

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS

ETHANOL PRODUCTION FROM FERMENTATION OF INDUSTRIAL WASTE

Gláucia Kovalski^{1,2}
Henrique Wedderhoff Herrmann¹
André Gallina³
Cynthia Beatriz Fürstenberger⁴
Paulo Rogério Pinto Rodrigues⁴

Resumo: O etanol é um biocombustível produzido a partir de diversas matérias primas, sendo a principal a cana-de-açúcar, também podem ser utilizados resíduos industriais como o glicerol do biodiesel, e resíduos da indústria de papel. Esses resíduos industriais apresentam em sua composição considerável concentração de carbono, podendo ser utilizados em processos de fermentação. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo produzir etanol pela fermentação anaeróbica do glicerol e de resíduos da indústria de papel utilizando-se um microorganismo específico. Foi utilizado um planejamento experimental multivariado 2² com ponto central. O processo de fermentação foi realizado por 72 horas a 36 °C ± 0,5. Os resultados mostraram uma tendência de maior produção de etanol nos ensaios com 2 g de resíduo celulósico e 4 mL de microorganismo. Os maiores teores de etanol obtido foram de 83 e 81 °GL.

Palavras-chave: Bioenergia, microbiologia, glicerol.

Abstract: Ethanol is a biofuel produced from various raw materials, being the main one sugar cane; it can also be used industrial waste such as residual glycerol from biodiesel and residue of the paper industry. These industrial waste present in their composition considerable concentration of carbon that can be used in fermentation processes. Thus, this study aims to produce ethanol by anaerobic fermentation of glycerol and waste from the paper industry by a specific microorganism. A multivariate 2² experimental design with midpoint was used. The fermentation process was executed during 72 hours at 36 °C ± 0.5. The results showed a trend of increased ethanol production using 2 g of cellulosic residue and 4 mL of microorganism. The highest concentration of ethanol obtained were 83 and 81 °GL.

Keywords: Bioenergy, microbiology, glycerol.

1 INTRODUÇÃO

A partir da Revolução Industrial, a utilização de energia pela sociedade passou por uma fase de elevado crescimento, sendo a matéria-prima de origem fóssil a principal fonte geradora de energia, marcando uma substancial modificação na história da sociedade humana (Cushion *et al.*, 2010).

Combustíveis de origem fóssil geram grande quantidade de gases responsáveis pelo efeito estufa, como o dióxido de carbono (CO₂) e o dióxido de enxofre (SO₂), os quais a concentração vem aumentando gradativamente na atmosfera, levando a mudanças climáticas e ambientais. Atualmente os combustíveis fósseis atravessam uma fase delicada, devido ao aumento do preço do petróleo, e aos prejuízos causados ao meio ambiente (Escobar *et al.*, 2009).

Dessa forma, o desenvolvimento de fontes renováveis e limpas de energia recebe

¹ Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Pós-graduandos em Bioenergia - Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Vila Carli, 85040-080 - Guarapuava – Paraná – Brasil.

² email: glaukovalski@gmail.com

³ Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, Docente do Departamento de Físico-Química - Rodovia PR-182, Km 466, s/n – Realeza – Paraná – Brasil.

⁴ Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, Docentes do Mestrado em Bioenergia - Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 - Vila Carli, Guarapuava – Paraná – Brasil.

destaque, onde se busca novos tipos de energia para suprir a demanda exigida pela sociedade. Entre as pesquisas desenvolvidas a produção de biocombustíveis se mostra uma opção favorável, podendo ser gerados a partir de diversos tipos de matéria-prima, tanto de origem vegetal como animal. As matérias-primas vegetais são provenientes de óleos de plantas como soja, canola, dendê, girassol, mamona, entre outros. As matérias-primas animais provêm do sebo suíno, bovino ou de aves. O uso de biocombustíveis apresenta fatores positivos como o incentivo da agricultura familiar, a diminuição da emissão de gases poluentes e maior estabilidade econômica (Leite e Cortez, 2012).

Se tratando de biocombustíveis, o etanol é um biocombustível renovável, que não possui enxofre em sua estrutura, quando sofre combustão não libera gases poluentes, como SO_2 (g) e SO_3 (g). É utilizado no Brasil desde 1970, quando em virtude da crise do petróleo, foi estimulado o desenvolvimento de combustíveis em substituição a gasolina, caracterizando-se como o Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool), sendo o Brasil um dos primeiros países a utilizar esse tipo de combustível (Banerjee, 2010).

Segundo o Balanço Energético Nacional (2013), houve aumento de 2,4% na produção de etanol, atingindo o montante de 23.476.667 m³. Desse total, 59,3% é de etanol hidratado: 13.913.109 m³. O etanol anidro obteve acréscimo de 9,7%, totalizando 9.563.558 m³. Visando viabilizar a produção de etanol muitas coisas ainda precisam ser feitas, com o objetivo de aumentar a produção e elevar a viabilidade comercial desse combustível. A inserção do etanol de segunda geração na matriz energética representa uma forma de alavancar a produção desse biocombustível (Ministério de Minas e Energia, 2012).

Dentre os tipos de biomassa que podem ser utilizadas, os resíduos da indústria de papel se mostram como uma matéria-prima em potencial. Na maioria das vezes, parte dos rejeitos da indústria é queimada e outra parte é removida para aterros inadequados. A maioria das plantas tem parede celular composta de aproximadamente 15-40% celulose, 30-40% hemicelulose e pectina e 20% lignina. Sabe-se que esses resíduos contêm elevado teor de celulose, fator este importante para se tornar matéria-prima na produção de etanol (Silva, 2010; Maiti *et al.*, 2011).

Além de resíduos celulósicos, outros resíduos industriais apresentam potencial na produção do etanol, como por exemplo, o glicerol, principal coproduto da produção do biodiesel. A quantidade de glicerol gerado no processo corresponde a cerca de 10% de todo biodiesel. O excesso de glicerol produzido gera preocupações ambientais e econômicas, visto que o mesmo apresenta impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, e não pode ser descartado diretamente na natureza (Hu e Wood, 2010; Maru *et al.*, 2012).

Na figura 1 é apresentada a reação global de transesterificação, principal rota para obtenção do biodiesel.

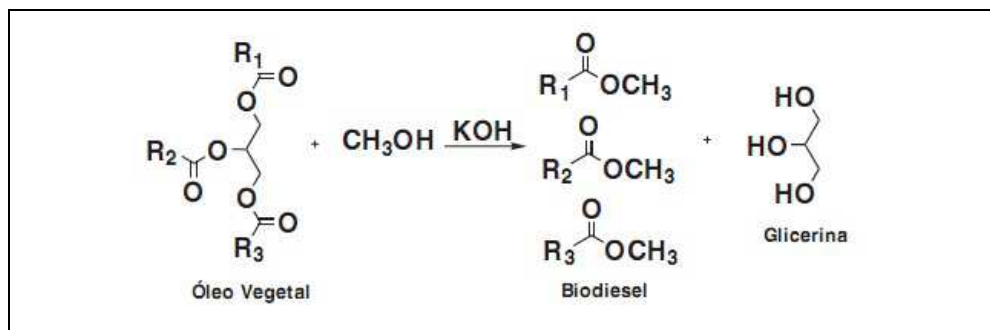


Figura 1. Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais (Mota e Pestana, 2011).

A primeira etapa consiste na conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, posteriormente a conversão destes em monoglicerídeos, e por último os glicerídeos são convertidos a glicerol, o que rende uma molécula de éster de álcool por glicerídeo em cada etapa. No final do processo de transesterificação, se forma uma massa líquida de duas fases

facilmente separadas por decantação, onde a fase superior contém os ésteres metílicos ou etílicos que constituem o biodiesel, e a fase inferior é composta por glicerol bruto e impurezas (RIVALDI, 2008).

O uso do glicerol na indústria depende de sua purificação, sendo necessário apresentar no mínimo 95% de pureza, para isso deve ser destilado, o que exige elevados custos. Por ser uma excelente fonte de carbono, pode ser aproveitado por microrganismos para realizar fermentação anaeróbica e converte-lo em produtos de maior valor econômico, como o etanol (Suhaimi *et al.*, 2012).

A fermentação é um conjunto de reações químicas, controladas por enzimas, onde ocorre a degradação de moléculas orgânicas em compostos mais simples e a conseqüente liberação de energia. Existem diversos microrganismos capazes de produzir etanol através da fermentação microbiológica (Lau *et al.*, 2010; Caparica *et al.*, 2012).

O princípio de conversão microbiológica de substratos em energia consiste no transporte da fonte de carbono para a célula e sua degradação a moléculas mais simples. A maioria dos microrganismos possui quatro vias metabólicas consideradas principais, para converter carbono e oxigênio em novas células e energia sob qualquer nível de oxigênio. Quando na ausência de oxigênio ocorre o crescimento fermentativo levando a produção de etanol (Tortora *et al.*, 2012; Zhang e Lynd, 2010).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo produzir etanol pela fermentação anaeróbica com um microorganismo específico utilizando-se como substratos resíduos da indústria de papel e glicerol residual do biodiesel.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são apresentados os materiais e métodos utilizados na pesquisa. Por se tratar de um processo de pedido de patente, o microorganismo e o resíduo da indústria de papel utilizados não serão mencionados.

2.1 MICROORGANISMO

O microorganismo utilizado na pesquisa foi obtido comercialmente, e armazenado em temperatura de -20 °C.

Posteriormente foi cultivado em meio líquido específico e incubado em estufa de cultura para o seu crescimento e desenvolvimento.

2.2 MATÉRIA-PRIMA

O glicerol utilizado no projeto é proveniente da produção da Usina de Biodiesel da Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO.

Os resíduos da indústria de papel foram cedidos por uma fábrica de papel cartão situada na região central do estado do Paraná/BR.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados dois planejamentos experimentais ^{2º} com ponto central para o desenvolvimento do projeto utilizando o software Design-Expert®.

As variáveis foram: concentração do resíduo celulósico e do microorganismo, utilizando-se 50 mL de glicerol para todos os ensaios.

2.4 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

O inóculo em sistema fechado recebeu gás nitrogênio para formar um sistema em anaerobiose. O processo de fermentação foi realizado em estufa microprocessada de cultura e bacteriologia - Q316M/Quimis, por 72 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

2.5 PROCESSO DE DESTILAÇÃO

A separação do álcool do concentrado fermentado pelo microorganismo foi executado via sistema de destilação simples. O fracionamento ocorreu por diferenças entre os pontos de ebulição, onde a temperatura ideal para destilação do etanol foi de 70°C .

2.6 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ETANOL

A determinação do teor de etanol no destilado bruto foi realizada utilizando-se o método NBR 13920. Consiste no uso de um espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível. É baseado na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional a concentração de etanol na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro a 600 nm. Foi realizada uma curva de calibração, e posteriormente análise das amostras para obtenção do teor de etanol (NBR 13920, 1997).

2.7 ANÁLISE DE DADOS

A análise de dados da pesquisa foi realizada utilizando-se o software Design-Expert®, para gerar a superfície de resposta e a tabela ANOVA para todos os meios estudados, sendo possível analisar os melhores parâmetros para produção do etanol.

2.8 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ETANOL

As análises físico-químicas do etanol foram realizadas em conformidade com a resolução ANP Nº 7, de 14 de abril de 2011.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ETANOL

Os teores de etanol obtido a partir da fermentação microbiológica do glicerol bruto (50 mL) e diferentes proporções de microorganismo e resíduos da indústria de papel do planejamento inicial estudado encontram-se na Tabela 1.

De acordo o programa estatístico Design Expert® os resultados obtidos no processo de fermentação seguem um modelo 2FI.

Na Tabela 2 são apresentados os dados relacionados a tabela ANOVA para a superfície de resposta do modelo estudado.

Tabela 1. Valores do teor de etanol no destilado bruto para o planejamento inicial.

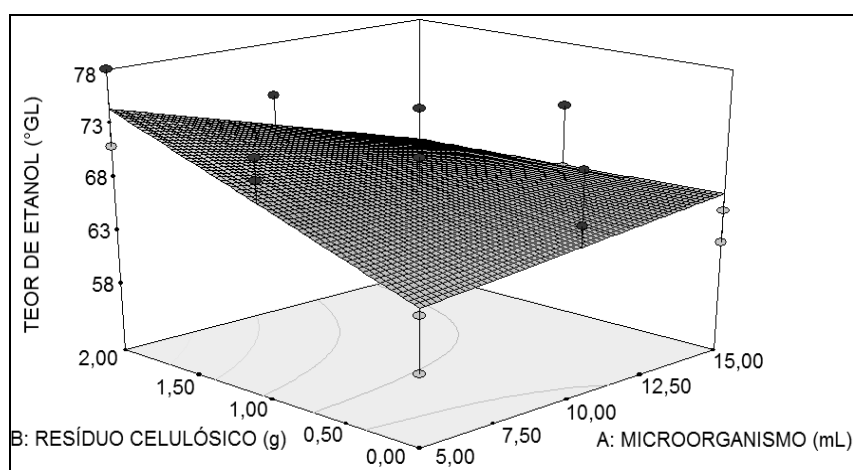
Ensaio	Microorganismo (ml)	Resíduo celulósico (g)	Etanol (°GL)
1	15	1	66±4,77
2	5	0	58±3,54
3	10	2	63±7,09
4	15	2	63±4,38
5	10	2	73±7,09
6	5	2	71±4,87
7	10	1	64±3,21
8	10	1	65±3,21
9	10	0	67±3,54
10	5	1	73±1,69
11	10	1	70±3,21
12	15	0	62±2,12
13	15	1	72±4,77
14	5	1	71±1,69
15	10	0	72±3,54
16	5	0	63±3,54
17	5	2	78±4,87
18	15	0	65±2,12
19	15	2	69±4,38

Tabela 2. Tabela ANOVA para os ensaios do planejamento inicial.

Fatores e interações	Efeito	p-valor
Interceptação/Modelo	62.21491	0.0710
A-Microorganismo	0.29167	0.2797
B-Proporção de resíduo	8.25000	0.0665
AB	-0.57500	0.0829
Desvio padrão: 4.38	R²: 0.3652	Erro padrão: 1.00

Conforme a Tabela 2 o modelo estatístico 2FI, apesar de não ser significativo, onde o valor p-valor é de 0,0710, representa 92,9% de nível de confiança, e indica forte tendência com relação a maior produção de etanol no estudo, como pode-se observar na superfície de resposta.

Na Figura 2 encontra-se a superfície de resposta dos ensaios estudados para as variáveis de concentração de microorganismo e percentagem de resíduo, para o planejamento inicial.

**Figura 2.** Superfície de resposta para o planejamento inicial.

A Figura 2 representa a superfície de resposta dos ensaios estudados, nota-se uma tendência de maior produção de etanol quando a concentração de microorganismo é de 5 mL e 2 g de resíduo celulósico, ensaios 6 e 17 da Tabela 1, nesses ensaios o teor de etanol obtido foi de 71 e 78 °GL, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos no planejamento inicial, foi realizado um segundo planejamento com o propósito de identificar as melhores condições de produção de etanol.

Os teores de etanol obtido pela fermentação no segundo planejamento encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Valores do teor de etanol no destilado bruto para o segundo planejamento.

Ensaio	Microorganismo (ml)	Resíduo celulósico (g)	Etanol (°GL)
1	5	2	71±4,87
2	4	1	75±2,12
3	4	1	78±2,12
4	6	1	57±1,41
5	4	3	69±1,41
6	4	2	83±1,41
7	5	1	73±1,69
8	6	2	63±1,41
9	4	2	81±1,41
10	5	1	71±1,69
11	6	3	55±2,12
12	6	2	65±1,41
13	5	3	59±3,28
14	5	2	78±4,87
15	5	3	63±3,28
16	4	3	71±1,41
17	6	3	58±2,12
18	6	1	59±1,41

O modelo que melhor explicou os resultados obtidos no processo de fermentação do segundo planejamento segue um modelo quadrático.

Na Tabela 4 são apresentados os dados relacionados a tabela ANOVA para a superfície de resposta do modelo estudado para o segundo planejamento.

Tabela 4. Tabela ANOVA para o segundo planejamento.

Fatores e interações	Efeito	p-valor
Interceptação/Modelo	62.21491	0.0001
A-Microorganismo	0.29167	0.0001
B-Resíduo celulósico	8.25000	0.0015
AB	-0.57500	0.2134
Desvio padrão: 2.69	R ² : 0.9334	Erro padrão: 1.42

De acordo com a Tabela 4 o modelo estatístico que melhor representa os ensaios estudados é o quadrático, o qual é significativo, representando 99,9% de confiança, sendo o valor p-valor de 0,0001, e indica forte tendência com relação a maior produção de etanol no estudo, como pode-se observar na superfície de resposta da Figura 2.

Na Figura 3 é apresentada a superfície de resposta dos ensaios estudados para o segundo planejamento.

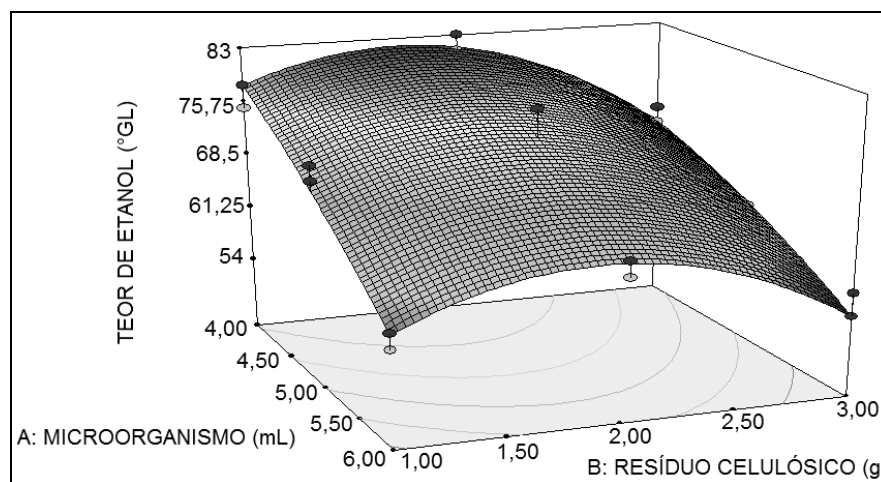


Figura 3. Superfície de resposta para o segundo planejamento.

Observa-se na superfície de resposta (Figura 3) que a maior produção de etanol foi em concentrações de 4 mL de microorganismo e 2 g de resíduo celulósico (ensaios 6 e 9), onde o teor de etanol obtido foi de 83 e 81 °GL, respectivamente.

Esses resultados apontam a melhor produção de etanol para o modelo estudado, indicando que concentrações maiores de microorganismo podem levar a uma saturação, impedindo o crescimento normal da população, o que interfere no processo de fermentação (Madigan *et al.*, 2010).

Segundo o modelo, a proporção de 2 g de resíduo celulósico representa melhor contribuição no processo de fermentação, indicando que nessas concentrações as fontes de carbono empregadas no processo apresentaram elevada taxa de conversão microbiológica, resultando em maior rendimento de etanol no final do processo de fermentação. Em proporções maiores de resíduo celulósico pode ter ocorrido uma saturação de substrato em relação ao microorganismo, o que tende a reduzir a ação de enzimas que atuam na produção de energia, limitando o crescimento da população e a conversão do substrato empregado (Tortora *et al.*, 2012).

3.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO ETANOL

As análises físico-químicas do etanol produzido foram realizadas em conformidade com a resolução ANP Nº 7, de 14 de abril de 2011. Os parâmetros que foram determinados encontram-se relacionados na Tabela 5.

Tabela 5. Análise físico-química do álcool gerado (ensaios 6 e 9 da Tabela 3).

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
Aspecto	NBR 14954	L.I.I (1)	L.I.I	-
Cor Visual	Visual	0 a 3 (2)	0	-
Massa específica a 20°C	ASTM D 4052	807,6 – 811,0	815,11	Kg.m ⁻³
Teor alcoólico	NBR 5992	92,5 – 93,8	90,71	°INPM
Potencial hidrogeniônico (pH)	NBR 10891	6,0 a 8,0	8,65	-
Condutividade elétrica	ASTM D 10547	389 máx.	154,0	µS/m

(1) L.I.I = Límpido e Isento de Impurezas.

(2) Ofício nº 249 / 2006 / SQP. Incolor (cor 0) e no máximo cor 3.

Observa-se na Tabela 5 que os resultados referentes às análises de Aspecto e Cor encontram-se dentro do padrão, indicando a pureza do álcool e a ausência de contaminantes visíveis. Com relação a Massa específica o resultado (815,11 Kg.m⁻³) encontra-se acima das especificações da ANP, percebe-se que quando a massa específica aumenta o teor alcoólico diminui (90,71 °INPM), apesar de não estarem dentro das especificações os resultados

encontram-se próximos dos valores estabelecidos pela ANP. O resultado de Potencial hidrogeniônico encontra-se em conformidade com as especificações da ANP, mantendo-se neutro. O valor de Condutividade elétrica (154,0 $\mu\text{S/m}$) está de acordo com as especificações, sendo o máximo permitido 389 $\mu\text{S/m}$.

4 CONCLUSÃO

É possível produzir etanol pela fermentação microbiológica do glicerol e de resíduos celulósicos. Os maiores teores de etanol obtido foram 83 e 81 °GL (4 mL de microorganismo e 2 g de resíduos celulósicos), utilizando 50 mL de glicerol em todos os ensaios. Empregar resíduos industriais no processo de fermentação para produzir etanol se caracteriza como tratamento adequado para esses subprodutos, impulsionando a matriz energética e reduzindo problemas ambientais.

AGRADECIMENTOS

A Capes, CNPq e a Ibema Cia. Brasileira de Papel pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 7, de 9.2.2011 - dou 10.2.2011 – retificada dou 14.4.2011. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2011/fevereiro/ranp%207%20-%202011.xml>. Acesso em: 20 jul. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13920: Determinação do teor alcoólico. São Paulo: ABNT, 1997.
- BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL 2013: Ano base 2012 / Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro: EPE, 2013.
- BANERJEE, S. et al. : Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4: 77-93, 2010.
- BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, Empresa de Pesquisa Energética. Plano Decenal de Expansão de Energia 2021 / Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME/EPE, 2012.
- CAPARICA, R. et al.: Processo de obtenção do etanol pelo bioprocessamento de glicerol derivado de biodiesel utilizando *Escherichia coli* selvagem e ATCC 25922 - BR1020130330353, 20 dez. 2013. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2013.
- CUSHION, E.; WHITEMAN, A.; DIETERLE, G.: *Bioenergy Development: Issues and impacts for poverty and natural resource management*. Washington D. C: The World Bank. 272 p., 2010.
- ESCOBAR, J.C., LORA, E. S., VENTURINI, O. J., YANEZ, E., CASTILLO, E. F.: *Biofuels: environment, technology and food security*. *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 13: 1275-1287, 2009.
- HU, H.; WOOD, T.K.: An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1033-1038, 2010.
- LAU, M.W. et al.: Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnol. Biofuels*. 3: 11-20, 2010.

LEITE, R. C; CORTEZ, L. A. B.: O etanol combustível no Brasil: BiocomBustíveis no Brasil: realidades e perspectivas. Brasília/DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 15p., 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.: Microbiologia de Brook. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1160, 2010.

MAITI, B.; RATHORE, A.; SRIVASTAVA, S.; SHEKHAWAT, M.; SRIVASTAVA, P. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. Applied Microbiology and Biotechnology, doi:10.1007/s00253-011-3158-x, p. 1-11, 2011.

MARU, BT.; CONSTANTIN, M.; STCHIGEL, AM.; MEDINA, F.; SUEIRAS, JE. Biohydrogen production by dark fermentation of glycerol using *Enterobacter* and *Citrobacter* sp. Biotechnol Prog, p. 29-31, 2012.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M.: Co-produtos da Produção de Biodiesel. Revista Virtual de Química, Rio de Janeiro, v. 3(5): 416-425, 2011.

RIVALDI, J.D. et al. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, 37: 44-51, 2008.

SILVA, N. L. C.: Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. 123 f. Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Departamento de Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SUHAIMI, S. N. et al.: Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* SS1. Brazilian Journal Of Microbiology, São Paulo, v. , n. , p.506-516, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.: Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre, Artmed, 2012. p. 920, 2012.

ZHANG, J.; LYND, L. R. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. Biotechnology and Bioengineering, 107(2), 2010.