

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS OBTIDOS DE CELULOSE

**DANIEL DA ROSA COUTO¹; ESTÊVAN CASARIN PEREIRA²; JANDER LUIS
FERNANDES MONKS³; CLÁUDIO RAFAEL KUHN⁴; RICARDO PERAÇA
TORALLES⁵**

¹IFSul Câmpus Pelotas – danielcouto.pl210@academico.if sul.edu.br

²IFSul Câmpus Pelotas – estevan.casarin@gmail.com

³IFSul Câmpus Pelotas – jandermonks@if sul.edu.br

⁴IFSul Câmpus Pelotas – claudiokuhn@if sul.edu.br

⁵IFSul Câmpus Pelotas – ricardotoralles@if sul.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos grandes desafios enfrentados pela sociedade é conseguir conciliar o crescimento da demanda energética com a grande necessidade de sustentabilidade, pois o esgotamento gradual dos combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa tem estimulado o uso de fontes de energia renováveis, sustentáveis e de baixo custo. Em vista disso, o etanol de segunda geração (bioetanol) vem ganhando grande destaque como uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, visto que é gerado a partir da biomassa lignocelulósica (SANTIAGO; RODRIGUES, 2017; ZHENG et al., 2008). Assim, o **objetivo** desse trabalho foi produzir açúcares redutores fermentescíveis e bioetanol usando um processo que combina hidrólise enzimática da celulose, fermentação e destilação.

2. METODOLOGIA

A hidrólise enzimática foi conduzida em um frasco de 250 mL contendo um meio reacional preparado com 1,84 g de celulose em pó, 65,2 mL de solução tampão pH 4,8 e 32,6 mL de extrato 0,3% v/v da enzima Cellic Ctec 3, totalizando a carga de (5,5 FPU/g celulose e 7,0 CBU/g celulose). A hidrólise foi realizada em agitador orbital 150 rpm a 50°C por 230 horas. Os ensaios foram realizados durante 230 horas em duplicata da unidade experimental, sendo que as análises foram realizadas em triplicata para açúcares redutores totais (ART) e total glicose monoreagente (GMR).

A fermentação do hidrolisado foi conduzido em frasco de 150 mL contendo 0,8 gramas de levedura comercial para cada 100 mL do hidrolisado, 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 5 g L⁻¹ de FeSO₄ e 5 g L⁻¹ de peptona sob agitação orbital (Quimis-Q816M22) a 150 rpm, a 30 °C por 24 h. Usou-se um bolhômetro para controle da condução de fermentação. Após as 24 horas, o mosto foi centrifugado e analisado pH, Brix, AR e GMR. O centrifugado foi armazenado a 4 °C, em tubos Falcon, para posterior destilação usando um destilador automático HERZOG HDA 627, com controle de vazão, temperatura ebulação e temperatura do vapor, a fim de obter uma melhor separação do álcool e, consequentemente, melhor desempenho. No destilado foram determinados AR, GMR e teor de álcool °INPM.

As determinações de ART, GMR e °INPM foram todas por espectrofotometria. Os AR seguiu metodologia proposta por Ferreira et al. (2018) usando como reagente cromogênico o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), baseado em curva padrão DNS-glicose e as leituras a 490 nm. Os GMR foram segundo metodologia proposta

por Pereira (2024) usando monoreagente enzimático colorimétrico (GOD-PAP, bioclin), sendo feita as leituras em espectrofotômetro UV/VIS a 505 nm. O teor de álcool [°]INPM foi determinado como descrito por Tomé 2018, baseado na reação do $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido com etanol e as leituras a 550 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra uma curva de concentração ART e GMR em função do tempo com os dois ensaios juntos mostrando uma concordância na tendência da curva tanto para ART como para GMR em ambos ensaios. Também observamos que no intervalo de 0 a 117 horas de hidrólise há um crescente aumento dos valores de ART e GMR, culminando em um rendimento máximo de glicose de 60% e uma conversão de 59,4%. Após 120 horas, os valores de ART e GMR estabilizaram, indicando uma possível limitação na reação devido ao não atingimento da velocidade máxima, possivelmente causada por uma baixa relação substrato (S) versus constante de Michaelis-Menten (K_M) que foi de apenas S/K_M de 1,4. Pereira (2024), trabalhando com afinidade da Cellic Ctec 3 frente celulose, relatou um K_M dessa enzima de $13,2\text{ mg mL}^{-1}$. Também tem que ser considerado o efeito inibitório da cellobiose e da glicose formada durante a hidrólise já relatado por alguns autores (RYU e Lee, 1985; PEREIRA, 2024). Tais fatos indicam que ainda existe espaço para melhorar o rendimento da hidrólise. No estudo de Zheng et al. (2008), trabalhando com hidrólise enzimática de azevém selvagem pré-tratada e uma carga enzimática de 5 FPU/g e 5 CBU/g de celulose, foi obtido um rendimento experimental de 55,2%.

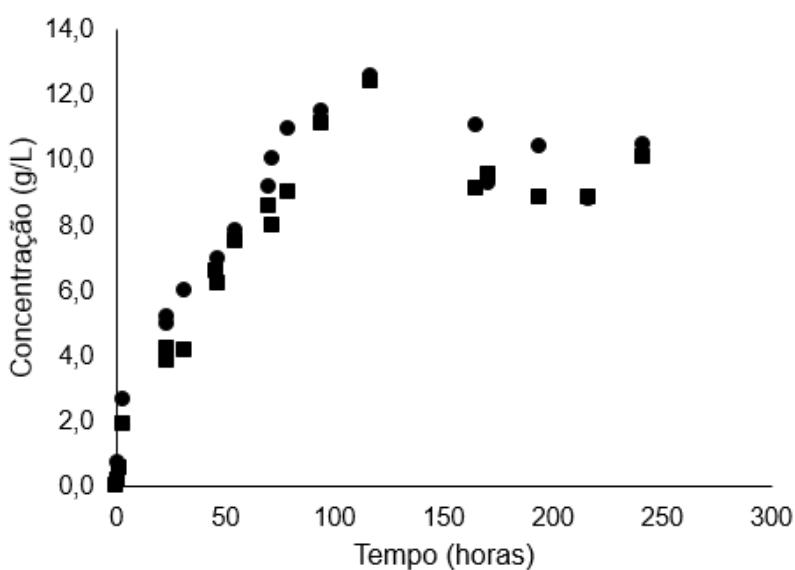


Figura 1. Hidrólise da celulose com Cellic Ctec 3: ART (●) e GMR (■). Meio reacional: 1,84g de celulose em pó, 65,2 mL de solução tampão pH 4,8 e 32,6 mL de extrato enzimático 0,3% com uma concentração de 5,5 FPU/g e 7,0 CBU/grama de celulose. Os valores médios dos ensaios 1 e 2 foram plotados juntos.

Uma vez terminado o processo de hidrólise enzimática, acompanhou-se também o ART e GMR nas etapas subsequentes de fermentação e destilação, bem como os volumes obtidos em cada etapa. A Tabela 1 tem-se um resumo das concentrações média de ART e GMR no hidrolisado, mosto e destilado usando celulose como substrato e observou-se que praticamente todo açúcar disponível na

etapa da hidrólise foi fermentado. O baixo valor observado de ART deve ser celobiose que não é fermentada por levedura comercial. Na etapa de destilação não observamos ART e GMR.

Tabela 1. Concentração média de ART e GMR no hidrolisado, mosto e destilado usando celulose como substrato.

Etapa	Ensaio 1			Ensaio 2		
	ART (g/L)	GMR (g/L)	Vol. (mL)	ART (g/L)	GMR (g/L)	Vol. (mL)
Hidrolisado	10,47 ± 0,61	10,08 ± 0,23	87	11,07 ± 0,12	9,12 ± 2,66	132
Mosto	0,628 ± 0,01	0,049 ± 0,02	70	0,24 ± 0,02	0,04 ± 0,08	106
Destilado	0,039 ± 0,03	0,00	3,0	0,05 ± 0,01	0,00	2,7

Observação. O hidrolisado é o volume de sobrenadante obtido após a hidrólise; o mosto é o volume de fermentado obtido após a fermentação; o destilado é o volume de destilado obtido após destilação simples.

No ensaio 1, o volume destilado foi de 3 mL com uma concentração de etanol de 10,3 °INPM. O rendimento (R) calculado em relação ao máximo etanol produzido se toda glicose antes da fermentação fosse fermentada foi de 67,9% e o calculado é mostrado a seguir pela equação 1:

$$R = \frac{\text{Volume de destilado (ml)} \cdot \rho \left(\frac{g}{ml} \right) \cdot \text{INPM} \left(\frac{g}{100 g} \right) \cdot 1000 \cdot \text{MM glicose} \left(\frac{g}{mol} \right)}{\text{Concentração de glicose} \left(\frac{g}{L} \right) \cdot \text{Volume do hidrolisado (ml)} \cdot 2 \cdot \text{MM etanol} \left(\frac{g}{mol} \right)} \quad (1)$$

$$R = \frac{3,0 \times 0,984 \times 10,3 \times 1000 \times 180}{10,077 \times 87 \times 2 \times 46} = 67,9 \%$$

A relação de produção (RP) de bioetanol produzido em relação a celulose inicialmente submetida a

$$RP = \frac{\text{Volume de destilado (ml)} \cdot \rho \left(\frac{g}{ml} \right) \cdot \text{INPM} \left(\frac{g}{100 g} \right)}{\text{massa de celulose (g)}} \quad (2)$$

$$RP = \frac{3,0 \times 0,984 \times 10,3}{3,6} = 8,45 \frac{\text{g bioetanol}}{100 \text{ g celulose}}$$

Para o ensaio 2, usando as mesmas equações, o volume destilado foi de 2,7 mL com uma concentração de etanol de 14,9 INPM. A RP foi de 10,94% e o rendimento foi de 64,0%.

Para ambos ensaios, comparando com a máxima produção teórica seria de 56 gramas de bioetanol por 100 gramas de celulose, verificou-se que a eficiência do processo (EP) foi de 15,1% e 19,5 respectivamente para ensaio 1 e 2. Na Figura 2 é feito um resumo comparativo dos dois ensaios para INPM do destilado, R, RP e EP. A eficiência média global indica que existe espaço para melhor o rendimento global do bioetanol reduzindo a concentração de açúcares não fermentescíveis (ART-GMR), reduzindo a perda de volumes nas etapas de hidrólise e fermentação, bem como melhorando a recuperação de bioetanol na destilação.

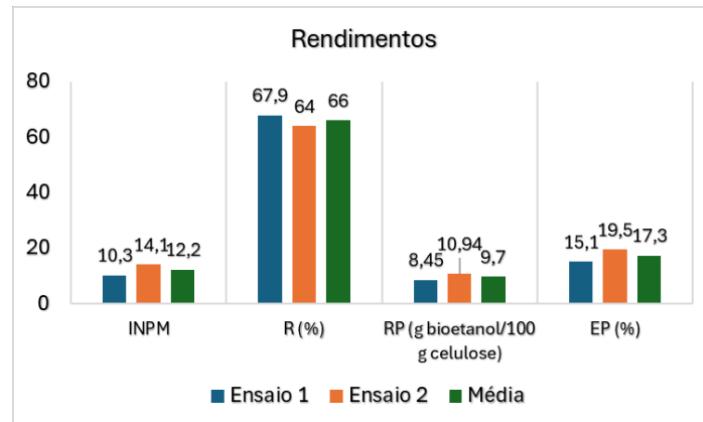


Figura 2. Resultados para INPM, R (%), RP e EP.

4. CONCLUSÕES

É possível produzir açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática da celulose usando Cellic Ctec 3 com uma carga de 5,5 FPU/g e 7,0 CBU/grama, pH 4,8 a 50°C com rendimento de 60%, porém há espaço para melhorar esse rendimento com novos estudos que levem em consideração inibição enzimática e um aumento S/K_M. Por outro lado, os açúcares fermentescíveis produzidos na hidrólise da celulose foram praticamente convertidos, em sua totalidade, em bioetanol durante a fermentação com um rendimento acima de 60%, porém a EP média global obtida em relação a máxima produção indica que há espaço para melhorar o rendimento global reduzindo perdas de volume, melhorando a recuperação de bioetanol na destilação e reduzindo a concentração de açúcares não fermentescíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERREIRA, M.V.; ROSSLER, A.F.; TORALLES, R.P.; RUIZ, W.A; ROMBALDI, C.V. Extracción optimizada ypurificación parcial de invertasa aislada de *S. Cerevisiae* en puré de durazno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.40, n.2, p.1-9, 2018.
- PEREIRA, E. C. **Hidrólise enzimática da celulose e da casca de arroz com pré tratamento ácido: parâmetros, modelagem e simulação.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Engenharia Química) – Departamento de Graduação e Pós-Graduação, Instituto Federal Sul-rio-grandense – Câmpus Pelotas.
- RYU, Dewey D.Y.; LEE, Sun Bok. Enzymatic hydrolysis of cellulose determination of kinetic parameters. *J. Chemical Engineering communications*, [s.l.], v. 45, n. 1-6, p. 119-134, jul. 1986.
- SANTIAGO, B. L. S.; RODRIGUES, F. A. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: uma revisão. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**. vol.03, n. 7 (2017) 1011-1022. 2017.
- TOMÉ, B. C. B. **Ensaios colorimétricos para detecção de etanol em amostras de uísque utilizando dispositivos poliméricos.** 2018. 45f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás.
- ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Biotechnol Bioeng.**, v. 102, n. 6, p.1558–1569, 2008.