

# PRODUÇÃO DE BIOETANOL PARA FINS CLÍNICOS: FERMENTAÇÃO DA PLANTA DO CARDO

## BIOETHANOL PRODUCTION FOR CLINICAL PURPOSES: FERMENTATION OF CARDOON

### **Autores**

Alexandra Fernandes - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias – Instituto Politécnico de Castelo Branco, BSc  
Francisco Rodrigues - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) | Sport, Health & Exercise Unit (SHERU), Instituto Politécnico de Castelo Branco, PhD  
Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) - Instituto Politécnico de Castelo Branco, PhD

### **Centro de execução do trabalho**

Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias  
Instituto Politécnico de Castelo Branco

### **Conflitos de interesse**

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

### **Fontes de Financiamento**

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

### **Contacto do autor responsável**

franciscobrodrigues@ipcb.pt

### **Tipo de artigo**

Artigo de Revisão

## Resumo

Os biocombustíveis são todos aqueles em que a produção parte de matéria-prima e, portanto, de fontes renováveis, tais como compostos vegetais e/ou de origem animal. A primeira etapa do processamento da matéria-prima lenhocelulósica deve ser o pré-tratamento, que permite solubilizar açúcares da hemicelulose aumentando a acessibilidade à celulose por parte das enzimas hidrolíticas. O pré-tratamento catalisado por ácidos consiste em quebrar as macromoléculas presentes na celulose e/ou hemicelulose, por adição de um ácido à biomassa; ou enzimas no caso da hidrólise enzimática; já naqueles em que são utilizadas bases, uma parte da lenhina é removida e a hemicelulose tem de ser depois hidrolisada pelo uso de enzimas —hemicelulases. Numa fase final deve ser realizada uma fermentação do hidrolisado obtido após pré-tratamento utilizando para o efeito microrganismos geneticamente selecionados com as melhores características que proporcionem a bioconversão da matéria-lenhocelulósica em bioetanol.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a utilização da espécie *Cynara cardunculus* (planta do cardo) como fonte de biomassa lenhocelulósica e como potencial matéria-prima para a produção de bioetanol por intervenção microbiana no processo fermentativo da matéria-prima.

Vários investigadores tentaram proceder a esta bioconversão realizando, em primeiro lugar, um pré-tratamento à biomassa obtendo rendimentos de xilose e/ou glicose entre os 64 e os 90%. Posteriormente, aquando da realização da sacarificação enzimática, podendo esta ser realizada simultaneamente à fermentação, foram reportados rendimentos entre os 60 e os 70%. Concluíram uma maior eficácia com rendimentos de etanol superiores aquando da realização da sacarificação enzimática simultaneamente com a fermentação. A partir da obtenção de bioetanol, este pode ser aplicado em diversas áreas com diferentes finalidades.

Um dos principais entraves para a globalização e expansão destes processos de bioconversão de material lenhocelulósico por fermentação a bioprodutos é o custo que os processos envolvidos apresentam. No entanto, é de ressaltar que esta situação é verificada apenas em situações que se pretende uma bioconversão de biomassa rica em

amido, dado que, necessita de uma conversão a açúcares passíveis de fermentação; o que evidencia a vantagem clara na utilização de biomassa que apresente na sua constituição a glicose no seu estado nato e que possa ser diretamente fermentada a etanol.

## Palavras-chave

*Cynara cardunculus* (B01.650.940.800.575.912 .250.100.269.500), Biomassa lenhocelulósica (SP4.011.072.573.994), Etanol (D02.033.375), Hidrólise (G02.380), Fermentação (G03.191.249)

## Abstract

Biofuels are all those in which the production starts from raw material and therefore from renewable sources such as plant or animal compounds. The first step in the processing of lignocellulosic raw material should be pretreatment, which allows solubilizing sugars from hemicellulose, increasing the accessibility of hydrolytic enzymes to cellulose. The acid catalyzed pretreatment consists of breaking down the macromolecules present in cellulose or hemicellulose, by adding an acid to the biomass or enzymes in the case of enzymatic hydrolysis. In those where bases are used, part of the lignin is removed, and hemicellulose must then be hydrolyzed by the use of enzymes — hemicelulases. In the final phase, a fermentation of the hydrolysate obtained after pretreatment should be carried out using genetically selected microorganisms with the best characteristics that provide the bioconversion of lignocellulosic matter in bioethanol.

This work aimed to evaluate the use of the species *Cynara cardunculus* as a source of lignocellulosic biomass and as a potential raw material for bioethanol production by microbial intervention in the fermentation process of the raw material. Several researchers have attempted to perform this bioconversion by first performing a biomass pretreatment yield xylose and/or glucose yields between 64 and 90%. Subsequently, at the time of enzymatic sacrifice, which can be performed simultaneously with fermentation, yields between 60 and 70% were reported. They concluded to be more effective with higher ethanol yields when enzymatic sacrifice was performed simultaneously with fermentation. By obtaining bioethanol, it can be applied in several areas with different purposes.

One of the main challenges for the globalization and expansion of these processes of bioconversion of lignocellulosic material by fermentation to bioproducts, is the cost that the involved processes present. However, it should be noted that this situation is verified only in situations that are intended for a bioconversion of starch-rich biomass, as it requires conversion to fermentable sugars; this shows, on the other hand, the clear advantage in the use of biomass that presents glucose in its natural state and that can be directly fermented to ethanol.

#### Keywords

*Cynara cardunculus* (B01.650.940.800.575.91 2.250.100.269.500), Lignocelulosic biomass (SP4.011.072.573.994), Ethanol (D02.033.375), Hydrolysis (G02.380), Fermentation (G03.191.249)

## Introdução

O Homem tem procurado satisfazer as suas necessidades energéticas de forma sustentável, desde os primórdios da sua existência na tentativa de substituir os combustíveis fósseis <sup>(1-6)</sup>. O novo padrão de produção de energia encontra-se centralizado na produção de etanol a partir de celulose sendo considerado um modelo energético sustentável e que prioriza a diversificação de fontes utilizáveis preservando o ambiente <sup>(7)</sup>. O interesse de alguns países para a utilização da energia a partir da biomassa produzida especificamente com esse propósito deu início com a produção de etanol por fermentação de açúcares — etanol de primeira geração — extraído de matérias-primas lenhocelulósicas <sup>(8,9)</sup>. No entanto, mais tarde com a expansão da tecnologia e das necessidades consumíveis da população, surgiu a necessidade de despoletar novas estratégias para produção de etanol a partir da biomassa e que são referidos como uma segunda geração de biocombustíveis <sup>(10)</sup>. Esta baseia-se na utilização de resíduos orgânicos de algum processo onde seja utilizada biomassa residual e por intervenção de uma técnica de hidrólise da matéria-prima celulósica e hemicelulósica, com produção de glicose, esta pode ser fermentada para produção direta de bioetanol <sup>(8,9)</sup>. Mundialmente, a principal fonte renovável de produção de bioetanol são as matérias-primas lenhocelulósicas, podendo ser produzido anualmente cerca de 442 mil milhões de litros a partir delas <sup>(5)</sup>. Dados de 2016 mostram que a produção de bioetanol mundial alcançou os 101 mil milhões de litros e presume-se que a sua produção continue a aumentar <sup>(11)</sup>. Com base nestes dados, estima-se que a sua produção e consumo alcancem os 135 mil milhões de litros já em 2024 <sup>(11)</sup>.

A produção de bioetanol no mundo incide principalmente na utilização de glicose (61%) e, em menor percentagem, de amido (39%) <sup>(10)</sup>. É importante salientar que enquanto a conversão dos hidratos de carbono em bioetanol é um procedimento relativamente simples, a conversão da biomassa na sua complexidade de constituintes é consideravelmente mais complexa, daí requerer um pré-tratamento mais afincado e moroso <sup>(10)</sup>. Volumes significativos de etanol são produzidos para mercados industriais e de bebidas, outra parte está direcionada ao setor dos transportes como aditivo de combustível <sup>(12,13)</sup>. Para além disso apresenta ainda propriedades de interesse para utilização como intermediário na indústria de tintas, química, farmacêutica e/ou de cosméticos, sendo

um importante produto químico comercial usado como solvente em diversos produtos de limpeza, de desinfecção, vernizes, vinagre, ácido acético, síntese de cloral e iodofórmico<sup>(12,13)</sup>. Cada vez mais o bioetanol é utilizado como uma alternativa renovável aos produtos químicos com o propósito de criar uma variedade de produtos<sup>(12)</sup>. Em termos clínicos, o etanol tem muitas utilidades médicas podendo ser também encontrado em medicamentos, panos e como antisséptico na maioria dos casos<sup>(12)</sup>. É ainda utilizado em géis desinfetantes antibacterianos para as mãos ou outra superfície cutânea, imprescindível no seio hospitalar e em restantes unidades de saúde<sup>(12)</sup>. Por esta razão, nas últimas décadas do século XX e já no século XXI, tem havido um enorme interesse na produção e utilização de bioetanol utilizando para o efeito Matérias-primas lenhocelulósicas<sup>(11)</sup>.

Como forma de otimizar os rendimentos de bioetanol, têm vindo a ser desenvolvidas formas de alterar o genoma das plantas para melhorar a produtividade e composição em monossacarídeos das diferentes matérias-primas, facilitando as etapas de processamento<sup>(8)</sup>.

A *Cynara cardunculus L.*, é a espécie mais difundida integrante da família *Asteraceae* e do género *Cynara*<sup>(14)</sup>. É considerada uma planta herbácea perene diploide que tem vindo a ser cultivada amplamente nas regiões do mediterrâneo e em regiões adjacentes à Europa (Madeira, Canárias, Norte de África, Chipre e Turquia) correspondendo a cerca de 85% da produção mundial, crescendo naturalmente em condições adversas de *habitat*<sup>(6,14)</sup>. A *Cynara cardunculus L.* selvagem cresce espontaneamente em áreas marginais de culturas de campo, zonas de pasto e ao longo de caminhos, nomeadamente em áreas secas e em solos com diferentes características, subsistindo a condições de elevado *stress* abiótico<sup>(6,14,15)</sup>.

Desde há muitos anos que muitas das espécies pertencentes ao género *Cynara* spp têm sido utilizadas na produção de medicamentos e para trabalhos de investigação em vários âmbitos, apresentando ainda diversas propriedades terapêuticas<sup>(14,16)</sup>. Devido ao alto teor de celulose e hemicelulose desta espécie de *Cynara* spp, a fração lenhocelulósica tem sido utilizada tanto para a produção de biocombustível sólido (incluindo a síntese de bioetanol) como para a produção de biogás de forma mais sustentável<sup>(14)</sup>. Assim, para a produção deste tipo de compostos, são utilizadas

tanto as fibras de celulose como também pode ser utilizado o óleo presente nas sementes<sup>(14)</sup>.

O que se encontra mais em voga é o sistema da celulase de fungos, sendo o primeiro e o mais utilizado, o fungo *Trichoderma reesei*<sup>(8)</sup>. Para além das celulases produzidas por mutação e seleção das melhores descendências desta espécie de fungo, também há igualmente a produção de celulases a partir de bactérias aeróbias e anaeróbias<sup>(8)</sup>.

A autohidrólise possibilita a desorganização da estrutura vegetal da matéria-prima lenhocelulósica e favorece a libertação dos açúcares diminuindo a formação de inibidores<sup>(17)</sup>. Os açúcares provenientes da celulose e hemicelulose são solubilizados na forma de oligossacarídeos minimizando a formação de produtos de degradação, o que exige que ambas as frações celulósicas tenham de ser novamente hidrolisadas a monómeros de glicose fermentáveis<sup>(17)</sup>.

## Objetivos

Investigar a utilização de matéria-prima lenhocelulósica à base de amido e/ou glicose para avaliação da produção de bioetanol.

Analisar a utilização da espécie *Cynara cardunculus* (planta do cardo) como potencial fonte de matéria-prima lenhocelulósica para a produção de bioetanol.

Avaliar as vantagens e desvantagens dos diferentes procedimentos de pré-tratamento realizados à matéria-prima lenhocelulósica.

Estudar a produção de bioetanol a partir de hidrolisados originados do pré-tratamento da matéria-prima lenhocelulósica por intermédio de uma fermentação microbiana.

## Metodologia de pesquisa

É um estudo exploratório descritivo de revisão de literatura específica, através do levantamento documental científico com método dedutivo, abordagem remota e atual, sobre a fermentação microbiana da *Cynara cardunculus* para obtenção de bioetanol.

Para a recolha e análise de referencial bibliográfico foram utilizadas as bases de dados *National Center for Biotechnology Information — NCBI, ResearchGate,*

SciELO, Science Direct e Google Académico, empregando as palavras-chave em inglês *cardoon*, *Cynara cardunculus*, *Lignocelulosic biomass*, *Ethanol*, *Hydrolysis*, *Saccharification and Fermentation*.

Foram determinados como critérios de inclusão bibliografia científica nos idiomas Português e Inglês publicados entre 1999 e janeiro de 2019.

## Dados

Os investigadores Ballesteros e et al. (2008) após compreenderem a composição da planta do cardo deram início ao seu pré-tratamento realizando uma hidrólise ácida à biomassa seca <sup>(18)</sup>. A biomassa foi submetida a um pré-tratamento de hidrólise ácida diluída utilizando para o efeito ácido sulfúrico a 0,2% e sob diferentes parâmetros de temperatura — 160 a 200°C — concentração da biomassa, concentração de ácido e tempo de reação <sup>(18)</sup>. No estudo de Shatalov e Pereira (2011) realizaram uma hidrólise ácida da biomassa seca seguindo os mesmos parâmetros utilizados por Ballesteros e et al. (2008) <sup>(19)</sup>. Obtiveram uma recuperação de xilose máxima de 81% a 140°C durante 30 minutos utilizando uma concentração de ácido de 0,5% <sup>(19)</sup>. O resíduo insolúvel após a hidrólise de xilano foi facilmente digerido em açúcares fermentáveis para produção de etanol, proporcionando uma conversão de celulose em glicose de 76% <sup>(19)</sup>. Já um estudo bastante recente de Fernandes e et al. (2018) veio reforçar os resultados obtidos por estes investigadores ao realizarem uma hidrólise ácida

diluída da biomassa seca utilizando para o efeito ácido sulfúrico a 6,7%, procedimento este realizado a 130°C durante 55 minutos tendo havido uma recuperação de 57%, condições estas semelhantes às estabelecidas como ideais no estudo realizado por Shatalov e Pereira (2011), embora utilizando uma concentração de ácido significativamente inferior <sup>(20)</sup>. O rendimento dos monossacarídeos foi de 14,7%, sendo que este corresponde principalmente às hemiceluloses dissolvidas <sup>(20)</sup>. A quantidade de xilose obtida foi semelhante à obtida por Ballesteros e et al. (2008) <sup>(20)</sup>. Os rendimentos máximos de xilose foram obtidos a 180°C e com uma concentração de ácido de 0,1% ou 0,2% <sup>(20)</sup>. Já a quantidade de glicose foi superior, tendo sido rematado pelos autores que o principal motivo se deveu a condições de processamento mais exigentes, nomeadamente uma concentração de ácido e simultaneamente um tempo de tratamento superiores <sup>(20)</sup>. Diferentemente ao que já foi mencionado, Fernandes e et al. (2015) realizaram outro estudo em que procederam à realização de um pré-tratamento por explosão a vapor que permitiu obter um resíduo sólido que foi seco a 40°C sendo proporcionadas as condições de desintegração dos tecidos da planta do cardo ideais para ocorrer a acessibilidade ao complexo dos polissacarídeos para a hidrólise enzimática <sup>(21)</sup>. Posteriormente, procederam à realização de uma hidrólise alcalina utilizando Hidróxido de Sódio a 2% que permitiu uma recuperação do resíduo seco de cerca de 50% <sup>(21)</sup>. Após o pré-tratamento do cardo seguido da hidrólise alcalina foi possível obter uma concentração de glicose de 20g.L<sup>-1</sup> no hidrolisado <sup>(21)</sup>.

<b>Ballesteros e et al. (2008)</b>	<b>Shatalov e Pereira (2011)</b>	<b>Fernandes e et al. (2015)</b>	<b>Fernandes e et al. (2018)</b>
<b>Hidrólise ácida diluída</b> Ácido sulfúrico a 0,2%	<b>Hidrólise ácida diluída</b> Ácido sulfúrico a 0,5%	<b>Hidrólise alcalina</b> Hidróxido de Sódio a 2%	<b>Hidrólise ácida diluída</b> Ácido sulfúrico a 6,7%
<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>
160 a 200°C	140°C	---°C	130°C
<b>Tempo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Tempo</b>
---	30 min	15 min	55 min
<b>Xilano</b>	<b>Xilose (recuperação máxima)</b>	<b>Xilose (recuperação)</b>	<b>Xilose (recuperação)</b>
Variou de 0 para 16,2%	81%	50%	57%
<b>[Glicose]</b>	<b>Glicose</b>	<b>[Glicose]</b>	<b>Rendimento de monossacarídeos</b>
20g.L <sup>-1</sup>	Conversão de celulose em glicose de 76%	20g.L <sup>-1</sup>	14,7%

**Tabela 1** – Comparação dos procedimentos de pré-tratamento de hidrólise dos diversos estudos apresentados.

Ballesteros e et al. (2008) obtiveram um rendimento de hidrólise enzimática de 80,2% quando o pré-tratamento foi realizado a 200°C com ácido sulfúrico a 0,2% <sup>(18)</sup>. Para além disso, este grupo de investigadores determinou que o ponto ótimo para o rendimento total de xilose e o rendimento global de glicose corresponde a valores de temperatura de 184,5°C, uma concentração de ácido sulfúrico de 0,15% (p/p) e uma concentração de sólidos de 5% (p/v) prevendo-se um rendimento total de xilose de 15,4g por 100g de matéria-prima e 26,3g de glicose por 100g de matéria-prima <sup>(18)</sup>. Após a obtenção do hidrolisado, este foi submetido a uma sacarificação simultaneamente à fermentação para conversão a biotanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* a uma temperatura de 42°C <sup>(18)</sup>. Com este trabalho obtiveram um rendimento de etanol próximo dos 65% e uma concentração de 23g.L-1 <sup>(18)</sup>.

Shatalov e Pereira (2011) realizaram uma hidrólise enzimática sob condições normais durante 72 horas alcançando uma conversão de celulose em glicose monomérica de 76% utilizando para o efeito a levedura *Saccharomyces cerevisiae* <sup>(19)</sup>.

O rendimento da hidrólise enzimática foi de cerca de 72,8±0,7% no estudo realizado por Fernandes e et al. (2015) <sup>(21)</sup>. O hidrolisado foi submetido à fermentação a bioetanol pela intervenção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tendo sido obtida uma concentração de glicose no início da fermentação

de 43,9±1,8g <sup>(21)</sup>. A concentração máxima de etanol atingida às 24 horas foi de 18,7g.L-1 com eficiência de fermentação de 66,6% <sup>(21)</sup>. Os resultados deste estudo permitiram concluir que o etanol obtido após fermentação do cardo pré-tratado por explosão a vapor e hidrólise alcalina foi de 20,1±0,5g.L-1 após 72 horas <sup>(21)</sup>.

Os resultados das concentrações e dos rendimentos de glicose e xilose obtidos nos hidrolisados após sacarificação enzimática do cardo com 5% e 8% (p/v) foi de 68,3 ± 2,0%/54,7±6,8% e 43,6±1,3%/54,6±0,3%, respetivamente, num estudo realizado pelos mesmos investigadores em 2018 <sup>(20)</sup>. A sacarificação enzimática foi realizada utilizando também a levedura *Saccharomyces cerevisiae* <sup>(20)</sup>. Após 72 horas de sacarificação com 5% (p/v) de biomassa sólida obtiveram 13% de rendimento de glicose <sup>(20)</sup>. A sacarificação do cardo pré-tratado com ácido apresentou um rendimento de glicose de 68% <sup>(20)</sup>. Após 24 horas de fermentação, a concentração de etanol foi de 11,5g.L-1 com uma eficiência global de fermentação de 52,5% <sup>(20)</sup>. Estes autores também procederam a uma fermentação simultaneamente à sacarificação enzimática, o que lhes permitiu obter uma concentração de etanol de 12,2g.L-1 com uma eficiência global de fermentação de 55,8% após 24 horas <sup>(20)</sup>. O rendimento máximo de hidrólise enzimática foi de 81% utilizando ácido sulfúrico a 0,11% (p/p) a 200°C e 10% (p/v) de concentração de sólidos <sup>(20)</sup>.

<b>Ballesteros e et al. (2008)</b> Hidrólise enzimática + Fermentação	<b>Shatalov e Pereira (2011)</b> Hidrólise enzimática	<b>Fernandes e et al. (2015)</b> Hidrólise enzimática + Fermentação	<b>Fernandes e et al. (2018)</b> Hidrólise enzimática + Fermentação
<b>Rendimento</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Rendimento</b>
81%	76%	72,8%	81%
<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Temperatura</b>
200°C	50°C	---°C	42°C
<b>Tempo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Tempo</b>	<b>Tempo</b>
72 h	72 h	24/72 h	24h
<b>Microrganismo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Microrganismo</b>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>Rendimento de etanol</b>	<b>Rendimento de etanol</b>	<b>Rendimento de etanol</b>	<b>Rendimento de etanol</b>
65%	---	66,6%	55,8%

**Tabela 2** – Comparação dos procedimentos de hidrólise enzimática e fermentação dos diversos estudos apresentados.

Em todos os estudos apresentados, os teores de açúcar presentes no hidrolisado foram analisados e determinados por *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC), assim como foi descrita a utilização de azida sódica com o intuito de conservar os constituintes do hidrolisado ao mesmo tempo que funciona como bacteriostático por inibir o citocromo oxidase presente em bactérias gram-negativas e gram-positivas e, desta forma, pode ser usado como controlo de pragas <sup>(18-21)</sup>. Sobre a análise e determinação do teor de bioetanol obtido na fase final do tratamento do hidrolisado, este foi realizado por HPLC no estudo de Shatalov Pereira (2011) e nos estudos de Fernandes e et al. (2015) e (2018) <sup>(19-21)</sup>. No estudo de Ballesteros e et al. (2008) essa análise e determinação foi realizada por cromatografia gasosa <sup>(18)</sup>.

## Discussão

Existe notoriamente uma vantagem da composição química do cardo relativamente a outras matérias-primas, dado que este apresenta menos lenhina — interferente no processo de bioconversão a etanol — e mais extrativos passíveis de bioconversão indicando um maior grau de acessibilidade e reatividade do complexo de carboidratos presentes na biomassa ao processamento químico que sofre <sup>(19,21)</sup>. Para a determinação da composição e dos diferentes componentes macromoleculares da *Cynara cardunculus*, foi tido em conta a variabilidade natural da planta, as condições edáficas e climatéricas de crescimento e as diferenças nas metodologias envolvidas das análises químicas realizadas <sup>(18-21)</sup>.

Na etapa de pré-tratamento por hidrólise ácida, Ballesteros e et al. (2008) e Shatalov e Pereira (2011) constataram que à medida que a temperatura e a concentração do catalisador aumenta, ocorre uma diminuição da recuperação total da biomassa devido à solubilização da hemicelulose e, embora acelere a hidrólise do xilano para xilose, intensifica simultaneamente as reações secundárias de degradação dos açúcares monoméricos decorrentes do processo <sup>(18,19)</sup>. Assim, perceberam que a inter-relação mais equilibrada entre a eficiência e a seletividade da hidrólise pode ser alcançada à temperatura de 140°C durante 30 minutos e utilizando uma concentração de ácido a 0,5% <sup>(19)</sup>. O teor de xilano — maior constituinte da hemicelulose — é o indicador mais importante da eficácia do pré-tratamento com

ácido, sendo que a sua solubilização aumentou com o aumento da temperatura e da concentração de ácido <sup>(18)</sup>.

Posteriormente, em 2018 outros investigadores demonstraram que a hidrólise ácida diluída tem a vantagem de melhorar a digestibilidade enzimática da celulose porque a remoção da hemicelulose é capaz de destruir as microfibrilas celulósicas de proteção da matriz presente na parede celular da biomassa <sup>(20)</sup>. Sob condições selecionadas conseguiram que quase todas as hemiceluloses fossem hidrolisadas e removidas dos materiais vegetais, ficando o hidrolisado enriquecido em celulose e lenhina <sup>(20)</sup>. O resíduo insolúvel após a hidrólise de xilano foi facilmente digerido a açúcares fermentáveis para produção de etanol, proporcionando uma conversão de celulose em glicose de 76% <sup>(19)</sup>.

Para além da hidrólise ácida que é realizada como pré-tratamento da biomassa, também é possível realizar uma hidrólise alcalina como outra alternativa de pré-tratamento da biomassa, possibilitando a remoção da lenhina de baixo peso molecular, parte da hemicelulose e outros produtos de degradação da superfície da fibra vegetal surgida durante o pré-tratamento <sup>(21)</sup>. Esta fase de hidrólise alcalina revelou ser fundamental para a remoção de compostos não celulósicos formados secundariamente e que poderiam impedir a hidrólise enzimática diminuindo a concentração efetiva de glicose <sup>(21)</sup>. No estudo realizado por Fernandes e et al. (2015) desfecharam que o pré-tratamento de explosão a vapor do cardo permitiu o rompimento das superfícies interfibrilares com solubilização preferencial da fração solúvel em água hemicelulósica, produzindo assim resíduos sólidos mais ricos em celulose e em lenhina <sup>(21)</sup>. A lenhina foi praticamente toda removida pelo procedimento de hidrólise alcalina <sup>(21)</sup>.

No processo de sacarificação enzimática simultânea à fermentação realizada por Ballesteros e et al. (2008), a glicose libertada é simultaneamente convertida em etanol pela intervenção da levedura *Kluyveromyces marxianus* o que reduz a inibição da enzima pela glicose <sup>(18)</sup>. A temperatura é o fator que tem maior influência no rendimento da hidrólise enzimática e fermentação simultâneas <sup>(18)</sup>. Os rendimentos máximos de etanol relatados no estudo de Ballesteros e et al. (2008), obtidos nas mesmas condições de carga enzimática e concentração de

substrato comparativamente com outros estudos deve-se ao facto de que neste obtiveram matéria-prima pré-tratada com maior teor em celulose<sup>(18)</sup>. *Saccharomyces cerevisiae* é considerado o microrganismo mais comumente utilizado para a produção de etanol a partir da fermentação das hexoses, constituintes da celulose, porque não fermenta xilose ou qualquer outro açúcar pentose a bioetanol<sup>(20,22)</sup>.

Fernandes e et al. (2018) precisaram que a realização do pré-tratamento da biomassa com ácido diluído permitiu intensificar o procedimento de hidrólise enzimática, uma vez que o rendimento da glicose aumentou 8 vezes<sup>(20)</sup>. O grau de digestibilidade da celulose pode ser melhorado apenas através do estudo de otimização da sacarificação enzimática<sup>(19)</sup>. A presença de lenhina em matéria-prima pré-tratada com ácido diluído pode contribuir para a maior adsorção não específica de enzimas, resultando em hidrólise não produtiva<sup>(20)</sup>.

Os resultados fornecidos por estes autores foram focados apenas na hidrólise da celulose somente porque existe pouca contribuição da hemicelulose nos resíduos de plantas pré-tratadas<sup>(20)</sup>. No entanto, a realização de um pré-tratamento catalítico com ácido sulfúrico permite uma produção de resíduos digestíveis e a solubilização de quantidades significativas da fração hemicelulósica<sup>(20)</sup>.

Proceder à realização da sacarificação enzimática simultaneamente à fermentação permite obter resultados mais satisfatórios comparativamente ao procedimento de fermentação realizada isoladamente<sup>(20)</sup>. O processo de sacarificação e fermentação simultânea permitiu a máxima concentração de etanol, produtividade e eficiência de fermentação em 24 horas versus as 96 horas do processo de duas etapas necessárias para os procedimentos de sacarificação e fermentação individualizados<sup>(21)</sup>. Para além disso, os rendimentos de etanol mostraram-se superiores quando o pré-tratamento realizado foi o de explosão a vapor ao invés da hidrólise ácida sob condições de fermentação semelhantes<sup>(20)</sup>.

Quando comparamos estes dados obtidos por estes investigadores, em diversos momentos temporais, percebemos que as nuances que se estabelecem

entre todos são tão ténues, que nos possibilita estabelecer uma concordância positiva entre todos. Quando comparamos estes dados com outros obtidos noutros estudos é possível amplificar esta concordância estabelecida.

Segundo Balat (2011) e Sun e et al. (2014), após a determinação da composição e dos diferentes componentes macromoleculares da biomassa lenhocelulósica concluíram valores percentuais de celulose, hemicelulose e lenhina muito semelhantes àquilo que foi obtido nos estudos mencionados anteriormente, o que estabelece, sem dúvida, uma similaridade entre a diversa matéria-prima lenhocelulósica que pode ser utilizada neste processo<sup>(23,24)</sup>.

Asada e et al. (2015), embora tenham realizado os seus estudos noutro tipo de biomassa que não a *Cynara cardunculus*, obtiveram resultados que sugerem que a aplicação de explosão de vapor a alta pressão favorece as taxas de conversão da glicose, resultados estes que são corroborados com os obtidos por Fernandes e et al. (2018)<sup>(25)</sup>. Num estudo realizado por Chen e et al. (2009) e Sun e et al. (2014) utilizando como matéria-prima lenhocelulósica o milho e bambu, respetivamente, já tinham outrora determinado uma maior eficiência de pré-tratamento quando realizada uma hidrólise alcalina que comprovou remover uma maior percentagem de lenhina, resultados comprovados posteriormente por Fernandes e et al. (2015)<sup>(24,26)</sup>. Sun e et al. (2014) determinaram um incremento do teor de celulose no hidrolisado quando este era tratado por explosão a vapor combinado com o tratamento de hidrólise alcalina comparativamente com hidrolisados que eram apenas tratados com explosão a vapor<sup>(24)</sup>. Desta forma, a hidrólise alcalina intensifica consideravelmente o pré-tratamento permitindo obter resultados mais satisfatórios<sup>(24,26)</sup>.

Segundo Yuan e et al. (2017) e Sun e et al. (2014), o processo de fermentação quando realizado a alta temperatura e durante mais tempo torna-se mais vantajoso, permitindo reduzir os custos, assim como a quantidade de enzimas que são necessárias utilizar no processo de sacarificação, à semelhança daquilo que foi obtido anteriormente por Ballesteros e et al. (2008)<sup>(22)</sup>. Apesar disto, foi identificado que a lenhina continua a ser uma das

maiores desvantagens da utilização de biomassa lenhocelulósica no procedimento da fermentação, pois torna a lenhocelulose bastante resistente à degradação química e biológica que é necessário ocorrer para a sua conversão em produto final<sup>(23)</sup>. No entanto, quando se procede à remoção da lenhina, esta promove melhorias na sacarificação enzimática, ou seja, quanto maior a quantidade de lenhina removida no pré-tratamento, maior a digestibilidade enzimática da celulose, não sendo a remoção da hemicelulose um passo fundamental para a melhoria do rendimento deste procedimento<sup>(24,26)</sup>. Este facto evidencia que o pré-tratamento de hidrólise alcalina tem uma maior vantagem sobre o rendimento de sacarificação enzimática quando comparado com o pré-tratamento de hidrólise ácida também já estudado por alguns investigadores<sup>(24)</sup>. Os valores de glicose e xilose obtidos nos diversos estudos tendem a ser semelhantes e os monossacarídeos predominantes no hidrolisado, o que indica que a celulose e hemicelulose são degradadas simultaneamente<sup>(26)</sup>. Os perfis da concentração destes monossacarídeos tendem a apresentar um padrão de hidrólise com rápida libertação no início do processo, seguindo-se um período de abrandamento da taxa de produção verificando-se uma ausência de glicose após cerca de 24 horas e, isto já foi explicitamente demonstrado no estudo de Fernandes *et al.* (2018)<sup>(27)</sup>. De referir, que a concentração de etanol obtida após o processo de fermentação depende quase exclusivamente da produção de açúcares ocorrida durante a etapa de hidrólise enzimática e concentrações mais altas de substrato levam a uma concentração mais alta de açúcares hidrolisados, sendo isto confirmado pelos dados apresentados<sup>(27)</sup>. Foi também demonstrada a importância da moagem da matéria-prima numa fase anterior ao pré-tratamento propriamente dito, facilitando e melhorando notavelmente a sacarificação enzimática<sup>(24)</sup>.

## Conclusão

Por razões ambientais, geopolíticas e económicas, o mundo e a comunidade subsistente está focada, cada vez mais, nas fontes renováveis de matérias-primas. No que se refere especificamente ao etanol, a comunidade de interesse está inteiramente focada na sua produção em grande escala e a baixo custo para utilização em biocombustíveis ou para a génese de produtos químicos de benefício comercial. Atualmente, a investigação e utilização de diversos métodos e tecnologias para conversão dos açúcares presentes nas matérias-primas celulósicas em etanol encontra-se em constante progressão e aprimoramento.

A fase de desenvolvimento dos biocombustíveis que se encontra a ser liderada mundialmente, dando ênfase ao bioetanol, como solução alternativa aos produtos não renováveis, tem demonstrado um significativo progresso nas etapas de pré-tratamento da biomassa utilizada que acresce de investigação científica no âmbito da manipulação e síntese de microrganismos compatíveis com as necessidades, bem como a etapa final de separação e purificação do bioetanol. No entanto, espera-se que o crescimento e avanço tecnológico e científico nesta área continue incessantemente de forma a aumentar a produção de bioetanol, de forma mais sustentável e com o intuito de minimizar os custos adversos no decorrer de todo o processo elaborado de extração e produção deste. Facto é que o consumo dos biocombustíveis, e em particular do etanol, cresceu consideravelmente nos últimos anos. Em contraponto também há a necessidade de preservar o espaço geológico e ambiental em que se vive.

Um dos principais entraves para a globalização e expansão destes bioprocessos é o custo que os processos envolvidos apresentam, nomeadamente no que diz respeito à obtenção das enzimas envolvidas no processo de sacarificação, assim como as altas temperaturas utilizadas que também envolvem um elevado dispêndio de energia e, globalmente, o processo torna-se um pouco dispendioso. No entanto, a utilização de biomassa que apresente na sua constituição a glicose no seu estado nato torna-se uma grande vantagem já que pode ser diretamente fermentada a etanol, como é o caso da planta do cardo, encontrando-se no auge

das matérias-primas mais adequadas para produção de biocombustíveis.

A opção por determinado tipo de biomassa em detrimento de outro influencia logo a primeira etapa de processamento — etapa do pré-tratamento — que altera, naturalmente a biomassa podendo facilitar ou dificultar a sacarificação enzimática que tem efeito direto na produtividade e rendimento da etapa de fermentação que é decisiva em termos de concentração de etanol obtido, tanto pela presença ou ausência de inibidores. Para além disso, o pré-tratamento aplicado, o rendimento da hidrólise e eventual custo das enzimas, assim como a estratégia utilizada durante todo o bioprocessamento são fatores que influenciam diretamente os resultados finais obtidos e, portanto, o principal foco é a plena compreensão e otimização do processo.

## **Desafios e perspectivas futuras**

A demanda constante e com projeção futura no aumento pela produção de etanol com alta eficiência e sustentabilidade projetada, sem dúvida, a necessidade de aumentar significativamente a sua produção nos próximos anos. Este aumento poderá ser alcançado pela introdução de novos métodos e tecnologias e pelo aperfeiçoamento dos já existentes, assim como do aproveitamento dos resíduos agrícolas e florestais e/ou por intermédio da utilização de plantas com poder estrutural e químico para o efeito da conversão. O grande objetivo é tornar o custo da produção do bioetanol competitivo aos combustíveis fósseis.

Pesquisas sobre configuração avançada de reatores ou sobre a utilização de suspensão total gerada na etapa de pré-tratamento parecem ser meios promissores para aumentar o rendimento final de etanol no processo de sacarificação e fermentação simultânea da biomassa <sup>(20)</sup>.

Também existe outro cenário que seria interessante testar laboratorialmente que implica a produção de bioetanol a partir quer do hidrolisado líquido quer da fração sólida, realizando os dois processos simultaneamente para que possa haver uma comparação posteriormente <sup>(5)</sup>. Isto iria permitir dar um avanço na produção de bioetanol, dado que, iria haver um aproveitamento integral da biomassa e, encontrar um processo que seja possível aplicar conjuntamente a ambas as frações seria um passo crucial no âmbito desta investigação <sup>(5)</sup>.

Quanto à obtenção de etanol a partir da planta do cardo especificamente, entendemos que seria interessante avaliar e comparar a composição e teor dos açúcares na planta do cardo e, conseqüentemente, o rendimento de bioetanol obtido a partir dela nas diferentes fases de desenvolvimento da planta. Da mesma forma, seria interessante proceder a uma comparação na fase inicial, a meio e numa fase mais tardia da idade da planta permitindo especular qual a melhor fase do estágio da planta.

## Referências Bibliográficas

1. Rosa SES, Garcia JLF. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. BNDES [Internet]. 2009; 32(1):152-154. Available from: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/7046>
2. Santos FA, Queiróz JH, Colodette JL, Fernandes SA, Guimaraes VM, Rezende ST. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova* [Internet]. 2012; 35(5), 1004-1010. Available from: doi: 10.1590/S0100-40422012000500025
3. Neves LMV. Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis. Universidade Nova de Lisboa [Internet]. 2009 [cited 2019 Mar 1]
4. Singh SP, Singh D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [Internet]. 2010; 14(1): 200-216. Available from: doi: 10.1016/j.rser.2009.07.017
5. Gonçalves MJA. Produção de Biocombustível de 2ª Geração: Obtenção de Bioetanol a partir de Cardo. Universidade de Aveiro [Internet]. 2016 [cited 2018 Oct 13]
6. Encinar JM, González JF, Sabio E, Ramiro MJ. Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil. *Ind. Eng. Chem* [Internet]. 1999; 38(8):2927-2931. Available from: doi: 10.1021/ie990012x
7. Benedetti OIS, Chaves RQ, Magalhães AM, Blos ALF, Silva TN. Análise preliminar da produção de etanol a partir de celulose: caminhos e desafios para a produção de álcool no rio grande do sul. Espírito Santo do Pinhal [Internet]. 2009; 6(2):272-284. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/7c2c/0372419438793d5eb6fcec8e337e3d48378f.pdf>
8. Ogeda TL, Petri DFS. Hidrólise Enzimática de Biomassa. *Química Nova* [Internet]. 2010; 33(7):1549-1558. Available from: doi: 10.1590/S0100-40422010000700023
9. Cinelli BA. Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. Universidade Federal do Rio de Janeiro [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 7]
10. Bastos VD. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. BNDES [Internet]. 2005 [cited 2018 Oct 13]. Available from: [https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2527/1/BS%2025%20Etanol%2C%20Alcoolqu%2C%20ADmica%20e%20Biorrefinarias\\_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2527/1/BS%2025%20Etanol%2C%20Alcoolqu%2C%20ADmica%20e%20Biorrefinarias_P.pdf)
11. Bušić A, Marđetko N, Kundas S, Morzak G, Belskaya H, Šantek MI, Komes D, Novak S, Šantek B. Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology Biotechnology* [Internet]. 2018; 56(3):289-311. Available from: doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5546
12. Epure. About Ethanol: Beverage & Industrial Use [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 6]. Available from: <https://epure.org/about-ethanol/beverage-industrial-use/>
13. National center for biotechnology information. PubChem Database. Ethanol, CID=702 [Internet]. [cited 2019 Mar 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>
14. Conceição C, Martins P, Alvarenga N, Dias J, Lamy E, Garrido L, Gomes S, Freitas S, Belo A, Brás T, Paulino Paulino A, Duarte MF. *Cynara cardunculus*: Use in Cheesemaking and Pharmaceutical Applications. *IntechOpen* [Internet]. 2018; 5(1). Available from: doi: 10.5772/intechopen.76530
15. Pedro AST. Estudo de compostos com propriedades funcionais em flor de cardo submetida a diferentes tratamentos de secagem. Instituto Politécnico de Viseu [Internet]. 2013 [cited 2019 Mar 1]
16. Matos JMD. Estudo da secagem da flor de cardo e análise de polissacarídeos e compostos fenólicos. Instituto Politécnico de Viseu [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 27]
17. Santiago BLS, Rodrigues FA. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: Uma Revisão. *Journal of Engineering and Exact Sciences* [Internet]. 2017; 3(7):1011-1022. Available from: doi: 10.18540/jcecv3l3iss7pp1011-1022
18. Ballesteros I, Ballesteros M, Manzanares P, Negro MJ, Oliva JM, Sáez F. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal* [Internet]. 2008; 42(1):84-91. Available from: doi: 10.1016/j.bej.2008.06.001
19. Shatalov AA, Pereira H. Biorefinery of Energy Crop Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) - Hydrolytic Xylose Production as Entry Point to Complex Fractionation Scheme. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology* [Internet]. 2011; 2(5). Available from: doi: 10.4172/2157-7048.1000118
20. Fernandes MC, Ferro MD, Paulino AFC, Chaves HT, Evtuguin DV, Xavier AMRB. Comparative study on hydrolysis and bioethanol production from cardoon and rockrose pretreated by dilute acid hydrolysis. *Industrial Crops & Products* [Internet]. 2018; 111(1):633-641. Available from: doi: 10.1016/j.indcrop.2017.11.037
21. Fernandes MC, Ferro MD, Paulino AFC, Mendes JAS, Gravitis J, Evtuguin DV, Xavier AMRB. Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. *Bioresource Technology* [Internet]. 2015; 186(1):309-315. Available from: doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.037
22. Yuan SF, Guo GL, Hwang WS. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain. *Microbial Biotechnology* [Internet]. 2017; 10(6): 1581-1590. Available from: doi: 10.1111/1751-7915.12712
23. Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* [Internet]. 2011; 52(2):858-875. Available from: doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013
24. Sun SL, Wen JL, Ma MG, Sun RC. Enhanced enzymatic digestibility of bamboo by a combined system of multiple steam explosion and alkaline treatments. *Applied Energy* [Internet]. 2014; 136:519-526. Available from: doi:10.1016/j.apenergy.2014.09.068
25. Asada C, Sasaki C, Takamatsu T, Nakamura Y. Conversion of steam-exploded cedar into ethanol using simultaneous saccharification, fermentation and detoxification process. *Bioresource Technology* [Internet]. 2015; 176:203-209. Available from: doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.039
26. Chen M, Zhao J, Xia L. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and Bioenergy* [Internet]. 2009; 33(10):1381-1385. Available from: doi: 10.1016/j.biombioe.2009.05.025
27. Manzanares P, Negro MJ, Oliva JM, Saéz F, Ballesteros I, Ballesteros M, Cara C, Castro E, Ruiz E. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [Internet]. 2011; 86(6):881-887. Available from: doi: 10.1002/jctb.2604