



Universidade Federal da Integração Latino-Americana
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza - ILACVN

PROJETO DE PESQUISA

Produção de biogás a partir de biomassa vegetal e pré-tratamento biológico

Márcia Regina Becker

Outubro 2022

Faixa de financiamento:

R\$ 15.000,00

Relação de nomes e currículo dos envolvidos:

- Coordenadora da proposta: Márcia Regina Becker - <http://lattes.cnpq.br/1604131237868242>
- Pesquisadora: Rafaella Costa Bonugli Santos - <http://lattes.cnpq.br/5470591128080574>
- Mestrando do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade – PPGIES – da UNILA – A ser selecionado.
- Graduando de curso de graduação da UNILA - A ser selecionado.

Resumo

O projeto **Produção de biogás a partir de biomassa vegetal e pré-tratamento biológico** tem por finalidade estudar a obtenção de biogás a partir da codigestão anaeróbia de diferentes substratos vegetais derivados de resíduos agrícolas, florestais, municipais e industriais, plantas aquáticas ou algas, após seu pré-tratamento biológico.

Para atender às crescentes demandas globais e principalmente como alternativa aos combustíveis fósseis, diversas tecnologias de geração de energia utilizando biomassa lignocelulósica têm ganhado muita atenção. Esta matéria orgânica pode ser proveniente de diferentes fontes e se apresenta como fonte quase inesgotável de energia renovável para a produção de biogás, uma mistura de metano e gás carbônico, por digestão anaeróbia. Embora com rendimentos de metano mais baixos em comparação com substratos convencionais já utilizados, a biomassa vegetal é uma opção barata e abundante. Os principais desafios encontrados durante sua biodigestão são sua natureza recalcitrante principalmente devido à presença de celulose cristalina e lignina na sua estrutura.

As biomassas vegetais, em proporção diversa, apresentam uma estrutura lignocelulósica que contém polímero de celulose, hemicelulose e lignina. Nessa estrutura, a lignina é o polímero mais recalcitrante que forma uma barreira em torno da celulose e hemicelulose dificultando a biodegradação e a produção de biometano. Pré-tratamentos podem ser empregados para romper os polímeros e permitir o acesso da comunidade microbiana aos compostos biodegradáveis. A escolha do pré-tratamento mais apropriado depende das características e estrutura da biomassa e deve evitar a perda de matéria orgânica durante o processo ou mesmo gerar um passível ambiental maior do que aquele que se propôs resolver.

O pré-tratamento biológico se apresenta como uma alternativa ecologicamente correta e com baixa demanda de energia. Esse pré-tratamento consiste na utilização de microrganismos puros, consórcios ou enzimas para aumentar a biodegradabilidade da biomassa lignocelulósica e, assim, aumentar a produção de biogás. O pré-tratamento enzimático é um método rápido, que pode ser realizado em poucas horas devido ao fato de as enzimas serem menores que os microrganismos. Além disso, as enzimas têm a melhor mobilidade, solubilidade e as melhores interações com os substratos.

Visando obter essas duplas vantagens, o aproveitamento energético de resíduos a partir da biomassa vegetal, este projeto está baseado no estudo da produção de biogás após o pré-tratamento biológico dessas biomassas e posterior codigestão anaeróbia com outros dejetos, como por exemplo o bovino. Esse projeto pretende avaliar os parâmetros do pré-tratamento biológico com diferentes fungos e enzimas, parâmetros da codigestão anaeróbia e características da comunidade microbiana após a codigestão.

Introdução e justificativas

As mudanças climáticas estão diretamente relacionadas à queima de combustíveis fósseis, que gera CO₂, sendo que os combustíveis fósseis são predominantes na produção de energia, no mundo todo, desde o século passado. Por conta disto, pesquisas têm sido feitas e novas tecnologias implementadas a fim de obter energia a partir de fontes limpas e renováveis, transportá-las e armazená-las. Uma delas consiste na produção de biocombustíveis a partir de plantas comestíveis. O uso dessas biomassas para a produção de biocombustíveis tem sido um tema de debate, pois pode aumentar a competição pela disponibilidade de terras agrícolas e corpos d'água utilizados para produzir alimentos. Frente a esse panorama a produção de biogás proveniente de resíduos orgânicos, surge como uma alternativa para a solução desta problemática, pois se constitui de uma energia limpa e renovável. Por conta disso, essa proposta alinha com alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Cúpula das Nações Unidas sobre o Desenvolvimento Sustentável em setembro de 2015.

A produção do biogás, mais especificamente o biometano, é proveniente de diversos tipos de biomassa que ao ser degradada pela ação de microrganismos gera o biocombustível. Todo este processo acontece em um ambiente anaeróbio, sob condições estritamente específicas como: temperatura, pH, presença ou ausência de O₂, relação de C/N, umidade e quantidade de bactérias por volume de biomassa (Araújo, 2017). A digestão anaeróbia é um processo complexo que requer tanto as condições anaeróbias antes mencionadas assim como uma atividade conjunta de uma associação de microrganismos para transformar o material orgânico em dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). O processo pode ser dividido em quatro fases, sendo: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Cada etapa é realizada por diferentes grupos de microrganismos, em sintrofia, e podem requerer diferentes condições ambientais (Kunz, 2019).

Dentre diversos tipos de biomassa utilizados para produzir biogás encontram-se aquelas de origem vegetal, disponíveis na natureza, como os resíduos da agricultura, da poda de árvores, algas e plantas aquáticas. A produção de biogás a partir desses substratos e por meio da digestão anaeróbia (DA) continua sendo um desafio, devido, principalmente, à sua complexa estrutura formada por polímeros lignocelulósicos. Este tipo de biomassa tem uma estrutura composta, geralmente, por celulose (23 a 32%), hemicelulose (38 a 50%) e lignina (10 a 25%). Esta última é um componente fundamental de tais substratos, já que fornece o suporte estrutural de impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano, resultando em um elemento recalcitrante que dificulta que os micróbios realizem a conversão bioquímica renovável (Meraj, 2021). Por outro lado, a celulose é um polímero polissacarídeo de celobiose linear fortemente ligado por ligações glicosídicas β-1,4. Cadeias de

celulose são interconectadas por ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, resultando em microfibrilas com alta resistência à tração. Além disso, as microfibrilas de celulose também estão ligadas entre si por hemicelulose e / ou pectina e cobertas por lignina. Essa estrutura especializada e complicada torna a celulose resistente a ataques biológicos e químicos (Mishra, 2018). Por último, a hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por vários monossacarídeos diferentes e sua despolimerização é muito mais fácil do que a celulose (Sethupathy, 2021). Este se liga de forma não covalente às fibras de celulose e atua como um material de matriz na biomassa lignocelulósica. A estrutura amorfa e o menor grau de polimerização da hemicelulose a tornam mais suscetível à degradação físico-química e biológica do que a celulose (Meraj, 2021; Koyama, 2017; Abraham, 2020).

Para que se torne eficiente, a conversão de biomassa para biometano é requerido pré-tratamento desses substratos (Gutiérrez, 2018). Os pré-tratamentos são essenciais para melhorar a produção de biogás, a fim de superar as limitações do processo de degradação, como a hidrólise. Para isso, diferentes pré-tratamentos como físicos, químicos e biológicos têm sido propostos, com o objetivo comum, que é causar deslignificação, solubilização de açúcares e a redução da cristalização da celulose em matérias-primas lignocelulósicas (Ali, 2017).

Os métodos de pré-tratamento biológico são realizados com agentes biológicos, quais sejam, microrganismos, consórcios ou as enzimas secretadas pelos microrganismos. O método não envolve geralmente espécies químicas, normalmente utiliza temperaturas e pressões moderadas. Este pré-tratamento é um método alternativo e, em comparação com os métodos de pré-tratamento químico e mecânico, é considerado muito mais ecológico, requerendo pouco aporte de energia. Dentre de esses microrganismos viáveis estão fungos brancos, marrons e de podridão mole, alguns facilmente encontrados no meio ambiente e que degradam principalmente lignina, hemicelulose e certa porcentagem de celulose. Os fungos da podridão branca podem produzir enzimas com elevada capacidade hidrolítica para a biodegradação da lignocelulose, tal como a lignina peroxidase, a manganês peroxidase e a lacasse. A hidrólise biológica da celulose é realizada por enzimas com atividades de exogluconase, endogluconase e β -glucosidase, enquanto a hidrólise de hemiceluloses requer muitas enzimas, incluindo endo-xilanase, endo-mananase, α -glucuronidase, entre outras. No entanto, o processo de degradação de celulose e hemicelulose em conjunto com a lignina requerem de um período de incubação prolongado, o que leva a uma desvantagem do método, limitando o uso destes processos em aplicações comerciais.

O pré-tratamento da biomassa vegetal com fungos lignocelulósicos, nos quais o processo de digestão anaeróbica é realizado por meio da codigestão, tem dado bons resultados na produção de biometano. A codigestão apresenta como vantagens um melhor equilíbrio de nutrientes, pois os

compostos inibidores na biodigestão são diluídos e a diversidade de espécies bacterianas aumenta devido a nutrição da ampla variedade de resíduos orgânicos, ajudando a estabilizar o ecossistema digestor. (Noonari, 2020; Rodrigues, 2020).

Além de produzir metano como biocombustível, o digestado resultante da DA pode ser valorizado como corretivo de solo. As comunidades microbianas do solo desempenham um papel essencial na saúde do solo, fertilidade e ciclagem de nutrientes. A inoculação do solo com corretivos digestivos pode produzir mudanças significativas na estrutura da comunidade microbiana do solo. Essas mudanças podem afetar a ecologia do solo, incluindo a competição e o antagonismo entre os microrganismos, que podem atuar na supressão de patógenos de plantas. Outros estudos com digestado produzido a partir da codigestão de resíduos de oliva, polpa cítrica, resíduos de gado, palha e soro de queijo, observaram aumento da atividade enzimática em solos corrigidos em comparação com solos não corrigidos. Essas enzimas incluem catalase e desidrogenase, que são indicadores da fertilidade do solo e da atividade oxidativa dos micróbios do solo, respectivamente, e se apresentaram promissores como fertilizantes do solo (Bayo, 2020).

Esse projeto de pesquisa que propõe estudar a produção de biocombustíveis a partir de diferentes biomassas vegetais com ou sem pré-tratamento. Pretende-se utilizar pré-tratamentos com baixo impacto ambiental e baixa demanda energética, como aqueles feitos com fungos e enzimas. O projeto prevê a digestão anaeróbia de biomassa vegetal, com ou sem pré-tratamento, e de sua codigestão com outros substratos. Nestes estudos estão envolvidos múltiplos conhecimentos e saberes das áreas da química, engenharias, biotecnologia e biologia, pois trata de sistemas de conversão de energia a partir de fontes renováveis e ambientalmente amigáveis. Este é um projeto que envolve docentes de diferentes áreas da UNILA e alunos da graduação e pós-graduação.

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a produção de biogás a partir da codigestão anaeróbia de substratos vegetais como macrófitas, gramíneas e outros, sem ou com pré-tratamento biológico, com outros dejetos.

São objetivos específicos avaliar a influência do pré-tratamento fúngico dos diferentes substratos vegetais na produção do biogás; avaliar parâmetros de físico-químicos e de mistura na codigestão; e analisar a composição da comunidade microbiana no digestato obtido na codigestão.

Metodologia

Para atingir os objetivos das atividades de pesquisa para os próximos 2 anos, pretende-se: Coletar amostras de substratos vegetais, animais e subprodutos animais.

Caracterizar os substratos quanto a sua estrutura polimérica (substratos vegetais) seus conteúdos de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF), de acordo com o método 2540 do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005).

Preparar ou aclimatar inóculo proveniente de reatores de tratamento de resíduos de restaurantes ou de dejetos animais. O inóculo, poderá ser armazenado e aclimatado em diferentes temperatura por períodos pré-definidos, antes de iniciar uma batelada de digestão.

Utilizar a enzima comercial Lacase (Sigma-Aldrich), como referência, no pré-tratamento de diferentes substratos vegetais. A atividade da lacase (comercial e do isolado) será determinada espectrofotometricamente (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995, e Baltierra-Trejo; Márquez-Benavides; Sánchez-Yáñez, 2015).

Disponibilizar o extrato bruto (sem purificação) da enzima produzida por diferentes fungos, entre eles o *Trametes polyzona_2AQ*. O fungo será isolado da decomposição da serapilheira do Parque Nacional do Iguaçu e está preservado na Coleção de Cultura de Microorganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, situada no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UNILA. O fungo será reativado em meio de cultura apropriado e será avaliada sua atividade quanto à lacase (BALDRIAN, 2009).

Pré-tratar diferentes substratos vegetais com a lacase comercial e com o extrato bruto de diferentes fungos, como o *Trametes polyzona_2AQ*, que será empregado para degradar ou modificar a lignina dos substratos (RENCORET et al., 2017). Os substratos secos serão utilizados para a produção do biocombustível. A atividade residual da lacase será avaliada nos sobrenadantes após a filtração.

Medir o potencial metanogênico bioquímico (BMP) de acordo com os parâmetros estipulados pela norma VDI 4630, abordando os teste físico-químico para caracterização da biomassa, o tratamento e proporção do inóculo, as temperatura de armazenamento ou de reações no biodigestor, a relação dos substratos e tempo de teste de BMP. Poderão ser utilizados diferentes substratos, além do vegetal, para os processos de codigestão, como dejetos bovinos e o lactossoro. Os ensaios serão feitos em batelada e em triplicata, ocorrendo em temperatura mesofílica ($37,5 \pm 1,0$ °C), com reatores contendo biomassas e inóculo necessários para obter um teor de até 10 % de sólidos totais com base na massa seca.

Caracterizar a comunidade microbiana do digestato e avaliar sua aplicabilidade como biofertilizante.

Cronograma de atividades

Para executar esse projeto serão desenvolvidas as seguintes atividades:

- 1) Pesquisa bibliográfica sobre substratos vegetais, pré-tratamento fúngico dos substratos vegetais, codigestão anaeróbia e digestato.
- 2) Coleta das biomassas vegetais e do dejetos bovino e subproduto animal.
- 3) Cultivo fúngico para obtenção do extrato enzimático.
- 4) Pré-tratamento da biomassa vegetal com a enzima comercial e a do fungo.
- 5) Fermentação anaeróbica de monodigestão ou codigestão para obtenção de biogás.
- 6) Caracterização do digestato.
- 7) Reuniões, seminários, participação em congressos científicos e publicações em periódicos.

Atividades	Período					
	1º quadrimestre	2º quadrimestre	3º quadrimestre	4º quadrimestre	5º quadrimestre	6º quadrimestre
1	X	X	X	X	X	X
2	X		X		X	
3		X	X	X	X	
4	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X
6		X		X		X
7	X	X	X	X	X	X

Resultados esperados

Com este projeto de pesquisa se pretende: dar continuidade a estudos sobre a obtenção de biogás a partir do pré-tratamento biológico de substrato vegetal na UNILA; promover e consolidar o conhecimento científico-tecnológico do grupo formado por alunos, professores e pesquisadores da Universidade, de diferentes áreas do conhecimento; manter a interação entre Institutos de Pesquisa de outras regiões do país como o PTI; formar recursos humanos de elevada qualidade em nível de iniciação científica (IC) e mestrado; publicar trabalhos em revistas internacionais e em congressos; e interferir positivamente na comunidade de maneira a melhorar a qualidade de vida das pessoas no que se refere ao meio ambiente.

Identificação das áreas do conhecimento participantes

A Profa. Márcia Regina Becker, docente da área de Química e no Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade – PPGIES – da UNILA, será a responsável pelo processo de codigestão anaeróbia. A Profa. Rafaella Costa Bonugli Santos, docente do curso de Biotecnologia e do Programa de Pós-Graduação em Biociências – PPGBC - da Unila, será a responsável pela preparação do fungos, produção das enzimas e inoculação dos substratos.

Os discentes de graduação e pós-graduação que tomarão parte do projeto podem ser oriundos de diferentes áreas como a de Biotecnologia, de Engenharia de Energias ou Engenharia Química.

Mecanismo de acompanhamento de execução

O projeto será acompanhado por meio de reuniões entre os pesquisadores envolvidos (professores, técnicos e alunos), publicação de trabalhos em periódicos, emissão de relatórios técnicos, apresentação de seminários e trabalhos nos Encontros de Iniciação Científica (EIC), defesa de dissertação e doutorado, da UNILA bem como em congressos.

Infraestrutura requerida para o projeto

Para a execução das atividades de pesquisa são requeridos os seguintes equipamentos:

Medidor de pH, estufa, balança, mufla, detector de gás metano, gás carbônico e ácido sulfídrico, espectrofotômetro UV-vis, forno de micro-ondas e vidraria de laboratório reagentes químicos. A maioria destes materiais e equipamentos está disponível na UNILA.

Em interação científica com o Parque Tecnológico de Itaipu (PTI), poderão ser adquiridos metodologias, inóculos e procedimentos relacionados a questões tecnológicas na produção de biogás, tendo em vista a experiência reconhecida que esse centro possui.

Os recursos necessários para a compra de materiais para os processos de extração e fermentação da biomassa serão obtidos junto a UNILA ou em parceria com o setor produtivo.

Referências Bibliográficas

ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; PARK, H.; CHOI, O.; SINDHU, R.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A.; PARK, J. H.; SANG, B. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 301, January, 122725, 2020.

ALI, S. S.; ABOMOHRRA, A. E. F.; SUN, J. Effective bio-pretreatment of sawdust waste with a novel microbial consortium for enhanced biomethanation. *Bioresource Technology*, 238, 425–432, 1 ago. 2017.

ARAÚJO, A. P. C. Produção de biogás a partir de resíduos orgânicos utilizando biodigestor anaeróbico, dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, 42, 2017.

BALDRIAN, P. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment*, v. 55, n. No. 9, p. 370–378, 14 out. 2009.

BALTIERRA-TREJO, E.; MÁRQUEZ-BENAVIDES, L.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. *Journal of Microbiological Methods*, v. 119, p. 126–131, dez. 2015.

BAYO, J. D. F.; SIMMONS, C.; GHEYNST, J. S. V. Characterization of digestate microbial community structure following thermophilic anaerobic digestion with varying levels of green and food wastes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 47, 1031–1044, 2020.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, n. 1, p. 81–87, abr. 1995.

GUTIÉRREZ, E. M. Biogas production from different lignocellulosic biomass sources: advances and perspectives. *3 Biotech*, 8, 233, 2018.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. Sbera. Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, 2019.

MERAJ, S.; LIAQUAT, R.; NAVQUI, S. R.; SHEIKH, Z.; ZAINAB, A.; KHOJA, A. H.; JUCHELKOVA, D.; ATABANI, A. Enhanced Methane Production from Anaerobic Co-Digestion of Wheat Straw Rice Straw and Sugarcane Bagasse: A Kinetic Analysis. *Appl. Sci.* 11, 6069, 2021.

KOYAMA, M.; WATANABE, K.; KUROSAWA, N.; ISHIKAWA, K.; BAN, S.; TODA, T. Effect of alkaline pretreatment on mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of a submerged macrophyte: Inhibition and recovery against dissolved lignin during semi-continuous operation. *Bioresource Technology*, v. 238, 666–674, 2017.

MISHRA, S.; SINGH, P. K.; DASH, S.; PATTNAIK, R. Microbial pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethanation and waste management. *3 Biotech*, 8, 458, 2018.

NOONARI, A. A.; MAHAR, R. B.; SAHITO, A. A.; BROHI, K. M. Effects of isolated fungal pretreatment on bio-methane production through the co-digestion of rice straw and buffalo dung. *Energy*, 206, 118107, 2020.

RENCORET J, PEREIRA A, DEL RIO JC, MARTINEZ AT, GUTIERREZ A. Delignification and saccharification enhancement of sugarcane byproducts by a laccase-based pretreatment. *Acs Sust Chem Eng*. 2017;5:7145–54.

RODRIGUES, L. N.; GALVIS, L. J. G.; SANTOS, R. C. B.; BECKER, M. R. Produção de biocombustível a partir de planta aquática invasora (*Hydrilla verticillata*). *Rev. Bras. de Iniciação Científica (RBIC)*, Itapetininga, 7, 1, 55-76, jan./mar., 2020.

SETHUPATHY, S., MORALES, M. M.; LI, Y.; WANG, Y.; JIANG, J.; SUN, J.; ZHU, D. Harnessing microbial wealth for lignocellulose biomass valorization through secretomics: a review. *Biotechnology for Biofuels*, v. 14, n. 1, 1–31, 2021.

VDI 4630 Fermentation of organic materials Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests, 2006.