

## **Utilização de Membrana de Fibras Ocas na Destoxificação de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar visando à Produção de Etanol**

**Eugenia Abiricha Montesi, Larissa Canilha, Maria das Graças de Almeida Felipe, Silvio Silvério da Silva**

Escola de Engenharia de Lorena EEL/USP – Departamento de Biotecnologia  
Estrada Municipal do Campinho, s/nº – CEP 12.602-810, Lorena, São Paulo E-mail:  
eugeniamontesi@alunos.eel.usp.br

### **RESUMO**

*Foi avaliado o desempenho fermentativo da levedura Sheffersomyces stipitis em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA), tratado com membrana de fibras ocas. A fase orgânica foi composta por uma mistura dos solventes alamina 336™ e octanol em diferentes proporções. Foi empregada a levedura S. stipitis como inóculo, obtido do cultivo em meio semi sintético enquanto as fermentações ocorreram em frascos Erlenmeyer com HHBCA tratado por membrana de fibras ocas e suplementado com nutrientes. A máxima remoção de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis foi de 56,90; 83,33; 50; 22,78 (%), respectivamente. Apesar dos ótimos resultados quanto à destoxificação, não verificou-se a produção de etanol pela levedura durante a fermentação de HHBCA destoxificado com membrana de fibras ocas, nas condições operacionais empregadas.*

**Palavras-chave:** hidrolisado hemicelulósico, bagaço de cana-de-açúcar, destoxificação, membrana de fibras ocas, etanol, *Sheffersomyces stipitis*

### **INTRODUÇÃO**

A energia em geral tem um papel vital no dia a dia de qualquer sociedade. As fontes de energia podem ser classificadas em três grupos: fóssil, renovável e nuclear<sup>1</sup>. É de conhecimento que a maior fonte atual de energia é proveniente do petróleo, o qual é uma fonte fóssil, não renovável, e que causa danos ao meio ambiente, como poluição e emissão de gases de efeito estufa. Como forma de evitar essa degradação e prover a sociedade com um tipo de combustível mais sustentável, diversos tipos de biocombustíveis vêm sendo estudados, dentre eles o etanol. Este trabalho teve por objetivo estudar a utilização de membrana de fibras ocas na etapa de destoxificação para tentar contornar um dos gargalos da produção de etanol proveniente de biomassas vegetais como bagaço de cana-de-açúcar: a remoção de compostos tóxicos resultantes da hidrólise ácida do bagaço. Tais compostos influenciam negativamente o metabolismo microbiano, dificultando a transformação de açúcares fermentescíveis em etanol.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolisado em reator de aço inoxidável com capacidade de 50 L, a 121 °C por 20 min, com 1% m/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e relação sólido-líquido de 1kg de bagaço para

cada 10 L de solução ácida (1:10). Posteriormente, o hidrolisado foi concentrado em evaporador a vácuo, a 70 °C, com a finalidade de aumentar o seu teor inicial de xilose.

### **Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**

O tratamento escolhido foi a extração líquido-líquido com interface imobilizada em membrana de fibras ocas (hollow fiber). O módulo de membrana Liquicel Minimodule® Membrane Contactors 1 x 5.5 (Charlotte, NC – USA) foi utilizado. O HHBCA (fase aquosa) foi centrifugado a 2000 x *g* por 20 minutos e filtrado em membranas de poros 14, 0,45 e 0,22 µm, respectivamente para evitar o posterior entupimento da membrana de fibras ocas. A fase orgânica foi composta por uma combinação em três proporções diferentes de alamina 336™ e octanol (Tabela 1). Ambas as fases foram bombeadas por duas bombas peristálticas. A fase aquosa foi bombeada pelo interior e a fase orgânica pelo exterior da membrana. O tratamento foi realizado em bateladas descontínuas e um pHmetro monitorou a variação de pH durante todo o procedimento. A Tabela 1 mostra os parâmetros utilizados na destoxificação:

**Tabela 1** – Parâmetros utilizados na destoxificação por membrana de fibras ocas

<b>Tratamentos</b>	<b>Fase aquosa:Fase orgânica (volume)</b>	<b>Fase orgânica Alamina:octanol (%v/v)</b>	<b>Volume fase orgânica (mL)</b>
<b>A</b>	1:1	50-50%	400
<b>B</b>	1:1	50-50%	600
<b>C</b>	1:1	25-75%	600
<b>D</b>	1:1	75-25%	600

### **Fermentação dos hidrolisados destoxificados**

O inóculo da levedura *Sheffersomyces stipitis* foi obtido em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio composto de (g/L) xilose (30,0), extrato de levedura (3,0), extrato de malte (3,0) e peptona (5,0) em incubadora de movimento circular a 200 rpm, 30 °C, por 24 h. As células foram recolhidas por centrifugação a 2000 *g* por 30 min e lavadas com água esterilizada, para o preparo da suspensão utilizada como inóculo da fermentação. As fermentações foram realizadas em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio incubados a 30 °C e 200 rpm por 96 h. A concentração celular inicial foi de 3,0 g/L. O meio de fermentação foi composto de hidrolisado de bagaço de cana tratado e suplementado com os mesmos nutrientes descritos acima, exceto xilose. O desempenho fermentativo da levedura foi avaliado pela retirada periódica de amostras para a determinação das concentrações de açúcares, etanol e células.

### **Métodos analíticos**

A determinação das concentrações dos açúcares, etanol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) nas condições descritas por Canilha *et al.*<sup>2</sup>. Os compostos fenólicos foram determinados por espectrofotometria a 280nm, conforme metodologia descrita por Rocha<sup>3</sup>. Sólidos totais e cinzas foram determinados segundo metodologia descrita por Gouveia *et al.*<sup>4</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de açúcares, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, sólidos totais e cinzas presentes nos HHBCA antes e após as destoxificações são apresentadas na Tabela 2. Em geral, as destoxificações pela extração com solventes orgânicos apresentaram comportamentos semelhantes quanto à perda de açúcares e remoção de inibidores, independente do volume ou composição da fase orgânica utilizada. De acordo com a Tabela 2 houve poucas perdas de glicose (A-2,04%, B-1,53%, C-0%, D-3,07%) e de xilose (A-1,64%, B-0,71%, C-0,02%, D-2,25%) após a destoxificação, ao se comparar com o hidrolisado concentrado. Em relação aos compostos tóxicos, boas remoções de ácido acético (A-56,90%, B-48,03%, C-48,03%, D-43,73%), furfural (A-50%, B-50,00%, C-66,67%, D-83,33%), hidroximetilfurfural (A-50%, B-7,5%, C-37,5%, D-37,5%) e fenóis totais (A-22,27%, B-22,78%, C-19,60%, D-21,55%) também foram observadas. A etapa de destoxificação é de extrema importância uma vez que quanto menor o teor destes compostos, maiores as chances de ocorrer uma boa fermentação, já que esses são inibidores do metabolismo microbiano, prejudicando a conversão dos açúcares presentes no hidrolisado em produtos de interesse como o etanol<sup>5,6</sup>.

**Tabela 2** – Composição dos hidrolisados original, concentrado e destoxificados com membrana de fibras ocas. GLI–glicose, XIL–xilose, ARA–arabinose, ACET–ácido acético, FURF–furfural, HMF–hidroximetilfurfural, FT–fenóis totais, CIN–cinzas, pH–potencial hidrogeniônico

Hidrolisados	GLI (g/L)	XIL (g/L)	ARA (g/L)	ACET (g/L)	FURF (g/L)	HMF (g/L)	FT (g/L)	ST (g/L)	CIN (g/L)	pH
<b>original</b>	1,44	13,95	1,23	1,53	0,33	0,02	3,89	24,98	3,81	1,00
<b>concentrado</b>	5,87	63,59	4,38	2,79	0,06	0,08	13,83	114,55	10,63	0,71
<b>A</b>	5,75	62,55	3,86	1,20	0,03	0,04	10,75	93,30	5,42	1,30
<b>B</b>	5,78	63,14	3,91	1,45	0,03	0,05	10,68	105,43	3,41	0,97
<b>C</b>	5,93	63,58	4,02	1,45	0,02	0,05	11,12	101,53	3,37	0,87
<b>D</b>	5,69	62,16	3,84	1,57	0,01	0,05	10,85	100,08	3,90	0,97

Na Tabela 3 são apresentados os parâmetros fermentativos obtidos após a fermentação dos hidrolisados destoxificados e do hidrolisado não destoxificado.

**Tabela 3** - Parâmetros fermentativos obtidos nas fermentações utilizando os hidrolisado de bagaço de cana tratados e não tratado.

Hidrolisados	Tempo(h)	Etanol(g/L)	Células (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Q_p$ (g/L.h)
<b>Não destoxificado</b>	48	0,99	3,71	0,19	0,02	0,02
<b>A</b>	48	0,00	0,30	0,00	0,10	0,00
<b>B</b>	48	0,00	0,19	0,00	0,11	0,00
<b>C</b>	48	0,00	0,19	0,00	0,07	0,00
<b>D</b>	48	0,00	0,44	0,00	0,15	0,00

Observa-se que houve um baixo consumo dos açúcares e também baixa produção de etanol(0,99 g/L) pela levedura ao se utilizar o hidrolisado não destoxificado. Tal resultado revela a necessidade da destoxificação do hidrolisado antes de ser utilizado como meio de fermentação, visando reduzir a concentração dos compostos inibitórios presentes, aumentando a fermentabilidade. Por outro lado o consumo dos açúcares também foi baixo nos ensaios onde o hidrolisado foi previamente destoxificado pela extração com solventes orgânicos, resultando na ausência de produção de etanol, indicando assim, uma possível inibição no metabolismo da levedura *S. stipitis* pelos solventes utilizados na etapa de destoxificação. Tal fato já foi constatado por Ferraz<sup>7</sup>, utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e a mesma levedura utilizada neste trabalho (*Sheffersomyces stipitis*) para a fermentação. Grzenia *et al.*<sup>8</sup> também obtiveram resultados semelhantes utilizando hidrolisado de palha de milho e a bactéria *Zymomonas mobilis* 8b para a bioconversão de açúcares a etanol. Segundo estes autores, os resultados sugerem que o octanol é muito tóxico para o microorganismo utilizado.

### CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível obter bons resultados quanto à destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela extração em membranas de fibras ocas. Porém, a presença de alamina e octanol no hidrolisado inibiu o metabolismo microbiano, impossibilitando a produção de etanol. Os próximos estudos relacionados ao assunto devem priorizar a procura de formas eficientes de diminuir a transferência desses compostos inibitórios para o hidrolisado durante a extração, de modo a aumentar as chances de fermentabilidade.

### REFERÊNCIAS

- (1) DEMIRBAS, A. **Biofuels: Securing the Planet's Future Energy Needs**, Editora Springer, Londres, 2009.
- (2) CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161, p.84-92, 2010.
- (3) ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar assistida por oxigênio**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (IQSC), São Carlos, 2010.
- (4) GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32, p.1500-1503, 2009.
- (5) PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.25-33, 2000.
- (6) RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; VITOLLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, p.299-311, 2001.
- (7) FERRAZ, F.O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo (EEL), Lorena, 2010.

(8) GRZENIA, D.L.; WICKRAMASINGHE, S.R.; SCHELL, D.J. Fermentation of Reactive-Membrane-Extracted and Ammonium-Hydroxide-Conditioned Dilute-Acid-Pretreated Corn Stover . **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.470-478, 2012.