

Técnica aproveita lignocelulose da cana para produzir etanol

Antonio Bonomi, Alfredo Eduardo Maiorano e Maria Filomena de Andrade Rodrigues*

ACERVO PETROBRAS



Vista de canavial no interior de Alagoas; abril 2006

O Brasil se defronta na atualidade com a perspectiva de aumento significativo da demanda de álcool combustível. Essa previsão se sustenta em três realidades de mercado: aumento interno do consumo de álcool hidratado, motivado pelo sucesso da introdução da alternativa *flex fuel* no mercado de veículos automotivos leves, expansão das exportações brasileiras de álcool, em função do interesse mundial crescente pela mistura do álcool à gasolina como forma de enfrentar o aquecimento global, e opção brasileira pela produção do biodiesel, utilizando etanol na transesterificação dos óleos vegetais. Uma visão realista projeta a necessidade de aumentar significativamente a produção de álcool brasileiro nos próximos 5 ou 10 anos. Esse importante salto na produção, que começa a se tornar realidade por meio da implantação de usinas, abrindo novas fronteiras agrícolas para a cana-de-açúcar, exigirá, paralelamente, esforço concentrado na busca de incremento significativo de produtividade, em litros de álcool produzidos por área de cana plantada.

Esse aumento poderá ser alcançado trilhando-se duas rotas tecnológicas. A primeira tem seu foco voltado para a área agrícola e buscará, por meio da ampliação do atual programa de introdução de novas variedades de cana e, futuramente, do emprego da cana transgênica, estender, e talvez potencializar, o atual padrão de aumento de produtividade, que atualmente situa-se em torno de 2,5% ao ano (CTC, 2006). A segunda rota, focada no setor industrial, buscará desenvolver tecnologias que permitam o aproveitamento integral da cana-de-açúcar na produção de etanol ou outros combustíveis renováveis, ou ainda valendo-se do conceito de biorrefinaria (agregar valor à cadeia da cana, com a produção de novos produtos). Pela rota química e biológica, a utilização de biomassa lignocelulósica para a produção de etanol envolve basicamente dois processos: hidrólise dos polissacarídeos em açúcares e sua fermentação a etanol.

PRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos têm em sua composição basicamente celulose, hemicelulose e lignina, em proporção variada, dependendo da matéria-prima. No caso do bagaço e da palha de cana, a composição aproximada é de 40%, 40% e 20%, respectivamente, variando em função da variedade da cana-de-açúcar. A forte associação que existe entre os três componentes dificulta a utilização desses materiais como matérias-primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual existe a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento físico e/ou químico que atenua a interação entre os componentes da biomassa e os torne susceptíveis à conversão em bioprodutos e/ou insumos para a indústria química. Assim, as principais etapas do processo de utilização dessa biomassa são pré-tratamento da matéria-prima, hidrólise, fermentação e recuperação de produtos.

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para modificar a estrutura rígida que caracteriza a biomassa. Eles podem ser caracterizados com físicos (moagem, irradiação), químicos (alcalinos, ácidos, com solventes orgânicos) e físico-químicos (explosão a vapor, hidrotérmicos e oxidação úmida). Em geral, pré-tratamentos que combinam métodos físico-químicos são os mais eficientes. Dentre as várias alternativas até então estudadas, o pré-tratamento por explosão a vapor, com ou sem adição de catalisadores (H_2SO_4 , SO_2 ou CO_2), foi proposto como um dos mais promissores,

já que permite uma sensível atenuação do caráter altamente recalcitrante ao ataque químico ou enzimático dos materiais lignocelulósicos *in natura*. A maioria dos pré-tratamentos, devido à sua severidade, gera compostos inibidores dos microrganismos usados na etapa de fermentação, de maneira que a biomassa pré-tratada precisa ser lavada para removê-los. A Tabela 1 mostra uma comparação entre diferentes processos de pré-tratamento.

A celulose é um polissacarídeo formado por monômeros de D-glicose. O peso molecular da celulose, que depende da espécie do vegetal, pode variar entre 50×10^3 g/mol e 250×10^3 g/mol, equivalendo respectivamente de 300 a 1.500 resíduos de glicose. A hidrólise pode ser realizada por processos que utilizam ácidos, solventes orgânicos ou enzimas. O processo enzimático, apesar de ser considerado de grande potencialidade, pelo fato de ser realizado a pressão ambiente, temperaturas moderadas (50-60°C) e sem a formação de subprodutos indesejáveis, enfrenta diversos gargalos tecnológicos, entre os quais podem ser citados o alto custo das enzimas, a baixa produtividade e a dificuldade para atingir altos rendimentos. Na etapa de fermentação, o hidrolisado sofre a ação de microrganismos, como por exemplo leveduras, para transformação dos açúcares em etanol, CO_2 e outros subprodutos, em menores quantidades.

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas celulolíticas altamente

TABELA 1 | COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES PROCESSOS DE PRÉ-TRATAMENTO

CARACTERÍSTICA	PROCESSO			
	Ácido diluído	Explosão a vapor	AFEX	Hidrotérmico
Condições de operação	150-180°C	160-240°C	50-80°C	170-230°C
	11-12 bar	6-34 bar	15 bar	> 50 bar
	5-30 min	1-10 min	10-60 min	5-60 min
Formação de inibidores	Alta	Média	Pouca	Pouca
Impacto ambiental	Alto	Médio	Médio	Baixo

Fonte: Elaborada pelos autores

específicas. O produto da hidrólise é uma mistura de açúcares, cujo principal componente é a glicose. O nome “celulase” é usado para designar uma mistura de várias enzimas. As principais enzimas que compõem as celulases são:

1. endoglucanase (CMCase, ou endo-1, 4- β -D-glucanohidrolase; EC 3.2.1.4), que atacam ao acaso as regiões de baixa cristalinidade da celulose, diminuindo significativamente o grau de polimerização;
2. exoglucanases (celobiohidrolase, ou exo-1, 4- β -D-glucanohidrolase; EC 3.2.1.91), cuja ação catalítica é capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, atuando nas regiões terminais das moléculas de celulose e promovendo a sua despolimerização gradativa, por meio da remoção de unidades de celobiose;
3. β -glucosidase (β -D-glucosideo glucohidrolase; EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose em glicose, reduzindo assim o efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases.

Essas três classes de enzimas apresentam alto grau de sinergia durante a hidrólise da celulose. Além dessas, podem estar presentes nas celulases, enzimas que atacam a hemicelulose e as cadeias laterais da celulose, tais como xilanases, β -xilosidases e galactomanases. Dessa

maneira, para a otimização do processo de hidrólise enzimática de um dado material ligoceulósico faz-se necessária a caracterização do complexo enzimático, bem como o conhecimento dos parâmetros cinéticos de cada enzima dessa mistura. Assim, podem-se projetar ações para superar os passos limitantes desse processo, de maneira a aumentar o rendimento e a velocidade de hidrólise.

Os fatores que mais influenciam o processo de hidrólise enzimática são o tipo de substrato, a atividade e composição das celulases, e o método de pré-tratamento empregado. Já os principais parâmetros do processo são a concentração de substrato, a relação enzima/substrato, o pH e a temperatura. A relação enzima/substrato exerce grande influência na produtividade do processo. A velocidade e o rendimento do processo aumentam na medida que aumenta a quantidade de celulase, embora ela faça crescer significativamente o seu custo. O enriquecimento em uma das enzimas do complexo celulolítico, a possibilidade de reciclagem das enzimas e a sacarificação e fermentação simultâneas são aspectos de grande importância para a otimização do processo de hidrólise enzimática do bagaço (Lynd et al, 2002), como mostra a Figura 1.

FIGURA 1 | (A) BIORREATORES PARA ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (B) BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOÇÃO A VAPOR



MICROBIOLOGIA

O complexo enzimático celulolítico é produzido por vários microrganismos, como bactérias e fungos. Dentre as bactérias, incluem-se diversas espécies de actinomicetos, *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Clostridium*. A produção de celulases por fungos é amplamente disseminada na natureza, e envolve diversos gêneros, tais como *Trichoderma sp*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, *Hemicola sp* e *Fusarium sp*. *Trichoderma reesei* é o fungo mais estudado nos últimos 50 anos, sendo o mais usado para a produção de enzimas celulolíticas (Figura 2).

FIGURA 2 | CULTURA DO FUNGO PRODUTOR DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS *Trichoderma sp*.



Embora os complexos enzimáticos secretados pelos fungos atendam às necessidades de decomposição da matéria lignocelulósica na natureza, o uso industrial das celulases para a produção de etanol combustível pressupõe a obtenção de preparações enzimáticas de baixo custo, com altos níveis de atividade enzimática e estabilidade. A obtenção de preparações com alta atividade celulolítica depende do microrganismo utilizado e do processo de produção de enzima, principalmente em relação à composição do meio de cultivo, que afeta não apenas o crescimento celular, como também o rendimento em produto. Esses mecanismos são acionados, entre outros fatores, por substâncias que podem exercer o papel de indutoras, ativadoras, inibidoras e repressoras.

Para aprimorar os microrganismos envolvidos, diversos estudos de melhoramento genético foram efetuados, empregando-se genética clássica (mutação) ou técnicas de biologia molecular. A produção de celulases por leveduras recombinantes também é uma importante estratégia para obtenção de complexos enzimáticos mais eficientes. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um importante microrganismo para atender à demanda industrial de proteínas/enzimas de interesse e vem sendo utilizada com sucesso para a expressão e secreção funcional de um amplo espectro de enzimas do complexo celulolítico (com atividade CMCase, FPase e β -glicosidase).

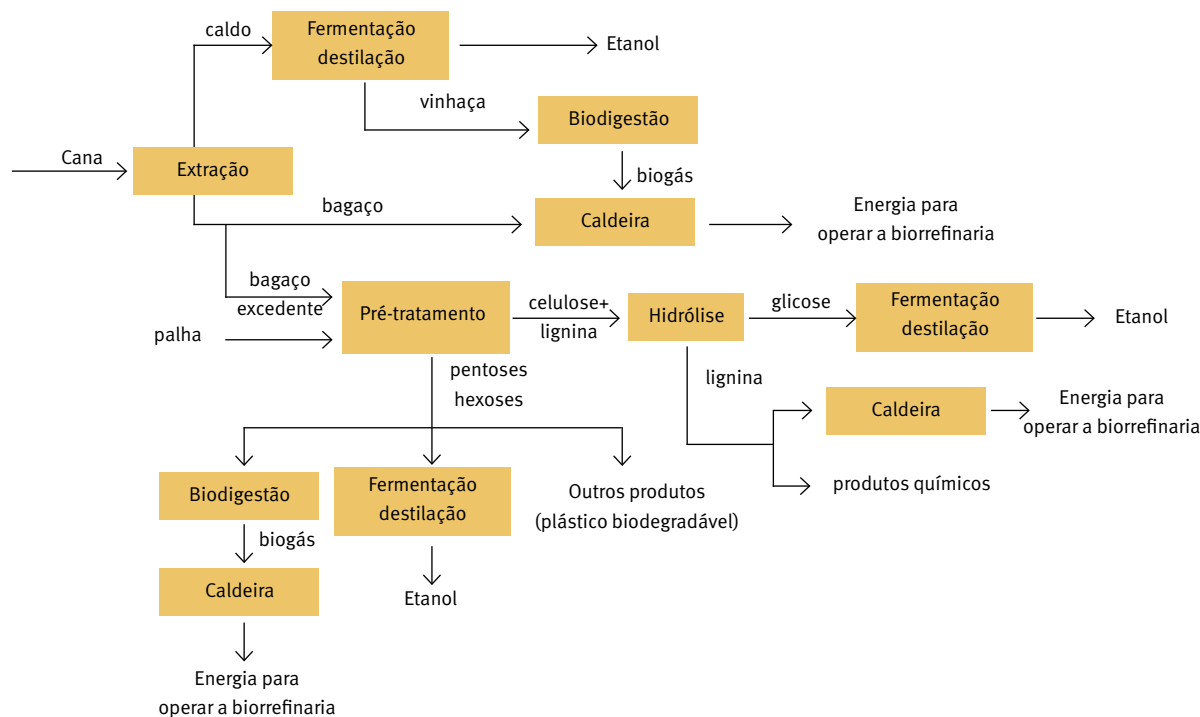
Açúcares derivados da hidrólise do bagaço de cana consistem em uma mistura de hexoses (principalmente glicose) e pentoses (principalmente xilose). Para a produção de etanol a partir de materiais

lignocelulósicos, é desejável que todos os açúcares contidos no hidrolisado sejam convertidos a etanol. No entanto, as linhagens selvagens *Saccharomyces cerevisiae* não metabolizam xilose ou outras pentoses. Adicionalmente, dependendo do processo de pré-tratamento e hidrólise do bagaço, os hidrolisados resultantes apresentam substâncias tóxicas às células microbianas pela presença de substâncias como ácido acético, furfural e hidroxi-metilfurfural. A limitação oferecida pelas leveduras gera a necessidade do desenvolvimento de microrganismos mais robustos, capazes de produzir etanol a partir dos hidrolisados de bagaço e palha.

Diferentes estratégias são estudadas para viabilizar a produção de etanol a partir de pentoses, dentre as quais se encontra a busca de linhagens de leveduras capazes de utilizar xilose.

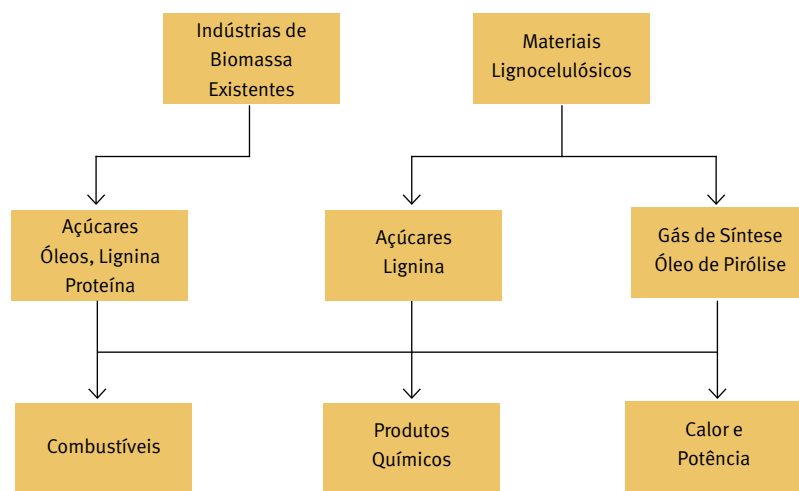
Linhagens recombinantes *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli* foram construídas com a capacidade de co-fermentar glicose e xilose. Alterthum e Ingram (1989) obtiveram uma linhagem de *Escherichia coli* recombinante que fermenta açúcares como a xilose, arabinose, galactose e lactose, por meio da clonagem dos genes da *Zymomonas mobilis* que conferem sua capacidade de produção de álcool. A tecnologia do DNA recombinante vem sendo usada para a clonagem e seqüenciamento de genes de interesse industrial em microrganismos, como estratégia para obtenção de microrganismos cada vez mais robustos para a produção de etanol. Contudo, muitas barreiras ainda precisam ser superadas, como a inibição do microrganismo recombinante pelo álcool ou por componentes resultantes dos processos de hidrólise.

FIGURA 3 | FLUXOGRAMA CONCEITUAL PRELIMINAR DA BIORREFINARIA: APROVEITAMENTO INTEGRAL DA CANA-DE-AÇÚCAR, PELA ROTA QUÍMICA E BIOLÓGICA



Fonte: Elaborada pelos autores

FIGURA 4 | BIORREFINARIA INTEGRADA DO FUTURO



Fonte: Elaborada pelos autores

POTENCIAL

Na implantação desta nova tecnologia, buscar-se-á coletar a cana integral (aprimoramento e mecanização do processo de colheita), além de otimizar o balanço energético da usina, de forma a aumentar a quantidade de biomassa excedente. As usinas de açúcar e álcool partem hoje para a mudança da tecnologia de geração de energia apenas para atingir a autosuficiência da usina com turbinas de contrapressão, passando a empregar turbinas de condensação e aumentando a pressão de operação para patamares significativamente maiores (atingindo 100 bar), o que viabiliza significativos ganhos na sobra de bagaço, dos atuais 10%, para valores próximos aos 50%. Esses excedentes otimizados de bagaço, o aproveitamento da palha e das pontas que deixam de ser queimadas no campo, bem como a produção de biogás a partir da biodigestão da vinhaça integram a revolução energética da cadeia produtiva da cana-de-açúcar. Com esse novo paradigma, ilustrado na Figura 3, para a rota química e biológica, pode-se projetar um aumento significativo da produção de

etanol por hectare de cana plantada/ano, introduzindo o conceito de biorrefinaria, passando dos atuais 6.000 litros, para cerca de 12.000 litros (IPT, 2006).

A biorrefinaria do futuro utilizará tecnologias desenvolvidas nas rotas químicas, biológicas e termoquímicas, ao mesmo tempo que gerará produtos de alto valor agregado, empregando a biomassa disponível. A Figura 4 integra, de forma simplificada, as tecnologias que darão suporte a esse novo conceito de biorrefinaria.

Ao contrário da plataforma bioquímica de aproveitamento de material lignocelulósico, para a qual o produto é bem definido (etanol), existe grande diversidade de configurações para a plataforma termoquímica. Os processos termolíticos da biomassa incluem a gaseificação e a pirólise para produzir produtos líquidos. A gaseificação seguida de síntese catalítica pode gerar diversos combustíveis, entre os quais se destacam o hidrogênio, o metanol e os chamados líquidos Fischer-Tropsch. Uma comparação realizada por Wright e Brown (2007) concluiu que, para o estado atual das tecnologias, nem

a plataforma bioquímica nem a plataforma termoquímica apresenta vantagem clara sobre a outra, no que se refere aos investimentos e aos custos operacionais, na produção dos chamados combustíveis de 2ª e 3ª gerações.

* **Antonio Bonomi** é diretor do Centro de Metrologia em Química (CMQ) (abonomi@ipt.br), **Alfredo Eduardo Maiorano** é pesquisador do Laboratório de Biotecnologia Industrial do Centro de Tecnologia de Processos e Produtos (CTPP) (maiorano@ipt.br) e **Maria Filomena de Andrade Rodrigues** é pesquisadora do Laboratório de Biotecnologia Industrial do Centro de Tecnologia de Processos e Produtos (CTPP) (filomena@ipt.br).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F., Ingram, L. O. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 1.943-1.948, 1989.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA (CTC) – Informação pessoal, 2006.
- INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO S. A. (IPT). Programa para a Cana-de-Açúcar – apresentação para a Fapesp. 2006.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.
- WRIGHT, M. M. and BROWN, R. C. Comparative economics of biorefineries based on the biochemical and thermochemical platforms. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, n. 1, p. 49-56, 2007.