por kg de macrófita, com uma eficiência de 33,35%.

Quando utilizando o pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> os valores de rendimentos em glicose variaram de 62,64 à 91,44 g ART. kg<sup>-1</sup>. Com a adição de ácido sulfúrico o tratamento 6 (15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100° por 60') foi o mais eficiente e disponibilizou 91,44 g de açúcar redutor total por kg de massa seca de *Lemna minuta*, obteve uma eficiência de 24,98%.

Considerando os 22 tratamentos de hidrólises ácidas que foram realizadas, verifica-se ser a mais eficiente em liberação de açúcares e mais econômico com adição de menor volume de ácido o tratamento 4 (5% HCl, 150° por 60') o qual foi repetido e, o hidrolisado obtido com 72,27 g ART.L<sup>-1</sup> foi submetido à fermentação conforme descrito na metodologia. Durante a fermentação foi monitorado o consumo da glicose, a qual é apresentada na Figura 3.

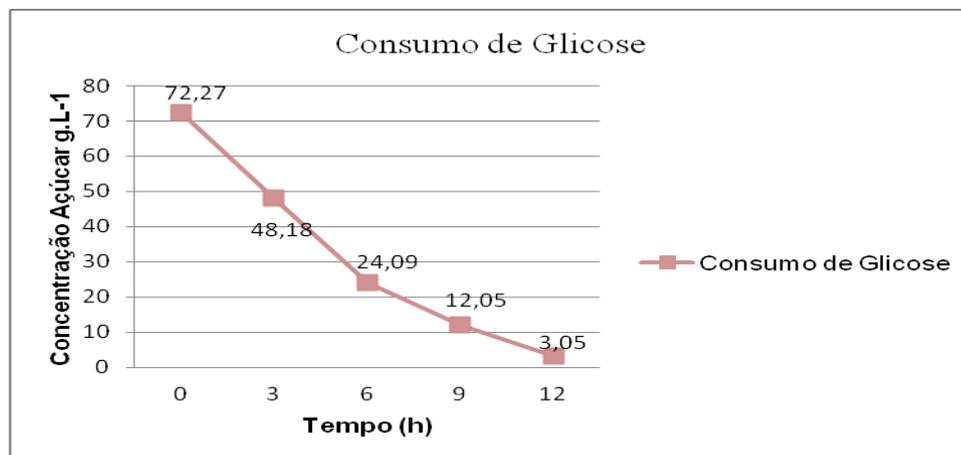


Figura 3: Gráfico do consumo de glicose durante a fermentação alcoólica

A análise da Figura 3 mostra que à semelhança dos processos fermentativos clássicos para a produção de etanol, a taxa fermentativa é fortemente influenciada pelo tamanho do inóculo, facilmente verificado no início

do processo. Considerando o tempo de 6 h de fermentação, verificou-se de maneira mais acentuada o consumo de glicose neste período.

Segundo LIMA et al. (2001), o uso de maior concentração celular não somente aumenta a produtividade volumétrica, mas também aumenta o controle sobre as bactérias contaminantes e restringe o crescimento da própria levedura. Por outro lado, elevado teor de levedura exige maior consumo de açúcar para manter as células vivas, além de resultar em maior competição pelos nutrientes do meio, diminuindo a viabilidade do fermento.

## CONCLUSÕES

Demonstrou-se a possibilidade de produção de bioetanol a partir das macrófitas aquáticas da família Lemnaceae, especificamente *Lemna minuta*, otimizando o processo de pré-tratamento físico-químico com hidrólise ácida e posterior fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, e quantificação do bioetanol. A partir dos resultados obtidos conclui-se que a biomassa possui potencial com fonte de glicose para a geração de etanol.

Espera-se ao término do estudo obter resultados promissores tão quanto os obtidos por Chen et al. (2012) em pesquisa realizada com Lemnaceae do gênero *Landoltia sp* que obteve o rendimento máximo de glicose de  $218,64 \pm 3,10$  mg/g MS com hidrólise enzimática cujos ensaios de fermentação obtiveram  $30,8 \pm 0,8$  g/L de concentração de etanol, 90,04% de rendimento da fermentação, os autores relatam ainda que esta era a maior concentração de etanol relatado até à data usando como matéria-prima a macrófita aquática flutuante da família Lemnaceae.

O processo de fabricação de etanol de segunda geração a partir macrófita gera dois tipos de resíduo conforme o método de produção, o resíduo hidrolisado e o resíduo fermentado. E estes em trabalhos futuros poderão ser submetidos a processo termoquímico por pirólise para obtenção de bio-óleo obtendo assim um produto com valor agregado, minimizando a produção de resíduos e os impactos ambientais promovendo a sustentabilidade da produção de etanol a partir de macrófita aquática flutuante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHENG, Q., JIN, Y., GUOHUA, Z., FANG, Y., XIAO, Y. e HAI, Z.. Improving Production of Bioethanol from Duckweed (*Landoltia punctata*) by Pectinase Pretreatment. *Energies*, v.5, p. 3019-3032, 2012.
2. JOHNSON, T.L, KEITH, D.W. Fossil electricity and CO<sub>2</sub> sequestration: how natural gas prices, initial conditions and retrofits determine the cost of controlling CO<sub>2</sub> emissions. *Energy Policy*, v.32, p.367- 382, 2004.
3. ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 826, 2011.
4. GE, X.; ZHANG N.; PHILLIPS, G. C. e XU, J.. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresource Technology*, USA, v.124, p. 485–488, 2012.
5. HARUN R., DANQUAH, M. K., FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, p.199-203, 2010.
6. HILLMAN, W. S.; CULLEY, D. D. JR. The uses of duckweed. *American Scientist*. V. 66, p. 442-450, 1978.
7. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020.
8. KARIMI, K., KHERADMANDINIA, S., TAHERZADEH, M.J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass & Bioenergy*, v.30, p.247–253, 2006.
9. LENG, R. A. DUCKWEED: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. *Collation*, 1999, p.108.
10. LIMA, U. A; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In: *Biotecnologia*. São Paulo: E. Blucher, 2001, v. 3, p. 1-43.
11. MALDONADE, I. R., CARVALHO, P. G. B. e FERREIRA, N. A.. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. Comunicado técnico 85, EMBRAPA, 2013, p.4.



12. OGEDA, T. L. E. e PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, vol.33, n° 7, 1549-1558, 2010.
13. PANAGIOTOU, G., OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnology And Bioengineering*, v. 96 n. 2, p. 250-258, 2007.
14. THOMAS, S. M. Fatores ecológicos associados à colonização e ao desenvolvimento de macrófitas aquáticas e desafios de manejo. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.20, p.21-33, 2002.
15. TOLMASQUIM, M. Balanço Energético Nacional 2008. Empresa de Pesquisa Energética – EPE. Rio de Janeiro, RJ, 2008, p.32.
16. UYSAL, Y., Removal of chromium ions from wastewater by duckweed, *Lemna minor L.* by using a pilot system with continuous flow. *Journal of Hazardous Materials*, v.253, p.486-492, 2013.