

Utilização de planejamento experimental no pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar

SIQUEIRA, Eliana M. G. Rodrigues de
ALUISI, Bianca
BARBEIRO, Isabela G.

Resumo

A produção de bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar apresenta grande potencial. Entretanto, necessita de um pré-tratamento para transformar matérias lignocelulósicas em açúcares fermentescíveis. Além disso, deve-se evitar a degradação ou perda desses açúcares e a formação de sub-produtos que são inibidores da fermentação. O presente trabalho apresenta um estudo do pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, através da utilização de um planejamento estatístico, na qual foi possível determinar um modelo matemático que represente o processo. Através dos resultados, constatou-se que foram significativas as variáveis temperatura e concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Palavras-chave: planejamento experimental; pré-tratamento oxidativo alcalino; bagaço de cana-de-açúcar.

Abstract

The production of bioethanol from sugar cane bagasse has great potential. However, it requires a pre-treatment to transform lignocellulosic materials into fermentable sugars. In addition, you should avoid the degradation or loss of sugars and the formation of sub-products that are inhibitors of the fermentation process. This work presents a study of pre-oxidative treatment in an alkaline medium sugar cane bagasse, by a statistical planning, where it was possible to determine a mathematical model that represents the process. Through the results, it had found that there were significant variables temperature and concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2).

Keywords: experimental planning; pre-treatment oxidative alkaline; sugar cane bagasse.

Resumen

La producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar tiene un gran potencial. Sin embargo, requiere un tratamiento previo para transformar materiales lignocelulósicos en azúcares fermentables. Además, se debe evitar la degradación o pérdida de los azúcares y la formación de sub-productos que son inhibidores de la fermentación. Este trabajo presenta un estudio de pre-tratamiento oxidativo en medio alcalino bagazo de caña de azúcar, a través del uso de una planificación estadística, donde fue posible determinar un modelo matemático que representa el proceso. A través de los resultados, se encontró que hubo importantes las variables temperatura y concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Palabras clave: planeamiento experimental; pre-tratamiento alcalino oxidativo; bagazo de caña de azúcar.

INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar não pode ser tratado dentro do setor sucroalcooleiro brasileiro somente como mais um resíduo, mas como um dos principais tipos de biomassa energética. No período de 2010/2011, mais de 620 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram moídas, gerando cerca de 208 milhões de toneladas de bagaço (ROCHA *et al.*, 2012).

A utilização de novas tecnologias para produção de bioetanol através da biomassa representa uma das alternativas mais significativas à consolidação de um modelo que seja sustentável para a produção de combustíveis renováveis (PITARELO *et al.*, 2012).

A produção de bioetanol de segunda geração é um novo conceito que corresponde à fabricação de álcool utilizando biomassa lignocelulósica. Entretanto, a utilização desta matéria-prima, requer um prévio tratamento, o qual resulta em uma redução no grau de cristalinidade aumento da área superficial e diminuição da formação de compostos inibidores. As tecnologias empregadas a partir de materiais lignocelulósicos consistem na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação. Para realizar esta tarefa, o processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas para a separação dos açúcares e remoção da lignina (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Embora já tenham sido utilizados vários métodos de pré-tratamento nos últimos anos, observa-se que ainda há necessidade de se desenvolver novas tecnologias economicamente viáveis. Em função desta necessidade têm-se utilizado vários reagentes álcalis ou ácidos nesses tratamentos.

Um dos grandes desafios consiste em se determinar o melhor processo na obtenção desses açúcares fermentescíveis, isto é, devido à forte ligação existente entre os polímeros da celulose, hemicelulose e lignina.

Um importante pré-tratamento é a deslignificação oxidativa, que é utilizado para dissolver os componentes da matriz lignocelulósica, acelerando a hidrólise enzimática e a biodegradação. Esse processo utiliza peróxido de hidrogênio em meio alcalino. A aplicação deste método, em resíduos lignocelulósicos, aumenta significativamente a susceptibilidade para a hidrólise enzimática e, conseqüentemente, a produção de bioetanol. A adição do hidróxido torna a solução ainda mais eficiente na ação de deslignificação e solubilização da hemicelulose (AGUIAR e LUCENA, 2011).

Dessa forma, o objetivo deste processo foi a remoção da lignina e hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade do material tratado. Por esse motivo alguns propósitos devem ser atendidos: obter açúcares simples (monômeros), evitando a sua degradação ou perda; evitar a formação de coprodutos que sejam inibitórios para processos seguintes; e desorganizar a estrutura da biomassa celulósica, beneficiando o trabalho das enzimas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido em usina próxima ao município de Piracicaba - SP. Antes de se iniciar o tratamento, este bagaço foi submetido à secagem em estufa com temperatura de 45°C durante 48 horas. Em seguida, foi submetido à moagem e separado em peneiras da série de Taylor de 20 e 60 mesh.

Pré-tratamento com H₂O₂ em meio alcalino

O bagaço de cana-de-açúcar foi pesado e colocado em uma suspensão com solução de peróxido de hidrogênio, cujas concentrações variaram de acordo com o planejamento fatorial utilizado. Todos os experimentos foram feitos na proporção de 4% (massa de bagaço/volume de solução). O pH desta suspensão foi ajustado em 11,5 com solução aquosa de hidróxido de sódio e deixado em agitação por 150 rpm, sendo que o tempo e a temperatura também foram determinados através do planejamento fatorial. O material sólido foi posteriormente lavado com água destilada até pH neutro e, em seguida, seco. Sendo analisado quanto açúcar redutor (AR) e fenóis totais.

Açúcares Redutores (AR)

Pesou-se 1g de amostra e diluiu-se para 50 mL de água destilada. Agitou-se e filtrou-se com gaze e algodão. Em um tubo de ensaio foi colocado 0,5 mL desta amostra e 0,5 mL de DNS. Ferveu-se por 5 minutos e esfriou-se em banho de gelo. Acrescentou-se 4 mL de água destilada e agitou-se bastante. Procedeu-se a leitura no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540nm. O valor obtido foi expresso em g de açúcar redutores/mL de solução da amostra (MILLER, 1959).

Determinação de Fenóis Totais

A determinação dos fenóis totais foi feita pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (Kujala *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005; Meda *et al.*, 2005). Amostras contendo 0,5 ml de hidrolisado foram misturadas com 0,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu (2N) e 1,0 ml de água destilada. Foram levadas à agitação em vórtice e, em seguida, deixadas em repouso por 5 minutos ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. Após este período foram adicionados 0,5 ml de carbonato de sódio 10% à reação, que foi novamente agitada em vórtice e mantida à temperatura ambiente e na ausência de luz por 1 hora. Procedeu a leitura em espectrofotômetro modelo T60U da marca PGI instruments, em um comprimento de onda de 760nm. Na preparação da amostra em branco foi utilizada apenas água destilada nas mesmas condições do método. O ácido gálico, dissolvido em água destilada, foi usado na elaboração da curva padrão.

Delineamento Experimental do Pré-Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar em meio Alcalino Oxidativo

As variáveis estudadas foram: tempo de hidrólise (A), temperatura (B) e concentração de H₂O₂ (C).

O delineamento experimental para verificação das variáveis sobre o pré-tratamento oxidativo em meio alcalino foi realizado segundo um esquema fatorial completo do tipo 2³ face centrada com 4 ensaios no ponto central e em duplicata. Os níveis dos fatores utilizados são mostrados na Tabela 1, onde (-1), (0) e (+1) significam o menor nível, nível médio e maior nível, respectivamente.

TABELA 1: Valores dos níveis das variáveis avaliadas no planejamento fatorial completo 2³ com face centrada e 4 ensaios no ponto central utilizados no pré-tratamento oxidativo em meio alcalino:

Variáveis	Níveis		
	(-1)	0	(+1)
A = Tempo de hidrólise (minutos)	75	90	105
B = Temperatura (°C)	30	35	40
C = Concentração de H ₂ O ₂ (%)	6	7	8

Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através do *software STATISTICA*TM, versão 8.0, onde foram feitas estimativas dos parâmetros nas variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, erros-padrão, teste t de “*Student*” e ainda em tabelas de análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do peróxido de hidrogênio no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar vem sendo feita com o intuito de se dissolver os componentes da matriz lignocelulósica e acelerar o processo de hidrólise enzimática. Sua principal função é reagir com a lignina, uma vez que se

comporta como um potente agente deslignificante (Rabelo *et al.*, 2011). Sendo isto verdade, nos resta acreditar que a quantidade de glicose liberada deve ser pequena.

Optou-se então por analisar o efeito do peróxido de hidrogênio em meio alcalino, sobre o bagaço de cana-de-açúcar, em relação à quantidade de fenol total, através do qual é possível correlacionar a liberação de lignina da matriz lignocelulósica pela maior quantidade de fenol total liberado em relação ao bagaço sem tratamento.

Como os resultados das análises demonstraram que o modelo não se ajusta a um linear, pois a curvatura apresentou efeito significativo, foi preciso realizar novos ensaios para determinar qual modelo se ajustava ao processo de pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar considerando os termos que realmente influenciam no processo. Foram realizados 16 experimentos em duplicata, dos quais, 8 representam o fatorial completo, 4 experimentos no ponto central e 6 correspondentes ao planejamento de face centrada. A Tabela 2 representa a matriz utilizada nesse planejamento e os resultados obtidos. Consta-se que através destes resultados, os ensaios que tiveram os maiores e menores valores em fenol total, respectivamente, foram 5 e 9. Nestes ensaios a única variável que não se alterou foi o tempo de reação, indicando que provavelmente esta variável não seja significativa, diferentemente da temperatura e concentração de peróxido de hidrogênio, que tiveram seus valores alterados.

TABELA 2: Esquema da matriz do planejamento utilizado no pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar segundo um fatorial completo 2^3 com face centrada.

Ensaio	A	B	C	Fenol Total (g/l)
1	-1	-1	-1	68,9
2	+1	-1	-1	66,8
3	-1	+1	-1	62,1
4	+1	+1	-1	64,6
5	-1	-1	+1	68,6
6	+1	-1	+1	67,1
7	-1	+1	+1	64,0
8	+1	+1	+1	64,6
9	-1	0	0	41,5
10	+1	0	0	43,1
11	0	-1	0	49,9
12	0	+1	0	42,3
13	0	0	-1	48,0
14	0	0	+1	52,4
15	0	0	0	46,6
16	0	0	0	35,5
17	0	0	0	39,5
18	0	0	0	43,1

A=Tempo de hidrólise (min) (-1 = 75; 0 = 90; 1 = 105); B=Temperatura (°C) (-1 =30; 0 = 35; 1 = 40); C = Concentração de H₂O₂ (%) (-1 =6; 0 =7; 1 = 8)

Avaliando os valores obtidos para os critérios estatísticos de ajuste do modelo de segunda ordem proposto (Tabela 3), observa-se que são significativas as variáveis quadráticas temperatura (B²) e concentração de H₂O₂ (C²), e que o R² apresenta um valor de 95 %, indicando ajuste do modelo.

Tabela 3: Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” e erros-padrão obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 com face centrada.

Efeitos e interações	Estimativas	Erros-Padrão	T
Média	39,349	+/-1,496	-
A	0,220	+/- 2,404	0,929
B	-4,740	+/- 2,404	0,084
C	1,380	+/- 2,404	0,582
AB	1,675	+/- 2,688	0,551
AC	-0,475	+/- 2,688	0,864
BC	0,325	+/- 2,688	0,907
A ²	9,555	+/- 4,619	0,072
B ²	17,155	+/- 4,619	0,006*
C ²	25,355	+/-4,619	0,000*

A = Tempo de hidrólise (min); B = Temperatura (°C); C = Concentração de H₂O₂ (%);

*Significativos ($t_{8,0,95} = 2,306$).

A partir das variáveis significativas e desprezando-se as não significativas, foi feita uma análise do coeficiente de determinação do modelo $R^2 = 89,8\%$, revelando que, este modelo, pode representar o processo de pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar.

O modelo matemático para representar o processo, considerando os termos que influenciam o processo de pré-tratamento alcalino oxidativo do bagaço de cana-de-açúcar, pode ser expresso pela Equação 1:

$$Y = 40,119 + 10,273B^2 + 14,373C^2 \quad (1)$$

Sendo que Y representa o valor do fenol total, B representa a temperatura e, C a concentração de H₂O₂.

A partir destes valores obteve-se melhores resultados quando se utilizou o valor de temperatura 30°C e concentração de H₂O₂ 6%. Nestas condições, o máximo estimado pelo modelo foi de aproximadamente 65%. As curvas de nível e a superfície de resposta do modelo estão representadas no Gráfico 1, onde percebe-se que, para obter os maiores resultados, através do pré-tratamento alcalino oxidativo, deve-se trabalhar nos valores extremos dos parâmetros.

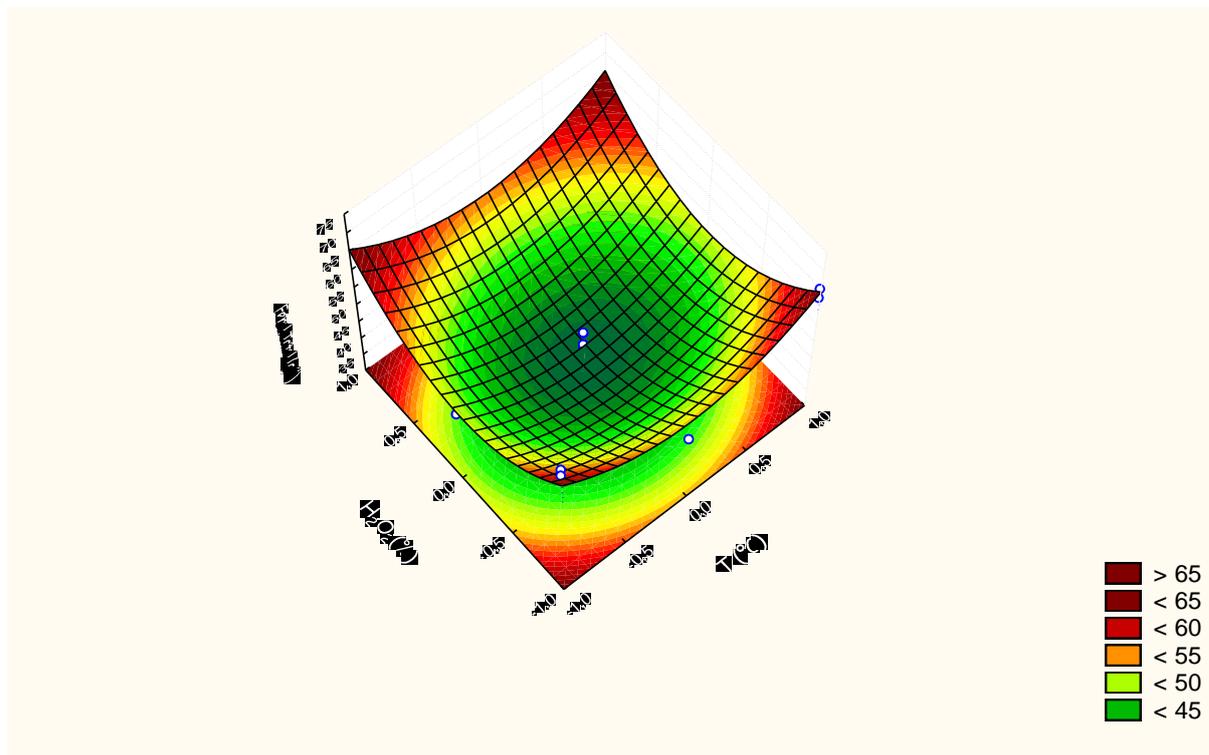


GRÁFICO 1: Superfície de resposta e curvas de nível descrita pelo modelo da Equação 1, que representa o processo de pré-tratamento alcalino oxidativo do bagaço de cana-de-açúcar.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, dentro dos limites estipulados, pode-se concluir que através da utilização do planejamento experimental, foi possível determinar o modelo matemático que representa o pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar. As melhores condições foram temperatura 30°C e concentração de peróxido de hidrogênio 6%. E como a variável tempo de reação não foi significativa, optou-se com trabalhar no menor valor, ou seja, 75 minutos.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M.; LUCENA, S. L. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* e cinética da desativação celulósica. *Acta Scientiarum Technology*, v. 33, n. 4. 2011.

KUJALA T. S.; LOPONEN J. M.; KLIKA K. D.; PIHLAJA K. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolic and three individual compounds. *Journal Agric Food Chemistry*. v. 48, p. 5338-5342. 2000.

MEDA A.; LAMIEN C. E.; ROMITO M.; MILLOGO J.; NACOUлма O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. v. 91, p. 571-577. 2005.

bioenergia em revista: diálogos, ano 4, n. 2, p. 59- 67-, jul./dez. 2014.

SIQUEIRA, Eliana M. G. Rodrigues de; ALUISI, Bianca; BARBEIRO, Isabela G.

Utilização de planejamento experimental no pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.

PEREIRA, JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and context of biorefinery. In: *Series on Biotechnology*, v. 2, p. 45. 2008.

PITARELO, A. P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1502-1509. 2012.

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass & Bioenergy*, v. 35(7), p. 2600-2607. 2011.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam Explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 35, n. 1, p. 274-279. 2012.

WU J. H.; TUNG Y. T.; WANG S. Y.; SHYUR L. F.; KUO Y. H.; CHANG S. T. PHENOLIC antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal Agric Food Chemistry*. v. 53, p. 5917-5921. 2005.

1 Eliana Maria G. Rodrigues de SIQUEIRA possui graduação em Engenharia Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Mestrado em Biotecnologia Industrial pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena na área de Microbiologia Aplicada e Genética de Microrganismos, Doutorado em Engenharia Química na área de Processos Biotecnológicos pela Universidade Estadual de Campinas e Pós-Doutorado pela USP. Atualmente é Professora Associada da Faculdade de Tecnologia de Piracicaba-FATEC. Tem experiência na área de Engenharia Química, com ênfase em Purificação de Enzimas, atuando principalmente nos seguintes temas: microrganismos, enzimas, fermentação e extração líquido-líquido.

2) Bianca ALUISI é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC – Faculdade de Tecnologia de Piracicaba Dep. “Roque Trevisan”.

3) Isabela G. BARBEIRO é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba Dep. “Roque Trevisan”.

bioenergia em revista: diálogos, ano 4, n. 2, p. 59- 67-, jul./dez. 2014.

SIQUEIRA, Eliana M. G. Rodrigues de; ALUISI, Bianca; BARBEIRO, Isabela G.

Utilização de planejamento experimental no pré-tratamento oxidativo em meio alcalino do bagaço de cana-de-açúcar