

# AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE GRAVIOLA VISANDO A OBTENÇÃO DE ETANOL 2G

C. E. F. SILVA<sup>1</sup>, I. C. C. SILVA<sup>2</sup>, G. N. S. B. GOIS<sup>2</sup>, R. M. R. G. ALMEIDA<sup>1,2</sup>, A. K. S. ABUD<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alagoas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Federal de Alagoas, Curso Engenharia Química, Centro de Tecnologia

<sup>3</sup> Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: eduardo.farias.ufal@gmail.com

**RESUMO** – A graviola se apresenta como uma das frutas de grande importância econômica para a fruticultura regional e cresce o seu aproveitamento pela agroindústria de polpas e sucos. O trabalho avalia a liberação de açúcares dos resíduos do processamento de graviola (*Annona muricata*) secos a 50-60°C, triturados a 30 mesh, pré-tratados com ácido sulfúrico (121°C e 1 atm) e hidrolisados com enzima celulase Sigma-Aldrich® (50°C, tampão citrato 50 mM e pH 4,8 por 96 horas, a 120 rpm, com relação biomassa/complexo enzimático (g/mL) de 1:2). Utilizou-se um planejamento experimental 2<sup>3</sup>, com triplicata no ponto central, tendo como variáveis o tempo e as concentrações de ácido e de biomassa. Conseguiu-se um resíduo com alto teor de carboidratos, com sacarificação da fração líquida do pré-tratamento gerando valores próximos a 30% e, da fração sólida, a 20%. Nenhum dos fatores avaliados no planejamento experimental foi significativo para a hidrólise enzimática, sugerindo que os tempos e concentrações de ácido digeriram bem a amostra.

## 1. INTRODUÇÃO

Na última década, o consumo de combustíveis renováveis praticamente dobrou no mundo, principalmente em relação ao bioetanol. O Brasil possui uma matriz energética voltada ao uso de energias renováveis, oriundas de hidrelétricas e da produção de bioetanol, bem como uma grande variedade de biomassas, muitas delas em forma de resíduos, cujo bioprocessamento tem um alto valor agregado, a exemplo do etanol de segunda geração, gerado a partir da quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal dos resíduos lignocelulósicos. Estima-se que a viabilização de tecnologias que utilizem a biomassa para produção de etanol de segunda geração representa uma alternativa ao aumento significativo na produção de bioetanol e atendimento à crescente demanda por esse biocombustível (Ramos, 2000; Pitarello *et al.*, 2012).

O estudo de fontes complementares de utilização de biomassa lignocelulósica, principalmente resíduos, como complementação à matriz energética, mesmo sabendo que nenhum resíduo de

biomassa atualmente processada pela indústria é tão abundante e com maiores chances à prospecção quanto o bagaço de cana, vem sendo desenvolvido por Universidades e centros de pesquisa em todo mundo.

Os materiais celulósicos naturais precisam ser submetidos a um pré-tratamento para que a biomassa celulósica se torne suscetível à ação das enzimas, representando uma etapa imprescindível na rota de produção, pois separa a matriz de lignina, reduz a cristalinidade da celulose, aumenta a fração amorfa da mesma e solubiliza a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose para que a mesma fique mais acessível às hidrólises biológicas e químicas (Sarkar *et al.*, 2012).

Para ser considerado eficaz, o pré-tratamento deve diminuir o grau de polimerização das moléculas de celulose, de forma que se tornem acessíveis ao processo de hidrólise enzimática, evitando a formação de subprodutos inibidores a estes processos e à fermentação e, principalmente, ser economicamente viável. Esta etapa irá influenciar diretamente os rendimentos de glicose durante a hidrólise enzimática do material, onde uma boa eficiência minimizará os custos envolvidos na aquisição de enzimas, viabilizando o processo (Alzate *et al.*, 2006).

O pré-tratamento ácido é realizado com a finalidade de romper a estrutura lignocelulósica por meio da solubilização da hemicelulose no meio ácido, o que promoverá um aumento da digestibilidade da celulose nas etapas posteriores. O tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) permite uma elevada reatividade da fibra celulósica, apresentando cerca de 90% de digestibilidade da mesma ao ataque enzimático (Baudel, 2006).

A hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens, sendo opção promissora em termos de custo global em virtude de se obter bons rendimentos glicosídicos e, também, ao crescente desenvolvimento de técnicas modernas de microbiologia e engenharia genética que podem tornar o processo viável, tornando a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica competitiva com as demais rotas de produção. Nessa etapa, as enzimas digerem a parede celular vegetal, liberando os açúcares hexoses e pentoses que serão convertidos posteriormente em etanol pelas leveduras durante a fermentação (Sun e Cheng, 2002).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, a exemplo da concentração de substrato, da atividade da celulase e das condições da reação (temperatura, pH, entre outros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulasas (Sun e Cheng, 2002).

Este trabalho busca avaliar as condições de pré-tratamento ácido e de hidrólise enzimática dos resíduos de graviola no processo de sacarificação desta biomassa, avaliando a possibilidade de uso como alternativa à produção de etanol de segunda geração.

A graviola (*Annona muricata*) é uma fruta da família das anonáceas, de grande importância econômica na fruticultura do Nordeste. Seus frutos são destinados na quase totalidade à agroindústria, para a produção de polpa, suco, néctar, sorvetes, etc., tendo, também, a possibilidade de uso na indústria farmacêutica e cosmética. Seus resíduos somam 30 a 40% do peso total do fruto e têm como

destino principal a ração animal (Franzao e Melo, 2014). O grande problema é o seu armazenamento, pois devido à alta umidade são passíveis de fermentação, mau cheiro e atração de insetos e roedores.

## 2. METODOLOGIA

Após a extração do suco/polpa na unidade produtora, o resíduo foi coletado e sanitizado com hipoclorito de sódio a 100 ppm durante 15 min. A etapa seguinte foi a secagem em estufa de circulação forçada de ar a 50-60°C até peso constante, sendo posteriormente triturado em moinho de facas tipo Wylle, em peneira de 30 mesh, visando uma granulometria uniforme e propícia ao ataque químico. O resíduo foi acondicionado em frascos plásticos herméticos à temperatura ambiente.

Utilizou-se a metodologia de superfície de resposta para verificar a melhor eficiência da hidrólise e a percentagem de açúcares solúveis extraído. Como parâmetros independentes, tiveram-se a concentração de ácido sulfúrico (1 a 5 mL ácido/100 mL), a concentração biomassa (1 a 9 g resíduo/100 mL de solução ácida) e o tempo de aquecimento (15 a 120 min).

Para a determinação de açúcares redutores totais (ART) foi utilizado o método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito segundo Miller (1959), realizando-se tratamento em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,5 M, em banho fervente por 30 min, com agitação ocasional para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não redutores.

Para etapa de pré-tratamento, as condições ambientais foram 121°C e 1 atm, monitoradas em autoclave. A eficiência de hidrólise em ART (açúcares redutores totais) foi calculada pela Equação 1.

$$Eficiência (\%) = 100 \frac{C_{ART}}{C_{biomassa}} \quad (1)$$

O experimento foi baseado no planejamento fatorial simples, com repetição nos pontos centrais, sendo codificado 3 níveis para cada variável, -1, 0, +1. As quantidades referentes às variáveis codificadas são apresentadas na Tabela 1. Para análise dos resultados foi utilizado o software Statistica® 7, do qual foram obtidos os gráficos de Pareto para cada variável dependente do modelo linear/quadrático com o efeito do tempo.

Tabela 1 - Matriz do planejamento com repetições no ponto central

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Tempo</b>	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0
<b>(min)</b>	(15)	(120)	(15)	(120)	(15)	(120)	(15)	(120)	(67,5)	(67,5)	(67,5)
<b>C ácido</b>	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	0	0	0
<b>(mL/100 mL)</b>	(1)	(1)	(1)	(1)	(5)	(5)	(5)	(5)	(3)	(3)	(3)
<b>C biomassa</b>	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0	0	0
<b>(g/100 mL)</b>	(1)	(1)	(9)	(9)	-1 (1)	-1 (1)	(9)	(9)	(5)	(5)	(5)

A hidrólise enzimática, realizada na biomassa pré-tratada, ocorreu em frascos Erlenmeyer de

100 mL, na presença do 0,5 g de resíduo, 30 mL tampão citrato (pH 4,8) e 1 mL da enzima celulase de *Aspergillus spp.* SIGMA-ALDRICH®, com reação em banho Dubnoff a 48°C e 120 rpm durante 96 horas, sendo coletadas amostras a cada 24 horas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A secagem do resíduo durou cerca de 20 horas e, após a trituração no moinho de facas, obteve-se uma farinha homogênea com um diâmetro de passagem de 30 mesh. Percebeu-se na caracterização físico-química um elevado teor de carboidratos e fibras (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização físico-química da farinha do resíduo de graviola.

Analises	Resíduo de graviola
Fibra (%)	9,78 ± 3,87
Umidade (%)	9,69 ± 0,38
Cinzas (%)	3,50 ± 0,40
Proteína (%)	7,37 ± 0,02
Lipídeos (%)	3,20 ± 0,07
Carboidratos (%)	66,46
Pectina (%)	9,75 ± 1,25

Na Tabela 3 são apresentados os dados de sacarificação durante o pré-tratamento ácido e a hidrólise enzimática. Perceberam-se altos valores, com uma média global em torno de 50% de sacarificação, majoritariamente dos teores de hemicelulose e celulose, bem como outros açúcares. Comparando-se com a caracterização físico-química do resíduo, que gerou um total de 66,46% em massa seca de carboidratos (Tabela 2), os resultados mostraram bastante significativos.

Tabela 3 – Sacarificação do pré-tratamento ácido e da hidrólise enzimática.

Ensaio	Açúcar liberado (%)		
	Pré-tratamento	Hidrólise Enzimática	Total
1	30,41	8,68	39,09
2	36,84	11,54	48,38
3	29,54	31,33	60,87
4	35,86	16,05	51,91
5	32,78	23,43	56,21
6	21,05	12,06	33,11
7	25,67	19,09	44,76
8	20,87	14,58	35,45
9	30,17	16,66	46,83
10	27,96	17,01	44,97
11	31,17	17,62	48,79

A sacarificação indica que o pré-tratamento pode ter sido muito agressivo, pois, segundo

Pereira *et al.* (2008), os subprodutos da graviola possuem cerca de 13,5% de hemicelulose, 21% de celulose e 12,90% de lignina, sugerindo que, provavelmente, o conteúdo a mais liberado na fração líquida do pré-tratamento possa ser devido à presença de outras fibras e substâncias solúveis, como a pectina, determinada nesse trabalho, a qual se obteve valor em torno de 10%.

A hidrólise enzimática foi acompanhada durante 96 horas (Figura 1), com coletas diárias para verificar o melhor tempo de hidrólise, e foi notado que, para a maioria dos casos, em 24 horas se obteve grande parte da sacarificação. Ainda que apresentasse uma hidrólise crescente, a diferença entre os resultados obtidos no primeiro dia e nos outros três subseqüentes não foram muito significativas, à exceção dos experimentos 3, 5 e 7. Lavorente *et al.* (2011), hidrolisando cascas de eucalipto, utilizaram 24 horas de hidrólise com celulasas comerciais e obtiveram rendimentos entre 10 e 60%.

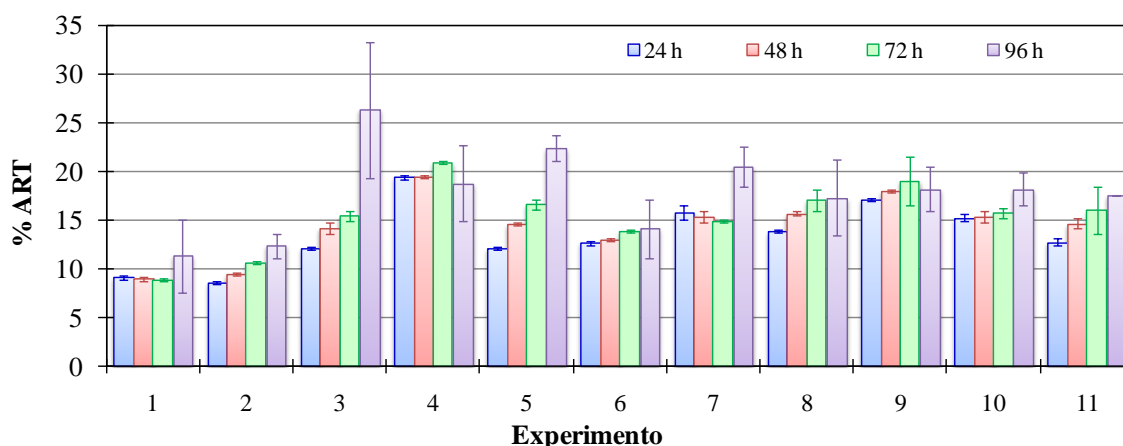


Figura 1 – Hidrólise enzimática dos ensaios ao longo de 96 h.

A análise estatística indicou que não houve significância de nenhum dos fatores analisados na hidrólise enzimática da biomassa, apesar do tempo ter apresentado influência negativa e a concentração da biomassa positiva. Isto leva a crer que a biomassa foi digerida suficientemente em todos os casos do planejamento, não apresentando diferença significativa entre as condições analisadas, como mostra a Figura 2.

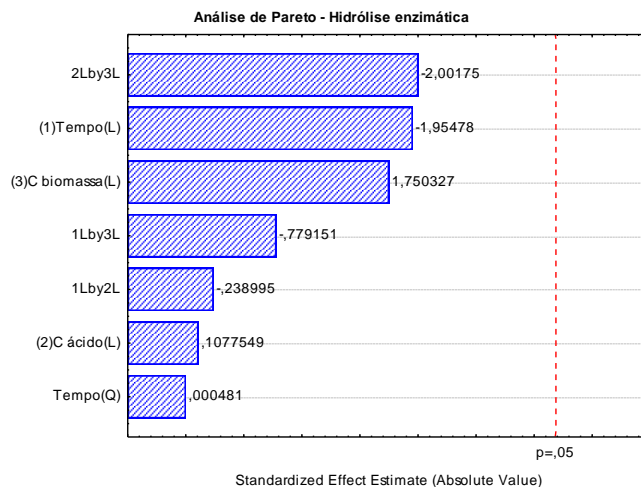


Figura 2 - Gráfico de Pareto para a hidrólise enzimática do planejamento analisado.

Na Tabela 4 estão os parâmetros estatísticos obtidos para a hidrólise enzimática dos resíduos de graviola, os quais mostram que o fator tempo de pré-tratamento teve uma influencia negativa, tanto linear (L) quanto quadrático (Q), enquanto que as concentrações do ácido e da biomassa tiveram efeito linear (L) positivo, apesar da sacarificação no pré-tratamento ter sido elevada. As interações lineares entre as variáveis também apresentaram efeito negativo. O ajuste do sistema não apresentou boa correlação ( $R^2 = 0,79406$ ) e, também, indicou o efeito significativo e positivo de alguma outra variável não analisada no presente estudo.

Tabela 4 – Parâmetros estatísticos da análise de variância para a hidrólise enzimática da biomassa.

	Soma dos quadrados	Coefficientes regressão	Efeito	F	p-valor	Erro padrão	t(3)
Média geral*	-	17,097	17,096	-	0,01027	2,9552	5,7853
(1) Tempo (L)	100,1112	-3,537	-7,075	3,8212	0,14559	1,8097	-1,9548
Tempo (Q)	0,0000	-0,0017	0,002	0,0000	0,99965	3,4652	-0,0005
(2) C ácido (L)	0,3042	0,1950	0,390	0,0116	0,92099	1,8097	0,1077
(3) C biomassa(L)	80,2645	3,1675	6,335	3,0636	0,17837	1,8097	1,7503
1 L x 2 L	1,4964	-0,4325	-0,865	0,0571	0,82651	1,8097	-0,2390
1 L x 3 L	15,9048	-1,4100	-2,820	0,6071	0,49271	1,8097	-0,7791
2 L x 3 L	104,9801	-3,6225	-7,245	4,0070	0,13909	1,8097	-2,0017

\* fator estatisticamente significativo (95% confiança)

O trabalho verificou apenas as quantidades sacarificadas em açúcares redutores totais a partir da fração líquida do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da fração sólida. Estudos mais detalhados poderiam mostrar a composição exata em termos de hexoses e pentoses, além dos teores de lignina da fração sólida. Pelos resultados pode ser que a concentração do ácido mesmo baixa, em 1% (m/V) tenha sido muito severa para o pré-tratamento, ou talvez ele não seja o mais eficaz para preservar os açúcares de interesse. Segundo Cortez, 2010, o fato dos resíduos agroindustriais possuírem baixo teor

de lignina, o tratamento alcalino diluído seria mais apropriado e se poderia obter alto teor de recuperação de açúcar e não formaria tantos inibidores quanto o ácido.

#### **4. CONCLUSÕES**

Conseguiu-se um resíduo com alto teor de carboidratos. A sacarificação da fração líquida do pré-tratamento gerou valores médios de 30% e, da fração sólida (hidrólise enzimática) de 20%. Percebeu-se que nenhum dos fatores avaliados no planejamento experimental foi significativo para a hidrólise enzimática, provavelmente porque os tempos e concentrações de ácido digeriram bem a amostra, sugerindo até mesmo uma severidade desnecessária em parte do processo, corroborando para a utilização de intervalo de tempo menor, 15 min, e concentração de ácido também menor, em torno de 1% (m/V), podendo-se utilizar uma maior concentração de biomassa, 9% (m/V). Menciona-se que 1% de ácido pode, ainda, ser elevado, devendo-se, em estudos posteriores, testar concentrações mais baixas.

#### **5. REFERÊNCIAS**

- ALZATE, C.; TORO, A. C; SÁNCHEZ O. J. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy*, v. 31, p. 2447-2459, 2006.
- BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M.; ZACCHI, G. Direct catalytic hydrogenation of bioethanol from sugarcane bagasse effluents over Ru/C catalyst: an eco-efficient environmentally friendly approach. In: XX Simpósio Ibero-Americano de Catálise, Gramado/ RS. Anais XX SICAT, 2006.
- CORTEZ, L. A. B. *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: Editora Blucher, 2010.
- FRANZAO, A. A.; MELO, B. *Cultura das Anonaceas: Graviola*. Portal do Nucleo de Estudos em Fruticultura do Cerrado. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/anonaceas.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2014.
- LAVORENTE, G. B.; SILVA, H. K. P.; LIMA, M.; POLIKARPOV, I.; BRAGATTO, J.; LABATE, C. A. Hidrólise Enzimática de Cascas de Eucalipto. In: 4º BIOCOM, Rio de Janeiro, 2011.
- MILLER, G. L., 1959, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, 31( 3), 426-428.
- PEREIRA, L. G. R.; BARREIROS, D. C.; OLIVEIRA, L.S.; FERREIRA, A. L.; MAURICIO, R. M.; AZEVEDO, J. A. G.; FIGUEIREDO, M. P.; SOUSA, L. F.; CRUZ, P. G.. Composição química e cinética de fermentação ruminal de subprodutos de frutas no sul da Bahia. *Live Stock for Rural Development*, v. 20, n. 1, 2008.
- PITARELO, A. P.; SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; RAMOS, L. P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 35, n. 8, p.1502-1509, 2012.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. In: Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclagem de Resíduos Sólidos Industriais. São Paulo, SP: Cetesb, SP, 2000.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.