

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

R. F. MOREIRA², O. ALMEIDA¹, N. T. MACHADO², E. M.S. RODRIGUES¹,
A. M. J. C. NETO³, M. A. CORDEIRO², B. R. CHAGAS¹, E. L. G. TENORO¹, M. L. F.
TEIXEIRA³, P. R. VEIGA DA SILVA³

¹ Universidade Federal Do Pará/Instituto de Ciências Exatas e Naturais/Faculdade de Química

² Universidade Federal Do Pará/Instituto de Tecnologia/Faculdade de Engenharia Química

³ Universidade Federal Do Pará/Instituto de Ciências Exatas e Naturais/Faculdade de Física

E-mail para contato: rosiane03@hotmail.com

RESUMO –O aproveitamento de recursos renováveis representa uma importante atividade econômica no cenário global de desenvolvimento tecnológico, uma vez que a exploração adequada de recursos naturais com potencial energético, como fonte de energia e de insumos para a indústria é um dos principais fatores de ascensão econômica atual dos países em desenvolvimento. A utilização de enzimas em processos fermentativos de resíduos celulósicos tem conquistado um lugar de destaque neste contexto. O objetivo principal deste trabalho foi em avaliar a utilização da combinação das enzimas comerciais Xylanase (NS22083), β -glucanase Xylanase (NS22002) e β -glucanase (NS22118) na proporção de 0,6:0,3:1,7, em massa, na produção de glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamento alcalino com solução de hidróxido de sódio (6% m/v) em quatro temperaturas, ambiente (28,5°C), a 70, a 90 °C (SPAC, PAC70 e PAC90), durante 24 horas e a 120 °C (PAC120), durante 1 hora, seguido de hidrólise enzimática para a conversão de celulose em glicose. As fermentações ocorreram a 50 ± 2 °C. Os rendimentos no processo de hidrólise enzimática foram de 23,87% (SPAC), 45,85% (PAC70), 51,99% (PAC90) e 90,85% (PAC120). Os resultados obtidos sugerem que as taxas de conversão dos resíduos celulósicos em glicose são fortemente dependentes da temperatura no processo de polpação alcalina.

1. INTRODUÇÃO

O bagaço de cana é usado atualmente como a principal fonte de energia necessária em usinas de açúcar e destilarias de álcool e também para a geração de energia elétrica, etc. (Rocha *et. al.*, 2011). Ele é um material lignocelulósico mais estudado para a produção de etanol de segunda geração sem necessidade de incrementos na área de plantio (Albarelli, 2013). Substâncias lignocelulósicas, tais como palhas de cereais estão disponíveis em grandes quantidades e pode ser facilmente fermentado para produzir o etanol, que pode ser usado tanto como um combustível para motores em forma pura ou como um componente de mistura de gasolina (Singhet. *al.*, 2014).

No Brasil, o resíduo mais abundante é o bagaço de cana de açúcar que é constituído principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de produtos extraíveis e

sais minerais (Albarelli, 2013; Dias, 2011; Rocha, *et al.*, 2011). A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas e sua composição pode variar em função do tipo de cana, do solo, do clima, da disponibilidade de água e da época na safra, dentre outros aspectos (De Souza, 2006).

Para a produção de etanol é requerida algumas etapas principais como: pré-tratamento da biomassa que podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto; hidrólise enzimática da celulose para obtenção de monossacarídeos onde se tem altos rendimentos fermentescíveis sem formação de inibidores e à não-degradação da glicose que é realizada a temperaturas brandas, em torno de 50°C e pH de 4,8 para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático; a fermentação e destilação o bagaço seguiria os mesmos processos na produção de etanol convencional (Albarelli, 2013; Dos Santos, 2009 Silva, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização da combinação das enzimas Xylanase (NS22083), β -glucanase Xylanase (NS22002) e β -glucanase (NS22118) na proporção de 0,6:0,3:1,7 (m/m) na produção de glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar, após pré-tratamento alcalino com solução de hidróxido de sódio (6% m/v) em quatro temperaturas, ambiente (28,5 °C), a 70, a 90 °C (SPAC, PAC70 e PAC90) e a 120 °C (PAC120) no processo de hidrólise enzimática.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Bagaço de Cana de Açúcar

As amostras do bagaço de cana de açúcar foram obtidas nas feiras livres de Belém-PA no mês de Outubro de 2013. A preparação do bagaço consistiu de lavagem, seguida de secagem à temperatura ambiente durante 72 h, secagem em estufa com circulação de ar (MARCONI-035) a 50 ± 2 °C, até atingir peso constante.

O material seco foi triturado em moinho de facas (WILLEY-BT 602) e acondicionado em sacos plásticos. O tamanho médio das partículas do bagaço utilizado foi de 6 a 50 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro de um filamento único sendo 3 mm o diâmetro do aglomerado. Essas medidas foram realizadas utilizando um paquímetro Mitutoyo (0 a 250 mm).

Os teores de umidade e de cinzas, foram determinadas conforme a *Association of Official Analytical Chemists*, métodos nº 940.26 (1984) e nº 964.22 (2000). O teor de lignina foi determinado pela adaptação do método de Klasson modificado por Rocha *et al.*, 1997.

2.3. Polpação Alcalina

O processo de polpação foi realizado em um Erlenmeyer (3L), contendo 150 g do bagaço de cana-de-açúcar seco e moído, seguido da adição de solução de NaOH (2 L) a 6% (m/v). Foram preparadas quatro polpas do bagaço nas mesmas condições, sendo que a primeira (SPAC), polpação realizada em temperatura ambiente (28,5 °C), a segunda PAC70) e a terceira (PAC90) foram submetidas a aquecimento em estufa a 70 e 90 °C, durante 24 horas. A quarta foi auto clavada a 120 °C durante 60 minutos.

Após este período, todas as soluções foram filtradas e os resíduos, lavados com água corrente

e neutralizados com ácido sulfúrico 1:8 (v/v), posteriormente, os resíduos foram submetidos a secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os rendimentos são expressos pela razão entre a massa de resíduo seco em relação à massa da amostra seca.

2.4. Atividade e Hidrólise Enzimática

As enzimas comerciais empregadas neste trabalho corresponderam às preparações Xylanase (NS22083), β -glucanase Xylanase (NS22002) e β -glucanase (NS22118) (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), cedidas pela Novozymes Latin América (Araucária, PR).

Para a determinação da atividade celulósica total das enzimas, utilizou-se o método de açúcares redutores (AR), baseada na metodologia proposta por Ghose (1987). Para os ensaios de hidrólise tomou-se como base as relações do complexo enzimático em massa de 0,6:0,3:1,7 (xylanase: β -glucanase:xylanase: β -glucanase). Foram utilizados 10 g do bagaço pré-tratados (SPAC, PAC70, PAC90 e PAC120) como fonte de carbono. Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 4,8, em seguida, foi adicionado a mistura do complexo enzimático na relação 1:2,6 (substrato:enzima).

A incubação foi realizada em estufa microbiológica a 50 ± 3 °C com agitação periódica. Após o tempo de incubação (7 dias) foi realizada a inativação enzimática com o aumento da temperatura para 90 °C por 1 hora. As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), mediante a construção da curva padrão de glicose nas concentrações de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹. A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (BIOSPECTRO, Faixa de 340-1000 nm, Modelo SP-12) a 540 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de umidade e o rendimento do bagaço em base seca foram 88,37% e 11,63%, respectivamente. Os teores de cinzas para o bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento (SPAC) e nos resíduos obtidos após a polpação alcalina (PAC70, PAC90 e PAC120), foram de $2,05 \pm 0,027$, $0,62 \pm 0,013\%$, $0,48 \pm 0,007$ e $0,18 \pm 0,003$. Os altos teores de lignina no bagaço de cana sem pré-tratamento (SPAC) ($20,08 \pm 0,006\%$) e do resíduo pré-tratado PAC70 ($13,03 \pm 0,009\%$), mostraram-se menos susceptíveis ao pré-tratamento, e consequentemente, baixa conversão por vias fermentativas.

Comparativamente ao bagaço de cana, os baixos teores de cinzas presentes nos resíduos (PAC70, PAC90 e PAC120) favorecem o potencial energético no processo de fermentação, e não acarreta um aumento na capacidade tamponante da matéria-prima, levando a uma neutralização parcial dos catalisadores ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos constituintes da biomassa.

A determinação do tempo ideal de fermentação e de incubação usando os resíduos do bagaço de cana de açúcar pré-tratados (PAC70, PAC90 e PAC120) foi realizado mediante a avaliação da atividade enzimática (Figura 1).

Os resultados mais expressivos foram obtidos em um tempo de 120 h, foram de 171,89 (SPAC), 330,13 (PAC70) e 140,37 (PAC90) e 245,30 (PAC120) U.mL⁻¹, respectivamente.

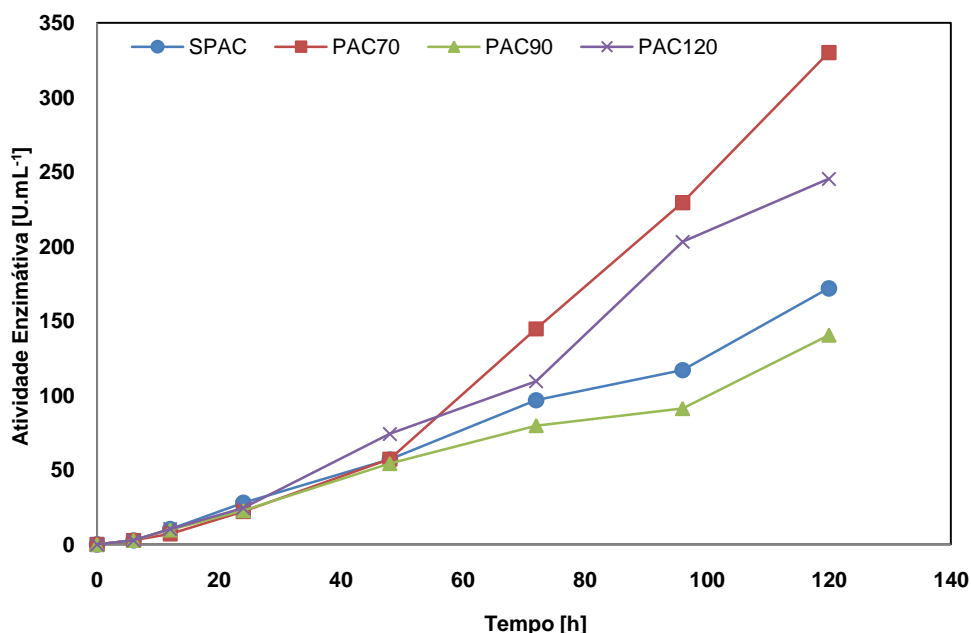


Figura 1. Atividade enzimática.

Os altos teores de lignina no bagaço de cana sem pré-tratamento (SPAC) ($20,86 \pm 0,006\%$) e do resíduo pré-tratado PAC70 ($13,03 \pm 0,009\%$), mostraram-se menos susceptíveis ao pré-tratamento e consequentemente baixa conversão por vias fermentativas.

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de muitos fatores que envolvem desde as características do substrato até a natureza do sistema enzimático utilizado. Os fatores relacionados às enzimas incluem a inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de produto final (glucose e celobiose), adsorção irreversível das enzimas sobre o substrato, desnaturação enzimática por exposição excessiva à temperatura e agitação necessárias ao processo. Já os fatores relacionados ao substrato correspondem ao teor de lignina, porosidade, cristalinidade das fibras de celulose e o teor de hemiceluloses.

Em paralelo aos resultados de atividade enzimática foram determinados os teores de açúcares redutores (AR) para os resíduos do bagaço de cana de açúcar pré-tratados. Os resultados obtidos indicam uma variação dos teores de AR's, no final do processo de hidrólise enzimático, os teores médios de AR's para os resíduos pré-tratados (SPAC, PAC70, PAC90 e PAC120) foram de 23,87, 45,85, 51,99 e 90,85%, respectivamente, conforme Figura 2.

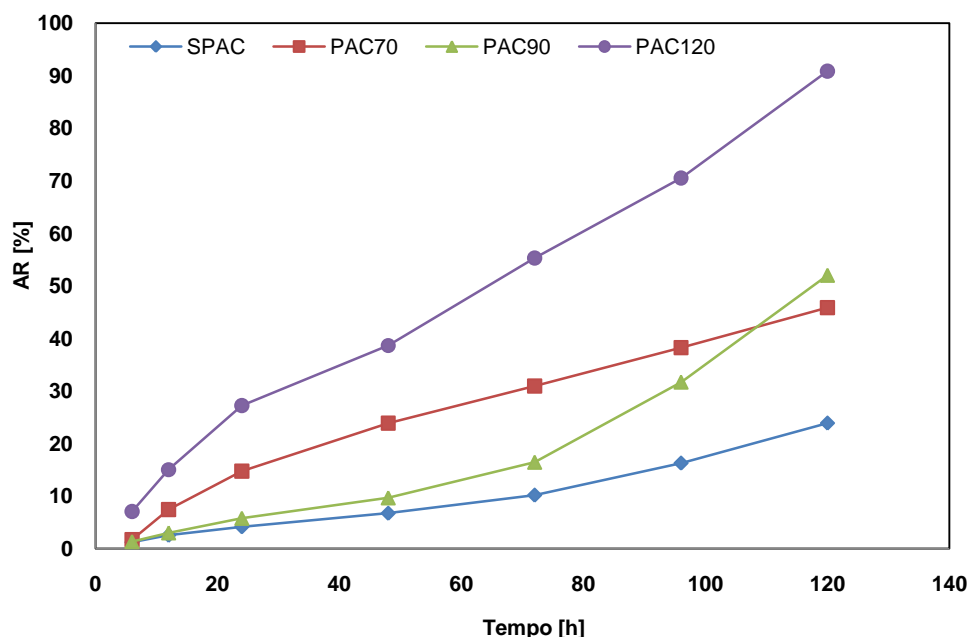


Figura 1. Teor de açúcares redutores no processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

5. CONCLUSÃO

O bagaço de cana-de-açúcar submetido a caracterização via umidade, cinzas, ART, polpação alcalina, lignina, atividade enzimática e fermentação alcoólica apresentou os melhores resultados quando submetido a pré-tratamento a 120°C.

Nesta temperatura o substrato insolúvel PAC120 apresentou teores de lignina de $0,18 \pm 0,003\%$, consequentemente apresentando a melhor taxa de conversão de resíduos celulósico em glicose (90,85%) e rendimento de 85,35% no processo de fermentação alcoólica.

Os resultados obtidos permitem afirmar que as taxas de conversão dos resíduos celulósicos em glicose são fortemente dependentes da temperatura, quando utilizada a proporção de substrato-enzima de 0,6:0,3:1,7, respectivamente para a mistura do complexo enzimático Xylanase (NS22083), β -glucanase Xylanase (NS22002) e β -glucanase (NS22118).

6. REFERÊNCIAS

ALBARELLI, J. Q. **Produção de Açúcar e Etanol de Primeira e Segunda Geração: Simulação, Integração Energética e Análise Econômica**- Tese de Doutorado - Campinas, 2013.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Edited by Patricia Cunniff .17th ed., v.2., cap.37, 42 e 44, 2000.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14th ed. Arlington: Sidney Willians, 1984.

DE ANDRADE, R. R. **Modelagem Cinética do Processo de Produção de Etanol a Partir de Hidrolisado Enzimático de Bagaço de Cana-de-açúcar Concentrado com Melaço Considerando Reciclo de Células** - Tese de Doutorado- Campinas, 2012.

DE SOUZA, C. S. **Derivatização Química e Caracterização de uma Lignina do Bagaço da Cana-de-açúcar** - Dissertação – Uberlândia-MG, 2006.

DIAS, M. O. S. **Desenvolvimento e Otimização de Processos de Produção de Etanol de Primeira e Segunda Geração e Eletricidade a partir da Cana-de-açúcar** - Tese de Doutorado- Campinas, 2011.

DOS SANTOS, J. R. A., GOUVEIA, E. R. **Produção de Bioetanol de Bagaço de Cana-de-açúcar**- Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.11, n.1, p.27-33, ISSN 1517-8595, 2009.

GHOSE, T. K. International Union of Pure and Applied Chemistry- **Measurement of Cellulase Activities**. v.59, n.2, p.257-268, 1987.

MALDONADE, I. R., CARVAHO, P. G. B., FERREIRA, N. A. **Protocolo para a Determinação de Açúcares Totais em Hortaliças pelo Método de DNS** - ISSN 1414.9850, Março, 2013.

ROCHA, G. J. M., MARTIN, C., SOARES, I. B., MAIOR, A. M. S., BAUDEL, H. M., DE ABREU, C. A. M. **Dilutemixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production**- Biomass and Bioenergy, v.35, p.663- 670, 2011.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S; ARAÚJO, G. T.; *Resumos do 5th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components*, Paraná, Brasil, 1997.

SILVA, O. G. **Produção de Etanol com a Utilização do Bagaço de Cana-de-açúcar**- Monografia - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba - Curso de Tecnologia de Biocombustíveis - Araçatuba, 2010.

SINGH, R., SHUKLA, A., TIWARI, S., SRIVASTAVA; M. **A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential-** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.32, p.713-728, 2014.