

ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DO CULTIVO DE MILHO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

R. A. P. SILVA¹, C. A. REZENDE²

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

² Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química

E-mail para contato: r147846@dac.unicamp.br

RESUMO – Amostras de resíduos da colheita de milho, como palhas, caules e folhas, foram pré-tratadas em um processo de duas etapas, sendo a primeira com soluções ácidas de H₂SO₄ 1 e 3% (v/v) e a segunda com soluções alcalinas de NaOH 0,5 e 5% (m/v), utilizando uma autoclave a 120°C e 1,05 bar por 40 min. Também foi realizado um planejamento fatorial para otimizar a retirada de lignina da biomassa, no qual os seguintes fatores foram variados: temperatura (100 e 120 °C), tempo (40 e 60 min) e concentração de NaOH (0,5 e 1%). Após os pré-tratamentos, as amostras tiveram seus teores de açúcares, lignina e cinzas quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e sua morfologia analisada por microscopia eletrônica de varredura.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 74 milhões de toneladas de resíduo seco de biomassa são desperdiçadas no mundo por ano e estas teriam o potencial de produzir 49 milhões de litros de bioetanol (Kim, 2003) e outros biocombustíveis (Dias, 2013). Além da questão energética, a biomassa é rica em compostos de carbono, como glicose, frutose, xilose e outros açúcares, que poderiam ser usados na obtenção de produtos químicos de alto valor agregado. Entre esses, destacam-se furfural, hidróximetilfurfural, etanol, butanol, *etc.* (Stark, 2011; Rinaldi, 2009).

O milho pertence à família Gramineae/Poaceae de nome científico *Zea mays L.* A planta é basicamente formada pelo caule, as folhas e as espigas. É uma cultura de importância significativa no Brasil e que resulta em uma quantidade grande de biomassa vegetal por tonelada de grãos produzidos. De uma forma geral, a biomassa lignocelulósica é constituída por paredes celulares secas de plantas, cujos principais componentes são celulose, hemicelulose e lignina (Azadi, 2012).

O aproveitamento dos diferentes componentes da parede celular na produção de etanol de segunda geração depende de pré-tratamentos capazes de separá-los e tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática, uma das etapas determinantes do processo. Assim, esse trabalho está centrado na otimização das etapas de pré-tratamento químico aplicado aos resíduos de milho, buscando teores mínimos de lignina restantes na biomassa e enriquecimento de seu percentual de celulose.

2. METODOLOGIA E RESULTADOS

As amostras de espécies híbridas *Zea mays L.* (sementes DKB 340 BRO, Dekalb) foram doadas por uma fazenda localizada no município de Casa Branca-SP. Os pés de milho foram colhidos 60 dias após o plantio e moídos em um moinho de facas Thomas Scientific. O tamanho das partículas foi controlado, utilizando-se uma peneira de 2 mm de diâmetro, segundo as especificações estabelecidas no protocolo do NREL (Sluiter, 2008). Em todos os pré-tratamentos realizados neste trabalho, as amostras eram uma mistura de folhas, caules e palhas da espiga na proporção 5:4:1. Tal proporção foi determinada de acordo com a massa seca obtida de cada componente da planta.

Os pré-tratamentos utilizados basearam-se em uma metodologia já sólida no grupo de pesquisa (Rezende, 2011). O pré-tratamento consiste de duas etapas: uma primeira etapa ácida, utilizando uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4), e uma segunda etapa básica, em que se utiliza um tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) aquoso (Rezende, 2011). Foi feito também um tratamento hidrotérmico para comparação, mantendo-se as demais condições iguais à do tratamento ácido-base (120 °C, 1,05 bar e 40 min). Em todos os tratamentos, utilizou-se uma autoclave vertical AV-75 Phoenix. As concentrações utilizadas de cada reagente e os respectivos nomes das amostras estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação das amostras de palha de milho tratadas em diferentes concentrações de ácido e base por 40 min, a 120 °C e 1,05 bar.

	Nome da amostra	H_2SO_4 (v/v)	NaOH (m/v)
1	<i>In natura</i>	---	---
2	Hidrotérmico	0%	---
3	H_2SO_4 1%	1%	---
4	H_2SO_4 1% + NaOH 0,5%	1%	0,5%
5	H_2SO_4 1% + NaOH 5%	1%	5%
6	H_2SO_4 3%	3%	---
7	H_2SO_4 3% + NaOH 0,5%	3%	0,5%
8	H_2SO_4 3% + NaOH 5%	3%	5%

Os resíduos sólidos obtidos após cada tratamento foram hidrolisados para serem quantificados quanto à sua composição química por HPLC e por espectroscopia UV-Vis, segundo um protocolo descrito anteriormente (Sluiter, 2008). A composição química das amostras encontra-se na Tabela 2.

Analisando a composição das amostras, pode-se observar que a quantidade de hemicelulose diminui quando tratamentos ácidos são aplicados. A quantidade média de hemicelulose nas amostras *in natura* (1) é de cerca de 6,5% e esse percentual permanece praticamente inalterado com o tratamento hidrotérmico, que utiliza água apenas. Nos tratamentos usando ácido 1 ou 3% (3 e 6), o teor de hemicelulose cai para cerca de 2%. Em relação ao percentual de celulose presente nessas amostras, a maioria dos tratamentos tende a enriquecer as amostras em celulose, o que se deve à retirada dos demais componentes da amostra. O único tratamento que diminui o percentual de celulose em relação aos 40% da

presentes na amostra *in natura* (1) é o tratamento hidrotérmico. Nos tratamentos com altas concentrações de NaOH (5 e 8), a amostra final é composta essencialmente por celulose pura (percentuais entre 94 e 99 %), embora seja importante considerar a perda de massa total nesses processos, que é de 75%. Esses tratamentos mostram-se assim bastante efetivos na obtenção de substratos ricos em celulose para produção de etanol de segunda geração.

Tabela 2 – Composição química das amostras de milho antes e após os pré-tratamentos.

Amostra		Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Total
		Média	Média	Média	Média	Média
1	<i>In natura</i> A (extrativos)	41 ± 1	6,6 ± 0,3	28,0 ± 0,5	0,65 ± 0,02	99 ± 2
2	H ₂ O	39,4 ± 0,9	6,1 ± 0,7	29,7 ± 0,3	0,53 ± 0,01	76 ± 1
3	H ₂ SO ₄ 1%	54,1 ± 0,2	2,9 ± 0,2	34,18 ± 0,09	1,35 ± 0,01	92,5 ± 0,3
4	H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 0,5%	73 ± 6	2,5 ± 0,3	26 ± 1	0,56 ± 0,03	102 ± 5
5	H ₂ SO ₄ 1% + NaOH 5%	94 ± 4	2,00 ± 0,08	9,65 ± 0,07	0,24 ± 0,02	106 ± 4
6	H ₂ SO ₄ 3%	58,13 ± 0,01	2,42 ± 0,04	35,5 ± 0,9	1,49 ± 0,05	97,5 ± 0,8
7	H ₂ SO ₄ 3% + NaOH 0,5%	79 ± 12	2,0 ± 0,2	25,9 ± 0,6	0,41 ± 0,01	107 ± 12
8	H ₂ SO ₄ 3% + NaOH 5%	99 ± 9	2,0 ± 0,2	9 ± 1	0,33 ± 0,00	110 ± 8

*No caso da amostra *in natura*, o total é obtido somando-se também os 22,5% de extrativos, retirados com H₂O e etanol/hexano (1:1) em extrator Soxhlet.

O principal função dos tratamentos com NaOH foi retirar lignina da biomassa, já que esse componente tem a função de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência à planta. Assim, a menor quantidade de lignina resulta em maior disponibilidade, acessibilidade e área superficial para as enzimas que atuarão na etapa de hidrólise enzimática para produção de etanol. De acordo com a Tabela 2, pode-se afirmar que a biomassa do milho *in natura* (1) possui cerca de 30% de lignina em sua composição. O tratamento hidrotérmico tem pouco efeito sobre esse percentual, mas o teor de lignina cai para cerca de 25% quando é utilizado, na segunda etapa do pré-tratamento, uma solução alcalina de concentração 0,5% (4 e 7), independentemente da concentração da solução ácida utilizada na etapa anterior. Já para as soluções de NaOH 5% (5 e 8), o valor cai para cerca de 10% e também independe da concentração do ácido utilizado na primeira etapa. No caso das amostras tratadas apenas com ácido (3 e 6), o percentual de lignina parece aumentar em relação à amostra *in natura*, mas isso se deve, na verdade, à retirada de outros componentes presentes na biomassa, principalmente hemicelulose. Com essa análise, observa-se que a retirada de lignina do material está intrinsecamente relacionada à concentração da solução alcalina, ou seja, o NaOH é o responsável pelo aumento da acessibilidade da biomassa por seu efeito de extrair lignina.

Procurando compreender melhor quais dos fatores de processo (temperatura, tempo e concentração de NaOH) tem maior influência sobre a concentração mínima final de lignina nas amostras, montou-se um planejamento fatorial 2³ em duplicata. Os dados do planejamento, incluindo os níveis em que cada um dos fatores foram variados e a quantidade de lignina total obtida (solúvel e insolúvel) após os tratamentos encontram-se na Tabela 3. O cálculo dos efeitos principais e das interações entre os efeitos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 3 – Dados do planejamento fatorial.

Fatores:	1: Temperatura, °C			100 (-)		120 (+)
	2: Tempo, min			40 (-)		60 (+)
	3: Concentração NaOH, %(m/v)			0,5 (-)		1,0 (+)
Ensaio	1	2	3	Quantidade de Lignina (%)		Média (%)
1	-	-	-	25,21	24,74	25,0 ± 0,3
2	+	-	-	24,94	25,34	25,1 ± 0,3
3	-	+	-	24,13	25,49	25 ± 1
4	+	+	-	31,33	32,01	31,7 ± 0,5
5	-	-	+	15,22	14,46	14,8 ± 0,5
6	+	-	+	17,08	16,82	17,0 ± 0,2
7	-	+	+	16,39	16,27	16,33 ± 0,09
8	+	+	+	17,08	17,16	17,12 ± 0,05

Tabela 4 – Efeitos principais e de interação entre os fatores.

1	2	3	12	13	23	123
2,5 ± 0,2	2,0 ± 0,2	-10,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	-1,0 ± 0,2	-1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,2

Analisando os dados, temos que a temperatura (1) e o tempo de residência (2) na autoclave não possuem um efeito principal significativo na retirada de lignina, dentro dos intervalos estudados (temperatura entre 100 e 120 °C e tempo entre 40 e 60 min). No entanto, o efeito principal 3, o qual corresponde à concentração de NaOH, é significativo e se destaca dentre todos os outros efeitos de interação. Isso significa que, quando mudamos do patamar baixo da concentração (0,5 m/v) para o mais alto (1,0 m/v) temos uma média de diminuição de 10% na quantidade de lignina da amostra e não há evidências de que esse aumento dependa dos níveis das outras variáveis, na faixa experimental investigada.

O ensaio que revelou a menor quantidade de lignina foi o ensaio 5, com uma média de 14,8%, o qual foi realizado a 100 °C (-), por 40 min (-) a uma concentração de NaOH 1,0% (+), enquanto que o ensaio com 120 °C (+), por 60 min (+) a mesma concentração teve uma média de 17,12% de lignina na composição. Tais dados confirmam que o tempo de residência na autoclave e a temperatura não possuem um efeito significativo na retirada da lignina. Dessa forma, é possível utilizar tempos relativamente curtos e temperaturas menores nos tratamentos, visando economia de energia.

Para a análise morfológica dos resíduos de milho, estes foram separados em caule, folhas e palha (da espiga) para facilitar a identificação das variações morfológicas em decorrência dos tratamentos. A Figura 1 mostra fibras de palha de milho com sinais brandos de degradação nas amostras tratadas só com H₂SO₄ 1% (Figura 1B) ou com H₂SO₄ 1% + NaOH 0,5% (Figura 1C), mas uma morfologia bastante degradada pelo tratamento com H₂SO₄ 1% + NaOH 5% (Figura 1D). Na Figura 1(A), observa-se com clareza as fronteiras das paredes celulares das células que compõem a palha da espiga e também uma fina camada de tecido que protege tais células, além de alguns estômatos espalhados ao longo dele. Já na

Figura 1(B), nessa amostra pré-tratada com ácido sulfúrico 1%, observam-se tecidos dobrados e rupturas na parede celular, que caracterizam as consequências morfológicas do tratamento químico aplicado. Na Figura 1(D), as estrutura fibrilar do milho (que é uma gramínea) está solta e as fibras menores encontram-se emaranhadas e retorcidas. A separação do feixe de fibras em amostras de gramíneas foi anteriormente observada nesse grupo de pesquisa (Rezende, 2011).

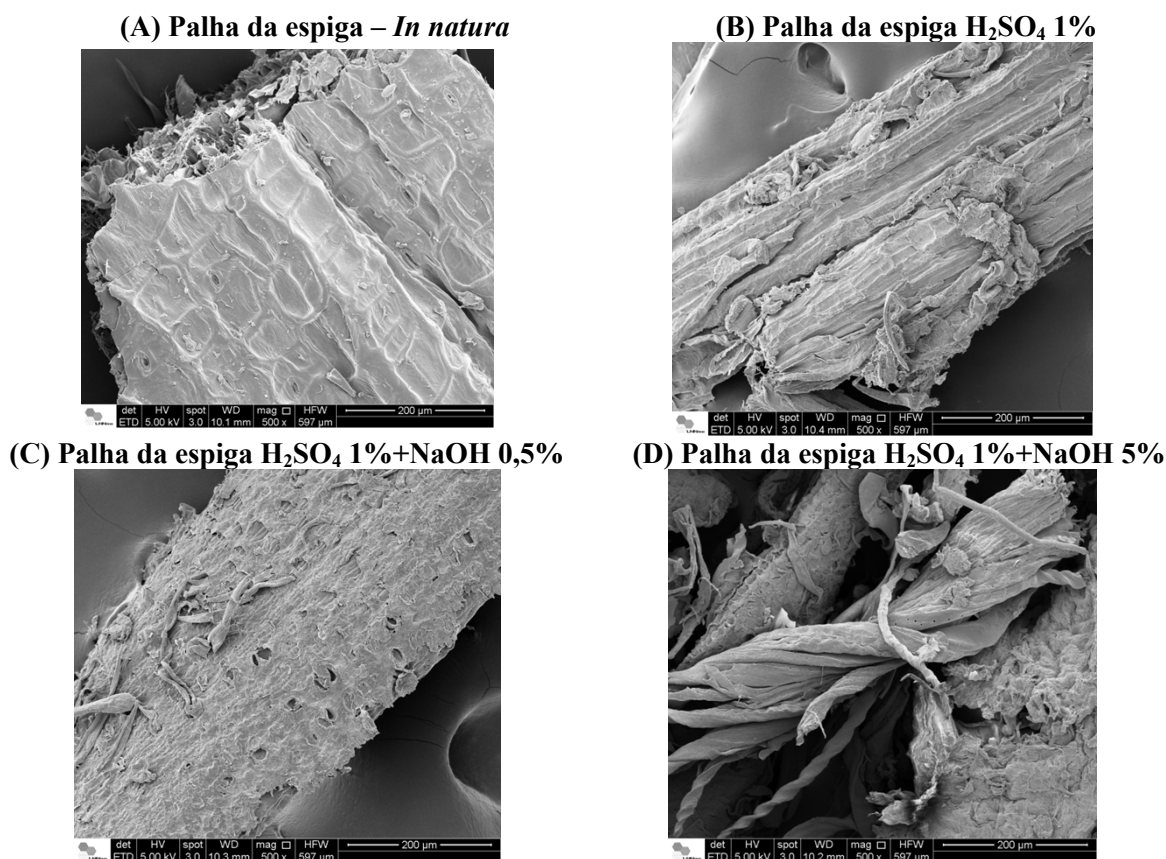


Figura 1. Imagens obtidas por FESEM da palha da espiga do milho: (A) *in natura*; (B) após tratamento com H₂SO₄ 1%; (C H₂SO₄ 1% + NaOH 0,5%; e (D) H₂SO₄ 1% + NaOH 5%. Barra de escala de 200 µm.

Esses resultados morfológicos estão totalmente coerentes com os dados de retirada de lignina apresentados na Tabela 2. O tratamento mais brando retira pouca lignina, deixando acessível algumas partes das estruturas fibrilares, por outro lado, o tratamento severo ataca fortemente a lignina e a remove com tanta significância que o material fica sem suporte e sem rigidez, perdendo totalmente a sua forma original. A Figura 2 mostra imagens ampliadas da parede celular da palha de milho em que os contornos das fibrilas individuais de celulose começam a se tornar nítidos. A superfície relativamente compacta da amostra *in natura* (Figura 2A) começa a apresentar poros maiores após os tratamentos químicos, o que pode ser atribuído à retirada de componentes da parede celular. Essas imagens em ampliações maiores evidenciam as mudanças morfológicas em uma escala bastante ampliada e mostram que a retirada de hemicelulose e de lignina dos interstícios entre as fibrilas e celulose, evidencia o relevo das mesmas.

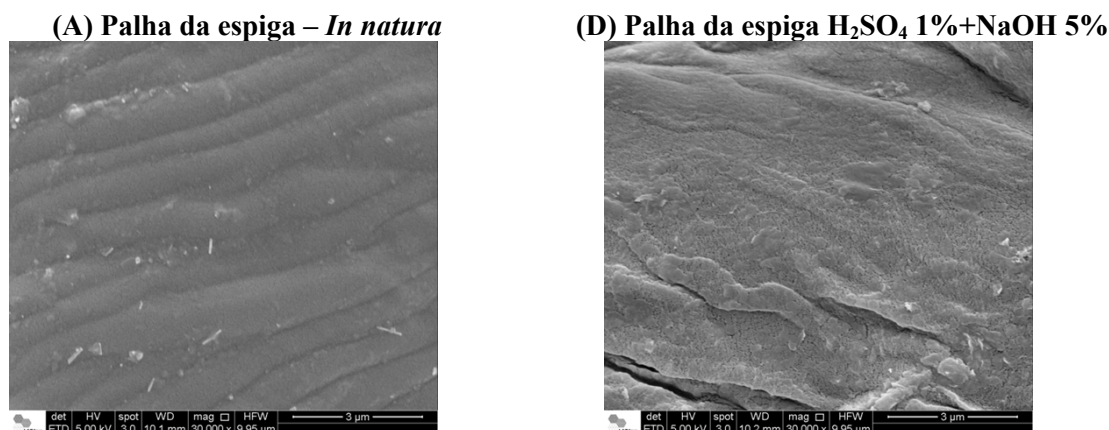


Figura 2. Imagens obtidas por FESEM da palha da espiga do milho: (A) *in natura*; (B) após tratamento com H_2SO_4 1% + NaOH 5%. Barra de escala de 3 μm .

3. CONCLUSÕES

Os tratamentos químicos aplicados nesse trabalho mostram-se muito efetivos para retirar lignina dos resíduos de biomassa de milho e para a obtenção de substratos enriquecidos em celulose para a obtenção de etanol de segunda geração. O pré-tratamento em duas etapas com H_2SO_4 3% + NaOH 5% rendeu as maiores porcentagens de celulose e as menores de lignina, além de apresentar uma morfologia mais aberta e com grande área de contato para hidrólise enzimática. O planejamento fatorial 2^3 mostrou que a concentração de NaOH é o efeito principal mais relevante para retirada da lignina das amostras, em detrimento do tempo e da temperatura de reação, dentro das faixas utilizadas neste trabalho.

Agradecimento: os autores agradecem ao LME/LNNano/CNPEM pelo uso do microscópio eletrônico de varredura.

4. REFERÊNCIAS

- AZADI, P.; INDERWILDI, O. R.; FARNOOD, R.; KING, D. A. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2012**,
- DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CUNHA, M. P.; BONOMIA, A.; MACIEL FILHO, R.; Utilization of pentoses from sugarcane biomass: Techno-economics of biogas vs. butanol production”, *Bioresource Technology*, Volume 142, **2013**.
- KIM, S.; DALE, E. D. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass and Bioenergy*, Vol. 26, p. 361-375, **2003**.
- REZENDE, C. A.; DE LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; DE AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels* 4, **2011**.
- RINALDI, R. *et. Al.* Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into the biorefinery schemes, *Chem. Sus. Chem.*, 2, p. 1096, **2009**.
- SLUITER, J.; SLUITER, A. Preparation of Samples for Compositional Analysis”, Laboratory Analytical Procedure, *NREL/TP-510-42620*, revised August **2008**.
- STARK, A. Ionic liquids in the biorefinery: a critical assessment of their potential, *Energy Environ. Sci.* 4, p. 19, **2011**.