

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO PARA USO COMO FONTE DE CARBONO

Juçara Cristina Pereira Sousa, Rafaela Couto, José Geraldo da Cruz Pradella

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, jucaracpsousa7@gmail.com, rafaella.couto.sla@gmail.com, jpradella51@gmail.com.

Resumo

O artigo aborda a otimização da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado visando seu uso como fonte de carbono. O bagaço de cana, um subproduto da indústria açucareira, possui potencial como matéria-prima para a produção de bioprodutos, como o biopolímero, devido à sua alta concentração de celulose. No entanto, a celulose presente no bagaço é complexa e resistente à hidrólise, sendo necessário um processo para quebrar essa estrutura em açúcares fermentáveis. O presente trabalho utiliza de análise espectrofotométrica a partir do reagente DNS a fim de quantificar o açúcar redutor presente nas amostras do projeto experimental. O artigo destaca a importância de potencializar as condições de hidrólise enzimática, controlando a concentração de resíduo lignocelulósico, quantidade de enzima e tempo, a fim de maximizar a eficiência da hidrólise subsequente. A utilização de um software estatístico reduziu exponencialmente a quantidade de experimentos necessários até encontrar o ponto ótimo com 7,5g de polpa e 1ml de enzima, a partir das variáveis polpa e enzima.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, fonte de carbono, hidrólise, açúcar redutor, espectrofotometria.

Área do Conhecimento: Ciências exatas e da terra / Química

Introdução

O uso de resíduos lignocelulósicos como o bagaço-de-cana de açúcar, tem sido preconizado no âmbito da Bioeconomia como matérias-primas fundamentais para geração de carboidratos fermentáveis para produção de vários bioprodutos como biocombustíveis, biopolímeros, ácidos orgânicos, entre outros (Livro Willibaldo, 2020).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso de celulase, hemicelulose compostos, respectivamente, por unidades monoméricas de glicose e xilose, protegida por macromolécula de unidades fenólicas denominada lignina (Figura 2).

O uso destes resíduos geralmente passa por duas etapas, a saber, pré-tratamento físico e químico seguido de hidrólise enzimática. O pré-tratamento tem como finalidade principal a desestruturação da matriz lignocelulósica ocorrendo nesta etapa hidrólise da hemicelulose e a remoção de grande parte da lignina, tornando a celulose disponível posteriormente para hidrólise enzimática da celulose.

A etapa da hidrólise enzimática é efetuada pelo concurso de um conjunto de glicohidrolases denominadas genericamente de celulasas que são divididas em dois grupos, conforme seu sítio de ação na celulose: endoglucanases e exoglucanases (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; BON et al., 2008).

As endoglucanases (EC 3.3.1.4) hidrolisam de maneira randômica as regiões internas da molécula de celulose, com mais afinidade por regiões amorfas. Sua atuação resulta na formação de celooligosacarídeos com graus variados de polimerização, com o consumo de uma molécula de água e formação de um novo terminal redutor e outro não redutor. Trata-se da enzima responsável por iniciar a hidrólise. Essa enzima reduz o grau de polimerização da molécula de celulose (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase e glucano-hidrolase. A glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. A celobiohidrolase (EC

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

3.2.1.91) participa da hidrólise primária da fibra de celulose e é responsável pela amorfogênese, um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando a desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais.

A celobiohidrolase ainda pode ser dividida em dois tipos: I e II. As exoglucanases do tipo I hidrolisam terminais redutores, e do tipo II os terminais não redutores. As celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) sofrem inibição pelo produto da sua hidrólise o dímero de glicose denominado celobiose.

A degradação da celulose é completada com a ação da celobiase (β - glucosidase – EC 3.2.1.21) para hidrólise da celobiose a 2 moles de glicose. A celobiase sofre inibição pelo seu produto de hidrólise. O nível correto dessa enzima em uma preparação enzimática evita a inibição das celobiohidrolases, bem como a liberação do produto de interesse, a glicose, na maior quantidade possível (ZHANG et al., 2010).

A glicose assim obtida será utilizada posteriormente para produção de polímeros da classe dos poli-hidroxialcanoatos (PHAs), polímero biodegradável produzido e armazenado por alguns microrganismos em até 80% de sua massa seca, com propriedades mecânicas semelhantes aos polímeros sintéticos derivados de petróleo.

No presente trabalho a hidrólise enzimática objetivou a maximização da concentração de carboidratos no licor de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BPT) em função das concentrações de BPT e de complexo celulolítico comercial, usando-se projeto estatístico de experimento denominado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Metodologia

Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado: Bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a tratamento físico químico que consistiu a aquecimento por vapor de água a 140°C por 10 minutos seguido de etapa de delignificação com NaOH (ROCHA et al. 2012).

Coquetel enzimático: Coquetel enzimático celulolítico de *Penicillium echinulatum* (BRIX BRASIL, Ltda, São Carlos, SP) e, segundo o fabricante, possui atividade enzimática de 120FPU/mL.

Descrição do ensaio: Foi efetuado peneiramento e pesagem de bagaço de cana pré-tratado (BPT) e adicionado em frascos erlenmeyer de 250 mL previamente preparado com 50 mL de água. Procedeu-se à correção do pH para 5,00, utilizando NaOH conforme necessário (MESA et al., 2010). Esterilizou-se os frascos erlenmeyer em autoclave a 121°C por 15 minutos. Com o meio esterilizado, adicionou-se o coquetel celulolítico enzimático. Os frascos erlenmeyer foram incubados em agitador rotativo a 180 rpm e temperatura de 50°C. Amostras foram retiradas nos intervalos de 0h, 24h e 48h para análise subsequente dosagem do açúcar redutor.

Métodos analíticos:

Método DNS para dosagem de açúcar redutor (AR): Amostras retiradas dos frascos erlenmeyer foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante da centrifugação (aqui denominado de licor de hidrólise) foi convenientemente diluído. Em seguida, uma proporção de 1:1 do sobrenadante diluído e do reagente DNS (ácido 3-5 dinitrossalicílico) foi transferida para tubos de ensaio. Estes tubos foram incubados em banho-maria de água, a temperatura de ebulição por um período de 15 minutos. Em seguida os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo e efetuada leitura de absorbância em espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 540nm. Os valor de AR foi computado utilizando-se curva e calibração previamente elaborada.

Resultados

A Tabela 1 abaixo reúne os resultados aos ensaios 1 a 13 do DCCR gerados pelo software estatístico MiniTab14 após selecionar duas variáveis, quantidade de polpa de bagaço de cana-de-açúcar e quantidade do coquetel enzimático, efetuado com as respectivas concentrações de bagaço pré-tratado (P) e do coquetel enzimático empregado (E).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Tabela 1 - Resultado do DCCR

N	P	E	AR
1	5,00	0,625	40,87
2	5,00	0,625	34,42
3	2,50	0,250	11,19
4	7,50	0,250	18,51
5	8,53	0,625	55,90
6	5,00	0,625	33,72
7	2,50	1,000	21,68
8	5,00	0,095	7,53
9	5,00	1,553	55,49
10	7,50	1,000	57,66
11	1,46	0,625	15,38
12	5,00	0,625	34,96
13	5,00	0,625	37,91

Fonte : o autor

N: número do experimento
P: g de bagaço pré-tratado / 50 mL de água
E: mL de celulase / 50 mL de água
AR: g glicose /L de licor de hidrólise

Pode-se observar que os experimentos 5, 9 e 10 conduziram aos melhores resultados em termos de concentração de açúcares redutores (AR) da ordem de 55 g/L. Os pontos centrais do DCCR, experimentos 1, 2, 6, 12 e 13 apresentaram valor médio de 36,385 g/L e desvio padrão de 2,973 g/L.

A Análise de Variância dos resultados efetuados com os dados da Tabela 1 está sumarizada na Figura 1 a seguir.

Figura 1 - Coeficientes de regressão estimados para AR e análise de variância para AR

The analysis was done using uncoded units.

Estimated Regression Coefficients for AR

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-8.2944	12.7601	-0.650	0.536
polpa	3.3683	3.5929	0.937	0.380
enzima	36.6019	22.3757	1.636	0.146
polpa*polpa	-0.3115	0.3085	-1.010	0.346
enzima*enzima	-28.5280	13.7116	-2.081	0.076
polpa*enzima	7.6427	2.7123	2.818	0.026

S = 5.086 R-Sq = 94.8% R-Sq(adj) = 91.1%

Analysis of Variance for AR

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	3321.57	3321.57	664.313	25.69	0.000
Linear	2	2989.92	72.46	36.231	1.40	0.308
Square	2	126.30	126.30	63.150	2.44	0.157
Interaction	1	205.35	205.35	205.349	7.94	0.026
Residual Error	7	181.05	181.05	25.864		
Lack-of-Fit	3	145.61	145.61	48.537	5.48	0.067
Pure Error	4	35.43	35.43	8.859		
Total	12	3502.61				

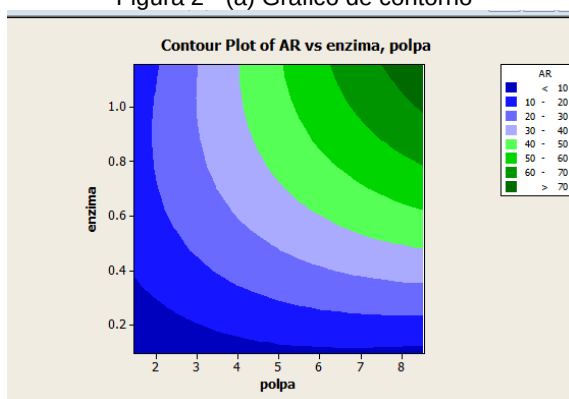
Fonte: MiniTab14

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

A análise de variância dos resultados ANOVA, conforme mostrado em figura 1. O modelo foi significativo com falta de ajuste não significativa ($p = 0,067$), confirmando assim a adequação da validade do modelo. Além disso, o alto valor $R - Sq$ (94,8%) e $R - Sq(ajd)$ (91,1%) indicam um bom ajuste com os dados experimentais e menos variações em torno o valor médio. Os termos significativos do modelo foram aqueles com valor de p inferior a 0,05 que indicam nível de confiança de 95%. Outros autores demonstram um nível de confiança de 80% para estudo de hidrólise enzimática de BPT com celulase comercial (MESA et al., 2010)

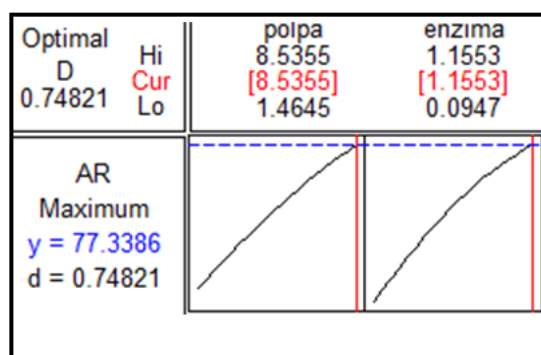
As Figuras 2a (dados experimentais) e 1b (dados teóricos) construídos com auxílio do software Minitab 14 representam, respectivamente, o gráfico de contorno que relaciona a concentração de açúcar redutor e as concentrações de polpa (P) e enzima (E) e a representação gráfica da otimização da equação 1 que relaciona AR com P e E. Segundo o mostrado a maximização do processo da hidrólise enzimática em concentração máxima de AR de cerca de 70 g/L seria atingida fossem utilizados valores de concentração de polpa e enzima de respectivamente 170 g/L e 22 mL de do coquetel enzimático /L. Ensaios nestas condições deverão ser efetuados para confirmar ou refutar esta hipótese.

Figura 2 - (a) Gráfico de contorno



Fonte MiniTab14

Figura 2 - (b) Gráfico de otimização da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (polpa) com coquetel enzimático e celulase BRCPT



Fonte: MiniTab14

O projeto de experimento de dois fatores foi aplicado para avaliar os efeitos da quantidade de polpa (bagaço de cana-de-açúcar) (X_1) e concentração de enzima (X_2) na hidrólise enzimática. Uma análise em diferentes níveis foi feita para cada variável resultando em um projeto de experimento de 13 experimentos. O parâmetro tempo de incubação e rendimento de glicose foram as variáveis resposta; o que gerou uma equação resposta polinomial de segunda ordem (RODRIGUES, IEMMA 2008), semelhante ao proposto na literatura por (IGBOJIONU et al. 2021; MESA et al 2010).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

$$AR = a + b.E + c.P + d.E.P + e.E^2 + f.P^2 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde AR é a variável de resposta (rendimento de glicose), a é o termo constante, b é o coeficiente de quantidade de polpa, c o coeficiente de concentração de enzima, d coeficiente de multiplicação polpa x enzima, e coeficiente de polpa², e f o coeficiente de enzima²; enquanto a,b e c são termos lineares d,e e f são termos de produtos cruzados.

$$AR = (-8,294) + (3,368).E + (36,601).P + (7,642).E.P + (-28,528).E^2 + (-0,311).P^2 \quad (\text{Eq.2})$$

O valor P(lack-of-fit) do modelo analisa o que está fora do 95% do grau de confiança a fim de gerar um gráfico de contorno; encontrando o valor de 0,067, ou seja, 6,7% de que o modelo matemático não especifica a relação correta.

Cada coeficiente na Eq. 2 foram calculados e os possíveis efeitos de interação das variáveis do processo sobre a resposta foram obtidos. Sua significância foi verificada por análise de variância (ANOVA) de resultados experimentais. Um rendimento máximo de glicose de 57,66g/L de licor de hidrólise foi obtido com 15% de polpa e 2% de enzima, sobre o tempo de incubação de 48h. Outros autores relataram concentração de glicose calculada de cerca de 70 g/L (rendimento de 72%, teor de celulose de 52%) após 72 h de hidrólise usando 20% do total sólidos (IGBOJONU; LALUCE, 2021), resultado semelhante ao ponto ótimo previsto pela eq. 2 (Figura 2 b). Enfatiza-se aqui que a despeito do bom resultado apontado pela otimização do modelo, o ponto ótimo assim previsto deve ser confirmado em experimentos a serem realizados na continuidade do trabalho.

Discussão

O artigo enfoca a conversão do bagaço de cana, um subproduto da indústria açucareira, em uma fonte valiosa de carbono. Isso é crucial, uma vez que o mundo está cada vez mais interessado em substituir os combustíveis fósseis por fontes renováveis, como biocombustíveis e produtos químicos derivados da biomassa. A exploração do bagaço de cana como matéria-prima demonstra um esforço em direção à sustentabilidade.

O bagaço de cana de açúcar é um resíduo lignocelulósico gerados frequentemente como subprodutos de atividades agrícolas e industriais, e cada vez mais mostra interesse no campo da biotecnologia e da bioenergia devido ao seu potencial como matéria prima para produtos de valor agregado. Resíduo lignocelulósico é um termo que se refere a materiais de origem vegetal ricos em lignina, celulose e hemicelulose, componentes importantes das paredes celulares das plantas. Os resíduos lignocelulósicos incluem uma variedade de materiais, como palha de cereais, cascas de frutas, serragem, bagaço de cana-de-açúcar, restos de madeira, entre outros. Esses materiais são compostos principalmente por celulose, um polissacarídeo composto por cadeias de glicose, um dos principais componentes da parede celular das plantas e alvo importante para a produção de açúcares fermentáveis; hemicelulose, um grupo de polissacarídeos variados que inclui xilose, arabinose e outros açúcares, é menos cristalina do que a celulose e, portanto, mais facilmente hidrolisada em açúcares. Lignina, um complexo que fornece proteção e resistência às paredes celulares das plantas, representa um desafio para a hidrólise, pois é menos suscetível à quebra e pode interferir nos processos de conversão.

A enzima celulase se destaca como a mais apropriada para degradar a celulose, representando cerca de metade dos custos totais de produção do bioetanol a partir de biomassa. Por isso, é crucial otimizar o processo de sacarificação enzimática da celulose, maximizando a geração de açúcares fermentáveis. (IGBOJONU; LALUCE, 2021)

A otimização dos parâmetros de hidrólise é um processo complexo que requer experimentação e cuidados de análise, tornando indispensável a utilização de métodos estatísticos, como o planejamento experimental e a análise de superfície de resposta, ajudam a identificar como combinar ideias de padrão para maximizar o rendimento da conversão de celulose em açúcares fermentáveis. O software Minitab 14 é uma ferramenta de análise estatística amplamente utilizada para otimização de processos industriais e experimentais.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Conclusão

A concentração de açúcar fermentável deve ser a mais alta possível para redução de custos na produção de AR. Assim, o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima de baixo custo com alto teor de carboidratos pode fornecer os açúcares fermentáveis necessários em larga escala sem a necessidade de aumentar as áreas de plantio de cana-de-açúcar.

O licor de hidrólise foi produzido a partir de desenhos experimentais, com auxílio do software MiniTab 14, no intuito de otimizar o estudo na busca pelo ponto máximo de AR. No presente trabalho, demonstramos que alto rendimento de glicose (até 57,66g/L) pode ser alcançado com 7,5g de polpa, 1ml de enzima em um volume de 50ml após 48h, com 180rpm a 50°C. A estratégia usada no presente estudo é simples e de baixo custo, no entanto, necessita ser confirmada em um ensaio de triplicata para o ponto ótimo com 8,5355g de polpa, 1,1553ml de enzima que prevê concentração de AR máximo de 77,34 g/L

Referências

IGBOJIONU, L. I.; LALUCE, C. Optimization of high-solid enzymatic hydrolysis of two-step alkaline and dilute acid-pretreated sugarcane bagasse at low enzyme loadings by response surface methodology. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2021. Acesso em: 08 ago. 2023.

MESA, L. et al. An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, n. 8, p. 1092–1098, 2010. . Acesso em: 10 ago. 2023.

ROCHA, G.J.M., GONCALVES, A.R., OLIVEIRA, B.R., OLIVARES, E.G., ROSSELL, C.E.V., 2012 Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* v.35, p. 274–279, 2012 Acesso em: 10 ago. 2023.

RODRIGUES, M I. IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimizacao de processos, 2a Ed., Campinas, 2009, 357 pp. Acesso em: 10 ago. 2022.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.