

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO EM FIBRA DA CASCA DE COCO VERDE PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

M. M. S. CABRAL^{1,2}, R. M. R. G. ALMEIDA¹ e A. K. S. ABUD^{1,3}

¹ Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

² Instituto Federal de Alagoas, Campus Penedo

³ Universidade Federal Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: marciocabral.ifal@gmail.com

RESUMO – O aumento do consumo da água de coco leva a uma maior geração de resíduos, os quais vêm merecendo atenção de pesquisadores para o aproveitamento desta biomassa. O trabalho estuda dois tipos de pré-tratamento químico, ácido e alcalino, na fibra da casca do coco verde a fim de avaliar a quantidade de açúcares liberados na fração líquida da solução para a obtenção de etanol de segunda geração. Os ensaios foram realizados em autoclave a 120 °C, variando-se a concentração do reagente (0, 5 e 10%), ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, e o tempo de reação (20, 40 e 60 min). A melhor condição encontrada foi a do pré-tratamento com hidróxido de sódio à 5% e 40 min, apresentando concentração média de açúcares de 44,72 g/100 g. No teste de capacidade fermentativa foram utilizados dois tipos de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*, onde se observaram êxito na fermentação nos experimentos com 0 e 5% de ácido sulfúrico, ambos inoculados com a levedura *Pichia stipitis*, indicando a liberação de pentoses no caldo pré-tratado, necessitando das etapas de hidrólise enzimática para avaliar melhor qual tipo de pré-tratamento é o mais eficaz para a sacarificação da fibra da casca de coco verde.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do coco se destaca em muitos países não só pelos aspectos econômicos, mas também pelos sociais e ambientais. A gama de produtos que pode ser explorada com esta frutífera a torna reconhecida como importante recurso vegetal para humanidade (Martins, 2011).

A produção e consumo de coco verde no Brasil vem crescendo consideravelmente a cada ano, principalmente pelo comércio de água de coco, o qual evoluiu em consequência da aplicação de tecnologias de processamento e conservação da água do coco verde, viabilizando o mercado deste produto e otimizando seu aproveitamento (Brígida, 2006). Este expressivo aumento do consumo de água de coco, considerada um isotônico natural, provoca graves problemas de geração de lixo nas grandes cidades, uma vez que a água de coco representa entre 20% e 25% do peso total do fruto e a casca pode demorar até oito anos para se decompor. Um copo de 250 mL de água de coco gera mais de um quilo de lixo (Aragão, 2002).

A conversão de biomassa lignocelulósica em etanol envolve, basicamente, quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise dos polissacarídeos contidos no material em açúcares, fermentação destes açúcares a etanol e destilação para recuperação do etanol. O pré-tratamento é uma importante etapa do processo de conversão da celulose, sendo necessário para alterar a estrutura da biomassa, tornando as moléculas de celulose mais acessíveis às enzimas que convertem os polímeros em açúcares fermentescíveis (Mosier *et al.*, 2005).

Diante dessa conjuntura, este trabalho visa contribuir para diminuição de impactos ambientais nas grandes cidades, diminuindo o descarte de resíduos da agroindústria do coco, mostrando, também, a importância da agregação de valor a esta cadeia produtiva e revelando a capacidade da fibra da casca do coco verde como mais uma alternativa para a produção de etanol 2G.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Pré-tratamento

Devido à eficácia comprovada na literatura em outros materiais lignocelulósicos, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar, este trabalho estudou dois tipos de pré-tratamento químico, o ácido e o alcalino, utilizando água, ácido sulfúrico (H_2SO_4) e hidróxido de sódio (NaOH) como reagentes.

No processo de pré-tratamento, aproximadamente 5 g de amostra de fibra da casca do coco verde foram misturadas a 100 mL de solução (água, ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio). Para cada reagente químico foi elaborado um planejamento experimental 2^2 , com três repetições no ponto central. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL, autoclavados à 121°C e 1 atm, variando concentração do reagente e o tempo de reação, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições experimentais do planejamento 2^2 do pré-tratamento ácido e alcalino

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração (% m/V)	0	5	10
Tempo (min)	20	40	60

Após o período de reação e despressurização da autoclave, ocorreu a separação das frações líquida e sólida por filtração. Do líquido, foram analisadas a quantidade de açúcares liberados, medido em açúcares redutores totais (ART) e o teste de capacidade fermentativa. A parte sólida foi lavada com água destilada à temperatura ambiente até que o líquido residual chegasse a pH neutro, sendo o resíduo, então, colocado para secagem em estufa à 50°C até massa constante. Este material será processado na hidrólise enzimática para quebra da celulose e, conseqüentemente, produzir monômeros de glicose, os quais serão fermentados.

As análises de ART foram obtidas por espectrofotometria, através do método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) proposto por Miller (1959).

Ao final de cada pré-tratamento foi calculado o rendimento mássico, a partir Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (1)$$

onde:

m_{inicial} = massa inicial seca submetida ao pré-tratamento (g)

m_{final} = massa final seca após lavagem até a neutralidade (g).

2.2. Destoxificação

Com o propósito de reduzir a concentração de substâncias tóxicas no processo fermentativo, empregou-se o procedimento de destoxificação da fração líquida resultante do pré-tratamento. A destoxificação foi elaborada de acordo com metodologia descrita por de Marton (2002) citado por Fugita (2010). Nesta etapa, realizada em incubadora tipo shaker, utilizou-se carvão ativo 1% (p/v) como agente adsorvente, durante 30 minutos e 50°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas para separação do sobrenadante do precipitado.

Segundo Fugita (2010), para o sucesso do processo de destoxificação, é necessário o ajuste do pH do hidrolisado. Então, as amostras provenientes dos pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino tiveram seu pH ajustado para 4,0, adicionando ácido fosfórico (H_3PO_4), enquanto que as do pré-tratamento ácido foram ajustadas para pH 7,0, pela adição de cal virgem (CaO), seguida de decaimento até pH 4,0, utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4).

2.3. Capacidade fermentativa

Para estimar a capacidade fermentativa, o líquido resultante da destoxificação de cada ensaio de pré-tratamento foi submetido ao teste de metabolização dos carboidratos, principalmente xilose e glicose, pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos.

O procedimento fermentativo se iniciou com a suplementação do hidrolisado por sulfato de amônio (0,1 g/L) e fosfato de potássio (0,1 g/L). As leveduras foram suspensas em água destilada estéril de forma a se obter uma absorbância de 0,626 em 540 nm, o que representa concentração de células na ordem de 10^6 cél/mL. Em cada tubo de ensaio, o material inoculado foi composto de 4,5 mL da amostra hidrolisada, 1 mL da solução de suplementação e 0,1 mL da solução de fermento. Para cada amostra, foram realizados dois ensaios de fermentação, um com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial e outro com a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do pré-tratamento foi baseada na quantidade de açúcares liberados na fração líquida do pré-tratamento, medida em ART (g ART/100 g de biomassa) e no rendimento mássico.

Para cada reagente foi realizado um planejamento experimental 2², com triplicata no ponto central, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados do planejamento experimental para o pré-tratamento ácido.

H ₂ SO ₄ (% m/V)	Tempo (min)	ART (g/100 g)	Rendimento mássico (%)
0	20	28,39 ± 1,34	62,20 ± 3,20
10	20	25,80 ± 1,86	49,63 ± 1,86
0	60	26,35 ± 0,38	62,79 ± 2,84
10	60	23,88 ± 2,55	49,75 ± 2,34
5	40	33,40 ± 1,05	50,35 ± 2,10
5	40	36,32 ± 3,29	49,65 ± 2,46
5	40	34,29 ± 1,71	50,15 ± 3,40

Tabela 3 – Resultados do planejamento experimental para o pré-tratamento alcalino.

NaOH (% m/V)	Tempo (min)	ART (g/100 g)	Rendimento mássico (%)
0	20	28,39 ± 1,34	62,20 ± 3,20
10	20	36,08 ± 3,61	28,29 ± 2,90
0	60	26,35 ± 0,38	62,79 ± 2,84
10	60	32,44 ± 4,64	27,38 ± 1,50
5	40	45,10 ± 1,56	24,79 ± 1,70
5	40	45,86 ± 4,87	25,69 ± 2,56
5	40	43,21 ± 4,17	26,48 ± 2,24

Observa-se que as condições que apresentaram maior quantidade de açúcares produzidos na fração líquida, tanto para o pré-tratamento ácido quanto o alcalino, foram as do ponto central, ou seja 5% (m/v) do agente químico, durante o período de reação de 40 minutos, obtendo concentrações médias, respectivamente, de 34,67 e 44,72 g/100 g de biomassa *in natura*.

Com relação aos resultados dos rendimentos mássicos, nota-se que a maior perda de massa aconteceu no pré-tratamento alcalino, alcançando valores superiores a 75%, os quais apresentam valores superiores aos encontrados por Nascimento (2011), que obteve 60% de perda de massa para o bagaço de cana-de-açúcar, utilizando 4% de concentração de NaOH. A Figura 1 compara os valores médios da perda de massa para os pré-tratamentos ácido e alcalino.

A análise estatística dos planejamentos fatoriais apresenta, nas Figuras 2 e 3, os gráficos de Pareto e as superfícies de resposta dos modelos que melhor se ajustaram aos resultados obtidos. Na Tabela 4 são mostrados os coeficientes de regressão e correlação, bem como os erros padrão dos planejamentos experimentais, considerando-se 5% de significância.

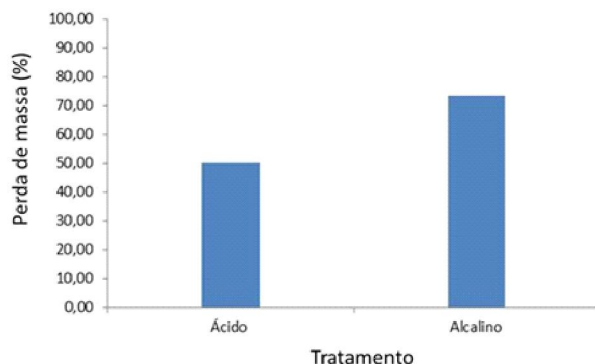


Figura 1 – Valores médios da perda de massa dos pré-tratamentos ácido e alcalino.

Para ambos pré-tratamentos, a variável significativa foi a concentração do reagente, em um efeito negativo e quadrático. Para o tratamento alcalino, o efeito linear e positivo da concentração também apresentou significância ao nível de 95% de confiabilidade. O tempo e a interação das variáveis analisadas não influenciaram significativamente o processo de sacarificação nos pré-tratamentos ácido e alcalino.

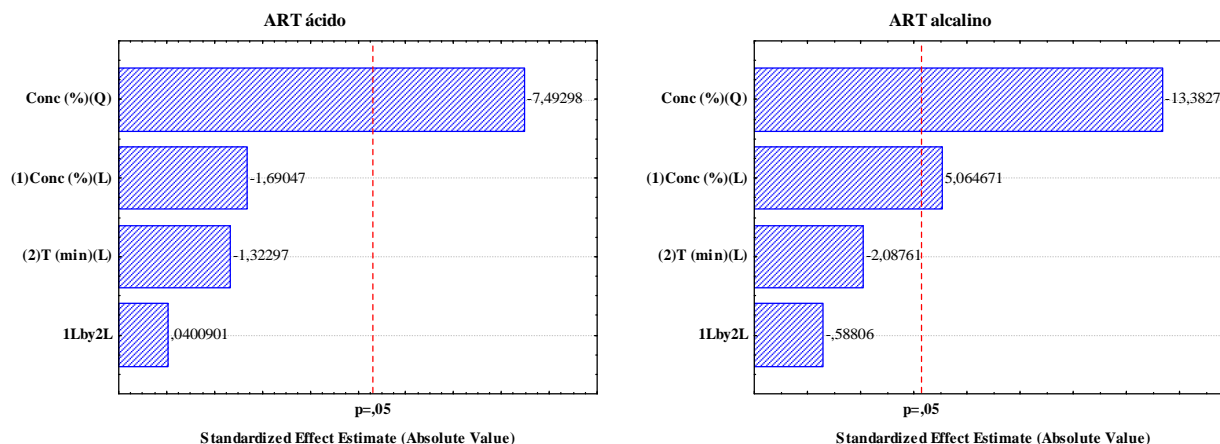


Figura 2 – Gráficos de Pareto para os pré-tratamentos ácido e alcalino.

Nas superfícies obtidas, percebe-se que a maior liberação de açúcares ocorreu na concentração média analisada, independentemente do tempo de pré-tratamento à 121°C. Os valores extremos de concentração e tempo, dentro da faixa estudada, influenciaram negativamente a liberação dos açúcares.

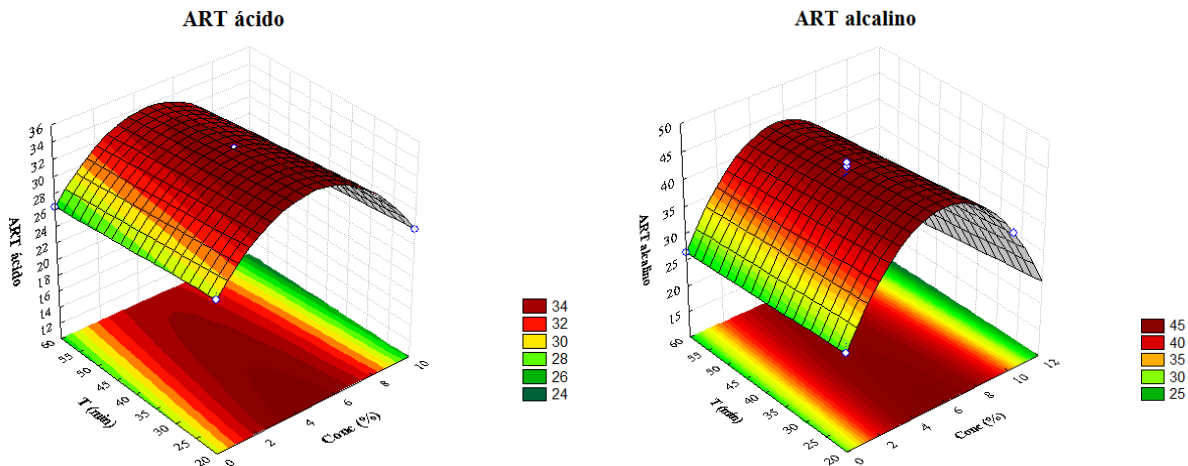


Figura 3 – Perfil das superfícies dos pré-tratamentos ácido e alcalino.

Tabela 4 – Coeficientes de regressão e erros padrão do planejamento fatorial.

Tratamento	Variáveis	Efeito	R ²	Erro padrão	t (2)	p-valor
ácido	Média *	29,41000	0,96813	2,366379	12,42827	0,006412
	Conc. (%) (L) *	3,16100		0,566615	5,57875	0,030661
	Conc. (%) (Q) *	-0,34260		0,045723	-7,49298	0,017349
	T (min) (L)	-0,05100		0,052914	-0,96383	0,436825
	Conc. x T	0,00030		0,007483	0,04009	0,971663
alcalino	Média *	29,41000	0,99054	2,150988	13,6728	0,005307
	Conc. (%) (L) *	6,41100		0,515041	12,4476	0,006392
	Conc. (%) (Q) *	-0,55620		0,041561	-13,3827	0,005537
	T (min) (L)	-0,05100		0,048098	-1,0603	0,400114
	Conc. x T	-0,00400		0,006802	-0,5881	0,616050

* fatores estatisticamente significativos (95% confiança)

O teste de capacidade fermentativa foi avaliado através da formação de gás no interior dos tubos de Durham, por 10 dias. Após este período, ficou evidenciado êxito na fermentação nos experimentos pré-tratados com 0 e 5% de ácido sulfúrico, ambos inoculados com a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, levedura capaz de fermentar pentoses (xilose) e hexoses (glicose).

Os ensaios de fermentação mostraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não conseguiu metabolizar nenhuma das amostras, evidenciando a forte presença de pentoses e baixa concentração ou total ausência de glicose na fração líquida pré-tratada.

4. CONCLUSÕES

Observou-se que a maior quantidade de açúcar liberado nos pré-tratamentos ácido e alcalino foi na condição de 5% de concentração do reagente, em 40 minutos, apresentando valores médios de 34, 67 e 44,72 g ART/100 g de biomassa *in natura*, respectivamente. O modelo estatístico que melhor representou os planejamentos experimentais investigados foi de segunda ordem, com a concentração do reagente sendo a variável significativa. As superfícies de resposta indicaram como maior sacarificação a faixa média de concentração aplicada e os coeficientes de regressão e ajuste de modelo, que uma variável não estudada no trabalho tem uma influência altamente significativa. No teste de capacidade fermentativa ficou evidenciado que a fração líquida apresenta elevada concentração de pentoses, pois não houve sucesso no processo fermentativo utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar do pré-tratamento alcalino ter apresentado maiores concentrações de açúcares comparadas as do ácido, é necessária a realização das etapas de hidrólise enzimática e fermentação para avaliar melhor qual tipo de pré-tratamento é o mais eficaz.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Processo No. 552595/2011-0 pelo auxílio financeiro.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por gentilmente ceder a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

5. REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, W. M.; CRUZ, E. M. O.; HELVÊCIO, J. S. *Caracterização morfológica do fruto e química da água de coco em cultivares de coqueiro anão*. Embrapa. Aracaju. 2002.
- BRÍGIDA, A. I. S. *Estudo da imobilização de lipase tipo B de Candida antártica utilizando fibra da casca de coco verde como suporte*. 2006. p.177. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- FUGITA, T. P. L. *Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana*. 2010. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Jaboticabal, 2010.
- MARTINS, C. R.; JÚNIOR, J. L. A.; *Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - panorama 2010. Documentos*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. ISSN 1517-1329
- MARTON, J. M. *Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção iotecnológica de xilitol*. 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Universidade de São Paulo, São Paulo, Lorena, 2002.
- MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOISER, N.; WYMAN, C.; DALE, P.; ELANDER, R.; LEE, Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresources Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.

NASCIMENTO, V. M. *Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros*. 2011. 136 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.