

Hidrólise enzimática da casca da pupunha para produção de etanol de segunda geração**Enzymatic hydrolysis of pupunha shell for second generation ethanol production**

DOI:10.34117/bjdv6n4-194

Recebimento dos originais: 10/03/2020

Aceitação para publicação: 14/04/2020

Johnatt Allan Rocha de Oliveira

Doutor em Engenharia de Química pela Universidade Estadual de Campinas

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Avenida Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém-PA, Brasil

E-mail: johnattrocha@yahoo.com.br

Lucas dos Santos Oliveira

Graduado em Nutrição pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Avenida Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém-PA, Brasil

E-mail: oliverlucasnutri@gmail.com

Kyara Silva Cassiano

Graduada em Nutrição pela Universidade Federal do Pará

Instituição: Universidade Federal do Pará

Endereço: Avenida Augusto Corrêa, 01, Guamá, Belém-PA, Brasil

E-mail: kyaracassiano@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo realizar a hidrólise enzimática com fins de produção de etanol. O material foi cozido em panela de pressão a 120°C por 40 minutos e seco em estufa com circulação em seguida triturado. A caracterização química da casca foi realizada para os teores umidade, cinzas, proteína, lipídios, teor de fibras e carboidratos totais. A hidrólise enzimática do material foi realizada com a enzima celulase *Trichoderma reesei* e avaliada através de um planejamento experimental de três níveis do tipo 3(2-0), sendo as variáveis de estudo: Concentração de sólidos (5-10%) e agitação (100-200 rpm). As hidrólises foram realizadas durante 60 minutos na temperatura de 50°C e os açúcares redutores liberados foram medidos pelo método do DNS. A melhor condição obtida no planejamento foi utilizada para a produção de hidrolisados obtidos durante 72 horas de hidrólise que em seguida foram fermentados com *Saccharomyces cerevisiae* durante 24 horas a 34°C em incubadora com agitação. A composição química da casca de pupunha apresentou teores de carboidratos acima de 70%. Já a análise estatística para hidrólise enzimática demonstrou, que a Concentração de Sólidos (L) foi a única que mostrou significância a 90% de confiança.

Palavras-chave: casca de pupunha; fermentação; pré-tratamento, hidrólise enzimática**ABSTRACT**

This work aims to carry out enzymatic hydrolysis for the purpose of ethanol production. The material was cooked in a pressure cooker at 120°C for 40 minutes and dried in an oven with circulation then crushed. The chemical characterization of the shell was carried out for moisture, ash, protein, lipids, fiber and total carbohydrate contents. The enzymatic hydrolysis of the material was carried out with

the cellulase enzyme *Trichoderma reesei* and evaluated through a three-level type 3 (2-0) experimental design, with the study variables: Solid concentration (5-10%) and agitation (100-200 rpm). Hydrolysis was carried out for 60 minutes at a temperature of 50°C and the reducing sugars released were measured by the DNS method. The best condition obtained in the planning was used for the production of hydrolysates obtained during 72 hours of hydrolysis, which were then fermented with *Saccharomyces cerevisiae* for 24 hours at 34°C in a shaking incubator. The chemical composition of the pupunha bark showed carbohydrate contents above 70%. The statistical analysis for enzymatic hydrolysis, on the other hand, showed that the Solid Concentration (L) was the only one that showed significance at 90% confidence.

Keywords: pupunha bark; fermentation; pre-treatment, enzymatic hydrolysis

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a procura por novas opções energéticas com o intuito de reduzir os danos provocados ao ecossistema é uma crescente, tendo em vista que a principal fonte de energia utilizada ainda é o petróleo, combustível responsável pelo fornecimento de um terço da energia primária no mundo; porém, por ser um combustível fóssil não renovável, possui um limite em suas reservas disponíveis e sua queima causa grande impacto no meio ambiente, pois libera dióxido de carbono, contribuindo para o aquecimento global e o efeito estufa, gerando derramamento de óleo, chuva ácida, poluição urbana e perda da biodiversidade (Goldemberg & Lucon, 2007; Santos et al., 2012; Coimbra, 2015).

A pupunha (*Bactris gasipaes*) é um fruto amplamente consumido, principalmente na forma cozida, e produzido na região amazônica, uma vez que um hectare de pupunheira é capaz de produzir de 4 a 10 toneladas de frutos por ano; frutos esses que podem possuir características diferenciadas entre si, como tamanho, cor, sabor, formato, além de constituintes nutricionais, por conta da ampla diversidade genética que possuem (Yuyama, 2007).

A hidrólise é uma etapa necessária para despolimerização dos resíduos para conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, os quais gerarão o bioetanol. O uso de celulase neste processo torna-se eficaz em comparação a outros tipos de hidrólises, pois possui menores chances de danificação de equipamentos e o processo é realizado em melhores condições de pH e temperatura. A hidrólise enzimática é caracterizada como processo mais lento, porém o tempo varia dependendo do método escolhido para o pré-tratamento (Rojas, 2012; Oliveira, 2014; Silva, 2016).

O potencial de aproveitamento da pupunheira é bastante extenso. O seu caule é utilizado para a produção do palmito de pupunha, as folhas são utilizadas na ornamentação de casas e também no artesanato, os frutos servem de consumo para a população e a casca é aproveitada na fabricação de produtos de panificação. A pupunheira possui diversas vantagens, do ponto de vista econômico, além do mais a escassez de recurso devido extração desenfreada tem levado a estudos sobre aproveitamento máximo de matéria prima da natureza (Borges, 2011).

Apesar de a principal matéria prima utilizada para produção de etanol no Brasil ser a cana-de-açúcar, o país possui uma gama enorme de produtos agrícolas em diferentes regiões que apresentam produtividades e hábitos de consumo diferenciados (Oliveira, 2014). Na região Norte, a pupunha é tradicionalmente consumida pela população. Porém, a parte utilizada é a polpa do fruto, não obtendo-se aproveitamento da casca, a qual é caracterizada como biomassa lignocelulósica. Nesse contexto, faz-se necessário avaliar o potencial desse resíduo para produção de bioetanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos e Análises de Alimentos, localizado na Faculdade de Nutrição, integrante do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (UFPA).

As pupunhas foram adquiridas em feiras públicas da cidade de Belém do Pará e foram cozidas em temperatura aproximada de 120°C por 40 minutos. As cascas obtidas foram secas com circulação de ar por 48 horas a uma temperatura de 40° C e em seguida trituradas. As cascas foram trituradas e utilizadas na granulometria contida no intervalo de 9 mesh (2,0 mm) a 35 mesh (0,45 mm).

2.2 ANÁLISES QUÍMICAS REALIZADAS

Para a caracterização química da casca da pupunha, foram realizadas as seguintes análises químicas em triplicata: teor de umidade por secagem direta em estufa a 105°C segundo o método número 920.151 da AOAC (1997), teor de cinzas por incineração em mufla a 550° C segundo o método 940.26 da AOAC (1997), teor de proteínas pelo método de Kejdahl número 984.13 da AOAC, teor de fibras pelo método de detergente ácido (Van Soest, 1967), teor de lipídios por Bligh e Dyer (Bligh; dyer, 1959) e o teor de carboidratos por diferença (AOAC, 1997). As concentrações de ART (açúcares redutores totais) foram determinadas conforme o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) segundo Miller (1959).

2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi determinada através de um planejamento experimental de 3 níveis com as variáveis de estudo: Concentração de sólidos (%) e agitação (rpm). A hidrólise enzimática foi realizada nas concentrações de sólidos descritas pelo planejamento, com tampão de citrato de sódio a pH 4,8 a 50 mM. A hidrólise enzimática foi realizada em Erlenmeyer de 250mL com celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) na carga enzimática de 15 FPU/g biomassa à 50 °C na condição

de agitação de estudo em shaker. A liberação dos açúcares redutores foi medida ao final de 60 min. A carga enzimática utilizada foi baseada no estudo de Gomez-Rueda (2010) e Oliveira (2014).

Após a hidrólise enzimática o material foi filtrado e a parte líquida (hidrolisado) analisada. A condição de maior liberação de açúcares foi utilizada para a obtenção do hidrolisado a ser fermentado. Este último foi obtido após 72h de hidrólise. Na tabela 1 é observado o planejamento experimental realizado para a hidrólise enzimática.

Tabela 1- Planejamento experimental realizado

Ensaio	Conc. de Sólidos (%)	Agitação (rpm)
1	5	100
2	5	150
3	5	200
4	10	100
5	10	150
6	10	200
7	15	100
8	15	150
9	15	200
10	10	150
11	10	150

2.4 FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS

Os hidrolisados obtidos após 72h na melhor condição definida pelo planejamento (ensaio 7: 15% e agitação de 100 rpm), foram fermentados. A fermentação utilizou 100mL de hidrolisado e foi realizada em Erlenmeyers de 250 mL. Em seguida, os Erlenmeyers foram adicionados de 1g da levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada, da marca Bionatus, e deixados sob incubação durante 72 h na temperatura de 34 °C e, a cada tempo definido (0, 0,5, 2, 4, 6,12, 24, 30, 48, 72) foram coletadas alíquotas de 2 mL. A alíquota coletada foi decantada durante 6 horas e analisada para os teores de açúcares e etanol, esta última obtida a partir dos valores de °Brix. Nas equações 1 e 2 a seguir são descritos os cálculos realizados para a obtenção dos valores do teor alcoólico no material fermentado (ASBC Methods of Analysis, 1958).

$$FG = 1.001843 - 0.002318474*OB - 0.000007775*OB*OB - 0.000000034*OB*OB*OB +$$

$$0.00574*FB + 0.00003344*FB*FB + 0.000000086*FB*FB*FB \quad (1)$$

Onde:

FG = Densidade Específica Final; OB = °Brix Original; FB = °Brix Final

Após a conversão dos valores de °Brix em gravidade, o valor de densidade foi corrigido para a temperatura de 34°C e o teor alcoólico calculado de acordo com a Equação 2 :

$$\text{Teor alcoólico: Densidade Inicial (DI) - Densidade Final (DF) * 131} \quad (2)$$

2.4.1 Parâmetros de avaliação da fermentabilidade (rendimento e produtividade de etanol)

Os parâmetros para a avaliação da fermentação foram: rendimento de fermentação e a produtividade volumétrica de etanol. Os valores de produtividade volumétrica de etanol foram calculados pela Equação 3:

$$PV = (PF - Pi) / t \quad (3)$$

Onde:

PF é a concentração de etanol (g.L⁻¹) no final da fermentação, Pi é a concentração de etanol (g.L⁻¹) no início da Fermentação e t é o tempo em horas. Enquanto que o rendimento de fermentação (RF) foi calculado pela Equação 4:

$$RF = \frac{E_f - E_i}{(G_i - G_f) \times 0,511} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

Ef = concentração de etanol no final da fermentação; Ei = concentração de etanol no inicial da fermentação; Gi = concentração de glicose no início da fermentação; Gf = concentração de glicose no final da fermentação; 0,511 é o fator estequiométrico

2.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas de ANOVA, teste de comparação de médias de Tukey (1%), através do programa Statistica 7.0. Será também utilizada a ferramenta estatística de planejamento Experimental com Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**3.1 RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE PUPUNHA**

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para a caracterização química da casca de pupunha cozida e seca.

Tabela 2 - Composição centesimal da casca da pupunha

Componentes	Resultados
Umidade	4,7±0,49
Cinzas	3,55±1,08
Proteína	1,45±0,18
Lipídeo	18,91±1,43
Fibra Bruta Total	25,65±0,21
Carboidratos	71,39±2,54
Total	100

*Médias obtidas a partir de triplicatas

De acordo com a Tabela 2 o valor de umidade obtido na análise da casca da pupunha foi de 4,7%, que ficou abaixo dos resultados encontrados no estudo de Gondim et al. (2005), o qual apresentou umidade acima de 49% para cascas de frutas, como abacate, abacaxi e tangerina.

Almeida (2011), que elabora e avalia nutricionalmente pães enriquecidos com farinha da casca da pupunha, encontrou o valor de 5,4% de umidade para casca da pupunha, sendo este bem próximo, porém ainda maior que o observado para este trabalho.

O teor de cinzas encontrado (3,55%) na análise do resíduo obteve resultado semelhante ao de Santos (2010) (3,72%) para a casca do abacaxi e foi maior que aquele observado por Almeida (2011) para a casca de pupunha que foi de 1,9% e menor que o obtido por Augusta (2011) com o valor de 4,7% para a casca de jambo vermelho. Como é possível observar na Tabela 2 os materiais analisados por Gondim et al. (2005) obtiveram resultados menores que 1%, com exceção da casca do abacaxi que obteve 1,03% de cinzas.

O percentual de carboidratos obtido (72,71%.) encontraram-se próximo ao observado por Almeida (2011), Santos (2010) e Augusta (2010) que obtiveram 69,1%, 80,55% e 59,25%, respectivamente.

3.2 RESULTADOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos para o planejamento experimental realizado para a hidrólise enzimática da casca de pupunha.

Tabela 3 - Resultados do planejamento experimental da hidrólise enzimática da casca de pupunha

Ensaio	Conc. de Sólidos	Agitação (rpm)	Açúcares liberados (g/L)
1	5	100	8,42
2	5	150	8,01
3	5	200	9,32
4	10	100	14,89
5	10	150	12,67
6	10	200	7,19
7	15	100	15,38
8	15	150	11,69
9	15	200	11,86
10	10	150	9,81
11	10	150	12,59

Conforme a Tabela 3 observa-se que a quantidade de açúcares liberados durante o planejamento experimental hidrólise enzimática, variou de 7,19 g/L e 15,38 g/L. O ensaio 7, que corresponde à concentração de sólidos de 15% e agitação de 100 rpm, foi o que mais liberou açúcares durante a hidrólise. O ensaio 6, que corresponde à concentração de sólidos de 10% e agitação de 200 rpm foi o que menos liberou açúcares durante a hidrólise. Oliveira (2014) investigando as etapas para o processo de produção de etanol a partir do caroço de açaí encontrou maior quantidade de açúcares liberados durante a hidrólise, no ensaio com menor concentração de sólidos e maior agitação. Este autor atribuiu este comportamento ao fato de que o material de seu estudo foi anteriormente, além de pré-tratado, deslignificado.

3.2.1 Análise estatística dos resultados da hidrólise enzimática

Na Figura 1 é mostrado o gráfico de Pareto no qual se verifica o quanto cada uma das variáveis influenciou nos teores de açúcares redutores (g/L) liberados após a hidrólise enzimática.

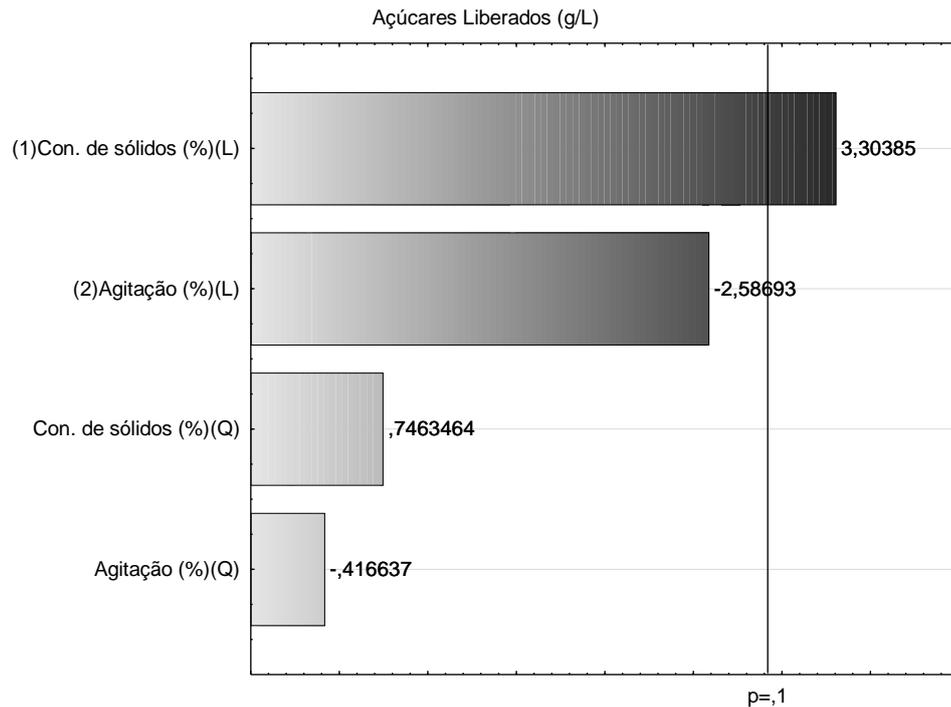


Figura 1 - Gráfico de Pareto obtido para o teor de açúcares redutores (g/L)

De acordo com o gráfico de Pareto apresentado na Figura 1 é possível observar que a concentração de sólidos linear (L) foi a única que se mostrou significativa, sendo aquela que mais influenciou a liberação de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática da casca de pupunha. Já as variáveis Agitação linear (L), Concentração de sólidos quadrática (Q) e Agitação quadrática (Q) não foram significativas como mostra o gráfico de Pareto para 90% de significância.

Na Tabela 4, são observados os resultados obtidos para a ANOVA realizada para os resultados dos teores de açúcares fermentescíveis liberados durante a hidrólise da casca de pupunha.

Tabela 4 - Análise da variância (ANOVA) para a concentração de glicose liberada após a hidrólise enzimática da casca da pupunha

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão (R)	48,32	4	12,08	2,70	3,18
Resíduos (r)	26,82	6	4,47		
Falta de ajuste (faj)	21,51771	4	5,37943	2,03	9,24
Erro puro (ep)	5,30480	2	2,65240		
Total (T)	75,13767	10			

% de variação explicada (R^2)	64,30%
% máxima de variação explicável	92,94%

É possível verificar que o modelo não foi significativo, uma vez que o valor do $F_{calculado}$ não foi no mínimo 5 vezes maior que o valor do $F_{tabelado}$ (Teste F da Regressão). Além disso, nem o modelo ou as superfícies de respostas puderam ser gerados, pois a análise estatística revelou que os resultados não passaram no teste F da falta de ajuste ($F_{calculado} < F_{tabelado}$) uma vez que, o valor do $F_{tabelado}$ (2,03) não foi no mínimo 5 vezes menor que o valor do $F_{tabelado}$ (9,24). De acordo com tabela da ANOVA (Tabela 4) o R^2 apresentou valor de 0,6430 o que demonstra que o modelo explicou 64,30% da variação dos dados experimentais. A análise estatística da anova revela a necessidade de uma ampliação da faixa de estudo das variáveis.

3.3 RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO

Na Figura 2 são observados os valores obtidos para a fermentação dos hidrolisados obtidos a partir da casca de pupunha.

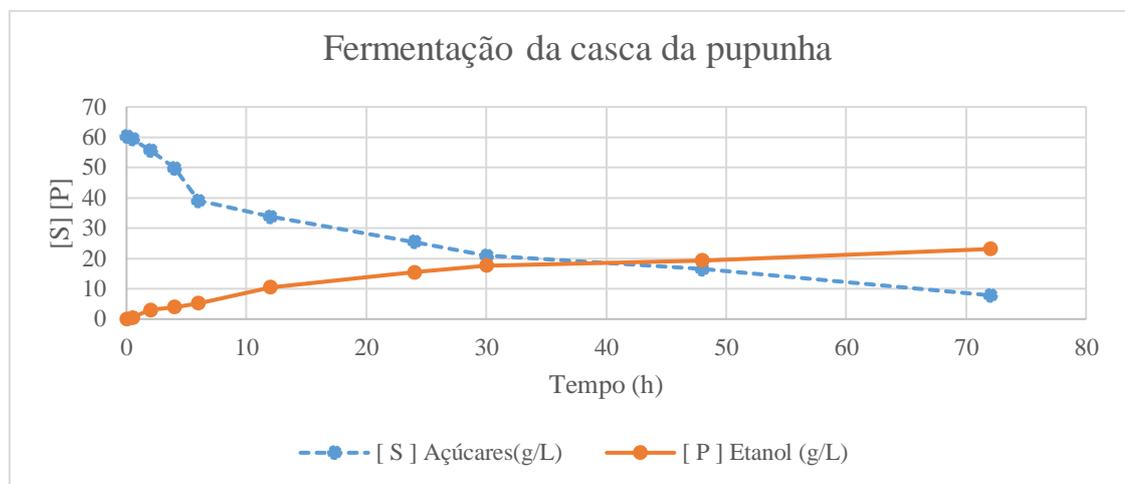


Figura 2 - Cinética de açúcares redutores e etanóis observados durante a fermentação de 72h em Erlemmeyers

Nesta etapa, os hidrolisados fermentados demonstraram produção máxima de etanol de 23,12g/L como pode ser observado na Figura 12. Esses valores são relativamente inferiores aos obtidos por Oliveira (2014) para a fermentação dos hidrolisados obtidos a partir do caroço de açaí que foi de 25,10g/L, porém, próximo ao encontrado por Wanderley (2012) na fermentação de hidrolisados do bagaço da cana-de-açúcar deslignificada proveniente de batelada alimentada, onde foi adicionado substrato a cada 12 horas, obtendo-se 23,38 g/L de etanol. O rendimento de fermentação e a produtividade volumétrica de etanol encontrado foram de 60,03% e 0,71g de

etanol.L.h⁻¹ respectivamente, e que são menores que os observados por Oliveira (2014) para o etanol de caroços de açaí, com os valores de 73,79-79,69% e 0,63-0,90 g de etanol.L.h⁻¹.

4 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados pode-se caracterizar este trabalho como nova pesquisa realizada afim de contribuir para gerar novas opções energéticas, além de contribuir para economia da região, a partir da sugestão de opções para reaproveitamento de resíduo. Portanto, de acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a casca da pupunha se caracteriza como um resíduo lignocelulósico com alto potencial para produção de etanol, uma vez que apresentou 71,39% de carboidratos, além de os valores de lipídeos e fibras se encontrarem significativo.

REFERÊNCIAS

ASBC Methods of Analysis, online. Barley Method 1. Sampling and Grading. Approved 1958, rev. 2003. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A.

Almeida, V. A., et al. (2011). *Análise sensorial e nutricional de pães elaborados através do aproveitamento alternativo da casca de pupunha (Bactrisgasipaes KUNTH)*. XX Jornada de Iniciação científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM. Manaus.

AOAC (1997). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16.ed. Washington. v.2, 850 p. 1997.

Augusta, I. M. et al. (2010). *Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (Syzygium malaccensis, (L.) Merryl & Perry)*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30(4): 928-932.

Bligh, E. G., Dyer, W.J. (1997). *A rapid method of total lipid and purification*. Can.J.Biochemistry.Physi, (37) 911-917, 1959.

Borges, P. R. S. (2011). *A pupunha como alternativa econômica para a agricultura familiar do Distrito Federal*. Pós-Graduação em Gestão Florestal do Departamento de Economia Rural e Extensão, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Coimbra, M. C. (2015). *Produção de etanol utilizando cascas de banana e laranja por cofermentação de Zymomonasmobilis e Pichiastipitis*. Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo.

GOMEZ-RUEDA, S. M. *Pré-tratamento e Hidrólise Enzimática do Bagaço de cana de açúcar*. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas-SP. 2010.

Goldemberg, J., Lucon, O. (2007). *Energia e meio ambiente no Brasil*. *Estud. A.*, vol.21, n.59, pp.7-20.

Gondim, J. A. M., et al. (2012). *Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, [online], v.25, n.4, p. 825-827, 2005. Disponível em: Acesso em: 11 fev. 2012.

Oliveira, A. M. M. M. (2010). *Development of panettone made of peach pal flour (BactrisgasipaesKunth)/ Desenvolvimento de panetone a base de farinha de pupunha (BactrisgasipaesKunth)*. *Alimentos e Nutricao [BrazilianJournalofFoodandNutrition]*, vol. 21, no. 4, p. 595.

Oliveira, Johnatt Allan Rocha de. *Investigação das etapas para o processo de produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa do caroço de açaí (Euterpe oleracea)*. 2014. 200 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

Santos, A. R. R., et al. (2010). *Avaliação da composição centesimal de casca de abacaxi*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 3., 2010, Uberaba. Anais. Uberaba: IFTM. p. 1 - 4.

Santos, R. A., et al. (2012). *Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol*. *Química Nova*, v. XY, p. 1-7, 2012.

Van Soest, P. J. (1967). *Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages*. *Journal of Animal Science*, v. 26, p.119-128.

Yuyama, L. K. O. (2007). *Uso de Frutos da Pupunheira para Alimentação Humana*. Coordenação de sociedade, ambiente e saúde - csas. Manaus, AM. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/paginas/pupunheira/download/CDTrabalhos/palestras/Lucia%20K%20O%20Yuyama%20Uso%20de%20frutos%20da%20pupunheira%20para%20alimentação%20humana.pdf>> Acesso em 08/01/2018.

Wanderley, Maria Carolina de Albuquerque. *Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por Saccharomyces cerevisiae UFPEDA 1238 em processo SHF*. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, programa de pós-graduação em biotecnologia industrial, Recife-PE. 2012.