

INFLUÊNCIA DOS CONTAMINANTES NO RENDIMENTO FERMENTATIVO NA PRODUÇÃO DO BIOETANOL

M. A. GOMES¹, J. H. S. OLIVEIRA¹, C. C. AMPARO¹, R. M. R. G. ALMEIDA¹

¹ Universidade Federal de Alagoas, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química
E-mail: cynha06@hotmail.com

RESUMO – As crescentes necessidades de energia da população mundial têm motivado uma corrida sem precedentes à produção de combustíveis renováveis. Nesse contexto, pesquisas vêm sendo realizadas para transformar materiais lignocelulósicos em etanol. Se tratando da matriz lignocelulósica é imprescindível à realização de um pré-tratamento, disponibilizando os açúcares fermentescíveis para produção bioetanol. Durante o processo de pré-tratamento ocorre à geração de inibidores potenciais. O estudo avaliou o rendimento fermentativo na presença desses contaminantes através de um planejamento experimental fatorial 2³, com intuito de fornecer subsídios para a otimização do processo de geração do bioetanol. A levedura utilizada no processo fermentativo foi *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados apresentaram que o ponto mínimo de ácido acético e de furfural, e o ponto máximo de fermento, obteve maior rendimento reacional, comprovando a interferência do ácido acético e do furfural no meio reacional.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, aproximadamente 350 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos são gerados ao ano, essa biomassa pode ser encontrada tanto em plantas lenhosas, como em resíduos agrícolas, florestais e até mesmo nos resíduos urbanos e industriais, sendo uma fonte abundante, e como tal, uma matéria-prima atrativa e de menor custo para obtenção de biocombustíveis. (Pereira, 2007; Taherzadeh *et al.*, 2007)

Dentre os materiais disponíveis, os resíduos agrícolas são uma das melhores opções para a produção de etanol. A produção do etanol lignocelulósico, ou etanol de segunda geração, está em constante desenvolvimento, onde a partir da hidrólise da celulose e da hemicelulose os monômeros de açúcar tornam-se disponíveis para a fermentação. Entretanto, a liberação dos açúcares monoméricos dessa biomassa para uso em processos fermentativos requer um tratamento adequado tem sido mostrado (Mosier *et al.* 2005).

Segundo Zhao *et al.* (2011), durante o pré-tratamento da biomassa para produção de etanol 2G pode ocorrer liberação de monômeros de açúcares e de substâncias com potencial inibitório na fermentação, como ácido acético e furfural. Todos esses compostos tóxicos afetam a fisiologia da levedura resultando no decréscimo da viabilidade celular, rendimento de etanol e produtividade tal como relatado (Zhang *et al.* 2013).

Segundo dados da Renewable Fuels Association (2010), a produção de etanol combustível está em torno de 75 bilhões de litros por ano, e a maior parte deste total, cerca de 95%, é produzida pela fermentação de determinados açúcares pela levedura *S. cerevisiae*, o que reforça a necessidade de estudos sobre a influência de parâmetros que podem interferir no processo fermentativo.

O trabalho avaliou o rendimento fermentativo na presença desses contaminantes através de um planejamento experimental fatorial 2^3 , com intuito de fornecer subsídios para a otimização do processo de geração do bioetanol. Para tal, foram inicialmente realizados ensaios de fermentação em meio sintético YPD (Yeast Peptone Dextrose), utilizando a levedura *S. cerevisiae* em níveis máximos e mínimos determinados com base em dados de Wolf (2011); níveis máximos e mínimos de ácido acético determinado com base nos valores obtidos experimentalmente segundo Santos (2014); e furfural com base Taherzadeh *et al.* (2007). Em seguida, as informações obtidas foram trabalhadas no programa Statistic sendo validadas pelos cálculos realizados conforme Bruns *et al.* (2007).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o preparo do inóculo nos ensaios de fermentação utilizou-se o meio de cultura YPD (Yeast Peptone Dextrose), com a seguinte composição: 10 g/L de extrato de levedura; 20 g/L de glicose; 20 g/L de peptona bacteriológica, tendo o pH ajustado para 5,0.

Como microrganismo utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* comercial, na forma de fermento seco. Ao meio de cultura foram adicionados os principais contaminantes gerados no processo de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos: furfural e ácido acético, em diferentes proporções para verificar a partir de qual concentração de qual contaminante influencia no rendimento fermentativo, como mostra a equação 1:

$$\% \text{ RENDIMENTO} = \frac{\text{Brix inicial} - \text{Brix final}}{\text{Brix inicial}} \times 100 \quad (1)$$

A escala de Brix foi utilizada para determinar a concentração de açúcar no meio fermentativo, aplicando o método de refratometria, utilizando refratômetro portátil para a leitura, efetuando a devida correção de temperatura.

Com o objetivo de otimizar os rendimento do processo de bioetanol e assim aprimorar as metodologias analíticas, um planejamento experimental 2^3 completo foi realizado verificando dentre as variáveis e níveis estudados os parâmetros relevantes. As amostras foram realizadas em duplicata, e as variáveis estudadas apresentando seus respectivos máximos e mínimos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: variáveis do planejamento experimental 2³

Fatores	(-)	(+)
1: Fermento (g)	0,2	1,0
2: Ácido Acético (%)	1,0	5,0
3: Furfural (g/L)	1,0	4,0

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A matriz de planejamento foi montada conforme a Tabela 2, com base no planejamento experimental 2³ completo. A resposta obtida é em rendimento a partir do Brix, com o Brix inicial 8,0 medido sem a presença de nenhum dos parâmetros.

 Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial 2³

Ensaio	1	2	3	Rendimento (%)	Média
1	-	-	-	30	30
2	+	-	-	40	45
3	-	+	-	17,5	15
4	+	+	-	12,5	12,5
5	-	-	+	22,5	22,5
6	+	-	+	30	30
7	-	+	+	12,5	10
8	+	+	+	5	0

Com os resultados apresentados pode-se observar que o maior rendimento reacional foi no ensaio 2, onde se encontram os maiores níveis de fermento e os menores níveis de inibidores.

Em posse dos resultados foi possível determinar os efeitos principais e de interação para o planejamento realizado, a Tabela 3 mostra os resultados para os efeitos e os seus respectivos erros padrões.

Tabela 3: Efeitos e combinação linear das interações

Media Global	20,94±0,49	Significativo
Efeitos Principais		
1 (Fermento)	1,88±0,99	Não Significativo
2 (Ácido Acético)	-20,62±0,99	Significativo
3 (Furfural)	-8,75±0,99	Significativo
Efeitos de Interação		
12	-8,12±0,99	Significativo
13	-2,5±0,99	Significativo
23	1,25±0,99	Não Significativo
Efeitos de Interação		
123	0,0±0,99	Não Significativo

No tratamento dos resultados, foram utilizadas equações de cálculo dos parâmetros estatísticos com base em Bruns *et al.* (2007). O modelo estatístico usado para descrever as respostas do planejamento foi formulado em termos dos efeitos por unidade de variação dos fatores.

$$y(x_1, x_2, x_3) = 20,94 - 10,31x_2 - 4,38x_3 - 4,06x_1x_2 - 1,25x_1x_3 \quad (2)$$

Foi possível observar que o aumento da concentração de ácido acético causou uma diminuição no rendimento reacional, o mesmo acontece com o furfural. Isso acontece porque segundo Freitas (2011), a adição de concentrações crescentes de ácido acético afeta o crescimento da levedura, provocando um aumento da duração da fase de latência e da fase exponencial, com redução do valor da taxa específica de crescimento. No caso do furfural, Taherzadh *et al.* (2007) relata que o crescimento de *S. cerevisiae* em meio sintético é inibido em 89% quando em presença de 4 g/L de furfural, comprovando assim o efeito da diminuição do rendimento a medida que avaliamos os níveis máximos.

Já nos efeitos de interação entre ambos não se faz significativa no rendimento, na faixa estudada. Para a verificação da modelagem, é necessário adequá-lo a um modelo linear, quadrático ou até mesmo cúbico. Iniciando, pelo teste do modelo linear, onde se faz necessário a análise de variância (ANOVA), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Análise de Variância (ANOVA)

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g. l.	Média Quadrática
Regressão	2.296,88	4	574,22
Resíduos	51,56	11	4,69
Falta de Ajuste	20,31	3	6,77
Erro puro	31,25	8	3,91
Total	2.400,00	15	

% de variação explicada: 96%

% máxima de variação explicável: 99%

Segundo Box *et al.* (1973), o teste F foi realizado onde se leva em conta os graus de liberdade apropriados, o mesmo é utilizado para realizar previsões no sentido da significância da equação obtida. A razão entre a média quadrática da regressão e a do resíduo deve ser maior que o ponto de distribuição F para que se tenha um maior grau de confiabilidade, se possível, dez vezes maior. Assim, $MQR/MQr = 122,43 > (10 \times F_{4,11})$; $F_{4,11} = 3,36$ (para 95% de confiança), mostra que temos um ajuste altamente significativo. A Figura 1, nos mostra o ajuste realizado ao modelo linear, assim como os valores mostrados na ANOVA.

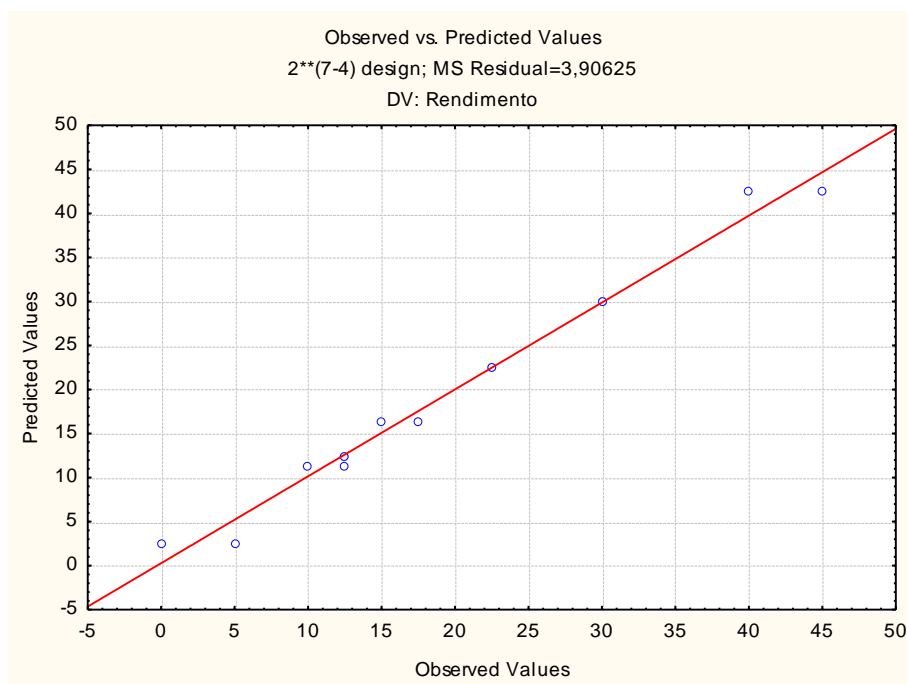


Figura 1: Ajuste ao Modelo Linear.

A superfície de resposta foi gerada para o modelo linear, apresentada na Figura 2, que se adequou ao sistema, sendo desnecessária a busca por outro modelo.

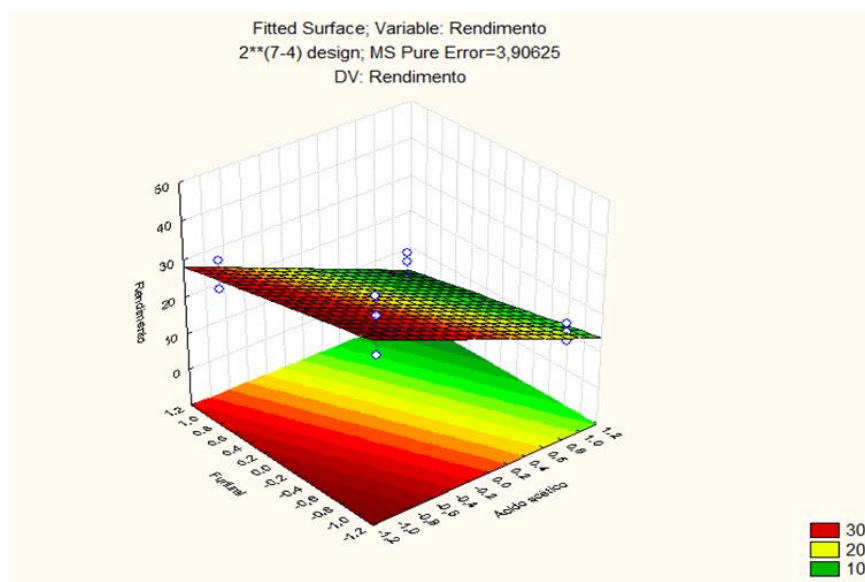


Figura 2: Superfície de Resposta.

Através da superfície de resposta confirmamos o que foi apresentado, à medida que os fatores significativos, ácido acético e furfural, variam de um nível maior para um nível menor

observamos um aumento significativo no rendimento reacional.

De acordo com Talcott *et al.* (1999), à presença destes compostos tóxicos, quando o hidrolisado hemicelulósico é utilizado diretamente em processos de bioconversão, sem serem submetidos a um tratamento prévio de destoxificação, ocorre diminuição na eficiência do processo fermentativo que atinge baixo rendimento e produtividade. Logo, o resultado obtido é totalmente aceitável uma vez que diminuiu o rendimento reacional à medida que se atingia as maiores concentrações desses inibidores.

4. CONCLUSÃO

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitem concluir que o rendimento reacional aumenta à medida que se diminui a concentração dos inibidores, dentre os estudados, ácido acético e furfural avaliados como efeito principal. Quando se analisa sua interação, não há um efeito significativo dentro da faixa avaliada. A quantidade de fermento estudada como parâmetro principal não oferece alteração ao rendimento da reação. Os maiores rendimentos foram obtidos no ponto de máximo de fermento (1,0 g), mínimo de ácido acético (1,0%) e mínimo de furfural (1,0 g/L) com média de 42,5%.

Os estudos sobre os efeitos e das combinações lineares do planejamento fatorial 2^3 , apresentou uma estimativa do aumento do rendimento à medida que se diminuía 20,62% de ácido acético, da mesma forma com a diminuição 8,75% de furfural. Já nos efeitos interativos, de ácido acético e furfural assim como fermento, ácido acético e furfural, os valores obtidos na base de cálculo não geraram significância como interferência no rendimento, isso dentro dos pontos máximos e mínimos estudados. O estudo realizado ressalta a necessidade de uma etapa de destoxificação, para o material lignocelulósico, visto que a presença desses inibidores causa uma baixa na produtividade.

5. REFERÊNCIAS

- BOX, G. E. P.; WETZ, J. *Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function*. University of Wisconsin Technical Report 9, 1973;
- BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.. *Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Editora Unicamp, 3º edição, 2007.
- FREITAS, C. S. S. *Utilização da citometria de fluxo multiparamétrica na monitorização da resposta fisiológica da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em presença de ácido acético na produção de bioetanol*. 76p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia de Sistemas Bioenergéticos, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bio. Tech.*, v.96, p.673-686, 2005.
- PEREIRA Jr., N. *Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria*, 2007.
- Renewable Fuels Association. Etanol industry statistics, 2010. Disponível em:

<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>.

- SANTOS, M. S. R. *Estudo de pré-tratamento de palha e sabugo de milho – visando a produção de etanol de 2G*. 77p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2014.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bio. Resources*, Vol 2, 472-499. (2007).
- TALCOTT, S.T.; HOWARD, L.R. Phenolic Autoxidation is Responsible for Color Degradation in Processed Carrot Puree. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.47, p.2109-2115, 1999.
- WOLF, L. D. *Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros*. 147p Dissertação (Mestrado em Engenharia Química na Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Formation kinetics of potential fermentation inhibitors in a steam explosion process of corn straw. *Applied Bioch. Biotechnol*, v. 169, p. 359–367, 2013.
- ZHAO, X.-Q.; ZI, L.-H.; B., F.-W.; L., H.-L.; H., X.-M.; Y., G.-J.; HO, N. W. Y. Bioethanol from lignocellulosic biomass. *Adv. Bioch. Engin/Biotechnol*, 2011.