

EFEITO DA SECAGEM DE BRACHIARIA BRIZANTHA CV. MARANDU SOBRE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SEUS POLISSACARÍDEOS

J.A. DE CARVALHO¹, M.A. CARVALHO², R. GAMBETTA³, T.F. PACHECO³, T.D. MENDES³,
E.L. SCHULTZ³, M.C.T. DAMASO³, D.S.R. GAMBETTA³

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso

² Embrapa Cerrados

³ Embrapa Agroenergia

E-mail para contato: dasciana.rodrigues@embrapa.br

RESUMO – A eficácia da hidrólise enzimática da biomassa é influenciada pela umidade da amostra. Alguns pré-tratamentos químicos podem reduzir/eliminar este efeito. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de secagem sobre o pré-tratamento químico e hidrólise enzimática de *brachiaria brizantha*. A biomassa foi moída e a umidade determinada, 65%, e uma parte desta foi seca até 5% de umidade. Cada uma destas amostras foi submetida à pré-tratamentos fraco (ácido e base diluídos) e forte (ácido e base concentrados) e depois submetidas à hidrólise enzimática. Os resultados comprovaram que a secagem da biomassa desfavorece a hidrólise, pois o rendimento de açúcares foi de 35 % para a amostra úmida e 2 % para amostra seca. Após pré-tratamento fraco o rendimento para amostra seca, 70 %, foi maior do que na amostra úmida, 59 %. Quando pré-tratamento forte foi aplicado, os rendimentos de hidrólise para amostras úmida (95 %) e seca (92 %) tornaram-se similares. Concluiu-se que o processo de secagem da biomassa não influencia o rendimento de açúcares da hidrólise enzimática se um pré-tratamento químico adequado for aplicado.

1. INTRODUÇÃO

Um dos pontos-chave para o uso de biomassa na produção de combustíveis e outros químicos renováveis é viabilizar o transporte e/ou armazenamento desta matéria-prima. Um dos principais obstáculos nestas operações é a umidade nas diferentes biomassas, as quais podem atingir até 70 % em água (Athmanathan *et al.*, 2011). Biomassas com elevados teores de água apresentam baixa densidade energética e tornam-se mais susceptíveis à degradação microbiana, desfavorecendo seu transporte e armazenamento (Acharjee *et al.*, 2011; Medic *et al.*, 2012).

A secagem da biomassa pode ser usada para facilitar seu transporte e armazenamento. Entretanto, há estudiosos que defendem o armazenamento da biomassa úmida em silos. Cada uma destas estratégias tem vantagens e desvantagens relacionadas a condições climáticas, degradação microbiana, perda do material no campo, gasto de energia no pré-processamento, digestibilidade do material, risco de incêndio, geração de resíduos, etc. (Li *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2012).

Quando se considera a produção de biocombustíveis, o fato de a secagem permitir a estocagem da biomassa por longos períodos, facilitar o transporte e facilitar a cominuição desta em moinhos comumente usados em escalas industriais, percebe-se que esta estratégia torna-se interessante, mesmo que as etapas seguintes sejam a reidratação do material para a produção de açúcares via processos biológicos (Rivers *et al.*, 1987; Digman *et al.*, 2010; Ewanick *et al.*, 2011).

O processamento de uma biomassa para obtenção de açúcares geralmente passa pelas seguintes etapas: cominuição, pré-tratamento e hidrólise enzimática. O teor de água presente na biomassa poderá influenciar fortemente na energia gasta na etapa de cominuição. No estudo realizado por Barakat *et al.* (2013), verificou-se que um aumento de até 50 % na energia gasta na etapa de cominuição pode ocorrer quando a umidade do material aumenta de 10 % para 15 %. Apesar das vantagens do uso de biomassa com baixo teor de água na etapa de cominuição, nas etapas seguintes do processamento isto poderá ter um efeito negativo (Ewanick *et al.*, 2011). Entretanto, o uso de um pré-tratamento adequado poderá neutralizar tais efeitos.

O pré-tratamento de biomassas é aplicado para a remoção ou modificação de componentes indesejados da biomassa visando o aumento da velocidade e rendimentos em açúcares via hidrólise enzimática (Mosier *et al.*, 2005). Neste trabalho, o pré-tratamento utilizado envolveu uma etapa usando ácido para remoção de hemicelulose e uma etapa alcalina para remoção de lignina, ambos com o objetivo de facilitar o acesso das celulasas ao substrato por meio do intumescimento e aumento da porosidade do material (Xu *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

A escolha do pré-tratamento é importante, mas é preciso manter em mente que a possibilidade de reidratação do material para facilitar a hidrólise enzimática dependerá de vários fatores, entre eles, tamanho de partícula da biomassa, temperatura de secagem, valor final de umidade, estrutura e composição química da biomassa (Cullis *et al.*, 2003; Acharjee *et al.* 2011; Luo *et al.* 2011; Zhang *et al.*, 2013). No estudo realizado por Maache-Rezzoug *et al.* (2011), observou-se que uma variação de 10 a 40 % no teor de água da palha de trigo não afeta a hidrólise enzimática, desde que esta matéria-prima seja previamente submetida a tratamento a vapor.

A biomassa pode estar envolvida pela água em diferentes níveis, por exemplo, em níveis moleculares (água ligada aos diferentes componentes) e macromoleculares (entre os poros e livre). Em cada um dos casos a água tem propriedades distintas, mas ambas fundamentais na interação enzima-substrato (Kristensen *et al.*, 2009). Dependendo da composição do material pré-tratado, diferentes quantidade e distribuição de água podem ser observadas, pois a água se liga de maneira diferente aos diferentes componentes da biomassa, por exemplo, hemicelulose tem alta capacidade de ter água ligada, enquanto celulose e lignina não a têm (Modenbach *et al.*, 2012).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da secagem de biomassa sobre o pré-tratamento químico e a hidrólise enzimática. A *Brachiaria brizantha* foi utilizada como biomassa modelo, pois apresenta elevado potencial de produção, podendo atingir 18 ton/MS/ha/ano (Sá *et al.*, 2010), a um baixo custo e, além disso, também apresenta baixo teor de lignina, o que tem despertado o interesse científico para estudos de melhoramento e aplicação desta biomassa na produção de biocombustíveis (Carvalho *et al.*, 2011).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Os principais materiais utilizados neste trabalho foram: a forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (produzida em campos da Embrapa Cerrados), o extrato enzimático comercial Cellic® CTec2, da Novozymes, o qual tem atividade $\cong 147$ FPU/mL. Os equipamentos utilizados foram moinho IKA modelo A11, estufa, mesa agitadora e cromatógrafo a líquido da Agilent Infinity 1260.

2.2. Métodos

Para visualizar a estrutura deste trabalho, um fluxograma com as principais etapas realizadas são apresentadas na Figura 1, e em seguida é apresentada uma descrição detalhada destas etapas.

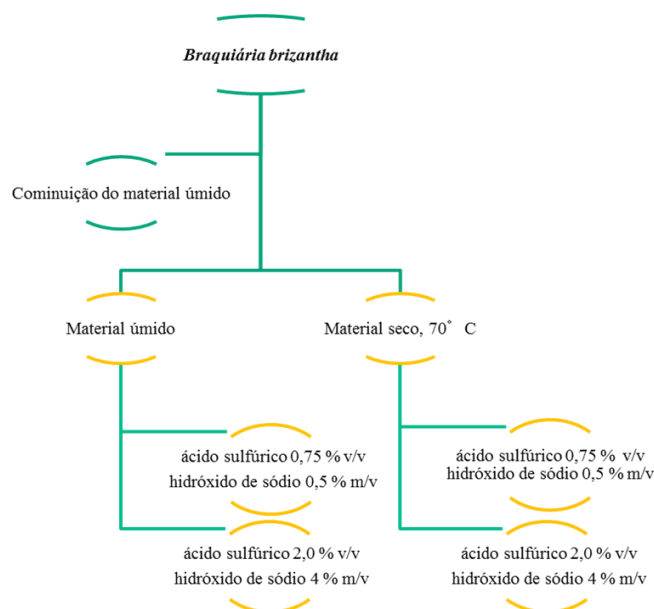


Figura 1 – Fluxograma das etapas de preparo da biomassa para a hidrólise enzimática. Cada um dos blocos amarelos representa uma amostra gerada.

Cominuição do material úmido: A eficácia do pré-tratamento e hidrólise enzimática depende do tamanho de partícula inicial da matéria-prima. Assim, para que a única diferença entre as amostras geradas fosse o teor de água, a biomassa foi cominuída ainda úmida e depois dividida em duas frações, uma que permaneceu úmida e outra que foi seca a 70 °C. Para moagem do material úmido foi utilizado um moinho modelo A11 basic da IKA, com rotação de 28000 rpm por 30 segundos.

Pré-tratamento: O pré-tratamento foi realizado em duas etapas, primeiramente com solução de ácido sulfúrico e em seguida com solução de hidróxido de sódio. A razão sólido:líquido em todas as condições de pré-tratamento foi de 1:10 m/v. As frações úmida e seca da biomassa, foram submetidas a pré-tratamento fraco (ácido sulfúrico 0,75 % v/v seguido de hidróxido de sódio 0,5 % m/v) e pré-

tratamento forte (ácido sulfúrico 1,5 % v/v seguido de hidróxido de sódio 4 % m/v). Em todas as etapas, as amostras foram mantidas por 30 minutos em autoclave a 121°C. Após a etapa ácida, cada material foi lavado com água destilada e o procedimento em autoclave repetido, desta vez usando solução de hidróxido de sódio. Ao final desta etapa o material foi lavado com água destilada fervente.

Caracterização das amostras in natura e pré-tratadas de *Brachiaria brizantha*: Todas as amostras de *Brachiaria brizantha* (úmida, seca, úmida e seca submetidas a pré-tratamento fraco, úmida e seca submetidas a pré-tratamento forte) foram caracterizadas quanto ao teor de umidade. Além disso, foi utilizada metodologia descrita por Gouveia et al. (2009) para estimar os percentuais de celulose e hemicelulose nestas amostras.

Hidrólise enzimática: a razão sólido:líquido nas reações de hidrólise enzimática foi de 0,025:1, m/v. A reação foi conduzida em mesa agitadora (shaker) a 50 °C e 200 rpm, na presença de tampão citrato 100 mM, pH 5. A quantidade de enzima utilizada em cada erlenmeyer foi de 30 FPU/g de celulose. Estes experimentos foram realizados em triplicata. A quantidade de glicose liberada após 48 h de reação foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados e discutidos nos dois itens a seguir, os quais tratam da caracterização da biomassa quanto ao percentual de cada polissacarídeo (celulose e hemicelulose) e teor de umidade e, além disso, apresentam os dados de desempenho na hidrólise de cada uma das amostras geradas.

3.1. Caracterização de *Brachiaria brizantha* in natura e pré-tratadas

A determinação dos teores de umidade da biomassa *in natura* (úmida e seca) e dos materiais obtidos após cada etapa de pré-tratamento foram fundamentais para definir a quantidade de massa úmida a ser pesada, de tal forma que em cada etapa reacional de pré-tratamento ou hidrólise enzimática, uma quantidade padronizada de massa seca da biomassa fosse adicionada aos reatores. Além disso, estes dados também permitiram a avaliação da eficácia dos pré-tratamentos e hidrólises enzimáticas dos diferentes amostras geradas. A Tabela 1 apresenta os dados de umidade.

Tabela 1 – Dados de umidade medidos em *Brachiaria brizantha* após diferentes tratamentos

Amostras de <i>Brachiaria</i> (após moagem)	Teor de umidade (%)
<i>In natura</i> (Úmida)	66,16 ± 1,1
<i>In natura</i> após secagem a 70 °C (Seca)	5,53 ± 0,0
Úmida submetida a pré-tratamento fraco	71,55 ± 2,0
Úmida submetida a pré-tratamento forte	78,71 ± 1,3
Seca submetida a pré-tratamento fraco	75,90 ± 0,4
Seca submetida a pré-tratamento forte	79,44 ± 0,8

Em função da drástica redução no teor de umidade após a secagem da biomassa (de 66 % para 5 %), é possível observar uma mudança no aspecto físico do material, como mostra a Figura 2 (B e E).

Apesar de o aspecto físico demonstrar apenas uma ligeira modificação na coloração do material, a secagem a 70 °C torna a biomassa mais “quebradiça”, o que é importante para a cominuição do mesmo, por exemplo, por meio de processos mecânicos. Por outro lado, este procedimento dificulta significativamente a etapa de hidrólise enzimática, como será apresentado no item a seguir.

Após os pré-tratamentos fracos tanto do material úmido quanto do material seco, foi observado um aumento no teor de umidade (71 e 76 %) em relação à umidade no material de partida (*Brachiaria brizantha* moída com 66 % de umidade). Vale ressaltar que estes valores foram medidos após lavagem e prensagem do material pré-tratado até que não fosse observada extração de água. Quando pré-tratamento forte foi aplicado os valores de umidade foram ainda ligeiramente aumentados (79 %).

Este resultado parece contradizer dados da literatura, pois é esperado um aumento da hidrofobicidade do material pré-tratado, ou seja, menor teor de água ligado a este. Algumas considerações precisam ser mencionadas, por exemplo, em relação aos tipos de água presentes na biomassa. Como a fração que apresenta maior tendência a manter água ligada, a hemicelulose, foi retirada, é esperado que o aumento no teor de água dos materiais pré-tratados se justifique pelo aumento da porosidade do material após a remoção da hemicelulose e lignina. Além disso, as alterações causadas na celulose devido à ação do hidróxido de sódio também provocaram o intumescimento deste sólido. Considerando as mudanças nos aspectos físicos após os pré-tratamentos, a Figura 2 apresenta fotos em que visivelmente é possível perceber o efeito da severidade nestes processos.

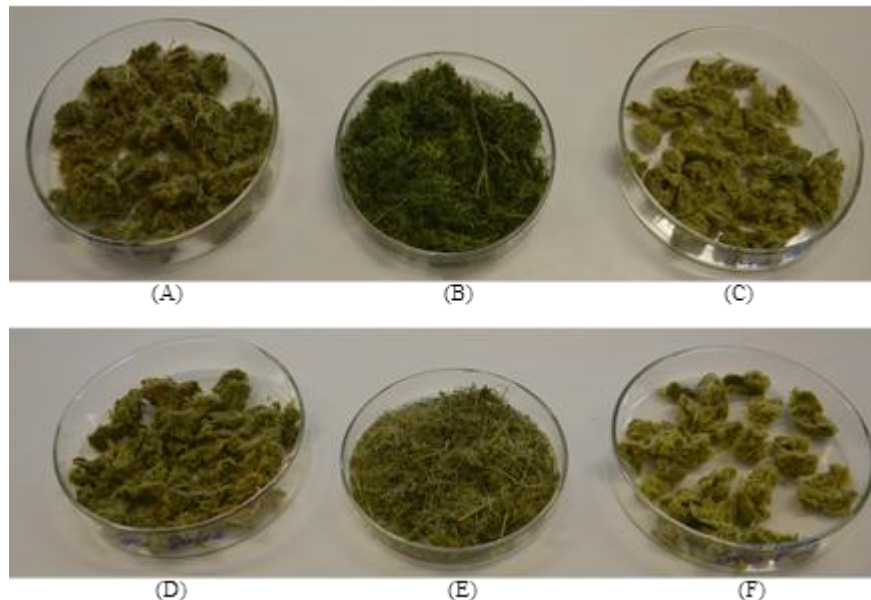


Figura 2 – Foto das seis amostras de *Brachiaria brizantha* geradas sob diferentes tratamentos para serem submetidas à hidrólise enzimática. (A) Úmida submetida a pré-tratamento fraco, (B) *In natura* (Úmida), (C) Úmida submetida a pré-tratamento forte, (D) Seca submetida a pré-tratamento fraco, (E) *In natura* após secagem a 70 °C (Seca), (F) Seca submetida a pré-tratamento forte.

Visualmente, é possível perceber que tanto em materiais pré-tratados a partir de amostra úmida quanto a partir de amostra seca, ocorre redução no tamanho das fibras na seguinte sequência: tamanho de fibras na amostra in natura (seca ou úmida) > tamanho de fibras nas amostras submetidas a pré-tratamento fraco > tamanho de fibras nas amostras submetidas a pré-tratamento forte. Amostras submetidas à pré-tratamento forte tem um aspecto mais homogêneo em relação às demais amostras.

3.2. Hidrólise enzimática de *Brachiaria brizantha* in natura e pré-tratadas

As amostras descritas acima foram caracterizadas quanto ao teor de celulose e hemicelulose, e experimentos de hidrólise enzimática foram realizados utilizando o extrato enzimático Cellic Ctec® 2. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados dos percentuais de celulose e hemicelulose em brachiaria pré-tratada

Amostras de <i>Brachiaria brizantha</i>	% de celulose	% de hemicelulose
In natura (Úmida)	$30,88 \pm 1,7$	$19,61 \pm 2,1$
In natura após secagem a 70 °C (Seca)	$30,88 \pm 1,7$	$19,61 \pm 2,1$
Úmida submetida a pré-tratamento fraco	$57,21 \pm 1,5$	$14,81 \pm 0,5$
Úmida submetida a pré-tratamento forte	$88,56 \pm 0,1$	$4,42 \pm 0,1$
Seca submetida a pré-tratamento fraco	$61,29 \pm 3,4$	$13,27 \pm 0,5$
Seca submetida a pré-tratamento forte	$86,66 \pm 0,7$	$4,37 \pm 0,2$

Conhecendo o teor de umidade e o percentual de celulose em base seca de cada uma das amostras da Tabela 2, a quantidade de cada um destes materiais a ser adicionada ao reator foi calculada de tal forma que a concentração final máxima de glicose, em caso de hidrólise completa, atingisse 25 g/L. O gráfico da Figura 3 apresenta os dados de concentração de glicose obtidos para cada uma das amostras. A quantidade de enzima utilizada em cada reator foi de 30 FPU/g de celulose e a reação ocorreu por 48 h.

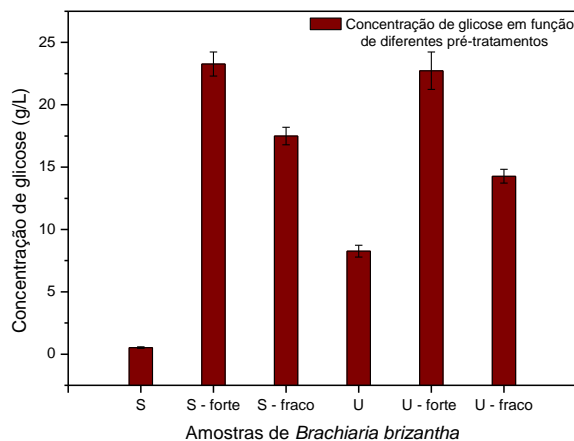


Figura 3 – Dados da hidrólise de brachiaria. S representa amostra seca; U, úmida; Forte, pré-tratamento forte e Fraco, pré-tratamento fraco.

Na Figura 3 percebe-se que a secagem interfere fortemente na eficácia de hidrólise dos materiais *in natura* (amostras seca e úmida), mas que após o pré-tratamento químico fraco e forte os rendimentos de hidrólise são similares.

4. CONCLUSÃO

A secagem de biomassa é importante para facilitar o transporte e armazenamento desta. Entretanto, isto causa um efeito negativo na hidrólise enzimática, o que leva a necessidade de um pré-tratamento eficaz para viabilizar a hidrólise enzimática. O pré-tratamento químico usando ácido sulfúrico e hidróxido de sódio em elevadas concentrações é uma das estratégias eficazes para reduzir a recalcitrância da amostra favorecendo o aumento no rendimento na produção de açúcares em processos de hidrólise enzimática.

5. REFERÊNCIAS

- ACHARJEE, T.C.; CORONELLA, C.J.; VASQUEZ, V.R. Effect of thermal pretreatment on equilibrium moisture content of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 4849–4854, 2011.
- ATHMANATHAN, A., MOSIER, N.S. Effect of storage method and duration on the bioprocessing of lignocellulosic biomass (2011). Disponível em: <http://www.aiche.org/cei/resources/chemeondemand/conference-presentations/effect-storage-method-and-duration-bioprocessing-lignocellulosic-biomass>. Acessado em: 28/04/2014.
- BARAKAT, A.; VRIES, H.D.; ROUAU, X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresour. Technol.*, v. 134, p. 362–373, 2013.
- CARVALHO, F.B.P.; PACHECO, T.F.; D.S. RODRIGUES, GONÇALVES, S.B., CARVALHO, M.A.; C.M.M. MACHADO. Produção de Etanol a partir da forrageira *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul – RS, 2011.
- CULLIS, I.F.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, S.D. Effect of initial moisture content and chip size on the bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 85, n. 4, p. 413–421, 2004.
- DIGMAN, M.F.; SHINNERS, K.J.; CASLER, M.D.; DIEN, B.S.; HATFIELD, R.D.; JUNG, H.-J.G.; MUCK, R.E.; WEIMER, P.J. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 5305–5314, 2010.
- EWANICK, S.; BURA, R. The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 2651–2658, 2011.
- KIM, S.; PARK, J.M.; SEO, J.-W.; KIM, C.H. Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. *Bioresour. Technol.*, v. 109, p. 229–233, 2012.

- KRISTENSEN, J.B. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose Substrate interactions and high solids loadings (2009). Disponível http://curis.ku.dk/ws/files/20572426/nr_42_phd_janweb.pdf. Acessado em: 28/04/2014.
- LI, Y.; SHI, J.; REEDER, R. Storing Lignocellulosic Biomass for Bio-Refining Industry. The Ohio State University (2011). Disponível em: <http://ohioline.osu.edu/aex-fact/pdf/0651.pdf>. Acessado em: 28/04/2014.
- LUO, X.; ZHUB, J.Y. Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 48, p. 92–99, 2011.
- MAACHE-REZZOUG, Z.; PIERRE, G.; NOUVIAIRE, A.; MAUGARD, T.; REZZOUG, S.A. Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology. *Biomass and Bioenergy*, v 35, p 3129-3138, 20 11.
- MEDIC, D.; DARR, M.; SHAH, A.; POTTER, B.; ZIMMERMAN, J. Effects of torrefaction process parameters on biomass feedstock upgrading. *Fuel*, v. 91, p. 147–154, 2012.
- MIAO, Z.; SHASTRI, Y.; GRIFT, T.E.; HANSEN, A.C.; TING, K.C. Lignocellulosic biomass feedstock transportation alternatives, logistics, equipment configurations, and modeling. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, v. 6, p. 351–362, 2012.
- MODENBACH, A.A; NOKES, S.E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment – A review. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 109, n. 6, p. 1430-1442, 2012.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; M. LADISCH. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, v. 96, p. 673–686, 2005.
- RIVERS, D.B.; EMERT, G.H. Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnol. Lett.*, v. 9, n. 5, p. 365-368, 1987.
- SÁ, J.F.; PEDREIRA, M.S.; SILVA, F.F.; BONOMO, P.; FIGUEIREDO, M.P.; MENEZES, D.R.; ALMEIDA, T.B. Fracionamento de carboidratos e proteínas de gramíneas tropicais cortadas em três idades. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.3, p.667-676, 2010.
- XU, J.; CHENG, J.J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresour. Technol.*, v. 102, p. 3861–3868, 2011.
- ZHANG, W.; YI, Z.; HUANG, J.; LI, F.; HAO, B.; LI, M.; HONG, S.; LV, Y.; SUN, W.; RAGAUSKAS, A.; HUF, F.; PENG, J.; PENG, L. Three lignocellulose features that distinctively affect biomass enzymatic digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in Miscanthus. *Bioresource Technology* 130 (2013) 30–37.