



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CAJU

GOMES^{*1}, S. D. L.; ALBUQUERQUE², T. L.; JUNIOR¹, J. E. M.; GONÇALVES³, L. R. B.;
M. V. P. ROCHA³

¹Aluno do DEQ/UFC ²Mestrando do DEQ/UFC ³Professor da DEQ/UFC
Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal Ceará
Endereço – Campus Universitário do Pici, Bloco 709, Fortaleza, CEP. CEP 60455-760, CE,
email: valponterocha@yahoo.com.br

RESUMO - O aproveitamento de resíduos agroindustriais tem ganhado cada vez mais relevância, devido à necessidade de descarte desse material rejeitado da indústria e pode ser utilizado para a produção de outros produtos. O bagaço do caju (BC), resíduo obtido em larga escala no nordeste brasileiro, possui baixo valor agregado. Dessa forma, diversos estudos que visam incorporação de valor a essa matéria-prima são desenvolvidos. Nesse trabalho, investigou-se a produção de etanol e xilitol por uma linhagem de *Candida tropicalis* a partir do hidrolisado enzimático do BC pré-tratado. A hidrólise enzimática foi realizada a fim de se obter açúcares monoméricos fermentescíveis como, xilose e glicose, a partir das cadeias de hemicelulose e celulose presentes na biomassa do BC. Para potencializar a ação enzimática, testaram-se no BC *in natura* dois pré-tratamentos alcalinos: com hidróxido de sódio (NaOH) e com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Determinou-se que a maior concentração de açúcares foi obtida na hidrólise enzimática do BC pré-tratado com H₂O₂ pelas enzimas xilanase, complexo celulase e hemicelulase, com as respectivas cargas de 6, 4 e 7 mg de proteína por grama de BC pré-tratado. A levedura *C. tropicalis* produziu xilitol e etanol utilizando os carboidratos obtidos da hidrólise enzimática do bagaço de caju.

Palavras chave: enzimas, bagaço de caju, etanol, xilitol.

INTRODUÇÃO

O conceito de biorrefinaria foi desenvolvido para ser um modelo ideal de processamento integral da biomassa lignocelulósica (Modenbach e Nokes, 2013). Essa biomassa é um dos recursos renováveis mais disponíveis e representa uma matéria-prima promissora de baixo custo, para a produção de biocombustíveis, bioenergia e

biomoléculas de valor agregado (Boussarsar et al., 2009).

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, estando esses constituintes distribuídos em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento (Fengel e Wegener, 1989).

A área ocupada com a cultura do caju no nordeste é de aproximadamente 700 mil hectares, com uma produção de cerca de 1.260.000.000 quilos de pedúnculo. Somente 10 a 20% da produção anual do pedúnculo de caju no nordeste brasileiro é beneficiado, com a fabricação do suco integral (70 mil toneladas/ano), principal produto da industrialização do pedunculo do caju. Com um desperdício de 80 a 90% da sua produção, a cultura do caju apresenta um baixo nível de aproveitamento do pedúnculo (Embrapa, 2013).

Quando o pedúnculo é industrialmente processado para a produção do suco, 40 % (m/m) de bagaço são produzidos e geralmente são rejeitados pelas indústrias locais (Correia *et al.*, 2012). A composição média do bagaço de caju (BC) *in natura* é, aproximadamente, $20,56 \pm 2,19$ % de celulose, $10,17 \pm 0,79$ % de hemicelulose e $35,26 \pm 0,90$ % de lignina (Correia *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2010).

A utilização do bagaço de caju, para produzir biocombustíveis de segunda geração, requer pelo menos três etapas principais: (1) o pré-tratamento, a fim de abrir a estrutura da biomassa lignocelulósica, liberando a cadeia polimérica de açúcares das suas ligações com a lignina, (2) a hidrólise enzimática que quebra os polímeros de açúcar em seus monômeros fermentáveis, e (3) a fermentação do hidrolisados enzimático em xilitol, etanol ou em outros produtos (Fitzpatrick *et al.*, 2010; Hendriks e Zeeman, 2009, Correia *et al.*, 2012).

Como a estrutura complexa da biomassa lignocelulósica limita o acesso enzimático, faz-se necessário a realização de um pré-tratamento da fibra, a fim de melhorarse a susceptibilidade da celulose e da hemicelulose a hidrólise enzimática (Boussarsar *et al.*, 2009). As técnicas de pré-tratamento antes da hidrólise enzimática podem incluir métodos físicos (explosão de vapor, radiação, congelamento, etc) e métodos químicos (ácidos, álcalis solvente orgânico, etc) (Mood *et al.*, 2013).

Após o pré-tratamento é realizado a hidrólise (ácida ou enzimática) para obter açúcares que serão utilizados na produção de outros produtos. Na hidrólise ácida há formação de produtos considerados tóxicos ao

crescimento microbiano como, ácido acético e fórmico (Albuquerque *et al.*, 2012; Rabelo, 2007). No entanto, na hidrólise enzimática não há formação destes inibidores (Modenbach e Nokes, 2013).

A hidrólise enzimática é tipicamente considerada o gargalo de toda a conversão no processo em termos de tempo e custo (Modenbach e Nokes, 2013) principalmente, pelo ainda alto custo de obtenção das enzimas, mesmo com os altos investimentos em pesquisas no ramo.

Nesse contexto, avaliaram-se dois pré-tratamentos alcalinos: com peróxido de hidrogênio (4,3% v/v) e hidróxido de sódio (4% m/v) no BC *in natura*. E após estudou-se a hidrólise enzimática do bagaço de caju para obter açúcares fermentescíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Pré-tratamento do Bagaço de Caju

O bagaço de caju *in natura*, cedido pela Indústria Sucos do Brasil S/A, foi submetido a dois pré-tratamentos, isoladamente. Parte sofreu tratamento por peróxido de hidrogênio 4,3 % (v/v) e pH 11,5, ajustado com NaOH 3 M a uma porcentagem de sólidos de 4% (m/v) a 250 rpm, 35 °C por 6 h. A outra parte do bagaço *in natura* sofreu tratamento por uma solução NaOH 4 % (m/v) a 121 °C por 30 min. Separou-se ao final do processo, por filtração à vácuo, o sólido que foi submetido a lavagens, com água destilada, para total remoção dos álcalis. Em seguida, foi seco em estufa a 50 °C por 24 h e selecionado entre 0,17 a 0,84 mm. Os sólidos resultantes foram caracterizados.

Caracterização do Bagaço de Caju pré-tratado

O bagaço de caju *in natura* após os dois pré-tratamentos foi caracterizado quanto à sua composição de celulose, hemicelulose e lignina segundo a metodologia de Gouveia *et al.* (2009), validada para a caracterização de bagaço de cana-de-açúcar.

Hidrólise Enzimática do Substrato Pré-tratado

A hidrólise foi realizada em tampão citrato de sódio 100 mM, fixando-se a quantidade de substrato em 3 g e o volume reacional em 50 ml. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL agitação de 150 rpm, a 45 °C por 48 h. As enzimas xilanase, complexo celulase e hemicelulase foram utilizadas com as respectivas cargas de 6, 4 e 7 mg de proteína por grama de BC pré-tratado (Gomes *et al.*, 2013). A cada 24 h, retirou-se uma alíquota da mistura para determinação de açúcares.

Produção de Xilitol e Etanol por *Candida tropicalis*

Uma linhagem de *Candida. Tropicalis* (GPBIO) utilizada nesse estudo, foi estocada em Agar YEPD inclinado (extrato de levedura, 10 g.L⁻¹; peptona, 20 g.L⁻¹; dextrose, 20 g.L⁻¹, e ágar, 20 g.L⁻¹). Para o preparo do inóculo, o micro-organismo foi cultivado em caldo YEPD por 24 h, em seguida centrifugou-se a quantidade de meio correspondente a 1,0 g.L⁻¹ e inoculou-se o precipitado celular no hidrolisado. O hidrolisado enzimático obtido da hidrólise do BC pré-tratado por H₂O₂ não recebeu nenhuma suplementação nutricional e foi esterilizado. A fermentação foi conduzida em agitador orbital a 30 °C e 200 rpm por 96 h.

Determinação da concentração de glicose, xilose, xilitol e etanol

Os açúcares (glicose e xilose) e os produtos (xilitol e etanol) foram analisados por cromatografia de alta performance (CLAE), utilizando um sistema CLAE Waters (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um índice de refração Waters 2414 detector. As concentrações de açúcares foram analisadas utilizando coluna Aminex HPX-87P, usando como efluente água ultrapura a uma taxa de fluxo de 0,5 ml.min⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizar os pré-tratamentos no bagaço de caju caracterizou-se o material pré-tratado. Os resultados da caracterização estão resumidos na Tabela 1. O pré-tratamento com H₂O₂(4,3% v/v) resultou em uma fibra com a seguinte composição 42,91 ± 2,68% de

celulose, 16,20 ± 1,13% de hemicelulose e 8,17 ± 2,68% de lignina. Os valores obtidos neste trabalho são bem semelhantes aos valores reportados por Correia *et al.*, (2012).

Já o pré-tratamento com NaOH (4% m/v) resultou em uma fibra com a seguinte composição 16,21 ± 2,04% de celulose, 11,48 ± 1,53% de hemicelulose e 30,27 ± 0,27% de lignina.

Tabela 1 – Caracterização do BC *in natura* e após o pré-tratamento com H₂O₂ e NaOH.

Matéria-prima	Extraíveis (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
<i>In natura</i>	7,79 ± 0,60	20,56 ± 2,19	10,17 ± 0,79	35,26 ± 0,90	1,62 ± 0,07
H ₂ O ₂ 4,3%	5,08 ± 0,33	42,91 ± 2,68	16,20 ± 1,13	8,17 ± 2,68	16,72 ± 1,09
NaOH 4%	5,76 ± 0,34	16,21 ± 2,04	11,48 ± 1,53	30,27 ± 0,27	11,13 ± 0,05

Os dois pré-tratamentos alcalinos, com H₂O₂ e NaOH, degradaram a cadeia de lignina presente no BC, entretanto o pré-tratamento com H₂O₂ mostrou-se mais eficiente na remoção do polímero, em relação ao outro testado, pois o BC pré-tratado com NaOH apresentou uma maior porcentagem de lignina (30,27 ± 0,27 %) em relação ao BC pré-tratado por H₂O₂ (8,17 ± 2,68 %).

O melhor resultado do pré-tratamento realizado com H₂O₂ explica-se pelo fato do principal alvo do ataque químico na reação ser a lignina e não as demais cadeias (Rabelo, 2007).

A fração sólida, resultante dos pré-tratamentos realizados, que apresentou maior valor percentual de hemicelulose (16,20 ± 1,13%), cadeia de interesse no presente trabalho por ser precursora do açúcar de interesse que é a xilose, foi aquela exposta a ação do H₂O₂ 4,3% (v/v).

O tratamento alcalino é reportado na literatura pela sua capacidade de solubilizar a lignina, um constituinte da fibra que dificulta a ação enzimática impedindo que o sítio ativo da enzima se ligue ao substrato (Alvira *et al.*, 2010). E os pré-tratamentos oxidativos têm sido usados para dissolver os componentes da matriz ligocelulósica e acelerar a hidrólise

enzimática (Rabelo, 2007), o que torna o H_2O_2 um pré-tratamento eficiente na deslignificação da biomassa é a adição do NaOH, durante a correção do pH da solução, que provoca a formação do ânion hidroperóxido (HO_2^-) principal espécie ativa do peróxido (Rabelo, 2007). Em condições alcalinas, o peróxido é instável e se decompõe em radicais hidroxil (OH^\cdot) e superóxido (O_2^\cdot) que oxidam a lignina, quebrando algumas ligações.

O tratamento com NaOH, em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento, utiliza temperaturas mais baixas e apresenta uma maior recuperação de açúcares, no entanto o tratamento com uma grande quantidade de licor negro torna-se um desafio com NaOH (Yu *et al.*, 2013). Os maiores inconvenientes do método são a necessidade de neutralização da suspensão resultante do pré-tratamento (Mood *et al.*, 2013).

Após o pré-tratamento, realizou-se a hidrólise enzimática nos sólidos pré-tratados e os resultados da hidrólise enzimática estão apresentados nas Figuras 1 e 2. O maior rendimento de glicose ($19,92 \pm 0,63 \text{ g.L}^{-1}$) e de xilose ($8,97 \pm 0,64 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidos em, respectivamente, 24 h e 48 h de hidrólise para o BC pré-tratado por H_2O_2 . Já para o BC pré-tratado por NaOH, as maiores concentrações de glicose e xilose foram de $12,64 \pm 0,50 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,87 \pm 0,20 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, com 72 h de hidrólise. Observou-se ainda que a xilose só foi liberada após 24 horas de hidrólise, supostamente pela baixa carga de enzimas utilizadas nos experimentos.

O substrato pré-tratado por H_2O_2 resultou em uma maior concentração de açúcares na etapa de hidrólise enzimática, possivelmente, pela remoção da lignina ter sido mais efetiva com este pré-tratamento quando comparado ao outro realizado.

A ação das três enzimas foi importante na hidrólise enzimática do BC, pois tornou mais efetiva a quebra dos polímeros, enquanto que a maior quantidade usada de hemicelulase ajudou a direcionar a hidrólise para obtenção do açúcar de interesse que é a xilose.

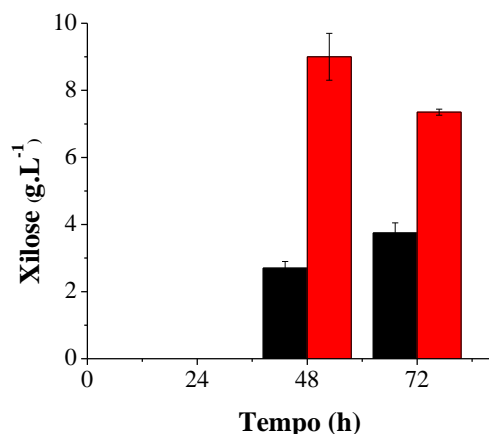


Figura 1- Concentração de xilose obtida na hidrólise enzimática a 45 °C e 150 rpm do BC pré-tratado com NaOH (■) e com H_2O_2 (■).

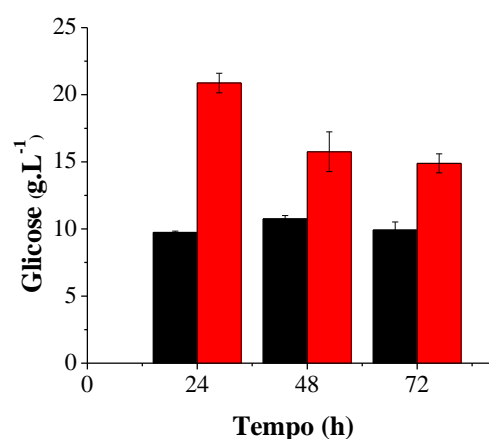


Figura 2 - Concentração de glicose obtida na hidrólise enzimática a 45 °C e 150 rpm do BC pré-tratado com NaOH (■) e com H_2O_2 (■).

Mesmo que a hemicelulose seja um polissacarídeo complexo, sua degradação enzimática é bem elucidada. Ocorre, de acordo com Aro (2004), uma ação combinada de endo-enzimas clivando internamente a cadeia principal e de exo-enzimas que liberam açúcares monoméricos e enzimas auxiliares que quebram lateralmente a cadeia de polímeros ou oligossacarídeos, levando à liberação de vários mono e dissacarídeos. Já a degradação da celulose ocorre a partir das celulasas que são um complexo de enzimas constituídos de três enzimas as endoglucanases (EG), exoglucanases e β -glicosidase. As endoglucanases atacam aleatoriamente a cadeia de celulose para formar glicose, celobiose e celotriose. As celobiohidrolases (exoglucanases) fracionam a cadeia em dímeros de glicose (celobiose). Outra enzima,

β -glicosidase, possui função de conversão da molécula de celobiose em duas moléculas de glicose (Correia *et al.*, 2012; Keshwani, 2009).

Como o hidrolisado do bagaço de caju pré-tratado com peróxido de hidrogênio apresentou maiores concentrações de xilose e glicose, selecionou-se esse líquido para avaliar a produção de xilitol e etanol.

A levedura *Candida tropicalis* foi capaz de metabolizar os carboidratos e produzir 6,8 g/L de xilitol e 6,0 g/L de etanol com 96 h de cultivo. Então, o hidrolisado enzimático obtido do bagaço de caju pré-tratado com H₂O₂ pode ser utilizado para produzir xilitol e etanol.

CONCLUSÃO

O pré-tratamento que resultou em maior redução da lignina (8,17 \pm 2,68%) foi aquele no qual o bagaço de caju sofreu ação do peróxido de hidrogênio (4,3% m/v) e no mesmo obteve-se a maior concentração de açúcares após a hidrólise enzimática, com concentrações de glicose e xilose de, respectivamente, 19,92 \pm 0,63 g.L⁻¹ e 8,97 \pm 0,64 g.L⁻¹. A levedura *C. tropicalis* produziu xilitol e etanol utilizando os carboidratos obtidos da hidrólise enzimática do bagaço de caju.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. L., GOMES, S. D. L., JUNIOR, J. E. M., GONÇALVES, L. R. B., SILVA JR, J. I., ROCHA M, V, P. (2013), “Avaliação da influência de tratamentos de destoxificação do hidrolisado de bagaço de caju na produção de xilitol por *Candida tropicalis*”. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Foz de Iguaçu.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. (2010), Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4851-4861.

ARO, N., PAKULA, T., PENTTILA, M. (2004), Transcriptional regulation of plant

cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 719-739.

BOUSSARSAR, H., ROGÉ, B., MATHLOUTHI, M. (2009), Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology*, 100, 6537-6542.

CORREIA, J., ROCHA, M., GONÇALVES, L. (2012), “Efeito da combinação de enzimas na hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado com peróxido de hidrogênio para produção de etanol”. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, Búzios.

EMBRAPA site:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/caju/arvore/CONT000fr3sbpu402wyiv80084arlaeog5af.html> acesso em novembro de 2013. Autor : Raimundo Marcelino da Silva Neto.

FENGEL, D., WEGENER, G. (1989), *Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions*, 1st ed., Walter de Gruyter: Berlin, p. 106-109.

FITZPATRICK, M., CHAMPAGNE, P., CUNNINGHAM, M. F., WHITNEY, R. A. (2010), A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101, 8915–8922.

GOMES, S. D. L., ALBUQUERQUE, T. L., JUNIOR, J. E. M., GONÇALVES, L. R. B., ROCHA, V. P. (2013), “Estudo da hidrólise enzimática do bagaço de caju visando a obtenção de xilose”. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Foz de Iguaçu.

GOUVEIA, E. R., DO NASCIMENTO R, T., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. J. M. (2009), Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, 6, 32, 1500-1503.

| HENDRIKS, A. T., ZEEMAN, G. (2009), Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10–18.

KESHWANI, D. R. (2009), Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Tese (Doutorado). Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América.

| MODENBACH, A, A., NOKES, S, E. (2013), Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings- A review. *Biomass and Bioenergy*, 56, 526-544.

MOOD, S, H., GOLFESHAN, A, H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G, S., NAJAFI, G, H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. (2013), Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.

RABELO, S.C. (2007), Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, área de concentração: Desenvolvimento de processos químicos, Campinas/SP, Brasil, 150p.

ROCHA, M. V. P. (2010), Produção de Bioetanol a partir de Pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por Fermentação Submersa. Tese de Doutorado -UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, Área de Concentração: Engenharia de Processos, Natal/RN, Brasil, 162p.

YU, Q., ZHUANG, X., YUAN, Z., QI, W., WANG, W., WANG, Q., TAN, X. (2013), Pretreatment of sugarcane bagasse with liquid hot water and aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, 144, 210-215.