

XI-038 - APROVEITAMENTO DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DA PRODUÇÃO DE TABACO PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES

Francesca Fornasier

Acadêmica de Química Industrial pela UNISC

Leonardo Amonte Anacker

Engenheiro Químico pela FURG; Mestre em Tecnologia Ambiental pela UNISC.

Rosana de Cassia de Souza Schneider⁽¹⁾

Professora do Departamento de Química e Física e do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental da UNISC, Química pela UNISC; Mestre em Química Analítica pela UFSM; Doutora em Química- Química Ambiental pela UFRGS.

Mateus da Silva Szarblewski

Químico Industrial pela UNISC

Lilian Ferreira

Acadêmica de Química Industrial pela UNISC

Endereço⁽¹⁾: Av. Independência, 2293, Bairro: Universitário - Santa Cruz do Sul - RS - CEP: 96815-900 – Brasil - Fone: (51) 3717-7300 - Fax: (51) 3717-1855 – e-mail: rosana@unisc.br

RESUMO

Materiais lignocelulósicos surgem como fonte de açúcares fermentescíveis e possuem a vantagem de não competirem com a produção de alimentos. Neste estudo utilizou-se o caule de tabaco moído e seco para a produção de açúcares em escala laboratorial, investigando-se algumas condições de pré-tratamento com ácido diluído e hidrólise enzimática. O pré-tratamento foi realizado com solução de ácido sulfúrico (1%, 2% e 3%) em autoclave por 30 a 90 min. A Hidrólise Enzimática foi realizada com a enzimas HTec2 da Novozyme obtendo-se 25,9 mg mL⁻¹ de produção de açúcares, pentoses e hexoses, correspondendo a 27,2% da biomassa inicial. Com isso, os resultados demonstraram que o caule de tabaco, o qual não possui valor econômico, aparece como uma fonte de monossacarídeos.

PALAVRAS-CHAVE: Caule do tabaco, Hidrólise enzimática, materiais lignocelulósicos, pré-tratamento ácido diluído

INTRODUÇÃO

A hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis utiliza rotas ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina.

A hidrólise enzimática é a segunda etapa do processo de produção de bioetanol de materiais lignocelulósicos, envolvendo a decomposição de polímeros da celulose e hemicelulose pelo ataque enzimático. A celulose usualmente contém somente glicanos, enquanto a hemicelulose é formada por vários polímeros como manano, xilano, glicano, galactano e arabinano. Com isso, o produto da hidrólise da celulose será basicamente a glicose, ao passo que a hidrólise da hemicelulose produzirá vários tipos de pentoses e hexoses (Binod *et al.*, 2010).

As enzimas podem ser produzidas por fungos como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* e/ou bactérias como *Clostridium cellulovorans*. Endo-glucanase, exo-glucanase e β -glucosidase são os três principais grupos de enzimas que atuam sinergicamente. *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces* também são capazes de produzir enzima celulase, assim como fungos *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophilium* sp (Sarkar *et al.*, 2012).

Com o objetivo de aumentar a eficiência da hidrólise enzimática os estudos estão concentrados na otimização do processo de hidrólise e no incremento da atividade da celulase. O grau de polimerização e a cristalinidade da celulose são fatores importantes para determinar a taxa de hidrólise, mas não os únicos responsáveis por uma boa hidrólise. O pré-tratamento favorece a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, mas em alguns casos aumenta o índice de cristalinidade, devido à remoção ou redução da parte amorfa da celulose. Por

outro lado, pré-tratamento com pH alto tem menos efeito e até mesmo reduz a cristalinidade da celulose (Alvira *et al.*, 2010).

Com isso, a taxa de reação de hidrólise está diretamente relacionada com o tipo de substrato e depende das características estruturais do mesmo e cada novo material a ser testado para a produção de açúcares com potencial de produção de etanol devem ser testados e a metodologia deve ser otimizada.

Com base nisso, buscou-se a produção de açúcares em escala laboratorial a partir do caule de tabaco remanescentes na lavoura após a colheita das folhas, investigando melhores condições de pré-tratamento com ácido diluído e com a enzima HTec2 no processo de hidrólise.

As lavouras de tabaco concentram-se 98% no sul do país, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, totalizando 652 municípios e 165,1 mil produtores, caracterizando-se por minifúndios (Ribeiro Fo, 2012).

A colheita das folhas de tabaco ocorre de maneira gradativa, iniciando-se nas folhas mais baixas e concluindo-se nas superiores (Figuras 1 e 2). Com isso, após a colheita da última folha de tabaco, sobra na lavoura o caule central da planta de tabaco, que é formado basicamente de celulose. Atualmente, este material é cortado e deixado na lavoura, sem aproveitamento para o solo ou para a próxima safra (Collins, 2011).



Figura 1: Tabaco antes da colheita



Figura 2: Tabaco após a colheita

Desta forma, o aproveitamento destes caules pode ser de interesse para a agricultura e indústria, uma vez que, para a produção de tabaco são utilizados 327,9 mil hectares, nos quais ficam todos os caules após a colheita (Ribeiro Fo, 2012).

MATERIAIS E MÉTODOS

O pré-tratamento e a hidrólise da biomassa foi definida a partir de estudos realizados com várias matérias-primas lignocelulósicas (De Vasconcelos *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Vancov *et al.*, 2015) e com caule de tabaco (Akpınar *et al.*, 2010; Shakhsh *et al.*, 2011).

Os caules de tabaco foram coletados na estação experimental da Associação dos Fumicultores do Brasil (AFUBRA), em Rio Pardo – RS, Brasil após a colheita das folhas de tabaco para a produção de cigarro. As amostras foram secas a 50°C em estufa e cominuídas até 20 - 80 mesh.

Pré-tratamento ácido

As condições de pré-tratamento com solução de ácido sulfúrico foram realizadas com 10 % (m/v) de biomassa. A concentração do ácido foi de 1 a 3% e o tempo do pré-tratamento de 30 a 90 min. Todas os experimentos foram realizados em triplicata.

O pré-tratamento foi realizado em recipiente de vidro borossilicato resistente a altas temperaturas, em autoclave a 121°C. Os hidrolisados foram filtrados e analisados quanto a composição de açúcares e a fase sólida foi seca e pesada.

A eficiência do pré-tratamento (EPA) foi calculada com relação ao teor de sólidos remanescentes após a hidrólise ácida (Unhasirikul *et al.*, 2012) e quanto ao teor de pentoses e hexoses no hidrolisado.

Hidrólise Enzimática

Na hidrólise utilizou-se a enzima Cellic HTEC2 (VHN00003) da Novozymes, oriunda de cepas de *Trichoderma reesei*. 0,5 g de amostra foram hidrolisados em 10 mL de solução tampão citrato pH 5 contendo 40 FPU de enzima. O ensaio da hidrólise foi conduzido em triplicata.

As hidrólises foram realizadas em Incubadora Shaker MA420, marca Marconi a 50°C, 300 rpm e 74 horas. Alíquotas de amostra de 0,5 mL foram coletadas em 0, 24, 43, 60 e 74 h, para análise dos açúcares.

Determinação de açúcares redutores totais

A determinação de açúcares redutores totais foi realizada pela reação com solução de DNS (2 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico e 60 g de tartarato de sódio e potássio - Sal de Rochelle diluído em 80 mL de hidróxido de sódio 0,5 mol L⁻¹). Os hidrolisados ácidos foram inicialmente neutralizados com solução de NaOH.

A reação com DNS foi conduzida pelo aquecimento à ebulição por 5 min, resfriamento a temperatura ambiente e filtração. O produto foi analisado a 540 nm em um espectrofotômetro UV/visível (V-1200, Pró-Análise) empregando glicose para a construção da curva analítica (Saqib e Whitney, 2011).

Determinação de pentoses e hexoses

Para a análise cromatográfica dos açúcares empregou-se Cromatógrafo à Líquido de Alta eficiência (HPLC, Shimadzu, Japão) com detector de arranjo de diodos (DAD, SPD-M20A). Para tanto, as amostras foram derivatizadas com o ácido p-aminobenzoico (PABA) (Erich *et al.*, 2012) e diluídas na fase móvel B descrita a seguir.

A análise cromatográfica foi realizada a 25 °C em coluna RP-C₁₈ Micropac, com duas fases móveis. A fase móvel A preparada com 20 mmol L⁻¹ de TBAHSO₄ em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 6,5) e metanol (50:50 (v/v)). A fase móvel B preparada com 20 mmol L⁻¹ de TBHSO₄ em tampão fosfato (0,05 mol L⁻¹, pH 6,5). Para ajustes de pH utilizou-se o ácido ortofosfórico. O gradiente de eluição das fases móveis foi: 100% de A nos primeiros 20 minutos, 25% de B e 75% de A nos 7 minutos seguintes e após este tempo 100% de A até 30 minutos. O volume injetado de cada amostra foi 10 µL, o fluxo total da fase móvel foi 0,8 mL min⁻¹. A detecção foi conduzida com varredura entre 210 a 400 nm e os açúcares derivatizados foram quantificados em 303 nm. Os dados foram coletados através do software LC Solution (Shimadzu) e posteriormente tratados no software OriginPro 8.5.

As curvas analíticas foram construídas para hexoses com glicose e para pentoses com arabinose, ambas em concentrações de 0.5 a 10 mg mL⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de amostras de caule de tabaco coletadas foi estimado a quantidade de caule gerada por hectare como sendo 1428 kg de caule seco por hectare plantado. Considerando-se que a área plantada de tabaco na Região Sul do Brasil em 2013 foi de 313.675 hectares e portanto 447.928 toneladas de caule. Assim, admitindo-se um

percentual de 35,7% de celulose no caule (Polycarpou, 2009), poderemos ter um excelente aproveitamento do caule em açúcares que poderão ser empregados para produção de biopolímeros ou bioetanol.

Pré-tratamento ácido da biomassa

As amostras de caule de tabaco foram submetidas a cinco diferentes condições de pré-tratamento em triplicata para identificar a melhor condição reacional. Os resultados da análise de açúcares destas amostras são apresentados na Tabela 1.

O pré-tratamento com ácido diluído hidrolisa principalmente a hemicelulose (Binod *et al.*, 2010; Avci *et al.*, 2013). Nesta etapa, da biomassa obtém-se principalmente pentoses e hexoses. De acordo com os resultados encontrados nas condições reacionais testadas há maior concentração de pentoses que hexoses no hidrolisado obtido, conforme esperado para a otimização do processo de pré-tratamento. Os dados da tabela 1 demonstram que as condições reacionais 1, 2 e 5 apresentam uma eficiência de hidrólise maior que as demais, evidenciado pela relação entre os açúcares no hidrolisado.

Segundo Avci *et al.* (2013) e Dagnino *et al.* (2013), a formação de compostos inibidores da fermentação e da hidrólise enzimática é favorecida pelo incremento da concentração de ácido e tempo de pré-tratamento, com isso, é essencial definir não somente as condições que liberem açúcares fermentescíveis, mas também as que produzam o mínimo de inibidores como furfural e hidroximetil furfural. Estes inibidores não foram observados nos cromatogramas obtidos dos hidrolisados analisados. Supõe-se que, tendo sido obtidos, foram em baixas concentrações.

Com base nos resultados do teor de pentoses e hexoses apresentadas na tabela 1 verifica-se que a melhor condição foi a hidrólise realizada com solução de ácido sulfúrico a 3% e 90 min. Nesta condição foi possível uma maior quantidade de pentoses com relação as hexoses, como mostra o resultado da proporção pentoses/hexoses.

Tabela 1. Composição dos hidrolisados obtidos no Pré-tratamento da biomassa de caule de tabaco.

Amostra	Concentração do ácido (%)	Tempo (min)	Açúcares Redutores Totais (%)	Hexoses ^a (mg mL ⁻¹)	Pentoses ^b (mg mL ⁻¹)	Proporção Pentoses/hexoses
1	3	90	20.3 ± 0.8	2.0	8,3	4,2
2	1	90	17.7 ± 0.7	2.0	8.1	4.1
3	3	30	13.3 ± 0.8	2.1	6.9	3.3
4	1	30	8.6 ± 0.1	1.3	3.1	2.4
5	2	60	16.6 ^c	1.0	4.5	4.1

a) Dados em teores de glicose; b) Dados em teores de xilose + arabinose; c) somente um resultado

A análise de eficiência do pré-tratamento também considerou a redução de massa do sólido (Tabela 2). Da mesma forma que houve a formação de mais açúcares nos hidrolisados, houve redução da massa de sólido, mostrando maior eficiência de pré-tratamento (EPA). Conforme os resultados obtidos para os açúcares no hidrolisado, houve maior remoção da hemicelulose do que celulose.

Tabela 2- Eficiência do Pré-tratamento Ácido de Caule de Tabaco

Amostra	Concentração do Ácido (%)	Tempo (min)	Eficiência (%)
1	3	90	54,2
2	1	90	51,3
3	3	30	48,6
4	1	30	41,2
5	2	60	52,5

Hidrólise Enzimática

Considerando que o tempo de 30 min de pré-tratamento não mostrou resultados favoráveis a remoção da hemicelulose da biomassa de caule de tabaco, foram realizados os experimentos de hidrólise enzimática com as amostras sólidas selecionadas a partir dos pré-tratamentos a 90 min, com 1 e 3 % de H₂SO₄ e a 60 min, 2% de H₂SO₄, ambas a 121°C. Os experimentos de hidrólise enzimática foram conduzidos para as estas três amostras e com a enzima HTec2 da Novozymes. Os resultados relativos a produção de açúcares redutores totais do pré-tratamento mais da hidrólise enzimática estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados de ART durante a Hidrólise Enzimática

	Tempo (h)	Açúcares Redutores Totais (mg mL ⁻¹)		
		#1	#2	#5
Hidrólise Enzimática	1	2,1	2,1	3,2
	24	3,7	4,7	7,1
	43	5,0	4,9	7,5
	60	4,8	4,4	8,7
	74	4,6	5,5	9,3
Pré-tratamento – Ácido	-	20,3	15,7	16,6
Total de ART		24,9	21,2	25,9

#1, #2, #3 – condições de pré-tratamento apresentadas na Tabela 1, das quais foi selecionada a fase sólida para a hidrólise enzimática.

Para as 3 amostras pré-tratadas, somando-se o teor de açúcares redutores totais do pré-tratamento com a hidrólise enzimática. Os dados não diferenciam uma condição de pré-tratamento (#1, 2# ou #5) como sendo a melhor para realizar a hidrólise enzimática como mostra a Figura 4.

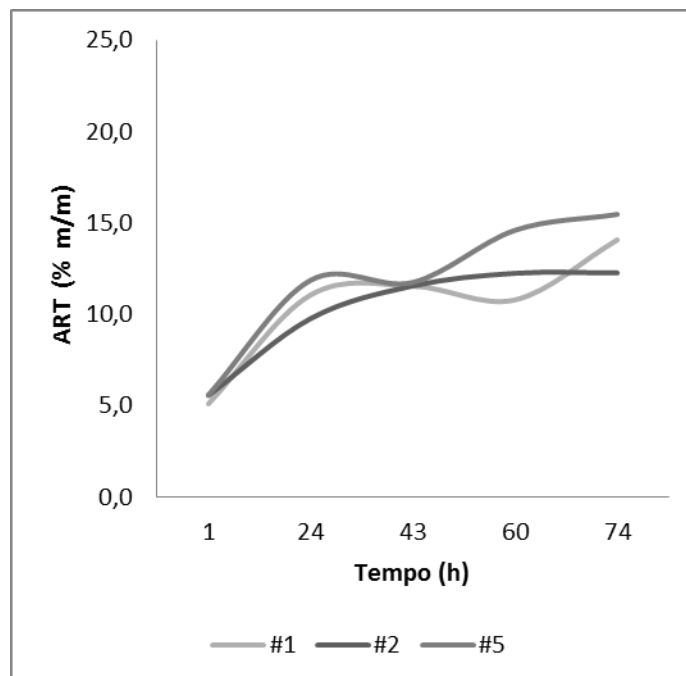


Figura 4 – Evolução do percentual de ART no hidrolisado com Enzima HTec2.

CONCLUSÕES

Resíduos lignocelulósicos surgem como uma alternativa para a produção de açúcares. O pré-tratamento da biomassa de caule de tabaco com ácido diluído apresentou melhores rendimentos com concentração de ácido sulfúrico de 2% e tempo de 60 min. Os resultados demonstram que o caule de tabaco, o qual não possui valor econômico, aparece como uma fonte de monossacarídeos. A produção de açúcares, pentoses e hexoses, analisadas pelo teor de açúcares redutores totais foi de até 25,9 mg mL⁻¹. Este valor corresponde a 27,2% da biomassa inicial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AKPINAR, O., ERDOGAN, K., BAKIR, U., YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 119-125, 2010.
- 2 ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- 3 AVCI, A., SAHA, B. C., KENNEDY, G. J., COTTA, M. A. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Bioresource Technology*, v. 142, n. 0, p. 312-319, 2013.
- 4 BINOD, P., SINDHU, R., SINGHANIA, R. R., VIKRAM, S., DEVI, L., NAGALAKSHMI, S., KURIEN, N., SUKUMARAN, R. K., PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.
- 5 COLLINS, W. E. A. Fundamentos da Produção do Tabaco de Estufa. . 1. 2011.
- 6 DAGNINO, E. P., CHAMORRO, E. R., ROMANO, S. D., FELISSIA, F. E., AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 42, n. 0, p. 363-368, 2013.
- 7 DE VASCONCELOS, S. M., SANTOS, A. M. P., ROCHA, G. J. M., SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresource Technology*, v. 135, n. 0, p. 46-52, 2013.
- 8 ERICH, S., ANZMANN, T., FISCHER, L. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2393-2396, 2012.
- 9 KIM, T. H., CHOI, C. H., OH, K. K. Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulfuric acid-assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, v. 130, n. 0, p. 306-313, 2013.
- 10 POLYCARPOU, P. Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*. *Renewable Energy*, v. 34, n. 12, p. 2525-2527, 2009.
- 11 RIBEIRO FO, M. Crescimento e Alternativas - Anuario Brasileiro do Tabaco 2012.
- 12 SAQIB, A. A. N., WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 11, p. 4748-4750, 2011.
- 13 SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S., AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.
- 14 SHAKHES, J., MARANDI, M. A. B., ZEINALY, F., SARAIA, A., SAGHAFI, T. Tobacco residuals as promising lignocellulosic materials for pulp and paper industry. *Bioresources*, v. 6, n. 4, p. 4481-4493, 2011.
- 15 UNHASIRIKUL, M., NARANONG, N., NARKRUGSA, W. Reducing Sugar Production from Durian Peel by Hydrochloric Acid Hydrolysis. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, v. 6, p. 14, 2012.
- 16 VANCOR, T., SCHNEIDER, R., PALMER, J., MCINTOSH, S., STUETZ, R. Potential use of feedlot cattle manure for bioethanol production. *Bioresour Technol*, v. no prelo, 2015.