

DESENVOLVIMENTO DE UMA ROTA TECNOLÓGICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO DE SEGUNDA GERAÇÃO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Samara Soares¹
Alexei Barban do Patrocínio²
Fábio César da Silva³

Introdução

Petróleo, gás natural e seus derivados representam 55% do consumo mundial de energia. São esses combustíveis que permitem a existência dos meios de transporte rápidos e eficientes que temos hoje, bem como boa parte das atividades industriais. Lamentavelmente, a previsão de durabilidade para as fontes de petróleo, que não são renováveis, não ultrapassam mais do que algumas décadas. Assim, as reservas dos combustíveis fósseis são finitas e a segurança de abastecimento é problemática para muitos países que os importam. Ainda, o seu uso é a principal fonte de gases que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global.

Assim, é importante e necessário o desenvolvimento de tecnologias renováveis de geração de energia e biocombustíveis a partir da biomassa, que é constituída pelo material produzido por todos os seres vivos em seus diferentes processos, isto é, a matéria orgânica viva, desde quando fixa energia solar nas moléculas constituintes de suas células, passando por todas as etapas da cadeia alimentar, ou trófica (BRISTOTI et al, 1993; JOHANSSON et al., 1993; WEREKO, et al, 1996; e mais).

As biomassas vegetais contêm grandes quantidades de celulose, além de outros polissacarídeos hidrolisáveis em glicose para fermentação a álcool combustível ou para a produção de produtos químicos de interesse. Na natureza a biodegradação é

1 Mestranda da Universidade de São Paulo – ESALQ. E-mail: samara.soares0502@hotmail.com.

2 Professor Fatec Piracicaba. E-mail: alexeipatrocinio@yahoo.com.br.

3 Engenheiro Agrônomo, doutor em Solos e Nutrição de Plantas, pesquisador da Embrapa Informática Agropecuária - Campinas - SP e professor da Fatec Piracicaba. Email: fabio.silva@embrapa.br.

lenta, pois a lignina e a cristalinidade dos substratos restringem o acesso das enzimas hidrolíticas aos componentes dos polissacarídeos. Entretanto, a biomassa pode ser pré-tratada e fracionada, utilizando processos que envolvem altas temperaturas e pressão, combinadas a catálises ácidas ou básicas, liberando os materiais lignocelulósicos em condições mais acessíveis ao ataque das enzimas (PALONEN et al., 2004).

No Brasil, o etanol produzido da cana-de-açúcar já substitui hoje metade da gasolina que seria consumida e seu custo é competitivo sem os subsídios que o viabilizaram no programa Proálcool em seu início. Com a crescente demanda do mercado nacional e internacional de álcool, faz-se necessário expandir as áreas de cultivo de cana-de-açúcar para que a mesma seja atendida. No entanto, para evitar a expansão desmedida das áreas de cultivo, têm se desenvolvido processos biotecnológicos que permitam a utilização dos resíduos industriais lignocelulósicos já existentes para a produção de etanol de segunda geração. Dentre estes resíduos, os resíduos celulósicos encontrados no bagaço da cana-de-açúcar constituem uma das fontes mais promissoras de carboidratos para a produção de etanol de segunda geração, com o excedente proveniente da geração de energia a partir do mesmo.

Materiais e Métodos

Bagaço de cana-de-açúcar

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar, utilizadas nas análises, vieram de uma usina próxima da cidade de Piracicaba, no interior de São Paulo. Foram colocados 2 kg de bagaço de cana-de-açúcar na estufa por 48 horas a 45°C (RABELO, 2010) e depois armazenado em temperatura ambiente, para evitar contaminação por microrganismos. Para o pré-tratamento ácido o bagaço foi lavado, filtrado e seco em uma estufa Biopar a 60°C por 24 h, desfibrado em um desintegrador modelo D-2500-II da marca Dedini separado em peneiras da série de Taylor de 14 e 60 mesh e armazenado em local fresco (MORAIS et al, 2012).

Pré-tratamento ácido

O bagaço de cana-de-açúcar foi pesado 50 g em Erlenmeyer, onde se adicionou ácido clorídrico comercial P. A. concentrado de acordo com os valores determinados no planejamento fatorial (Tabela 1). Sendo agitado a 150 rpm, o tempo e a temperatura foram determinados também por planejamento fatorial. Em seguida, o bagaço foi lavado, neutralizado e analisado quanto aos açúcares redutores (AR), compostos fenólicos, hemicelulose, lignina e celulose.

Foram determinados os seguintes parâmetros neste trabalho através das metodologias usuais do setor sucroalcooleiro: Açúcares Redutores (AR), compostos fenólicos, holocelulose, celulose e lignina.

Delineamento Experimental do Pré-Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar em meio Ácido

Os parâmetros aqui estudados foram: tempo (A), temperatura (B) e razão sólido-líquido (bagaço/ácido) (C).

O delineamento experimental para verificação dos parâmetros sobre o pré-tratamento ácido foi realizado segundo um esquema fatorial completo do tipo 2^3 com 4 ensaios no ponto central e em duplicata. Os níveis dos parâmetros utilizados são mostrados na Tabela 1, onde (-1), (0) e (+1) significam o menor nível, nível médio e maior nível, respectivamente.

Tabela 1. Valores dos níveis dos parâmetros avaliados no planejamento fatorial completo 2^3 com 4 ensaios no ponto central utilizado no pré-tratamento ácido.

Parâmetros	Níveis		
	(-1)	0	(+1)
A = Tempo de hidrólise (min.)	20	40	60
B = Temperatura (°C)	30	45	60
C = Razão sólido/líquido (g/mL)	1:10	1:15	1:20

Resultados e Discussão

Durante a hidrólise ácida, a xilose é rapidamente degradada a furfural, fenol e outros co-produtos de condensação, os quais são inibitórios as enzimas e leveduras. Visando o pré-tratamento ácido, um planejamento experimental foi realizado, através do estudo dos parâmetros: tempo de hidrólise, temperatura, razão sólido/líquido e suas interações e foram determinados rendimento em AR (açúcar redutor), determinação de fenol (mg/L) e AR (mg/mL) e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Esquema Matriz do planejamento fatorial 2³ com 4 ensaios no ponto central, rendimento em AR (açúcar redutor), determinação de fenol (mg/L) e AR (mg/mL).

Ensaio	Rendimento em AR (%)	Rendimento em Fenol (mg/L)	Rendimento em AR (mg/mL)
1	635,8	93,4	9,6
2	2157,7	78,4	29,4
3	4476,9	35,9	59,5
4	1376,9	79,7	19,2
5	613,8	94,7	9,3
6	1489,2	48,4	20,6
7	3256,2	44,7	43,6
8	2847,7	40,9	38,3
9	2608,5	72,3	35,2
10	3139,2	82,4	42,1
11	2412,3	94,0	32,6
12	3053,8	87,4	41,0

Os resultados determinados estão de acordo com o que se esperava na literatura, ou seja, o ensaio onde se obteve maior quantidade de açúcar foi o qual se obteve menor valor em fenol e vice-versa. Isso pode ser observado ao analisar a Tabela 2 constatando-se que o ensaio 3 obteve-se a maior quantidade de AR (mg/mL) e o menor valor de fenol (mg/L) e o ensaio 5 ao contrário.

Ainda, ao analisar a Tabela 2, constata-se que o ensaio 3 foi o que se obteve-se o maior rendimento em AR, com os parâmetros razão sólido/líquido e tempo em seu menor nível (-) e temperatura no seu maior nível (+) e o ensaio 5 obteve o menor rendimento em AR, com os parâmetros tempo e temperatura no menor nível (-) e razão sólido/líquido no seu maior nível (+).

Estas observações podem ser comprovadas pela análise estatística dos resultados, apresentadas na Tabela 3. Os resultados comprovam as observações anteriores, ou seja, o parâmetro temperatura apresenta efeitos significativos. O mesmo não acontece com o tempo e razão sólido/ líquido. Sendo assim, esses resultados são

muito importantes, pois o que interessa é obter o maior rendimento em açúcares redutores com o menor consumo de ácido e menor quantidade de fenol.

Ao analisar os parâmetros significativos, constata-se que o parâmetro B apresenta um sinal positivo, o que indica que, para haver aumento do rendimento em atividade, será preciso aumentar os valores deste parâmetro. Os parâmetros A e C não apresentaram efeito significativo juntamente com suas interações, apresentando um valor ($p < 0,05$). Estas observações podem ser comprovadas através da Tabela 4 onde se pode também notar através da análise da variância que a curvatura não é significativa ($p < 0,05$), o que indica que o modelo é melhor representado por uma equação linear.

Tabela 3. Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” e erros-padrão obtidos no planejamento fatorial completo 2³ com 4 ensaios no ponto central.

Efeitos e interações	Estimativas	Erros-Padrão	T
Média	2106,72	234,4889	8,98433
A	-277,7	468,9778	-0,59214
B	1765,4	468,9778	3,76436*
C	-110	468,9778	-0,23455
AB	-1476,55	468,9778	-3,14844*
AC	511,15	468,9778	1,08992
BC	235,05	468,9778	0,5012

A = Tempo de hidrólise (min.); B = Temperatura (°C) C = Razão sólido/líquido (g/mL); *Significativos ($t_{4,0,95} = 2,77$)

Como os resultados das análises demonstraram que o modelo é linear, então podemos representar o processo de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar considerando os termos que realmente influenciam no rendimento em atividade, pela Equação 1:

$$Y = 2.106,725 + 882,700B - 738,275AB, \text{ onde } (1)$$

Y representa o rendimento em atividade, A o tempo da reação e B a temperatura.

A partir deste modelo, obteve-se melhores resultados de recuperação em atividade quando se utilizou os valores de 20 minutos para tempo de reação e 60°C para temperatura. Nessas condições o rendimento máximo estimado pelo modelo foi de 3.727%.

A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições do pré-tratamento ácido sobre o bagaço de cana-de-açúcar, fornecendo um modelo matemático adequado para a resposta em rendimento em atividade (BARROS NETO *et al.*, 2010).

A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Figura 1. É possível observar que o rendimento máximo obtido para este modelo pode ser de 4.000%.

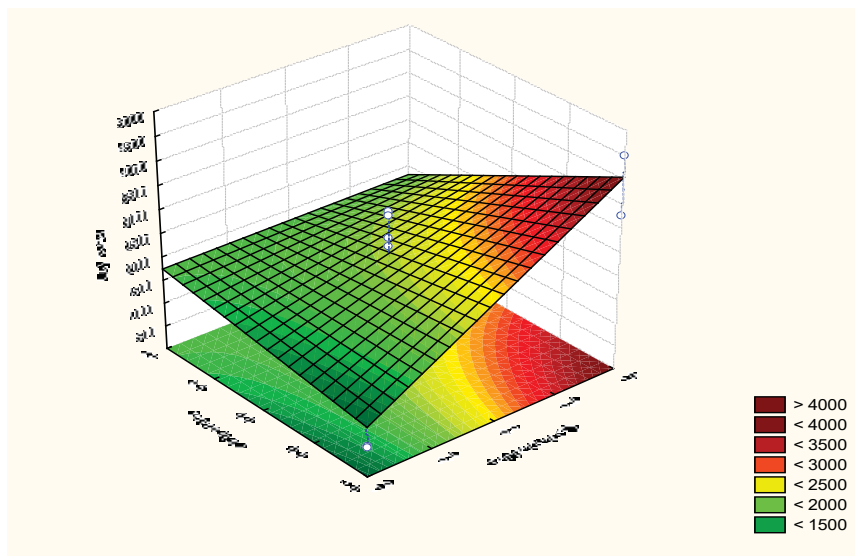


Figura 1. Superfície de resposta e curvas de nível descrito pelo modelo da equação 1, que representa o pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar.

Com o objetivo de se avaliar o modelo, foi realizado um novo experimento nas condições otimizadas. Para isto, utilizou-se temperatura a 60°C que foi o parâmetro significativo no maior nível (+) e tempo de 20 minutos no menor nível (-). Uma vez que a razão sólido/líquido não foi significativa, optou-se em trabalhar no valor inicial, 1:10, o que equivale ao menor nível (-1). Foi obtido um valor de rendimento em atividade de 3.780%. O rendimento previsto variou em função do experimental em 1,4%, estando o mesmo dentro dos valores esperados.

Determinação de holocelulose (celulose+hemicelulose) e lignina

O pré-tratamento tem por objetivo a solubilização e a separação dos principais componentes da biomassa – celulose, hemicelulose, lignina e extrativos, deixando o material remanescente mais disponível à hidrólise, através da quebra da proteção vinda

da lignina, solubilização da hemicelulose e da desestruturação da celulose cristalina. A Tabela 9 mostra o que acontece com a fibra ao passar por um processo de pré-tratamento, através da determinação da holocelulose, celulose, lignina e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento e do bagaço tratado com HCl 37%.

Na composição da biomassa da cana, existe um predomínio da holocelulose, (celulose + hemicelulose), seguido pela lignina. A outra fração significativa é a dos extraíveis em solventes orgânicos (éter etílico e benzeno), constituída fundamentalmente pela película protetora de ceras que impermeabiliza o caule da cana (NOVA CANA, 2013).

Com a separação das principais estruturas morfológicas das fibras e a redução da cristalinidade da celulose, espera-se que os diferentes tipos de pré-tratamentos, pelo que ressaltou o trabalho de (KUMAR *et al.* 2009), atinjam aos seguintes requisitos: melhorem o rendimento da sacarificação da celulose; evitem a perda ou degradação dos carboidratos; evitem a formação de subprodutos inibidores dos processos subsequentes (hidrólise e/ou fermentação, etc.) e apresentem um custo-benefício compensatório.

Tabela 5. Determinação de holocelulose, celulose, lignina e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento e do bagaço tratado com HCl 37%.

Tipo de bagaço	Frações do bagaço de cana (g)			
	Holocelulose	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Sem tratamento	1,0975	0,1768	0,9207	0,3925
HCl 37%	0,3429	0,3351	0,0078	0,0179
Rendimento	68,76 %	89,54 %	99,15 %	95,44 %

*Tipo de bagaço: *sem tratamento*- bagaço lavado, triturado e peneirado; *HCl 37%*- bagaço pré-tratado a 60 °C, 20 min. e razão sólido/líquido 1:10 determinada como condições otimizadas pelo planejamento fatorial.

Com respeito aos teores de celulose, o bagaço com o pré-tratamento foi, em geral, superior ao bagaço sem tratamento, apresentou um rendimento de 89,54 %. O tratamento com HCl 37% apresentou maior teor de celulose, sugerindo maior extração de frações como a lignina e reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a amorfa da mesma.

Também na Tabela 5 constata-se que o bagaço sem tratamento apresentou maiores teores de hemicelulose do que o bagaço pré-tratado, que comprova o que mostra na literatura que o objetivo do pré-tratamento é reduzir a cristalinidade da celulose, separar a matriz da lignina, solubilizar a hemicelulose para que a celulose fique mais acessível à hidrólise enzimática.

Conclusões

No pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar utilizando um planejamento fatorial 2^3 foram analisados os parâmetros: tempo, temperatura e a razão sólido/líquido, sendo que as que apresentaram elevada significância foram temperatura (60°C) e a interação entre temperatura (60°C) e o tempo (20 min.). Com a análise de variância constatou-se que a curvatura não foi significativa, sendo o modelo melhor representado como linear.

Com o objetivo de evitar a formação de fenol no pré-tratamento ácido, pois prejudicaria as etapas posteriores, comprovou-se que as condições físico-químicas do processo são muito importantes para evitar a formação desses compostos fenólicos e dependendo dessas condições, quanto mais açúcares gerados no pré-tratamento, menos fenol é produzido nas amostras e vice versa.

A determinação de celulose, hemicelulose e lignina do bagaço de cana-de-açúcar que foi submetido a um pré-tratamento ácido nas condições otimizadas dada pelo planejamento fatorial 2^3 na etapa anterior em comparação com o bagaço que não foi tratado, comprovou que o pré-tratamento tem por objetivo separar a matriz da lignina, reduzir à cristalinidade da celulose e aumentar à amorfa da mesma e solubilizar a hemicelulose, deixando a celulose mais acessível à hidrólise enzimática, apresentando 89,54 % em rendimento de celulose.

Referências

- BARROS N.B., et al. **Como fazer experimentos:** pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Unicamp, 2003.
- BRISTOTI, et al. **Diagnóstico da utilização e da oferta da biomassa vegetal no Rio Grande do Sul.** Núcleo de Energia, PROMEC, UFRGS, Porto Alegre, 1993.
- JOHANSSON, T. B. et al. **Renewable energy:** sources for fuels and electricity. Washington, DC: Island Press, 1993.
- KUJALA T. STS. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. **J Agric Food Chem**, n. 48, p. 5338-5342, 2000.
- KUMAR, P.; BARRETT D, M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, mar. 2009. Article ASAP DOI:10.1021/ie801542g.
- MORAIS, A. P. S., et al. **Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química.** Disponível em: <energia.fca.unesp.br/index.php/energia/article/download/784/324>. Acesso em: 01 out. 2013.
- NOVA Cana **Etanol celulósico:** o bagaço da cana-de-açúcar como matéria-prima

para a hidrólise, 2013. Disponível em: <<http://www.novacana.com/estudos/etanol-celulosico-bagaco-cana-de-acucar-como-materia-prima-para-hidrolise-241013/>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

PALONEN, H., et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pre-treated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65–72, 2004.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Campinas, SP: UNICAMP, 2010.

SUN, Y. et al., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Raleigh, v. 83, n. 1. p. 1-11, maio. 2002.

TAPPI. (Professional Organization dedicated to pulp and paper industries). Disponível em: <www.tappi.org>. Acesso em: 02 jul. 2014.

WEREKO-BROBBY, CHARLES Y. & HAGEN, ESSEL B. **Biomass conversion and technology**., UNESCO energy engineering series, John Wiley & Sons Ltd., England, 203 p., 1996