

# ESTUDO COMPARATIVO DO PRÉ-TRATAMENTO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SEGUIDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA DE CANA DE AÇÚCAR E SABUGO DE MILHO

A. C. LUCARINI, M. P. A. MARIN, J. S. CARNEIRO, L. G. GARCIA,  
R. A. dos REIS e T. P. A. ARAÚJO

Centro Universitário da FEI, Departamento de Engenharia Química  
Email para contato: [lucarini@fei.edu.br](mailto:lucarini@fei.edu.br)

**RESUMO** - Neste trabalho comparou-se a deslignificação por peróxido de hidrogênio alcalino seguida de hidrólise enzimática de dois tipos de biomassa lignocelulósica: a palha de cana-de-açúcar e o sabugo de milho. Na deslignificação das duas biomassas foi utilizado peróxido de hidrogênio alcalino em diferentes concentrações (2, 5 e 10 %v/v). Após a deslignificação a 2%, houve redução de 92,1% e 51,8% da lignina do sabugo de milho e da palha de cana. A hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se celulase obtida por fermentação semi-sólida de *A. niger* e celulase comercial de *T. reesei*. Com os resultados experimentais realizou-se o balanço de massa e verificou-se que a partir de uma tonelada de biomassa *in natura*, após deslignificação e hidrólise, obtiveram-se 4,2 e 2,1 kg de glicose, na hidrólise da palha de cana e do sabugo de milho com o extrato celulolítico de *A.niger*. Com a hidrólise com celulase de *T.reesei*, obtiveram-se 76 e 46 kg de glicose por tonelada de biomassa para a palha e para o sabugo, respectivamente.

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente vem modelando o planejamento estratégico em vários setores da engenharia e sua influência na engenharia química é muito grande. Fontes energéticas limpas, capazes de substituir adequadamente os derivados de petróleo, como a obtenção de energia a partir de biomassa, motivam muita pesquisa e desenvolvimento na atualidade. O foco atual está direcionado no uso de biomassas lignocelulósicas, que são encontradas em abundância no setor agrícola, tais como: bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, sabugo de milho e palha de cana-de-açúcar. Estes materiais são compostos basicamente por celulose e hemicelulose, entremeados por lignina, que é uma macromolécula composta por polifenóis (Mood *et al.*, 1981).

A celulose é um dos polissacarídeos mais abundantes no planeta e também é fonte de carbono e bloco de construção no metabolismo de grande parte dos seres vivos. A hemicelulose, que é um heteropolissacarídeo constituído por pentoses e hexoses, encontra-se intercalada às microfibrilas de celulose e assim confere elasticidade e impede que as mesmas se toquem. Por se tratarem de macromoléculas ricas em açúcar são matérias-primas potenciais para uma série de conversões biotecnológicas, tais como a fermentação alcoólica (Mood *et al.*, 1981).

Devido ao fato de a lignina formar uma rede hidrofóbica impedindo a hidrólise da celulose e hemicelulose, faz-se necessário a deslignificação da matéria-prima para o acesso ao conteúdo fermentescível. O método mais empregado industrialmente é o processo Kraft, utilizado em indústrias de papel e celulose, que pode apresentar uma inevitável poluição odorífica, baixo rendimento de polpação e alto custo de branqueamento (Klock *et al.*, 2005). Assim, métodos físicos e químicos alternativos de deslignificação vêm sendo estudados para a produção de etanol de segunda geração, com o intuito de expor a fração celulósica facilitando a hidrólise, melhorando a produção de açúcares fermentescíveis e evitando a formação de subprodutos que possam atrapalhar a fermentação posterior. O pré-tratamento por oxidação por peróxido de hidrogênio em meio alcalino apresenta facilidade de manuseio, não toxicidade relativa dos componentes e versatilidade do método (Azzam, 1989).

Nesse estudo, realizou-se o processo de hidrólise de duas biomassas disponíveis em grandes quantidades no Brasil, resíduos de atividade agroindustrial: o sabugo de milho e a palha de cana de açúcar. A hidrólise da celulose se dá a partir de duas vias: ácida ou enzimática. Para que a celulose seja hidrolisada enzimaticamente é necessária a ação da celulase, complexo formado por endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, que agem de forma sinérgica para produzir glicose. A celulase é produzida por mais de 200 microrganismos, dentre fungos, protozoários e bactérias de diversos gêneros, sendo que os mais utilizados para essa produção são os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* (Sun e Cheng, 2002).

O objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver o estudo da hidrólise enzimática das biomassas lignocelulósicas, sabugo de milho e palha de cana, e avaliar o potencial do processo e biomassa como fonte de glicose para produção de etanol de segunda geração. Foi realizada para isso a caracterização das biomassas, o estudo do efeito da concentração de  $H_2O_2$  na deslignificação, a produção de extrato enzimático através de fermentação semi-sólida e o balanço de massa do processo.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Matéria-prima e Deslignificação**

As biomassas utilizadas (sabugo de milho e palha de cana) foram lavadas, secas a 90 °C até massa constante, moídas em moinho tipo facas e armazenadas em local seco. Para a caracterização física da matéria-prima (análise dimensional), peneirou-se o sabugo fragmentado em agitador de peneiras sequencias tipo Mesh/Tyler. Para a palha, selecionaram-se 200 amostras, aferiram-se largura e comprimento e calculou-se a área (Gomide, 1991). Para a caracterização química da biomassa realizaram-se os testes de cinzas, lignina Klason, holocelulose e celulose. Os testes de composição foram feitos para a biomassa *in natura* e deslignificada, em triplicata.

Para a deslignificação por tratamento com peróxido de hidrogênio foram utilizadas soluções de peróxido de hidrogênio a 2, 5 e 10% (v/v) (proporção 1:25 – massa em kg de biomassa:volume em L de solução de peróxido de hidrogênio). Ajustou-se o pH da suspensão para 11,5 com hidróxido de sódio. A reação ocorreu durante 14 horas a 30°C. Após a reação, o material foi filtrado e lavado com água até o pH neutro e seco em estufa a 60°C até massa

constante (Azzam ,1989). O percentual de lignina removida após a deslignificação foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ de Lignina Removida} = \frac{\% \text{ Lignina (biomassa)} - \% \text{ Lignina (após deslignificação)}}{\% \text{ Lignina (biomassa)}} \quad (1)$$

## 2.2. Hidrólise Enzimática

O processo de hidrólise enzimática da biomassa deslignificada foi realizado a 50°C e pH 5 com uma proporção enzimática de 20 FPU (*Filter Paper Unit*)/g de substrato (Ghose, 1987). Foram realizadas hidrólises enzimáticas de duas maneiras diferentes: (1) com celulase comercial de *Trichoderma. reesei* ATCC 26921 (Sigma C8546) com atividade enzimática de 1,11 FPU por mL de solução enzimática na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> de sólidos em água; e, (2) com um extrato bruto de celulase de *A.niger* preparado por fermentação semi-sólida em laboratório com 0,048 FPU por mL de extrato enzimático. A obtenção do extrato bruto de celulase de *A. niger* foi realizada de acordo com metodologia desenvolvida por Lucarini *et al.*(2012). Para a avaliação da hidrólise enzimática foram preparados substratos secos de palha de cana e sabugo de milho deslignificados com 2% v/v de peróxido de hidrogênio. Para manter a atividade em 20 FPU/g de substrato foram necessários 18 mL de solução de celulase comercial e 400 mL de extrato bruto de celulase.

Para o cálculo da eficiência relativa da hidrólise considerou-se uma hidrólise com eficiência de 100% aquela na qual toda a massa de celulose presente na amostra foi convertida em glicose e a eficiência foi calculada segundo a Equação 2.

$$Eficiência [\%] = \frac{Massa \text{ de Glicose}}{Massa \text{ de Celulose}} * 100\% \quad (2)$$

## 2.3. Determinações Analíticas

O teor de cinzas totais foi determinado calcinando-se 1 grama de biomassa seca até que após pesagens sucessivas a massa ficasse constante. O teor de cinzas consiste na diferença percentual das massas inicial e final.

Para a determinação do teor de lignina Klason, pesou-se 1g de biomassa seca e adicionou-se 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m). O sistema foi agitado por 2 horas a 200 rpm, adicionou-se 560mL de água destilada e o sistema permaneceu em refluxo por 4 horas. O resíduo foi seco, e calculou-se o teor de lignina a partir da diferença percentual das massas inicial e final, subtraindo-se o teor de cinzas (TAPPI – T222 om-88, 1999).

Para o teor de holocelulose, pesou-se 5g de biomassa seca e adicionou-se 100 mL de água destilada, 0,5g de ácido acético glacial e 0,75g de clorito de sódio. O sistema foi colocado em aquecimento a 75°C durante 1 hora. O resíduo foi filtrado e seco, e calculou-se o teor de holocelulose a partir da diferença percentual das massas inicial e final (TAPPI – T9 wd-75, 1975). Para o teor de celulose, pesou-se 1g do resíduo de teste de holocelulose e adicionou-se 15mL de KOH 24% (m/m). O sistema foi agitado por 15 horas a 200 rpm em temperatura ambiente. Depois de filtrado, neutralizado e seco, calculou-se o teor de celulose a

partir da diferença percentual das massas inicial e final (Rossi *et al.*, 2010).

Para a determinação da composição em açúcares dos hidrolisados foi realizada a determinação de açúcares redutores (AR) pelo método do DNS (Miller, 1959) e da concentração de glicose por método enzimático GOD-POD segundo kit do fabricante Laborlab® cat. 02200.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização da Biomassa *in natura*

Foi determinado a partir da análise granulométrica que o diâmetro médio das partículas do sabugo de milho foi de  $1,960 \pm 0,043$  mm, o que indicou que a amostra era dimensionalmente homogênea. Calculou-se a área superficial média da palha de cana em  $72,750 \pm 57,530$  mm<sup>2</sup>. Os resultados da caracterização química das biomassas *in natura* encontram-se na Tabela 1, para o sabugo de milho e palha de cana, respectivamente.

Tabela 1 - Caracterização química dos materiais lignocelulósicos *in natura*

Biomassa	Umidade (%m/m)	Composição em percentual em massa (base seca) (%m/m)			
		Cinzas	Lignina	Holocelulose	Celulose
Sabugo de milho	$73,40 \pm 0,65$	$0,53 \pm 0,04$	$10,20 \pm 0,19$	$90,72 \pm 0,24$	$48,02 \pm 1,70$
Palha de cana	$55,43 \pm 3,20$	$4,24 \pm 0,35$	$14,33 \pm 0,80$	$77,29 \pm 1,40$	$58,55 \pm 2,00$

#### 3.2. Resultados Obtidos após Deslignificação

Estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 a caracterização química obtida após a deslignificação do sabugo de milho e da palha de cana, respectivamente, utilizando-se concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio alcalino para a oxidação, como descrito na seção 2.3.

Tabela 2 - Caracterização química do sabugo de milho deslignificado

Biomassa	% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%v/v)	Composição em percentual em massa (base seca) (%m/m)			
		Cinzas	Lignina	Holocelulose	Celulose
Sabugo de milho	2	$0,017 \pm 0,002$	$0,85 \pm 0,095$	$83,19 \pm 0,54$	$62,36 \pm 2,20$
	5	$0,015 \pm 0,001$	$0,89 \pm 0,13$	$84,90 \pm 0,75$	$63,97 \pm 1,23$
	10	$0,016 \pm 0,001$	$1,31 \pm 0,21$	$85,57 \pm 0,80$	$64,45 \pm 1,60$

Tabela 3 - Caracterização química da palha de cana deslignificada

Biomassa	% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%v/v)	Composição em percentual em massa (base seca) (%m/m)			
		Cinzas	Lignina	Holocelulose	Celulose
Palha de cana	2	$0,074 \pm 0,013$	$8,92 \pm 0,66$	$68,03 \pm 1,30$	$62,15 \pm 0,24$
	5	$0,078 \pm 0,012$	$7,59 \pm 0,60$	$82,01 \pm 1,20$	$68,87 \pm 1,07$
	10	$0,082 \pm 0,009$	$6,38 \pm 1,23$	$83,19 \pm 0,54$	$69,87 \pm 0,60$

Analisando-se os dados apresentados nas Tabelas 2 e 3, juntamente com o percentual de lignina removida, apresentado na Figura 1, verifica-se que a remoção de lignina pelo ataque com peróxido foi mais eficiente para o sabugo de milho do que para a palha de cana. Para o caso do sabugo de milho o aumento da concentração de peróxido utilizado não foi significativo na redução de lignina, tendo em vista que já se reduz em 92% a quantidade de lignina presente, com concentração de 2%. Operacionalmente isto é benéfico, pois o consumo de peróxido é menor, assim como o potencial de risco do agente oxidante. Analisando-se os dados obtidos para a deslignificação da palha de cana, vê-se que a deslignificação mais eficiente foi ao se utilizar  $H_2O_2$  a 10% em volume. Entretanto, os ensaios utilizando as concentrações de 5% e 10% de  $H_2O_2$  foram muito instáveis devido à grande produção de gás, e a eficiência da deslignificação utilizando  $H_2O_2$  a 2% foi aproximadamente 12% inferior. Assim, considerando-se estes aspectos concluiu-se que a concentração de  $H_2O_2$  a 2% é suficiente para uma deslignificação adequada tanto do sabugo de milho como da palha de cana nas condições avaliadas.

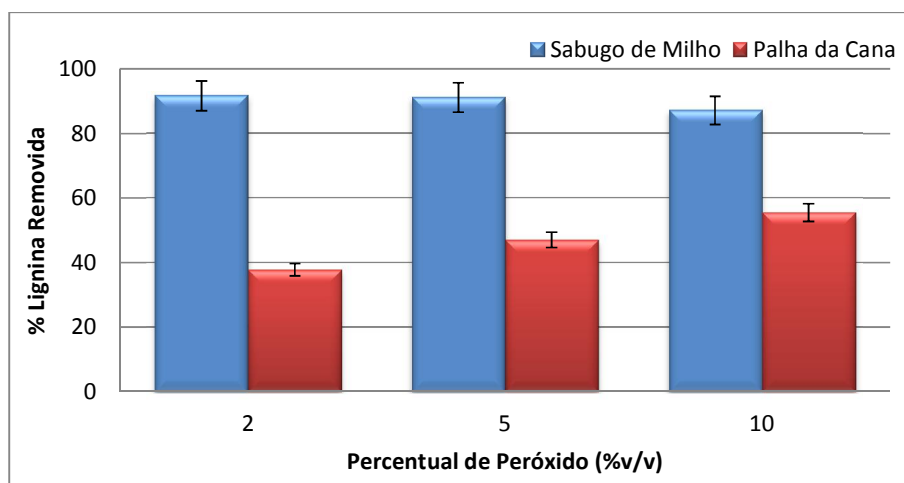


Figura 1 – Percentual de lignina removida da palha de cana e do sabugo de milho tratado com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio

Outro fator relevante para as diferentes eficiências de deslignificação estão ligadas à porosidade da biomassa. O sabugo de milho é mais poroso, o que facilita o ataque oxidante em comparação à palha de cana, que é mais fibrosa. Outra vantagem que o sabugo de milho apresenta em relação à palha de cana é a filtração pós-tratamento, que é mais rápida e atinge pH neutro com menor consumo de água.

### 3.3. Hidrólise Enzimática da Biomassa Deslignificada

Os resultados obtidos dos estudos da hidrólise enzimática com o extrato bruto de celulase proveniente da fermentação semi-sólida de *Aspergillus niger* e celulase comercial de *Trichoderma reesei* estão apresentados na Tabela 4. A eficiência de hidrólise calculada é mostrada na Figura 2.

Tabela 4 - Dados médios resultantes dos ensaios de hidrólise enzimática

	Substrato	Concentração de açúcares redutores (g/L)	Concentração de glicose (g/L)
<b>Celulase Comercial</b>	Palha	25,34 ± 2,73	13,12 ± 0,39
	Sabugo	24,67 ± 1,23	13,78 ± 0,76
<b>Extrato Enzimático</b>	Palha	0,437 ± 0,0212	0,026 ± 0,0045
	Sabugo	0,315 ± 0,0276	0,023 ± 0,0029

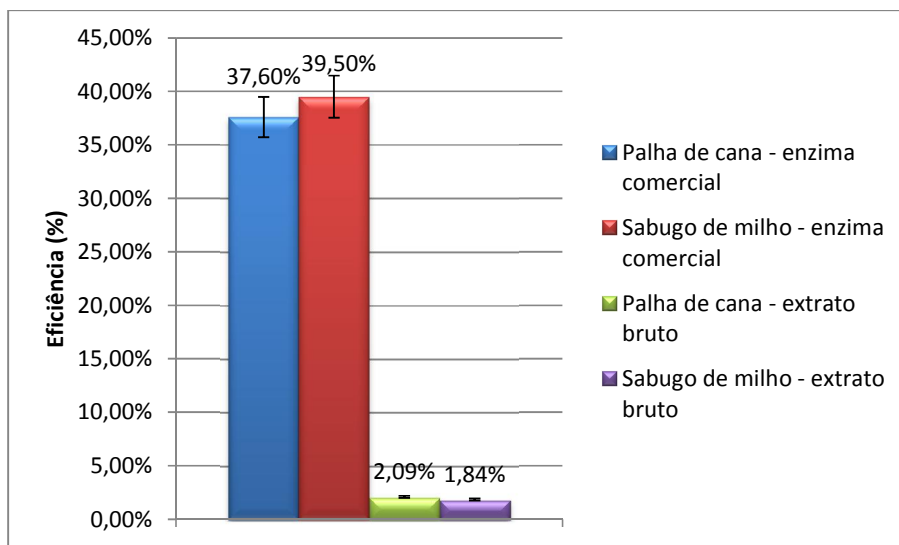


Figura 2 - Eficiência da hidrólise

Com os dados da Figura 2, observa-se que os processos que utilizaram a celulase comercial foram significativamente mais eficientes que os processos com extrato enzimático bruto. Possivelmente, isto ocorreu por diferenças de composição das celulases, tendo em vista que a celulase proveniente de *Aspergillus niger* é rica na fração  $\beta$ -glicosidase, responsável pela clivagem da celobiose em glicose. Já a celulase de *T.reesei* atuou melhor na clivagem da celulose em açúcares redutores como celobiose e celotriose e na formação de glicose, pois produz um complexo celulolítico superior ao proveniente de outros fungos (Sun e Cheng, 2002).

Foi proposto um processo para a obtenção de glicose a partir de biomassa que está apresentado na Figura 3. Com base nos resultados experimentais foi efetuado um balanço de massa para quantificar a glicose obtida por tonelada de biomassa *in natura* utilizada, considerando as diferentes rotas de hidrólise enzimática propostas. Na Tabela 5 são apresentados os valores em quilos das correntes (1, 3, 4, 8, 11, 14 e 15) indicadas na Figura 3, que são as principais correntes para o processo.

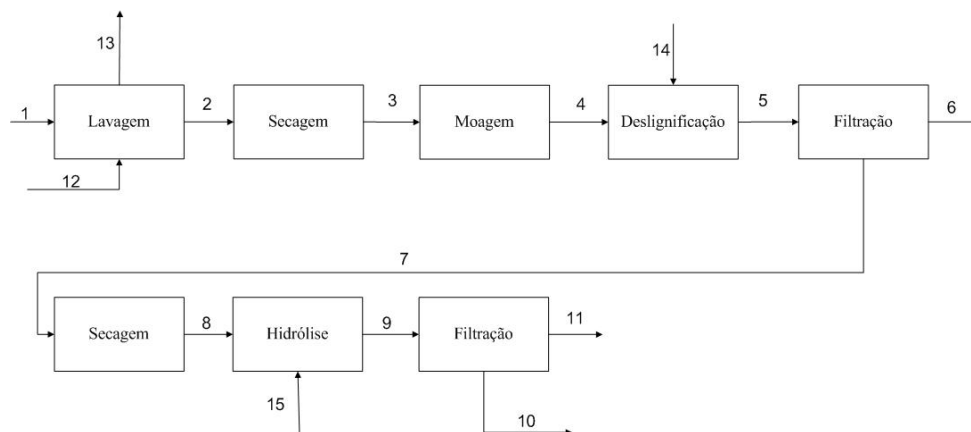


Figura 3 – Fluxograma de blocos do processo proposto

Tabela 5 – Balanço de massa para as principais correntes do fluxograma de blocos

Corrente	Descrição	Sistema Reacional			
		Palha + Celulase <i>T.</i> <i>reesei</i>	Palha + Extrato Bruto <i>A.</i> <i>niger</i>	Sabugo + Celulase <i>T.</i> <i>reesei</i>	Sabugo + Extrato Bruto <i>A. niger</i>
1	Biomassa <i>in natura</i>	1000 kg	1000 kg	1000 kg	1000 kg
3	Biomassa seca	445,7 kg	445,7 kg	266,0 kg	266,0 kg
4	Biomassa moída	445,7 kg	445,7 kg	266,0 kg	266,0 kg
8	Biomassa deslignificada seca	324,5 kg	324,5 kg	185,8 kg	185,8 kg
11	<b>Glicose</b>	<b>75,9 kg</b>	<b>4,2 kg</b>	<b>45,8 kg</b>	<b>2,1 kg</b>
14	Solução alcalina da H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 2%	11,1 m <sup>3</sup>	11,1 m <sup>3</sup>	6,7 m <sup>3</sup>	6,7 m <sup>3</sup>
15	Preparado enzimático	5,8 m <sup>3</sup>	129,8 m <sup>3</sup>	3,3 m <sup>3</sup>	74,2 m <sup>3</sup>

Com os dados apresentados, conclui-se que a utilização de palha de cana de açúcar é mais eficiente do que o uso do sabugo de milho para a produção de glicose. Apesar da eficiência de hidrólise em ambos os casos ser de aproximadamente 40%, essa diferença na produção de glicose por tonelada de biomassa *in natura* é causada pela diferença entre os teores de água das biomassas. Observa-se que o teor de água do sabugo de milho é igual a 73,4% e que o da palha de cana é igual a 55,4%, portanto há mais celulose na palha de cana do que no sabugo de milho, em termos absolutos. No entanto, em termos de biomassa seca, a produção de glicose a partir das duas biomassas é muito semelhante. Entretanto, devido às dificuldades técnicas que a palha de cana apresentou durante seu manuseio, nas operações unitárias feitas em laboratório, conclui-se que o sabugo de milho é operacionalmente melhor para ser utilizado no processo de obtenção de açúcares fermentescíveis do que a palha de cana.



#### 4. CONCLUSÃO

O estudo da composição da biomassa mostrou que ambas possuem valores próximos de celulose em sua estrutura. Após a avaliação dos resultados de deslignificação, verificou-se que o peróxido de hidrogênio a 2% em volume é a concentração mais adequada, pois não houve aumento significativo da porcentagem de lignina removida com o aumento da quantidade de peróxido. Após a hidrólise com ambos os complexos enzimáticos, constatou-se que o extrato bruto produzido em laboratório não apresentou bons resultados por sua baixa eficiência nas condições aplicadas de tempo de reação, pH e temperatura. Para os processos que utilizaram celulase comercial, obteve-se uma produção de 172,2kg e 170,3kg de glicose por tonelada de biomassa seca, para o sabugo e a palha de cana, respectivamente, dados obtidos após balanço de massa do processo. Portanto, concluiu-se que o sabugo de milho foi a matéria prima mais viável para o processo, dado que a produção de glicose é semelhante à outra biomassa em base seca e que sua manipulação é mais fácil.

#### 5. REFERÊNCIAS

- AZZAM, A.M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Heal.* v.B24, n.4, p.421-433, 1989.
- MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v.27, p.77-93, 2013.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, v.59, n.2, p.257-268, 1987.
- GOMIDE, R. Manual de Operações Unitárias. São Paulo: Editora Reynaldo Gomide, v. 1, 1991.
- KLOCK, U.; MUÑIZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE, A.S. *Química da Madeira*. Curitiba: Editora da Universidade - UFPR. 2005. 81p.
- LUCARINI, A.C., MARIN, M.P.A., ARAUJO, F.D.C., MACIEL, M., RUAS, C.V. Avaliação da produção de celulase por fermentação semi-sólida do fungo filamentoso *Aspergillus niger* em diferentes resíduos lignocelulósicos In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2012, Búzios, 2012. p.4204 – 4213.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- ROSSI, F.G.; TAMBORGUI, E.B.; MORANDIM, A.A.; OKADA, F.; HOEPERS, A.J.; SOUZA, R.R. Estudo de processos químicos de polpação do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de Acetato de celulose. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, 2010.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.*, v.83, p. 1-11, 2002.
- TAPPI TEST METHOD T222 om-88, Acid-insoluble lignin in wood and pulp. In: Technical Association of the Pulp and Paper Industry Test Methods, Atlanta, 1999.
- TAPPI TEST METHOD T9 wd-75, Holocellulose in wood. In: Technical Association of the Pulp and Paper Industry Test Methods, Atlanta, 1975.