

**LETÍCIA RENATA BOHN**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA  
LIGNOCELULÓSICA DE MILHO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: **Prof. Dr. João Paulo Bender**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 06 / 12 / 2018

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli – UFFS**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior - UFFS**

## PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA DE MILHO

Letícia R. Bohn<sup>a</sup>, Guilherme M. Mibielli<sup>a</sup>, Sérgio L. Alves Jr.<sup>a</sup> e João P. Bender<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal da Fronteira Sul - Campus Chapecó-SC, Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM)

**Resumo:** Já existe um consenso da necessidade de uma mudança do cenário energético global para aumentar a parcela de fontes renováveis, tornando a economia baseada em uma ampla gama de plataformas alternativas de energia, na qual o etanol pode ser apontado como um importante biocombustível. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, contudo ainda é necessário a diversificação da matriz de produção a fim de torna-lo mais atrativo para substituição como combustível alternativo. Dessa forma, observa-se a necessidade de estudos com diferentes matérias-primas, principalmente a utilização de resíduos de baixo custo que apresentem grande disponibilidade, como, por exemplo, os resíduos lignocelulósicos da agricultura. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de bioetanol como biocombustível a partir do resíduo lignocelulósico do milho. Para tanto, executou-se um pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis. A melhor condição ocorreu com o emprego de uma suspensão de 100 g/L de biomassa, concentração de 0,2 gCaO/g<sub>biomassa</sub> em incubação à temperatura de 70°C e agitação de 200 rpm, por um período de 24 horas. A seguir foi realizado hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas comerciais nas concentrações de 2% Ctec2 (m/m) e 0,5% Htec2 (m/m), em incubação à temperatura de 50°C e 200 rpm de agitação, durante 24 h. Por meio desse processo, obteve-se uma solução com concentração de 0,31 g<sub>açúcares</sub>/g<sub>biomassa</sub>, sendo os açúcares fermentescíveis quantificados via HPLC. Em seguida, produziu-se um novo hidrolisado, o qual foi fermentado utilizando uma cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e outra selvagem, isolada a partir de biomassa de milho em decomposição, identificada taxonomicamente como uma nova espécie do gênero *Wickerhamomyces*. A partir desses processos determinou-se um rendimento de 0,376 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glicose</sub>, demonstrando o potencial deste processo para a produção de bioetanol.

**Abstract:** There is already a consensus on a new global agenda to increase the share of renewable sources, to become an economy based on a wide range of alternative energy sources, in which ethanol can be regarded as an important biofuel. Brazil is the second largest producer of ethanol, however, it is still necessary to diversify the production matrix to make it more attractive for replacement as an alternative fuel. Therefore, it is observed the need for studies with different raw materials, mainly the use of low-cost residues that have a high availability, such as lignocellulosic wastes from agriculture. In this context the aim of this work was to study the production of bioethanol as biofuel from corn lignocellulosic residue. For that, a pretreatment followed by enzymatic hydrolysis to obtain fermentable sugars was carried out. The best condition was the use of a solution of 100 g/L of biomass, concentration of 0.2 g<sub>CaO</sub>/g<sub>biomass</sub> in incubation at 70 °C and agitation of 200 rpm for a period of 24 hours. Then enzymatic hydrolysis was performed using commercial enzymes at concentrations of 2 % Ctec2 (m/m) and 0.5 % Htec2 (m/m), incubated at 50 °C and 200 rpm of stirring for 24 hours. Through this process, a solution with a concentration of 0.31 g<sub>sugars</sub>/g<sub>biomass</sub> was obtained, being fermentable sugars quantified by HPLC. Thereafter, a new hydrolyzate was produced in order to be fermented by an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain (PE-2) and by a wild yeast strain, isolated from rotting corn and taxonomically identified as a new species from genus *Wickerhamomyces*. From these processes, a yield of 0.376 g<sub>ethanol</sub>/g<sub>glucose</sub> was achieved, demonstrating the potential of this process for the bioethanol production.

**Palavras-chave:** Biomassa. Resíduo Lignocelulósico. Biocombustível.

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade de produzir combustíveis renováveis de baixo custo para substituir os de origem fóssil vem sendo demonstrada nas agendas políticas de vários países, ressaltando o consenso existente da necessidade de realizar uma mudança no cenário energético global (SORDA et al., 2010). O Brasil, por meio de sua política de expansão da matriz energética, tem estimulado a produção de biocombustíveis com uma dinâmica que visa gerar desenvolvimento local e sustentável (PEREIRA et al., 2015).

Dentre os biocombustíveis o etanol se destaca como substituto à gasolina no setor de transporte, visto tratar-se de uma fonte de energia natural, limpa, renovável e sustentável. Cabe salientar que o Brasil é o segundo maior produtor de etanol, o qual é produzido a partir de matéria-prima sacarínea (caldo de cana), em um processo que se caracteriza pelo seu baixo custo e alto rendimento (da ROSA, 2013).

Entretanto apesar de ser um dos maiores produtores, ainda é necessário realizar uma diversificação na matriz de produção com o intuito de torna-lo mais atrativo para substituição como combustível alternativo. Nesse cenário faz-se necessário o desenvolvimento de rotas de produção a partir de diferentes matérias-primas, como, por exemplo, a utilização de resíduos agroindustriais. Dentre os possíveis resíduos, os materiais lignocelulósicos possuem potencial suficiente para se tornarem matéria-prima.

Uma fonte de material lignocelulósico que se apresenta em destaque é a biomassa proveniente da colheita do milho. No Brasil, são produzidos anualmente cerca de 90 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2018), e como toda produção agrícola, a produção de milho gera quantidades significativas de resíduos, podendo chegar a 2,2 toneladas de resíduo por tonelada de milho plantada (KOOPMANS e KOPPEJAN, 1997).

Os esquemas de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica são referidos como uma segunda geração de biocombustíveis, denominando-se então etanol de segunda geração (E2G), cujo processamento é uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento (da ROSA, 2013). O sucesso da produção depende da quantidade de polissacarídeos na composição da biomassa, pois a partir desses obtém-se glicose e xilose, monômeros essenciais para produção de etanol de E2G.

Nesse caso, o desenvolvimento de um processo eficiente passa inicialmente por uma adequada caracterização química do resíduo lignocelulósico, principalmente quanto

aos teores de celulose, lignina e hemicelulose. A caracterização do material lignocelulósico é de extrema importância para que se possa obter informações a respeito dos rendimentos ao longo dos processos realizados. A partir da caracterização é possível avaliar se as condições utilizadas estão sendo favoráveis à produção do etanol. (GOUVEIA et al., 2009).

A produção desse combustível requer inicialmente a hidrólise da celulose e da hemicelulose em seus monômeros antes da conversão dos mesmos em etanol. No entanto, esses polissacarídeos encontram-se intimamente associados à lignina, que confere rigidez à parede das células e dificulta a ação hidrolítica. Assim sendo, a biomassa lignocelulósica necessita passar por um processo de pré-tratamento físico e/ou químico, a fim de aumentar a porosidade do material tornando a celulose e hemicelulose susceptíveis à hidrólise. O rendimento em termos de açúcares está extremamente relacionado com a eficiência do pré-tratamento, sendo dessa forma a etapa que apresenta maior potencial para melhorar a eficiência do processo (GALBE E ZACCHI, 2012).

Considerando a busca pela diversificação da matriz energética, através do desenvolvimento de processos que utilizem matérias primas que sejam alternativas, de fácil acesso, baixo custo e com alta concentração de celulose para produção de E2G, este estudo busca oferecer uma alternativa em relação ao aproveitamento do resíduo da colheita do milho por meio da sua utilização na produção de bioetanol. O estudo foi conduzido com objetivo de determinar a composição química da biomassa e o rendimento de produção ao final das etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos açúcares fermentescíveis obtidos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

#### *Biomassa*

A biomassa lignocelulósica, utilizada nos experimentos, foi recolhida do campo após a colheita do milho no município de Palmitos-SC e corresponde ao híbrido do milho AS 1666.

#### *Enzimas*

As preparações enzimáticas comerciais empregadas neste trabalho foram a Cellic CTec2 (complexo de celulases) e NS22244 - Cellic HTec2 - (complexo de hemicelulases), ambas provenientes da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca) e fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil).

### *Leveduras*

Utilizou-se uma linhagem selvagem de levedura isolada a partir da biomassa de milho em decomposição (cepa UFFS-CE-3.1.2), pertencente à coleção do Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM) da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Chapecó. Essa linhagem foi taxonomicamente identificada como uma nova espécie (ainda não descrita) do gênero *Wickerhamomyces* (BAZOTI et al., 2017).

Também se utilizou a levedura industrial PE-2, fornecida pela empresa Fermentec (Piracicaba/SP) (BASSO et al., 2008).

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Caracterização da biomassa:

Inicialmente a biomassa de milho foi moída em moinho de facas a fim de obter partículas menores e homogêneas. Em seguida realizou-se a caracterização físico-química da biomassa – distribuição granulométrica, teor de umidade, materiais inorgânico, teor de extrativos, carboidratos estruturais e lignina - utilizando como referência o procedimento padrão NREL (Nacional Renewable Energy Laboratory) descrito por SLUITER et al (2005a,b,c), utilizando-se apenas a fração de biomassa que passou pela peneira de 30 mesh.

### 2.2.3 Pré-tratamento

Empregou-se um pré-tratamento básico utilizando óxido de cálcio. Para estudar essa etapa, elaborou-se um Delineamento Experimental Fatorial Completo com dois fatores investigados (DEFC 2<sup>2</sup>), com triplicada em todos os ensaios, objetivando avaliar os efeitos da temperatura de incubação e concentração de óxido de cálcio. Os níveis investigados para cada variável são apresentados na Tabela 01.

Para execução dos ensaios, 20 g de biomassa lignocelulósica foram adicionados em frascos de vidro tipo paralelepípedo retangular de 1,5 L com tampa, juntamente com

200 mL de uma suspensão de óxido de cálcio (concentrações definidas - Tabela 01), resultando em uma suspensão com razão sólido/líquido de 100 g/L. A reação de pré-tratamento ocorreu em agitador orbital, modelo Shaker SL-223 da marca SOLAB, a 200 rpm durante 24 horas, variando a temperatura de acordo com o planejamento.

Tabela 01- Planejamento experimental para a investigação das variáveis de processo temperatura e concentração de CaO para a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	55	70
Concentração de CaO g/g <sub>biomassa</sub>	0,2	0,4	0,6

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 2.2.4 Hidrólise enzimática

Finalizada a etapa de pré-tratamento, corrigiu-se o pH do meio tratado utilizando uma solução de Ácido Cítrico (1M), até atingir o pH ótimo para as enzimas, em torno de 5,0 - 5,5 (Novozymes, 2017). Após a correção do pH, adicionou-se as preparações enzimáticas Cellic CTec2 (2 % -m/m em relação a biomassa seca) e Cellic HTec2 (0,5 % -m/m em relação a biomassa seca), ambas diluídas em tampão acetato de sódio (1:10 v/v). Os recipientes foram novamente acondicionados no agitador orbital em rotação de 200 rpm, temperatura de 50 °C por um período de 24 h.

Ao fim da hidrólise enzimática, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 05 minutos e filtradas em vials, utilizando filtros de nylon não estéril com poros de 0,45 µm (Milipore) e PVDF não estéreis de 0,22 µm, para leitura dos açúcares, acetato, furfural e hidroximetilfurfural em HPLC, conforme metodologia expressa no item 2.3.

#### 2.2.5 Fermentação em batelada do hidrolisado

A partir da melhor condição definida no planejamento experimental de pré-tratamento seguido de hidrólise enzimática, preparou-se um novo hidrolisado, o qual foi esterilizado através de uma filtração a vácuo utilizando filtros de nylon com poros de 0,45 µm (Milipore). Posteriormente realizou-se o ajuste dos micronutrientes por meio da adição de 3,0 g/L de fosfato de potássio monobásico.

Para o pré-crescimento das leveduras, as células foram cultivadas em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) durante 48 h em um agitador shaker a 145 rpm. As células do pré-crescimento foram transferidas para um meio fresco de YPD (1 centésimo do volume final), sendo a preparação do inóculo ocorrendo *overnight* até que as células atingissem o início da fase exponencial de crescimento. Esta fase é definida pela densidade ótica (DO = 3,5), a qual é obtida por meio da leitura em espectrofotometria a 570 nm (ALVES et al., 2008). Nesse ponto, as células foram lavadas duas vezes utilizando água destilada a 4°C e em seguida as mesmas foram suspensas nos hidrolisados de forma a atingir a concentração de 10 mg de células/mL.

Após retirou-se uma alíquota de 200 µL, a qual foi centrifugada a 3500 rpm por 05 minutos, tendo seu sobrenadante armazenado a -20 °C. O restante da cultura foi incubado a 28°C e 145 rpm. A fermentação ocorreu por um período de 30 horas, sendo que, nos intervalos apontados nas Figuras 03 e 04, uma alíquota de 200 µL foi retirada e centrifugada a 3500 rpm por 05 minutos, tendo seu sobrenadante armazenado a -20 °C.

Ao fim do período da fermentação, os sobrenadantes armazenados foram descongelados e filtrados em vials, utilizando filtros de nylon com poros de 0,45 µm (Milipore) para quantificação dos açúcares e etanol, conforme metodologia expressa no item 2.3.

### 2.3 Métodos Analíticos

#### *Determinação de açúcares, etanol e ácido acético*

A análise de açúcares foi realizada por HPLC (LC-MS 2020 da marca SHIMADZU). Utilizou-se a coluna Aminex HPX-87H para quantificação de glicose, xilose, celobiose, ácido acético e etanol com o detector RID-10A. As concentrações de cada componente foram determinadas com o auxílio das curvas de calibração, obtidas inicialmente com padrões analíticos.

Tendo-se como condições de análise o volume de injeção de 10 µL, utilizando como fase móvel uma solução aquosa com ácido sulfúrico (5 mM) na taxa de fluxo de 0,6 mL/min, com temperatura do forno de 50 °C, temperatura do detector de 40 °C em 25 min de execução.

#### *Determinação de Furfural e Hidroximetilfurfural:*

Utilizou-se o sistema de HPLC (LC-MS 2020 da marca SHIMADZU), equipado com a coluna NST-18, empregando o detector SPD-M20A. As concentrações de cada



componente foram determinadas com o auxílio das curvas de calibração, obtidas inicialmente com padrões analíticos.

As condições de análise foram de 20 µL para o volume de injeção, utilizando como fase móvel uma solução de água ultrapura com acetonitrila na relação de (85:15 v/v) acidificada com ácido acético (1% v/v), aplicou-se uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min, na temperatura do forno e do detector- SPD – M20A (Diodo Array Detector)/Shimadzu de 40 °C, em 15 min de execução.

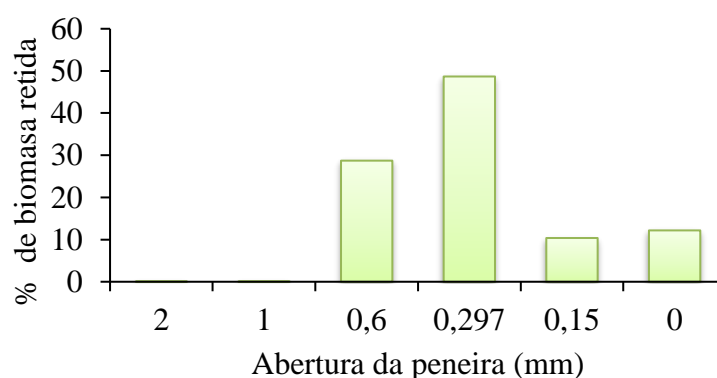
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA BIOMASSA

Os resíduos lignocelulósicos da colheita de milho (caule, folha, espiga e palha) se apresentam em tamanhos grandes e irregulares, o que dificulta o processo de transformação em açúcares fermentescíveis. Dessa forma, os mesmos necessitam ser fracionados em partículas menores e mais uniformes para aumentar a superfície de contato desses materiais, tornando-os mais susceptíveis aos organismos ou às enzimas responsáveis pela hidrólise.

Num primeiro momento realizou-se a moagem em moinho de facas para a redução de tamanho, sendo após realizado o peneiramento para identificação da distribuição granulométrica, a qual pode ser observada na Figura 01.

Figura 01- Distribuição de frequência dos diferentes tamanhos de partículas obtidas após a etapa de moagem.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através da análise granulométrica, observa-se que 71,22% da biomassa apresentou um diâmetro igual ou inferior a 0,6 mm, sendo que a maior parte apresentou diâmetro de 0,297 mm. Dessa forma, com o objetivo de homogeneizar as amostras optou-

se por realizar os ensaios de caracterização com a biomassa que passou pela peneira de 30 mesh, ou seja, 0,6 mm.

O intuito de caracterizar o resíduo é conhecer a biomassa utilizada, bem como obter informações para as etapas posteriores de pré-tratamento e hidrólise enzimática, objetivando maximizar o rendimento glicosídico. Para a biomassa lignocelulósica em estudo, os resultados da composição química são apresentados na Tabela 02.

Tabela 02- Composição química do resíduo lignocelulósico em base seca

<b>COMPOSIÇÃO QUÍMICA (m/m)</b>	<b>%</b>
<b>Umidade</b>	6,20
<b>Cinzas</b>	7,27 ± 0,64
<b>Extrativos</b>	22,53 ± 0,95
<b>Lignina Total</b>	13,3 ± 0,11
<b>Celulose</b>	34,48 ± 1,18
<b>Hemicelulose</b>	22,67 ± 0,69
<b>Total</b>	100,08 ± 3,57

Fonte: Elaborado pelo autor

Ressalta-se que não são encontrados valores fixos para cada análise, mas sim uma faixa de valores. Isso ocorre porque a composição final de cada planta pode sofrer variações devido ao clima, pH de solo, presença de pragas, entre outros. Em geral, a quantidade de celulose, hemicelulose e lignina nos materiais lignocelulósicos se baseiam nas proporções de 40% (m/m) a 60% (m/m) de celulose, 15% (m/m) a 50% (m/m) de hemicelulose, 10% (m/m) a 30% (m/m) de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Dessa forma, os valores obtidos estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura. (SANTOS et al., 2012; SALAZAR, 2005).

No que se refere à utilização do material para produção de etanol, destaca-se a fração das estruturas de hemicelulose e celulose, as quais perfazem 57,15% (m/m) da composição química do material em questão. Tais estruturas são polissacarídeos que, ao serem hidrolisados, geram mono e dissacarídeos, que por sua vez podem ser fermentados a etanol.

### 3.2 PRÉ-TRATAMENTO

As estruturas das biomassas vegetais possuem rigidez devida a formação de um complexo entre a lignina e os polissacarídeos, tornando essas estruturas recalcitrantes à ação hidrolítica, o que gera processos lentos de conversão. Assim sendo, faz-se necessário a execução de um pré-tratamento da biomassa a fim de aumentar a exposição das fibras da celulose e hemicelulose, tornando-as acessíveis aos agentes hidrolíticos (SANTOS et al., 2012). Para avaliar as condições de pré-tratamento da biomassa, foi realizado um Delineamento Experimental Fatorial Completo (DEFC 2<sup>2</sup>), variando a concentração de óxido de cálcio e a temperatura do processo. Na Tabela 03 são apresentadas as condições de cada ensaio, bem como os resultados em termos de glicose, xilose e celobiose.

Tabela 03– Rendimento glicosídico do resíduo lignocelulósico do milho após o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Ensaio	T (°C)	[ ] CaO g / g <sub>biomassa</sub>	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	AT (g/L)	g AT / g <sub>biomassa</sub> **	Rendimento (%)***
01	(-) 40	(-) 0,2	14,71 ± 0,08	6,73 ± 0,02	0,77 ± 0,28	22,21	0,22	37,27
02	(+) 70	(-) 0,2	20,41 ± 1,59	10,05 ± 0,83	0,59 ± 0,29	31,04	0,31	52,08
03	(-) 40	(+) 0,6	1,71 ± 1,55	1,17 ± 0,52	0,48 ± 0,2	3,36	0,03	5,64
04	(+) 70	(+) 0,6	0,78 ± 0,01	ND	0,53 ± 0,17	1,31	0,01	2,19
05	(0) 55	(0) 0,4	5,57 ± 1,53	3,63 ± 1,70	1,10 ± 0,10	10,31	0,10	17,30

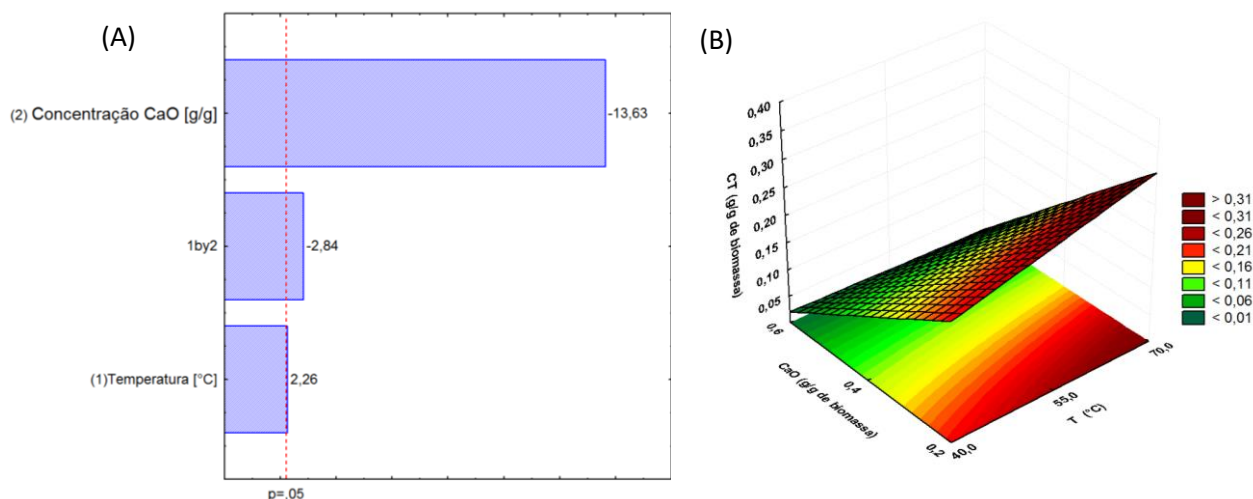
Legenda: (ND): Não Detectado; (AT): Açúcares Totais; (\*): Temperatura; (\*\*): Valor correspondente para 20,0 g de biomassa e 0,2 L de suspensão; (\*\*\*) Percentual de hemicelulose e celulose convertida em açúcar fermentescível.

Observa-se que o ensaio 02 apresenta um rendimento superior, juntamente com os ensaios nos quais a concentração de CaO segue o nível inferior (-1) do planejamento (0,2 g<sub>CaO</sub>/g<sub>biomassa</sub>). É possível observar que a diferença nas condições de pré-tratamento estão relacionadas apenas com a variável concentração de óxido de cálcio, conforme observado pela análise de Pareto da Figura 02 A. Observa-se que a variável concentração de óxido de cálcio possui efeito negativo significativo, o que leva a entender que baixas concentrações na etapa de pré-tratamento são suficientes para melhorar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise enzimática e assim aumentar os rendimentos glicosídicos.

Kaar e Holtzaple (2000) também recomendam a utilização de baixas concentrações, uma vez que possuem como melhor condição para o pré-tratamento do resíduo da colheita de milho 0,075 g de  $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$  de biomassa seca.

No que se refere à variável temperatura, não há efeito significativo em termos de rendimento glicosídico total, contudo, como pode ser observado na superfície de resposta na Figura 02 B, maiores temperaturas resultam em maiores resultados de açúcares totais. Quando se infere para a interação entre os dois fatores, percebe-se que o efeito da interação se apresenta como um efeito significativo negativo, ( $p > 0,05$ ), indicando que ao diminuir uma das variáveis deve-se, para aumentar o rendimento, aumentar a outra variável.

Figura 02- Análise estatística. (A) Gráfico de Pareto (B) Superfície de Resposta



Fonte: Elaborador pelo autor

Referente à concentração de açúcares no fim do processo, pode-se apontar os resultados obtidos ( $0,31 \text{ gAT/g}_{\text{biomassa}}$ ) como satisfatórios, visto que estão próximos aos valores reportados na literatura no que se refere à obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de biomassa lignocelulósica. Rabelo (2010) realizou um pré-tratamento básico com hidróxido de cálcio no bagaço de cana-de-açúcar e, ao fim da otimização do processo, obteve  $0,351 \text{ gAT/g}_{\text{biomassa}}$ . Já Barbosa et al. (2016) obtiveram  $0,355 \text{ g}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$  a partir do capim elefante.

Quanto ao rendimento médio obtido a partir da etapa de hidrólise enzimática, ou seja, a conversão das estruturas de hemicelulose e celulose em açúcares, alcançou-se 52,08% para a melhor condição do planejamento experimental. Este valor está dentro do padrão apresentado na literatura para outras biomassas lignocelulósicas que visam à produção de etanol. Para a palha de arroz, Bak et al. (2009) encontraram 52,0% de

rendimento, enquanto Krishnan et al. (2010) obtiveram em torno de 62,0% de rendimento para o bagaço de cana-de-açúcar.

No que se refere os componentes inibitórios, esses podem ser originários da composição da biomassa e ser liberados durante as etapas de pré-tratamento ou hidrólise de forma espontânea, ou podem ser produzidos por condições severas de temperatura e pressão durante o processo (BELLISSIMI et al., 2009). Dessa forma, durante a quebra da hemicelulose ocorre o surgimento do ácido acético, sendo esta molécula presente na estrutura deste polissacarídeo. Na Tabela 04 são apresentados os produtos inibidores gerados para cada condição experimental do planejamento. Não foram detectados Hidroximetilfurfural e Furfural.

Tabela 04– Inibidores gerados via processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração CaO g/g biomassa	AA (g/L)	IT (g/L)	g IT/g biomassa*
01	(-) 40	(-) 0,2	ND	0,00	0,00
02	(+) 70	(-) 0,2	3,06 ± 0,06	3,06 ± 0,06	0,03
03	(-) 40	(+) 0,6	ND	0,00	0,00
04	(+) 70	(+) 0,6	2,34 ± 0,10	2,34 ± 0,10	0,02
05	(0) 55	(0) 0,4	2,68 ± 0,11	2,68 ± 0,11	0,03

Legenda: (ND): Não Detectado; (AA): Ácido Acético; (IT): Inibidores Totais; (\*): Valor correspondente para 20,0g de biomassa e 0,2L de suspensão.

Fonte: Elaborado pelo autor

Ao avaliar a Tabela 04, nota-se que apesar do ensaio 02 apresentar alto rendimento glicosídico, também gera o maior valor de Inibidores Totais – IT (3,06 g/L), sendo todo ele formado pelo ácido acético. Esse alto valor encontrado de ácido acético é um indicativo de que o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática foi efetivo, visto que o mesmo é gerado pela quebra da estrutura de hemicelulose.

Vale ainda ressaltar que tais compostos são denominados de inibidores uma vez que possuem efeitos tóxicos às leveduras, como a *S. cerevisiae*, prejudicando o processo fermentativo. O ácido acético, por exemplo, possui toxicidade elevada devido a sua capacidade de penetração no citoplasma das leveduras, promovendo uma acidificação intra-celular, afetando diretamente o sistema motriz de transporte na célula. Seu efeito

pode ser observado em concentrações superiores a 3,0 g/L e é tanto maior, quanto menor for o pH do meio (BELLISSIMI et al., 2009).

### 3.4 FERMENTAÇÃO

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir do caldo da cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassa lignocelulósica, a via fermentativa é a etapa mais importante para a obtenção do álcool. A fermentação alcoólica consiste em uma série de reações químicas catalisadas por um complexo de enzimas, presentes no metabolismo dos microrganismos.

Nesse estudo, a fermentação e a posterior quantificação do etanol foi um passo adicional a fim de se verificar a capacidade de produção de etanol da biomassa avaliada. Para tanto, um novo pré-tratamento e uma nova hidrólise enzimática foram realizados. As concentrações de açúcares, bem como de inibidores do hidrolisado produzido para a fermentação, são apresentados na Tabela 05.

Tabela 05 - Quantificação de açúcares e inibidores no hidrolisado produzido para posterior fermentação.

<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Xilose (g/L)</b>	<b>Celobiose (g/L)</b>	<b>AT (g/L)</b>	<b>g AT / g biomassa*</b>	<b>AA (g/L)</b>	<b>IT (g/L)</b>	<b>g IT/g biomassa *</b>
8,236	3,068	1,042	12,35	0,124	2,546	2,546	0,03

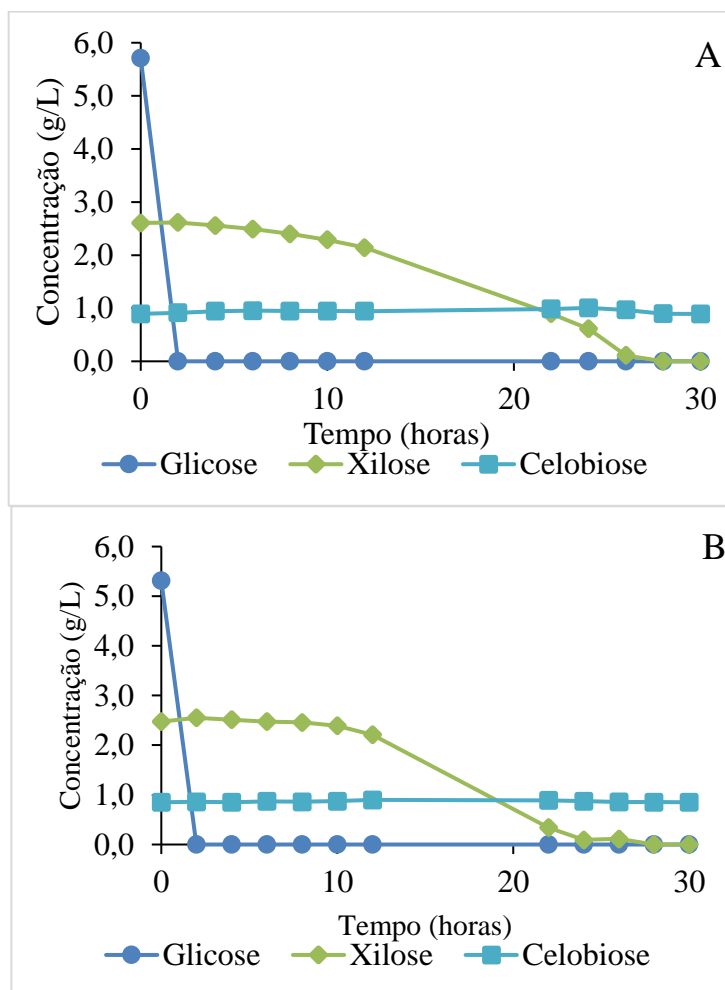
Legenda: (AT) Açúcares Totais; (AA): Ácido Acético; (IT): Inibidores Totais; (\*): Valor correspondente para 20,0 g de biomassa e 0,2 L de suspensão.

Fonte: Elaborado pelo autor

A preparação do hidrolisado para a fermentação foi realizada nas mesmas condições experimentais do ensaio 02 do planejamento experimental, contudo, fica evidente que os ensaios não apresentaram o mesmo rendimento em termos de açúcares. Dessa forma, ressalta-se a importância do desenvolvimento de estudos acerca do tema, principalmente com o intuito de padronizar os processos experimentais e adquirir repetitividade nos ensaios.

O hidrolisado enzimático obtido a partir da biomassa de milho foi submetido a fermentação utilizando duas linhagens de leveduras, em ensaios independentes. Na Figura 03 demonstra-se o consumo dos açúcares ao longo do processo fermentativo a partir das duas cepas utilizadas.

Figura 03 - (A) consumo dos açúcares pela cepa UFFS-CE-3.1.2, (B) consumo dos açúcares pela cepa PE-2.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em geral os microrganismos apresentam uma preferência natural em consumir determinados açúcares, em sua maioria, glicose (KIM et al., 2010). No entanto, observa-se na Figura 03 (A) e (B) que ambas linhagens inoculadas no hidrolisado apresentaram consumo total da xilose inicial em cerca de 20 horas. A xilose foi consumida durante o processo, contudo a mesma não foi fermentada a etanol, uma vez que nos tempos em que ocorrem o consumo de xilose não há aumento da produção de etanol (Figura 04).

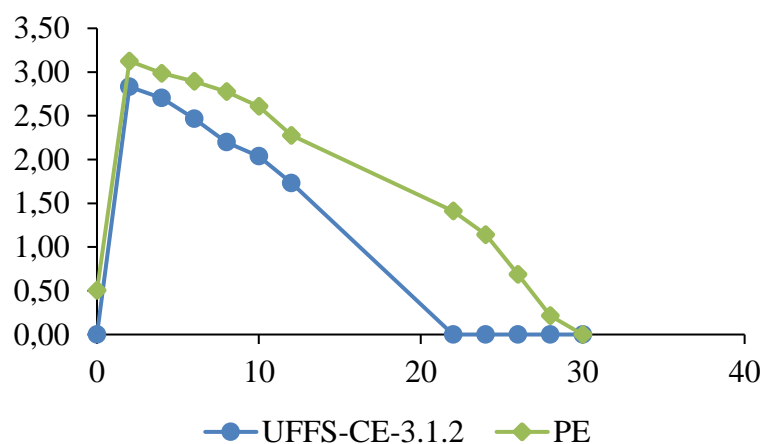
Sabe-se ainda que a levedura comercial utilizada não utilizou a xilose como fonte de carbono ou energia. Lopes et al. (2017) demonstram que a PE-2 não apresenta crescimento em xilose nem mesmo após 336 h de incubação. Em compensação, produz xilitol a partir da xilose, o que justifica o consumo desse açúcar apresentado na Figura 03 (B). Contudo, houve apenas o consumo desse açúcar, mas não a sua metabolização, o que

garantiria mais crescimento celular (especialmente por respiração) ou maior produção de etanol (por metabolismo fermentativo).

Destaca-se ainda o consumo de xilose pela levedura UFFS-3.1.2. De acordo com Bazoti et al. (2017) a mesma consome esse açúcar e utiliza-o como fonte de energia e carbono, visto apresentar crescimento celular em xilose. Dessa forma, demonstra uma característica satisfatória, tendo em vista a produção industrial de bioetanol, na qual os microrganismos devem mostrar alta atividade fermentativa para açúcares simples como glicose e xilose (KRICKA et al., 2015; ZALDIVAR et al., 2001).

Ressalta-se ainda o desempenho da levedura UFFS-CE-3.1.2, a qual trata-se de uma levedura selvagem de uma espécie ainda não descrita do gênero *Wickerhamomyces*, que foi isolada pelo Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos (GPPEM) da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Chapecó. Conforme demonstra a Figura 04, essa levedura apresentou desempenho muito similar ao da levedura industrial utilizada nesse estudo. As cepas industriais passam por um longo processo de seleção, apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância a fatores de estresse (LOPES et al., 2016), processos que não ocorreram para a levedura selvagem.

Figura 04 – Produção de etanol por fermentação em batelada para as cepas UFFS-CE-3.1.2 e PE-2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Destaca-se na Figura 04 o pico de produção de etanol que ocorreu próximo das duas horas de inóculo, sendo dessa forma, etanol proveniente da glicose - conforme observado na Figura 02, sendo o único consumido até este instante. Outro fato importante a ser observado na Figura 03 é que a concentração inicial de glicose no  $t = 0$  foi de 5,5 g/L de glicose no meio, sendo um valor menor do que a concentração de glicose



determinada para o hidrolisado representada na Tabela 05. A diminuição na concentração de glicose justifica-se pelo fato de que o hidrolisado foi suplementado e as leveduras foram adicionadas, dessa forma diluindo o meio. E ainda ambas leveduras consumiram esse açúcar muito rapidamente, ou seja, durante o preparo do experimento até a coleta da primeira amostra, uma parcela de glicose foi consumida.

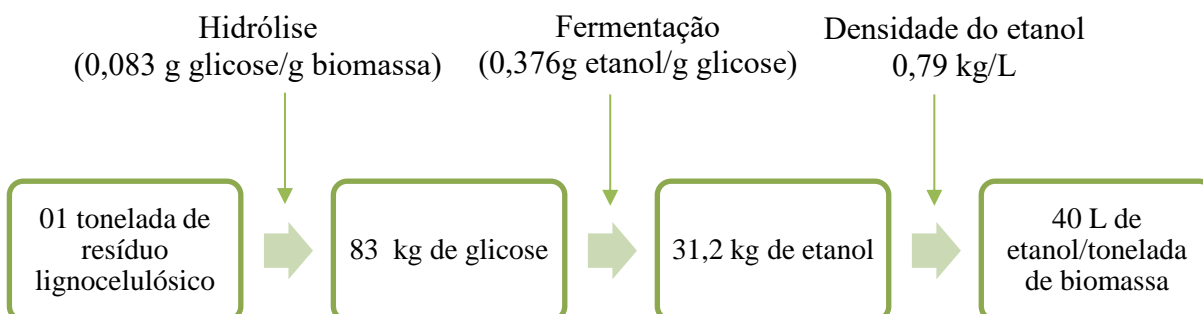
Dado que toda a glicose foi consumida, as leveduras passam a utilizar outras substâncias contidas no meio para produção de energia. Nesse experimento a concentração de glicose foi consumida rapidamente, em seguida as leveduras utilizaram o etanol gerado como fonte de energia e carbono.

Visto que ambos ensaios iniciaram com a concentração de 8,236 g/L de glicose e que se produziu, a partir desta, 2,8 g/L e 3,1 g/L de etanol para as cepas UFFS-CE-3.1.2 e PE-2, respectivamente, tem-se um rendimento de 0,34  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  para a UFFS-CE-3.1.2 e 0,376  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  para PE-2, sendo o rendimento teórico máximo de 0,51.

### 3.5 RENDIMENTO GLOBAL DO PROOCESSO

A determinação do rendimento torna-se importante para entender a viabilidade técnica e econômica do processo, bem como determinar se é possível realizar aumento na produção e quais são as etapas que podem ser desenvolvidas para atingir esse aumento. Dessa forma, utilizando os rendimentos obtidos para as etapas de obtenção de açúcares fermentescíveis e fermentação calculou-se a possível geração de bioetanol considerando a atual produção brasileira de milho.

Figura 05- Rendimento em etanol por tonelada de biomassa lignocelulósica a partir das condições determinadas nesse estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com os dados da CONAB, 2018, atualmente no país são produzidos cerca de 90 milhões de toneladas de grãos por ano, o que corresponde a 198 milhões de toneladas de resíduo e um incremento teórico de 3.600 milhões de litros de etanol na produção brasileira.

Ainda pensando no aumento desse rendimento, as condições de processo descritas nesse trabalho poderiam ainda ser otimizadas, aumentando o rendimento em termos de açúcares fermentescíveis obtidos ao final do processo. Sabe-se, por meio da caracterização do material, apresentada na Tabela 02, que a biomassa em questão apresenta 34,48% m/m de celulose e 22,67% m/m de hemicelulose em sua estrutura, perfazendo um total de 57,15% m/m de estruturas que podem ser hidrolisadas e convertidas em açúcares fermentescíveis (glicose e xilose).

A partir do hidrolisado realizado para o processo fermentativo obteve-se 8,236 g/L de glicose, o que corresponde a 23,89% m/m da estrutura de celulose, restando uma diferença de 76,11% m/m. Ainda foi obtido 3,068 g/L de xilose, correspondendo a 13,53% m/m da estrutura de hemicelulose. Sabe-se que esse rendimento pode ser incrementado, visto que no presente trabalho melhores resultados foram obtidos no estudo da etapa de pré-tratamento, que, para as mesmas condições, apresentou uma conversão de 52,08% m/m das estruturas de celulose e hemicelulose. A falta de repetitividade demonstra que o processo aplicado nesse estudo é recente e que ainda necessita ser estudado a fim de entender a origem da variabilidade.

Por fim, no que se refere a etapa de fermentação dos açúcares provindos de materiais lignocelulósicos, busca-se organismos que apresentem eficiência quanto à fermentação das pentoses, pois poucos microrganismos possuem a capacidade de fermentá-las a etanol. A transformação das pentoses em etanol é fundamental para atingir uma tecnologia eficiente na produção de etanol de segunda geração.

Vale ressaltar que não se busca substituir totalmente o uso da energia proveniente de fontes não renováveis pelo uso dos biocombustíveis de segunda geração. Contudo, esses últimos podem contribuir social e economicamente para o país ao evitar o esgotamento das fontes de energia não renováveis, agregar valor aos resíduos agroindustriais e aumentar a produção de combustíveis de forma a contribuir na diversificação da matriz energética.

## 4.0 CONCLUSÃO

A demanda futura por etanol de alta eficiência e sustentabilidade projeta a necessidade de aumentar significativamente a produção desse combustível nos próximos anos. Esse aumento poderá ser alcançado pela introdução de novas matérias-primas, como a biomassa lignocelulósica do milho, a qual além de diversificar a matriz energética agrega valor a um resíduo agrícola, que geralmente é deixado no campo.

A biomassa de granulometria inferior a 30 mesh utilizada nesse estudo apresentou sua composição química equivalentes à faixa reportada na literatura para materiais lignocelulósicos. Ressalta-se que perfez um total de 57,15% das estruturas de celulose e hemicelulose, as quais podem ser convertidas em açúcares fermentescíveis.

No pré-tratamento empregado (0,2 gCaO/gbiomassa e 70°C) seguido de hidrólise enzimática, obteve-se uma concentração de 0,31 g de açúcares totais por grama de biomassa seca, valor próximo aos apontados em outros trabalhos em condições otimizadas. A fermentação do hidrolisado obtido nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática resultaram em um rendimento de 0,376 g de etanol por grama de glicose, utilizando uma levedura comercial e outra isolada a partir de biomassa em decomposição.

Dessa forma, considerando a atual produção de milho no Brasil e sua respectiva produção de biomassa, seria possível incrementar a produção nacional em 3.600 milhões de litros de etanol.

Em decorrência do incremento da produção sem necessidade de aumento da área plantada, utilizando como matéria-prima um resíduo agrícola, essa biomassa demonstra elevado potencial para produção de biocombustível, carecendo dessa forma de estudos mais aprofundados quanto ao seu aproveitamento energético em escalas maiores.

## 5.0 REFERÊNCIAS

ALVES, S. L. Jr.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C., TRICHEZ; D., MILETTI, C. L.; ARAUJO, P. S. e STAMBUK, B. U. **Molecular Analysis of Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Determinant Role for the AGT1 Permease.** Applied and environmental microbiology, v. 74, n. 5, p. 1494–1501, Mar. 2008.

BAK, J. S.; KO, J. K.; HAN, Y. H.; LEE, B. C.; CHOI, I. G.; KIM, K. H. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. **Bioresource Technology**, v.100, n.3, p.1285-1290, 2009.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. e LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v. 8, p. 1155–1163. 2008.

BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**. v. 244, p. 582-587, 2017.

BELLISSIMI, E., DIJKEN, J. P. V., PRONK, J. T., MARIS, A. J. A. V. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, 9, 358-364. 2009

BONOMI, A. Termo de referência do “*III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise*” - Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas- **Etanol**. São Paulo, Dez., 2006.

CARVALHO, L. L. M. Estudo da Hidrólise e Fermentação dos Resíduos de milho (*Zea mays*) para produção de Etanol de Segunda Geração. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Maceió – AL. 2016, p. 68.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Disponível em <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18\\_01\\_11\\_14\\_17\\_49\\_graos\\_40\\_levantamento.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_14_17_49_graos_40_levantamento.pdf)> Acesso em 02 Mar. 2018.

da Rosa A. **Biomass**, in *Fundamentals of Renewable Energy Processes*, ed. da Rosa A., editor. (Oxford, UK: Elsevier Science & Technology), 533–590, 2013.

Galbe, M.; Zacchi, G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass Bioenergy** 46, 70–78, 2012.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. e SOUTO-MAIOR, A.M. **Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar**. Química Nova, v.32, n. 6, p.1500-1503, 2009.

KIM, J. H., BLOCK, D. E., MILLS, D. A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: An optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*. 88(5):1077–85, 2010.

KOOPMANS, A. e KOPPEJAN, J. “**Agricultural and Forest Residues - Generation, Utilization and Availability**”, In: *Regional Consultation on Modern Applications of Biomass Energy*. **Anais**. Kuala Lumpur, Malaysia, Jan. 1997.

KRICKA, W., FITZPATRICK, J., BOND, U. Challenges for the production of bioethanol from biomass using recombinant yeasts. *Adv Appl Microbiol*. 92:89-125, 2015.

KRISHNAN, C.; DA COSTA SOUSA, L.; JIN, M.; CHANG, L.; DALE, B. E.; BALAN, V. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v.107, p.441-450, 2010.

LOPES, D. D.; ROSA, C. A.; HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; MERTENS, F.A. e AYUB, M. A. Z. Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. **J Ind Microbiol Biotechnol**. V. 44, p. 1575-1588. 2017.

LOPES, et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian journal of microbiology**. V. 47S, p, 64-67. 2016.

NOVOZYMES. Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/files/products/overviews/cellicctec2.pdf>>. Acesso em 14/02/2018.

PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C. M. M. e FARINAS, C. S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuel*. 8:44, 2015.

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. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Faculdade de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Campinas – SP. 2010.

SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. *Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos*. Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL. Lorena – SP. 2005, p.7.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; REZENDE, G.; REZENDE, S. T. *Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 5, 1004- 1010, 2012, 7p.

SIMAS, J. P. Biocombustíveis e produção de alimentos: Uma análise das controvérsias científicas e sociais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do ABC, Centro de engenharia, modelagem e ciencias sociais aplicadas programa de pós-graduação interdisciplinar em energia. Santo André-SP. 2010.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J. e TEMPLETON, D. **Determination of Ash in Biomass**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005b.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Total Solids in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005c.

SORDA G, BANSE M, KEMFERT C. An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy*, 2010.

ZALDIVAR, J., NIELSEN, J., OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl Microbiol Biotechnol**. 56(1– 2):17–34, 2001.