

AVALIAÇÃO DO TIPO DE GÁS E DA PRESSÃO INICIAL NO TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO.

OLIVIERI, R.R.B¹, BON, E.P.S¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica do Instituto de Química
E-mail para contato: rodrigo.eq@gmail.com

RESUMO – Os bicompostíveis têm se mostrado como as fontes energéticas mais viáveis em relação às outras fontes renováveis e poderiam futuramente, substituir o uso do petróleo. No Brasil, o etanol celulósico é apontado como um dos potenciais bicompostíveis a ser produzido em escala industrial em virtude da alta oferta de cana-de-açúcar. Entretanto ainda permanecem questões relacionadas à seleção da biomassa, aos tipos de pré-tratamento que serão empregados bem como suas condições de processo, e o custo das enzimas celulolíticas, que é outro fator importante por possuir um forte impacto no custo do processamento das biomassas lignocelulósica para a comercialização do etanol celulósico. A palha e o bagaço de cana são resíduos com potencial para a implementação industrial da produção de etanol celulósico associada à cogeração de energia nas usinas. A palha de cana-de-açúcar pode ser utilizada também como agente de proteção das culturas de cana. A biomassa lignocelulósica ao passar pelas etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação alcoólica e destilação, pode dar origem ao etanol celulósico, oriundo da celulose presente nestes materiais. Este trabalho visa avaliar parâmetros relacionados ao tratamento hidrotérmico como o tipo de gás de pressurização (nitrogênio, ar sintético e gás carbônico) e a pressão inicial (5-20 bar) com o intuito de beneficiar a hidrólise enzimática da palha de cana e/ou reduzir o custo com as enzimas na etapa de hidrólise enzimática.

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera terrestre, representando 50% da biomassa terrestre, segundo Sarko (1997). Dentre os resíduos agroindustriais de composição lignocelulósica de maior importância destacam-se: bagaço e palha de cana-de-açúcar; sabugo e palha de milho; palhas de trigo e arroz, restos de madeira processada e lixo com base em papel.

O bagaço de cana e palha de cana são produzidos em grandes quantidades pelas usinas de açúcar e álcool no Brasil (Martínez *et al.*, 2003; Hernández-Sallas *et al.*, 2009). Segundo Pandey *et al.*, (2000) Cerca de 50% deste resíduo é utilizado em destilarias

como fonte de energia; enquanto o restante é acumulado. Portanto, devido a disponibilidade do bagaço de cana e da palha como resíduos da agroindústria da cana, que oferece vantagens econômicas, ambientais e estratégicas, há um grande interesse no desenvolvimento das tecnologias de produção de combustíveis e produtos químicos, a partir destes materiais (Adsul *et. al.*, 2004).

As frações, celulósica e hemicelulósica do bagaço e da palha de cana, podem ser hidrolisadas por celulases e hemicelulases gerando principalmente glicose e xilose, que são açúcares passíveis de serem fermentados a etanol. O microrganismo de eleição para fermentar glicose é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que, entretanto, não metaboliza a xilose a etanol (Cheng *et al.*, 2008). A estrutura nativa da parede celular vegetal, que é o principal componente dos materiais lignocelulósicos apresenta uma estrutura supramolecular recalcitrante à degradação por agentes biológicos. Assim, estes materiais devem ser tratados por processos físicos, químicos ou biológicos visando alterar a sua estrutura nativa e diminuir a recalcitrância à hidrólise enzimática. Embora a composição química dos produtos e subprodutos do pré-tratamento variem, de acordo com a natureza do processo, existem fatores que afetam a eficiência da hidrólise da celulose: a porosidade do material (área de superfície acessível), a cristalinidade das fibras de celulose e o teor de lignina e hemicelulose presente no material que dificultam o acesso das enzimas às fibras de celulose, impedindo a hidrólise de 100% da celulose (Mc Millan, 1994). A remoção ou redução dos teores de lignina e hemicelulose em conjunto com a diminuição da cristalinidade através de processos de pré-tratamento podem favorecer significativamente a etapa de hidrólise. A hidrólise enzimática da hemicelulose não apresenta dificuldades cinéticas ou de rendimento em função da sua natureza amorfa.

1.1. Pré-tratamentos de biomassa

Inúmeras estratégias de pré-tratamento vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar a reatividade da celulose e assim consequentemente aumentar o rendimento de açúcares fermentáveis na etapa de sacarificação enzimática. Os objetivos típicos dos pré-tratamentos estudados são: (1) produção de compostos digestíveis que beneficiem o rendimento de hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação de açúcares (especialmente as pentoses) incluindo aquelas oriundas da fração hemicelulósica; (3) minimizar a formação de inibidores para as etapas de fermentação subsequentes; (4) recuperação da lignina para formação de subprodutos e (5) ter um custo operacional efetivo utilizando reatores de tamanho moderado que minimizem a demanda por calor e energia. Os tipos de pré-tratamento geralmente são classificados como: físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos (Brodeur *et al.*, 2011).

Pré-tratamento hidrotérmico: O *Hot compressed water* (HCW), também chamado por alguns autores como *Liquid Hot Water* (LHW) é um tipo de tratamento hidrotérmico que não utiliza nenhum tipo de reagente químico e não é necessária a descompressão rápida. Neste tratamento, a pressão é aplicada para manter a água no estado líquido a temperaturas elevadas (160- 240°C). O principal objetivo deste tratamento é a solubilização da hemicelulose para

tornar a celulose mais acessível, evitando a formação de inibidores. A fração líquida gerada ao final deste tratamento pode ser filtrada dando origem a duas correntes, uma delas rica em celulose (resíduo sólido) e outra rica em açúcares derivados da hemicelulose. Através deste método, a lignina é parcialmente solubilizada e despolimerizada, entretanto a total deslignificação não é possível somente ao utilizar água quente, devido à recondensação de alguns componentes solúveis presentes na lignina. Em geral este tipo de tratamento é atrativo do ponto de vista econômico por não requerer catalisadores, utilizar reatores com baixo custo de construção, por possuir baixo potencial de corrosão e pelo aproveitamento energético, uma vez que o calor gerado pelo o tratamento pode ser utilizado em outras correntes através do emprego de trocadores de calor (Alvira, *et al.*, 2010).

Este trabalho visa avaliar parâmetros relacionados ao tratamento hidrotérmico, como a pressão inicial do sistema e o tipo de gás utilizado, a fim de beneficiar a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar visando a otimização técnico-científica e econômica do processo.

2. Materiais e métodos

2.1. Matéria-prima

A palha de cana-de-açúcar foi gentilmente cedida pelo Complexo Bioenergético Itarumã S.A. (Goiás, Brasil - <http://www.usinaitaruma.com.br>). Este material foi seco à temperatura ambiente, pré-moído em moinho de facas SM-300 (Retsch, Alemanha) e peneirado de forma a selecionar partículas menores que 2 mm. Para a determinação do teor de umidade do material peneirado foi utilizando o analisador de umidade modelo IV-3000 (Indústria e Comércio Eletrônica Gehaka, São Paulo, Brasil).

2.2. Tratamento hidrotérmico

Os ensaios de pré-tratamento hidrotérmico foram realizados utilizando um reator de aço inox com volume total de 1L e volume útil de 300 mL (Parr 4520, PARR Instrument Company, Moline, IL, E.U.A). O reator foi alimentado com 30g de biomassa seca (partículas menores que 2 mm) suspensa em 300 mL de água (100 g/L), a mistura foi homogeneizada e para a pressurização do sistema, foram utilizados diferentes tipos de gases, como, Nitrogênio UP, Ar sintético UP e CO₂ industrial, variando a pressão de 0 a 20 bar e mantendo a agitação de 100 RPM, a temperatura em 165°C durante 25 minutos para todas as condições testadas. Experimentos controles sem pressão inicial e/ou somente com a purga de cada gás foram realizados afim de comparar o efeito de cada um deles sobre a biomassa.

A fração sólida gerada no pré-tratamento foi lavada com 600 mL de água deionizada antes da realização dos ensaios de hidrólise enzimática. Já a fração líquida gerada nos ensaios de pré-tratamento foi quantificada em termos de inibidores como, furfural, hidroximetil furfural (HMF) e ácido acético.

2.3. Hidrólise enzimática

Os ensaios de sacarificação enzimática foram realizados visando avaliar a eficiência dos pré-tratamentos como facilitadores da hidrólise da celulose contida na biomassa da cana-de-açúcar. As misturas reacionais apresentando 10 g de substrato em um volume total de 100 mL foram conduzidos à 50°C por até 72h em pH inicial 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM) e 200 RPM. A carga de enzima correspondeu a 10 FPU/g de biomassa, sendo utilizada a enzima comercial Power Cell (Prozyn, São Paulo, Brasil). Amostras foram retiradas em 0h, 48h e 72h para análise dos açúcares liberados.

2.4. Quantificação de produtos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os açúcares produzidos na etapa de hidrólise enzimática foram quantificados por um sistema de CLAE (Ultimate 3000, Thermo Scientific, E.U.A) equipado com uma coluna Aminex HPX-87P (7,8 mm I.D. × 30 cm, BioRad, E.U.A) e um detector de índice de refração, trabalhando à 80°C com fluxo de 1,0 mL de água por minuto. Inibidores como o furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético, também foram analisados por um sistema de CLAE (Elite La Chrom, Hitachi, Japão). Neste último caso, foi utilizada a coluna, Aminex HPX-87H (7,8 mm I.D. × 30 cm, BioRad, E.U.A), à temperatura de 60 °C utilizando 1 mM de ácido sulfúrico (H_2SO_4) como eluente a um fluxo de 0,6 mL por minuto.

3. RESULTADOS

3.1. Pré-tratamentos com N_2

A figura 1 apresenta os resultados após 72h de hidrólise enzimática para todos os pré-tratamentos realizados utilizando nitrogênio como gás de pressurização, nas pressões de 5 bar, 10 bar, 15 bar e 20 bar. Adicionalmente aos ensaios acima mencionados foram testados 3 controles comparativos: 1) Para o material sem tratamento; 2) Para o material sem purga de N_2 e sem pressão inicial e 3) Para o material com purga de N_2 e sem pressão inicial.

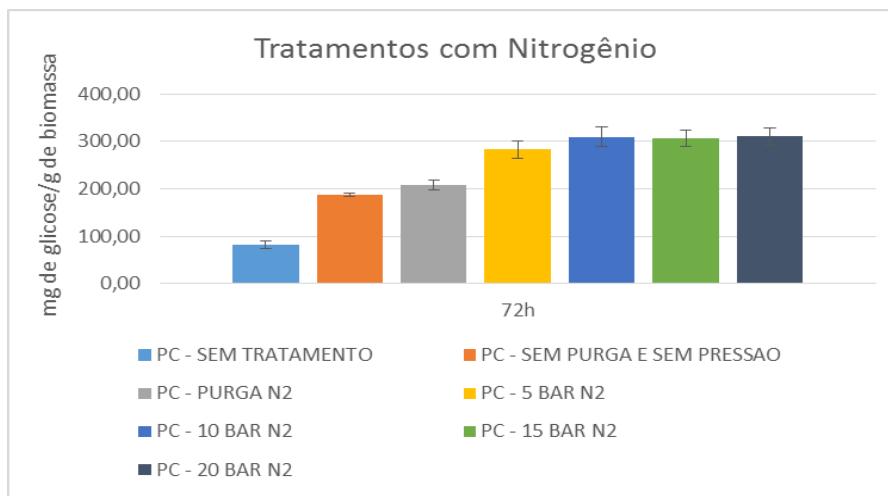


Figura 1 – Resultados de recuperação de glicose após 72h de hidrólise enzimática para ensaios de pré-tratamento utilizando nitrogênio ultra puro como gás de pressurização.

A partir dos resultados apresentados na figura 1 é possível observar que os níveis de glicose recuperados para pressões iguais ou superiores a 10 bar são muito próximos, indicando uma saturação da hidrólise enzimática ao recuperar aproximadamente 310 mg de glicose por grama de biomassa. Considerando que a palha de cana possui aproximadamente 38% de celulose em sua composição química, pode-se estimar que o rendimento de hidrólise nas melhores condições de tratamento ao utilizar nitrogênio como gás de pressurização é da ordem de 74%. Para palha de cana sem tratamento foi possível recuperar 81 mg de glicose/g de biomassa, o que corresponde a aproximadamente 19% de rendimento. Para o experimento sem purga e sem pressão foi possível recuperar 187 mg de glicose/ g de biomassa, o que corresponde a aproximadamente 45% de rendimento. E finalmente ao fazer somente a purga com nitrogênio foi possível recuperar 208 mg de glicose/ g de biomassa, o que corresponde a 50% de rendimento.

3.2. Pré-tratamentos com Ar sintético

A figura 2 apresenta os resultados após 72h de hidrólise enzimática para todos os pré-tratamentos realizados utilizando ar sintético ultra puro como gás de pressurização, nas pressões de 5 bar, 10 bar, 15 bar e 20 bar. Adicionalmente aos ensaios acima mencionados foram testados 3 controles comparativos: 1) Para o material sem tratamento; 2) Para o material sem purga de ar sintético e sem pressão inicial e 3) Para o material com purga de ar sintético e sem pressão inicial.

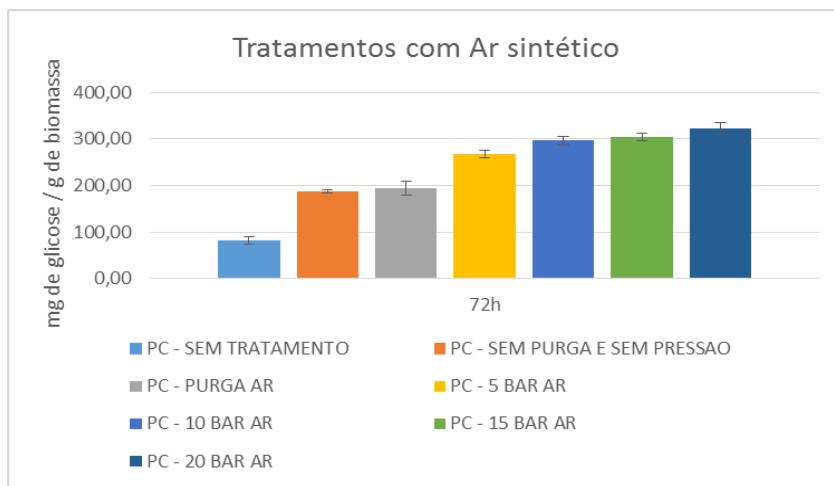


Figura 2 - Resultados de recuperação de glicose após 72h de hidrólise enzimática para ensaios de pré-tratamento utilizando ar sintético ultra puro como gás de pressurização.

A partir dos resultados apresentados na figura 2 é possível observar que os níveis de glicose recuperados para pressões iguais ou superiores a 10 bar, similarmente aos resultados obtidos com ar sintético, os resultados de recuperação de glicose foram muito próximos, indicando uma saturação da hidrólise enzimática ao recuperar aproximadamente 323 mg de glicose por grama de biomassa. Considerando que a palha de cana possui aproximadamente 38% de celulose em sua composição química, pode-se estimar que o rendimento de hidrólise nas melhores condições de tratamento ao utilizar ar sintético como gás de pressurização é da ordem de 77%. Ao fazer somente a purga com ar sintético foi possível recuperar 195 mg de glicose/ g de biomassa, o que corresponde a 47% de rendimento.

3.3. Pré-tratamentos com CO₂

A figura 3 apresenta os resultados após 72h de hidrólise enzimática para todos os pré-tratamentos realizados utilizando CO₂ industrial como gás de pressurização, nas pressões de 5 bar, 10 bar, 15 bar e 20 bar. Adicionalmente aos ensaios acima mencionados foram testados 3 controles comparativos: 1) Para o material sem tratamento; 2) Para o material sem purga de ar sintético e sem pressão inicial e 3) Para o material com purga de CO₂ e sem pressão inicial.

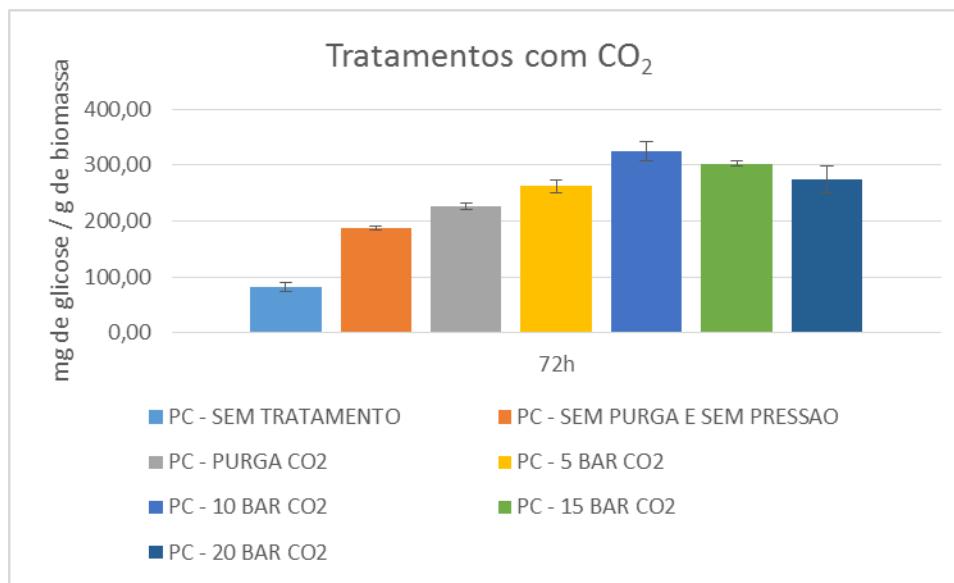


Figura 3 - Resultados de recuperação de glicose após 72h de hidrólise enzimática para ensaios de pré-tratamento utilizando CO₂ industrial como gás de pressurização.

A partir dos resultados apresentados na figura 3 é possível observar que os níveis de glicose recuperados para uma pressão de 10 bar foram os maiores, quando comparados aos resultados com pressões superiores ou inferiores. Indicando que para pressões superiores a 10 bar podem sugerir uma degradação da celulose do material devido ao caráter oxidante do CO₂. Para a pressão de 10 bar de CO₂, foi possível recuperar aproximadamente 324 mg de glicose por grama de biomassa. Considerando que a palha de cana possui aproximadamente 38% de celulose em sua composição química, pode-se estimar que o rendimento de hidrólise utilizando 10 bar de pressão de CO₂ é da ordem de 78%. Ao fazer somente a purga com CO₂ foi possível recuperar 226 mg de glicose/ g de biomassa, o que corresponde a 54% de rendimento.

3.4. Formação de inibidores de fermentação

A fim de confirmar a melhor condição de pré-tratamento hidrotérmico em termos do gás de pressurização e da pressão inicial de tratamento, é necessário também, avaliar em conjunto com a hidrólise enzimática, a formação de produtos inibitórios durante o tratamento. Inibidores como HMF e furfural, que são provenientes da desidratação da glicose e xilose, são extremamente tóxicos para as leveduras que promovem a fermentação alcoólica. Além disso a formação de ácido acético também acontece devido a auto hidrólise da biomassa durante os diversos pré-tratamentos, como consequência da presença de terminais acetato presentes na estrutura nativa da biomassa de cana.

Ao avaliar a formação de HMF para os 3 gases testados em diferentes pressões, não foi possível identificar um perfil diferenciado pois em todas as condições testadas, os níveis de HMF liberados na fase líquida foram da ordem de 0,2 g/L.

Já os níveis de furfural e ácido acético gerados comparando os 3 gases a 10 bar de pressão foram superiores para CO₂ (1,0 g/L e 1,2 g/L, respectivamente) seguidos pelo ar sintético (0,6 g/L e 0,9 g/L, respectivamente). Para os tratamentos com 10 bar de N₂ foram gerados 0,3 g/L de furfural e 0,5 g/L de ácido acético. Isto acontece provavelmente devido ao caráter mais inerte do N₂, quando comparado a gases oxidantes como o ar sintético e o CO₂.

4. DISCUSSÃO

Em geral, ainda existem poucos trabalhos relacionados ao tratamento hidrotérmico com palha de cana, entretanto alguns resultados da literatura, realizados com bagaço de cana, mostram que o tratamento a altas temperaturas ($> 220^{\circ}\text{C}$) e baixos tempos de residência (< 2 min.), associado a uma baixa carga de sólidos (~ 5%), resultam em aproximadamente 87% de rendimento de sacarificação e fermentação simultânea (Laser *et al.*, 2002), entretanto, utilizar uma baixa carga de sólidos implica na utilização de grandes quantidades de água, grandes volumes reacionais e a fração líquida recuperada, rica em xilose, apresentaria baixas concentrações de açúcares C5, impedindo que a mesma pudesse ser utilizada diretamente em um processo de produção de álcool ou de produção de enzimas, necessitando obrigatoriamente de uma etapa de concentração.

Os resultados deste trabalho mostram que ao utilizar 10% de sólidos, temperaturas e tempo intermediários (165 °C por 25 min.), é possível atingir cerca de 74-78% de rendimento com baixa formação de inibidores, como furfural e HMF. Embora este tipo de tratamento remova parcialmente a fração hemicelulósica do material, a presença da lignina impede que rendimentos superiores a 90% sejam atingidos, provavelmente devido à baixa área de superfície específica encontrada nos materiais tratados, pois a lignina a altas temperaturas adere a superfície das fibras de celulose impedindo que as mesmas fiquem exposta ao ataque enzimático.

5. CONCLUSÕES

Avaliando conjuntamente os resultados de hidrólise enzimática com os resultados de formação de inibidores, tem-se que a melhor condição de tratamento em termos de tipo de gás e pressão inicial de tratamento se dá ao utilizar 10 bar de nitrogênio, pela obtenção de um alto rendimento de hidrólise e uma menor formação de inibidores. Entretanto para uma otimização completa é necessário investigar os custos de processamento bem como outros parâmetros relevantes ao tratamento hidrotérmico, como, o pH, a carga de biomassa, a agitação, a temperatura de tratamento e o tempo de residência, que serão investigados futuramente neste mesmo projeto.

6. REFERÊNCIAS

- ADSUL, M.G., GHULE, J.E., SINGH, R., SHAIKH, H., BASTAWDE, K.B., GOKHALE, D.V., VARMA, A. J., Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. Carbohydr. Polym. 57, 67–72, 2004.

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

BRODEUR, G., YAU, E., BADAL, K., COLLIER, J., RAMACHANDRAN, K. B., RAMAKRISHNAN, S., Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*, 2011.

CHENG, K.K., CAI, B.Y., ZHANG, J.A., LING, H.Z., ZHOU, Y.J., GE, J.P., XU, J.M., Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochem. Eng. J.* 38, 105–109, 2008.

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M., VILLA-RAMÍREZ, M.S., VELOZ-RENDÓN, J.S., RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N., GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A., PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A., Trejo-Estrada, S.R., Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*. 100, 1238–1245, 2009.

LASER M, SCHULMAN D, ALLEN SG, LICHWA J, ANTAL MJ, LYND LR. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*; 81, 33-44, 2002.

MARTÍNEZ, E.A., SILVA, S.S., SILVA, J.B.A., SOLENZAL, A.I.N., FELIPE, M.G.A., The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. Guilliermondii*. *Process Biochem.* 38, 1677–1683, 2003.

Mc MILLAN, J.D., Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 292–324, 1994.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., SOCCOL, V.T., Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 74 (2), 69–80, 2000.

SARKO, A. Cellulose- How much do we know about this its structure? In: *Wood and Cellulosics: Industrial Utilization. Biotechnology, Structure and Porperties*. John Wiley & Sons, New York, 1997.