



# PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE MILHO EM REATOR BATELADA

A. P. DRESCH<sup>1</sup>, A. BUENO<sup>1</sup>, J. F. FUHR<sup>1</sup>, G. M. MIBIELLI<sup>1</sup> e J. P. BENDER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul, curso de Engenharia Ambiental e Sanitária  
E-mail para contato: alinepdresch@gmail.com

**RESUMO** – A necessidade de diversificação da matriz energética mundial vem intensificando as pesquisas relacionadas às energias renováveis, como aquelas provenientes de resíduos agroindustriais. Assim, esse estudo objetivou avaliar a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, visando a obtenção de açúcares. Para tanto, realizou-se um Planejamento Fatorial Completo para avaliar as variáveis “concentração de glicerina” e “tipo de agente químico” na etapa de pré-tratamento, tendo como variável resposta a concentração de açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática da biomassa tratada foi realizada utilizando-se os complexos enzimáticos Ctec2 e Htec2, nas porcentagens de 2 e 0,5% (v/m), respectivamente. A glicerina apresentou um efeito negativo no processo, enquanto a adição dos agentes químicos hidróxido de cálcio e óxido de cálcio apresentaram resultados positivos na quebra da rigidez estrutural da biomassa, obtendo-se um mosto com concentrações próximas a 0,31 g açúcares/g biomassa após hidrólise enzimática, o que corresponde a aproximadamente 47,4% de rendimento em relação a quantidade de celulose e hemicelulose presentes na biomassa. Diante disso, demonstrou-se que a biomassa residual do milho é uma matéria-prima promissora para produção de bioetanol. No que se refere à utilização de agitação mecânica, empregando impelidor do tipo hélice naval, foi possível afirmar que, trabalhando-se com razão sólido/líquido de 60 g/L, o mesmo manteve o meio homogêneo, sendo favorável à produção de bioetanol lignocelulósico em reator tipo batelada.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por alternativas renováveis de energia vem crescendo, sendo motivada principalmente pelo aumento do consumo energético e alta dependência dos combustíveis fósseis, que são prejudiciais ao meio ambiente e têm suas fontes escassas e mal distribuídas. Uma das alternativas são os biocombustíveis obtidos a partir de resíduos agroindustriais, que oferecem flexibilidade e menor preço. Além disso, esse tipo de bioetanol pode ser produzido em larga escala sem que seja necessário o aumento da área plantada (Rabelo, 2010).

Para obter-se etanol a partir da biomassa lignocelulósica, é necessária uma etapa de pré-tratamento, que tem a função de facilitar o acesso dos agentes hidrolíticos ao interior da estrutura, o que aumenta o custo total do processo. Nesse sentido, pesquisas têm estudado a adição de outras substâncias além daquelas já utilizadas, como a glicerina, composto residual

da produção de biodiesel. Por ser um solvente orgânico e ter estrutura polar, a glicerina pode penetrar na estrutura vegetal, contribuindo na quebra da lignina (Martin *et al.*, 2011).

As substâncias surfactantes também têm se destacado. Relatos da literatura indicam que sua adição melhora a conversão da biomassa em açúcares. Segundo Zhang *et al.* (2017), a presença de surfactantes no meio aumenta a atividade e estabilidade das celulasas, intensificando as interações entre essas enzimas e seus substratos.

Outra dificuldade encontrada na produção de bioetanol lignocelulósico é a eficiência do processo de transferência de calor e massa, variável que controla a velocidade da reação e tem grande impacto no custo final. Esse processo é acelerado pela agitação do meio mediante agitadores mecânicos, que impõem movimento ao fluido (Corrêa, 2016).

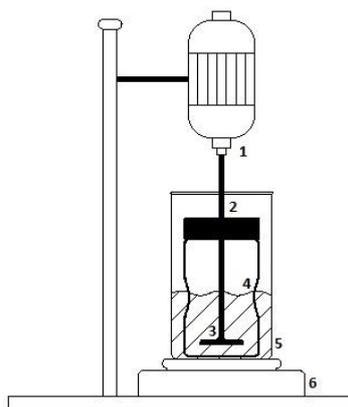
Tendo, portanto, como desafio atual, o melhoramento das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos, assim como, levando em conta a importância de se estudar ambos os processos em uma unidade experimental voltada ao uso industrial, o presente trabalho teve como objetivo buscar a maximização na obtenção de açúcares fermentescíveis, em reator batelada, avaliando o sistema mecânico de agitação.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Materiais

Para a execução dos testes de pré-tratamento e hidrólise enzimática, foi adaptada uma unidade experimental, conforme Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática do aparato experimental: (1) motor de agitação; (2) reator; (3) impelidor; (4) chicanas; (5) banho de óleo e; (6) chapa aquecedora.



Fonte: próprios autores, 2018.

O agitador mecânico utilizado possui marcação analógica, com velocidade variando de 1 a 8. Cada um dos pontos corresponde a aproximadamente 225 rpm, porém, apenas quando utilizado somente água como fluido a ser agitado.

A biomassa utilizada foi obtida nas áreas experimentais da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Chapecó, e corresponde ao híbrido do milho DKB 177 Pro 2. A



mesma foi seca em estufa a 50°C, passou por moinho de facas e peneiramento com peneiras de 30 mesh, resultando em partículas menores que 0,6mm.

## 2.2. Procedimentos

A caracterização da biomassa foi realizada por Bohn *et al.* (2018). Foram determinados os teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina total, celulose e hemicelulose, utilizando a metodologia descrita por Rabelo (2010).

Partindo dos resultados da caracterização, foram realizados testes preliminares para avaliação do sistema reacional e obtenção de um meio homogêneo. Os parâmetros avaliados foram: razão sólido/líquido; tempo de pré-tratamento e; velocidade de agitação.

A partir das condições definidas nos testes preliminares, empregou-se um planejamento experimental fatorial completo 2<sup>2</sup>, com triplicata no ponto central, objetivando identificar o efeito de diferentes agentes químicos na etapa de pré-tratamento, que resultasse na maior disponibilização dos constituintes da celulose e hemicelulose para a etapa de hidrólise. Para tanto, investigaram-se os parâmetros “concentração de glicerina” e “tipo de agente químico” utilizado no pré-tratamento. Os tratamentos e níveis investigados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>, com triplicata no ponto central, empregado para avaliar o efeito de diferentes substâncias adicionadas para pré-tratamento

Ensaio	Concentração de glicerina (mL)	Óxido de Cálcio/Hidróxido de Cálcio (g)
1	0,0 (-1)	2,4/0,0 (-1)
2	2,4 (+1)	2,4/0,0 (-1)
3	0,0 (-1)	0,0/2,4 (+1)
4	2,4 (+1)	0,0/2,4 (+1)
5	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)
6	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)
7	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)

Fonte: próprios autores, 2018.

Para os ensaios, amostras de 12 g de biomassa foram pesadas e tratadas segundo o estabelecido no planejamento experimental, conforme Tabela 1. Também foi adicionado surfactante Tween 80 na concentração de 2,5% (v/v de solução). Posteriormente, as amostras foram colocadas sob a influência do agitador mecânico a velocidade 8 e 70°C, por 12 horas.

Transcorrido o tempo de pré-tratamento, as amostras foram neutralizadas com solução de ácido cítrico (1 M) até pH ótimo (5,0). As enzimas foram adicionadas nas concentrações de 2% para Ctec2 e 0,5% para Htec2 (volume de enzima/m de biomassa), diluídas 1:10 em tampão acetato de sódio (0,05 mol/L e pH 4,8).

As amostras foram novamente colocadas sob agitação mecânica, a 50°C e velocidade 8, por 24 horas. Após o processo, os hidrolisados foram centrifugados; alíquotas foram filtradas em filtros com poros de 0,22 Milipore e diluídas 1:2 em água destilada, sendo analisadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme indicado por Bohn *et al.* (2018), a fração caule do milho utilizada neste estudo apresenta, em base seca, 28,44% de hemicelulose, 37,01% de celulose, 17,46% de lignina total, 25,36% de extrativos e 2,86% de cinzas. Assim, aproximadamente 65,45% da biomassa, correspondente aos teores de celulose e hemicelulose, é passível de conversão em açúcares fermentescíveis.

Por meio de testes preliminares foi possível estabelecer condições fixas para as variáveis razão sólido/líquido (60 g/L), tempo de pré-tratamento (12 horas) e velocidade de agitação (velocidade 8 do equipamento), para a obtenção de um meio reacional homogêneo.

Quanto ao planejamento experimental, realizado para avaliar o efeito das variáveis “concentração de glicerina” e “tipo de agente químico”, os resultados estão dispostos na Tabela 2. Também é apresentado o valor de rendimento para cada ensaio, calculado com base na concentração de celulose e hemicelulose presente na biomassa (65,45%).

Tabela 2 – Rendimento glicosídico obtido com a variação dos agentes de pré-tratamento por meio de planejamento experimental

Ensaio	Glicerina (mL/g)	CaO/ Ca(OH) <sub>2</sub> (g/g)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	CT (g/L)	g CT/g biomassa	R (%)*
1	0,0 (-)	2,4/0,0 (-)	15,97 ± 0,06	7,64 ± 0,03	ND	23,61 ± 0,09	0,39 ± 0,00	60,12 ± 0,23
2	2,4 (+)	2,4/0,0 (-)	14,72 ± 0,30	4,43 ± 0,03	ND	19,15 ± 0,31	0,32 ± 0,01	48,76 ± 0,80
3	0,0 (-)	0,0/2,4 (+)	13,31 ± 1,39	6,10 ± 0,49	ND	19,41 ± 1,87	0,32 ± 0,03	49,42 ± 4,77
4	2,4 (+)	0,0/2,4 (+)	12,85 ± 1,10	3,83 ± 0,34	0,54 ± 0,06	17,23 ± 1,49	0,29 ± 0,02	43,86 ± 3,78
5	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	11,75 ± 0,67	3,31 ± 0,21	0,69 ± 0,05	15,75 ± 0,93	0,26 ± 0,02	40,12 ± 2,36
6	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	11,77 ± 0,59	4,45 ± 0,85	0,73 ± 0,01	16,94 ± 1,44	0,28 ± 0,02	43,14 ± 3,66
7	1,2 (0)	1,2/1,2 (0)	11,76 ± 0,01	3,88 ± 0,80	0,71 ± 0,03	16,35 ± 0,84	0,27 ± 0,01	41,63 ± 2,14

(ND): Não detectado; (CT): Carboidratos totais; R(\*): Rendimento percentual de celulose e hemicelulose.

Fonte: próprios autores, 2018.

Analisando os resultados da Tabela 2, observa-se que a melhor condição encontrada foi no ensaio 1, que obteve 0,39 g de açúcares por grama de biomassa, correspondendo a um rendimento de 60,12%.

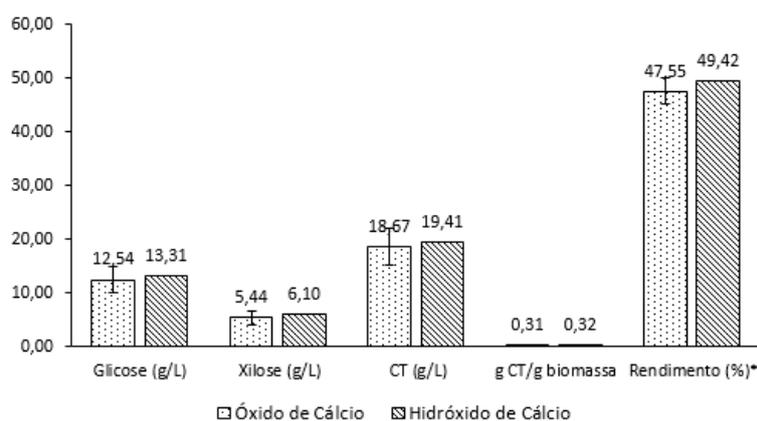
A partir da análise estatística realizada, foi possível perceber que as duas variáveis estudadas apresentaram efeito significativo negativo. Isso revela que, no caso da glicerina, quanto menor for a concentração adicionada, melhor a conversão. Para o parâmetro agente

químico, o tratamento negativo representa o óxido de cálcio, o que significa que esse composto apresenta melhores resultados em termos de rendimento glicosídico frente à utilização do hidróxido de cálcio. O efeito da interação das variáveis é não significativo.

A partir dos resultados encontrados, tendo como melhor condição o pré-tratamento sem adição de glicerina e com a utilização do óxido de cálcio, realizou-se uma triplicata de ensaios com as mesmas condições, visando repetir o resultado do ensaio 1 (0,39 g CT/g biomassa).

Porém, no novo teste não foi possível repetir o resultado do ensaio 1 do planejamento. Assim, comparando a média dos quatro ensaios realizados com óxido de cálcio (planejamento experimental e testes de repetição), e seus intervalos de confiança ( $\alpha=0,05$ ), com os resultados do ensaio 3 do planejamento (realizado com hidróxido de cálcio), é possível observar que, estatisticamente, não existe variação significativa na utilização dos dois compostos, já que há sobreposição dos valores. Essa comparação pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Comparação entre os resultados de rendimento glicosídico para os ensaios com utilização de óxido de cálcio e hidróxido de cálcio



(CT): Carboidratos totais; (\*): Percentual de celulose e hemicelulose convertido.  
 Fonte: próprios autores, 2018.

O mesmo pode ser concluído se forem comparados o valor médio de rendimento do pré-tratamento utilizando óxido de cálcio (0,31 g CT/g biomassa), com o valor médio obtido nos testes preliminares com hidróxido de cálcio, que resultaram em 0,34 g CT/g biomassa.

Ainda que o melhor resultado do planejamento não tenha se repetido, a média de rendimento dos quatro testes realizados com o óxido de cálcio (0,31 g CT/g biomassa) pode ser considerada positiva, assim como o resultado de 0,32 g CT/g biomassa obtido pelo hidróxido de cálcio no planejamento experimental, pois estão próximos dos valores encontrados na literatura.

Rabelo (2010), que estudou as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática utilizando bagaço de cana-de-açúcar, ambos os processos realizados com agitação orbital em shaker, chegou a um valor final de 0,35 g CT/g biomassa, muito próximo ao relatado no presente estudo, frente a nova configuração do sistema.



Também, vale destacar que o aparato experimental utilizado para realização dos ensaios não foi dimensionado levando em consideração as características do processo, mas adaptado segundo os equipamentos disponíveis. A escolha dos impelidores, por exemplo, segundo Corrêa (2016), deve levar em conta o tipo de mistura, a capacidade do reator e seu formato, além das propriedades do fluido, principalmente sua viscosidade.

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados, foi possível observar que a fração de biomassa residual de milho utilizada no presente trabalho é matéria-prima promissora para produção de bioetanol, apresentando percentual de 65,45% de celulose e hemicelulose.

No planejamento experimental, realizado para definição do melhor composto pré-tratante, concluiu-se que ambos os agentes químicos hidróxido de cálcio e óxido de cálcio são eficientes na quebra da rigidez estrutural da biomassa, resultando em valores de 0,32 e 0,31 g CT/g biomassa após hidrólise enzimática, respectivamente.

Por fim, é possível afirmar que o sistema mecânico de agitação é conveniente aos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática, não resultando em alterações nas estruturas da biomassa e das enzimas, desnaturação dos complexos enzimáticos na etapa de hidrólise ou aceleração dos processos de degradação dos carboidratos, sendo favorável ao avanço das pesquisas relacionadas a produção de etanol lignocelulósico em larga escala.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BOHN, L. R.; DRESCH, A. P.; ALVES, S. L.; MIBIELLI, G. M.; BENDER, J. P. Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica de milho para produção de bioetanol. *Anais da VIII JIC*, Realeza, v. 8, n. 1, 2018.
- CORRÊA, L. J. ; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. [s.l.], v. 39, p. 285-294, 2016.
- MARTIN, C; PULS, J.; SAAKE, B; SCHREIBER, A. Effect of glycerol pretreatment on component recovery and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Cellulose Chemistry and Technology*. [s.l.], v. 45, p. 487-494, 2011.
- RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP, 2010.
- ZHANG, H.; YE, G., WEI, Y.; LI, X.; ZHANG, A., XIE, J.. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant. *Bioresource Technology*. [s.l.], v. 229, p. 96-103, abr. 2017.