**INFLUÊNCIA DOS EXTRATIVOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALMA FORRAGEIRA**

**Diego Ribeiro do Amaral** *​*​**[[1]](#footnote-1)**​**; Bárbara Ribeiro Alves Alencar 2**​ ​**; Emmanuel Damilano Dutra 1**

1Grupo de Pesquisa em Energia da Biomassa, CTG, UFPE, PE, Brasil

2Grupo de Engenharia Metabólica, CB, UFPE, PE, Brasil

diego.ramaral@ufpe.br

**Resumo**

Biocombustíveis, como etanol, podem substituir diretamente combustíveis fósseis. Para obter etanol, diversas biomassas são analisadas. No Nordeste brasileiro, tem-se avaliado biomassas de climas áridos e semiáridos, por requererem menos água para cultivo. Em Pernambuco, 85% da área possui clima semiárido, escassez de água e altas temperaturas, limitando a área produtiva para biocombustíveis. A palma forrageira possui eficiência no uso da água e resistência à irregularidade das chuvas, além de alto teor de celulose (25-35%) e hemicelulose (9-15%), e baixo percentual de lignina (2-7%). Estas características químicas favorecem a hidrólise enzimática, possibilitando a eliminação de pré-tratamento químico. O teor de extrativos varia entre 25-35%. Este trabalho avalia como os extrativos influenciam a hidrólise, analisando diferentes métodos de extração. Os cladódios foram lavados, secos a 105°C e triturados em moinho a 10 mesh. Amostras de 5g de biomassa foram submetidas a extrações com 250mL de um dos solventes: (1) água, (2) etanol e (3) ciclo-hexano/etanol (1:1), em equipamento Soxler, durante 8h. A extração com água foi a mais eficiente. A hidrólise enzimática utilizou o complexo Celluclast® 1.5L (Novozymes). Amostras submetidas à 5h de extração apresentaram teor de extrativos semelhante às submetidas por 8h, indicando possível redução do tempo de reação. Os valores de celulose, hemicelulose e lignina foram de 10,57%, 15,40% e 5,67% respectivamente. A maior eficiência de hidrólise foi da amostra com 1h de extração, 16,46% de extrativos, com 26,75% de ART convertidos. Portanto, conclui-se que não há influência dos extrativos da palma forrageira na hidrólise enzimática.

PALAVRAS-CHAVE: otimização; etanol; biomassa; zonas secas. ​

# Introdução

Considerando os impactos ambientais e a finitude dos recursos fósseis, a pesquisa voltada à obtenção e uso combustíveis renováveis é relevante. O uso de biocombustíveis, é uma alternativa que é debatida desde antes da crise do petróleo de 1970, o que impulsionou a busca por fontes renováveis.

Um dos mais importantes biocombustíveis produzidos no mundo, atualmente, é o etanol, No Brasil, a principal biomassa associada à essa produção é a cana-de-açúcar. Porém, a produção deste vegetal requer grandes volumes de água. Cerca de 10% do país está inserido em regiões semiáridas, onde a cana não pode ser plantada sem auxílio de tecnologias que necessitem de alto investimento financeiro. No Nordeste, este percentual representa 48% [7], e em Pernambuco, para 85%. Deste modo, o desenvolvimento de tecnologias viáveis, em biomassas mais adaptada ao clima pernambucano, para a obtenção de etanol de segunda geração(2G) é almejada.

O etanol 2G é quimicamente idêntico ao etanol comum, diferenciando-se apenas por se originar de biomassa lignocelulósica. Ao se utilizar carboidratos estruturais, como hemicelulose e celulose, para conversão em combustível, surge a necessidade de etapas adicionais, como o pré-tratamento e hidrólise enzimática. A primeira tem, por função, tornar os carboidratos estruturais mais acessíveis às moléculas (enzimas, ácidos...) que os converterão em monossacarídeos, principalmente a glicose. Por essa razão o etanol 2G ainda não é economicamente competitivo [3].

Para diminuir os custos de produção, busca-se diminuir o uso de recursos como água, reagentes e energia no processo global. Ao mesmo tempo, é interessante pensar em biomassas adequadas aos climas locais. A palma forrageira é uma planta cultivável em climas semiáridos, e, consequentemente, apresenta alta eficiência no consumo de água [5]. A planta possui alto teor de celulose (25-35%) e hemicelulose (9-15%) e baixos teores de lignina (2-7%) fatores que favorecem a hidrólise enzimática. Ademais, pesquisas anteriores mostraram que a etapa de pré-tratamento não é necessária para convertê-la em etanol [1][4][6]. O teor de extrativos da palma forrageira também é alto, variando entre 25-35% [1][6], o que torna relevante o entendimento dos efeitos dessa fração sobre as reações químicas realizadas.

Desta forma, este projeto analisa os efeitos dos extrativos da palma forrageira nos rendimentos da hidrólise enzimática.

# Metodologia

1. *Amostras de palma forrageira*

As variedades de palma forrageira foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA – Caruaru – PE). Os cladódios da variedade Orelha de Elefante Mexicana foram lavados com água destilada, para retirada de solo e impurezas, e cortados em cubos. Parte foi seca em estufa a 105°C, durante 48h, triturada em moinho e peneirada a uma granulometria de 10 *mesh* (2 mm).

1. *Caracterização química da palma forrageira*

As amostras foram caracterizadas conforme o método descrito por Van Soest (1963) [8].

1. *Diferentes solventes para determinação dos extrativos (água, etanol e ciclo-hexano)*

Em acordo com a norma Tappi T204 cm-97, 5g de biomassa seca de palma forrageira, foram transferidos para cartucho feito de papel de filtro qualitativo (14 x 4 cm), e submetidos à extração com 3 diferentes solventes, em Soxhlet®. Uma parte das amostras sofreu extração com 250 mL de solução 1:1 de ciclo-hexano/etanol (95%) durante 8h. Outra parte sofreu extração com 250 mL de etanol 95% e uma terceira parte com 250 mL de água (Tappi T207 cm-99), ambas também por 8h.

1. *Influência do teor de extrativos na hidrólise enzimática*

Foram estabelecidos tempos de extração para o melhor solvente, identificado na fase anterior, para atingir teores de extrativos relativos a tempos de extração de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e 7h. Estas amostras foram posteriormente submetidas a hidrólise enzimática.

Uma carga de 10% m/V de biomassa seca, de palma forrageira, foi submetida à hidrólise enzimática, durante 48h, a 50°C, 150 rpm, em tampão citrato 50mM (pH 4,8), em mesa incubadora rotativa. Foi aplicada uma carga enzimática de 10 FPU/g de biomassa, do complexo enzimático Celluclast® 1.5L (Novozymes). Posteriormente, o hidrolisado enzimático foi filtrado em papel de filtro qualitativo, devidamente tarado. A eficiência da hidrólise enzimática foi determinada conforme Equação 3.

$h=\left(\frac{∆c}{CS\*Fc\*CC}\right)\*100$ Equação 1

Onde h corresponde a eficiência da hidrólise enzimática (%), Δc é a variação da concentração inicial e final da etapa de hidrólise (g/L), CS a carga de sólidos aplicada ao sistema (g/L), Fc é o fator de conversão e CC é o percentual de celulose e hemicelulose na biomassa.

# Resultados e Discussões

Ao realizar as extrações com os solventes água, etanol e ciclo-hexano/etanol (1:1), observou-se que a água apresenta maior poder de remoção de extrativos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de extrativos removido através das soluções de água, etanol e ciclohexano/etanol, em 8h

|  |  |
| --- | --- |
| **Solvente** | **Extrativos (%)** |
| Água  | 50,59 ± 3,36 |
| Etanol | 18,70 ± 2,30 |
| Ciclohexano/etanol  | 18,52 ± 1,02 |

Este resultado foi associado ao fato da temperatura de ebulição da água (100°C) ser maior que a do etanol (78°C) e do ciclo-hexano (81°C). Com o aumento da temperatura, a matéria solúvel é mais facilmente removida. Portanto, a água foi utilizada como solução extratora para a obtenção de amostras com diferentes teores de extrativos. Os resultados das extrações realizadas, em períodos de 1h à 7h, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Cinética do percentual de extrativos removidos pela solução água

|  |  |
| --- | --- |
| **Tempo de Extração (h)** | **Extrativos (%)** |
| 1 | 16,46 |
| 2 | 29,33 |
| 3 | 34,59 |
| 4 | 41,89 |
| 5 | 50,76 |
| 6 | 56,24 |
| 7 | 47,90 |

É possível notar que a partir de 5h de extração, o percentual de massa removida não apresenta aumento significativo. Conclui-se que a etapa de extração pode ser reduzida em três horas, refletindo em menor consumo energético.

A representação gráfica dos valores da Tabela 2 revela uma dependência, parabólica do teor de extrativos com o tempo de reação, com uma estabilização a partir da marca de 5h (Figura 1).

 

**Figura 1.** Relação entre o percentual de remoção de extrativos da biomassa e tempo de extração, usando água.

A caracterização química da biomassa (Tabela 3) apontou teores de hemicelulose e lignina compatíveis com os valores esperados (15,4% e 5,67%, respectivamente), porém o percentual de celulose (10,57%) foi mais baixo do que o obtido por Alencar et al. (2011) (28,51%) possivelmente devido à maturidade da planta. Outros fatores podem influenciar os teores desses componentes, como a espécie de palma forrageira, as condições de cultivo e as metodologias [1].

**Tabela 3.** Caracterização química da biomassa após a remoção dos extrativos pela água

|  |  |
| --- | --- |
| **Compostos** | **Percentual (%)** |
| Celulose | 10,57 ± 1,95 |
| Hemicelulose | 15,40 ± 0,15 |
| Lignina | 5,67 ± 0,10 |

Após a hidrólise das amostras, com diferentes valores de extrativos, utilizando a concentração de celulose e hemicelusose da biomassa, e considerando que a carga de sólidos aplicada ao sistema foi de 100 g/L, foi possível calcular a eficiência da conversão dos carboidratos fibrosos em açúcares redutores (AR) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Relação entre a eficiência da hidrólise enzimática e o percentual de extrativos

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| T (h) | Ex(%) | CF(g/L) | CG(g/L) | Ef (%) |
| **1** | 16,46 | 31,09 | 9,23 | 26,75 |
| **2** | 29,33 | 36,75 | 9,17 | 22,47 |
| **3** | 34,59 | 39,70 | 11,03 | 25,02 |
| **4** | 41,89 | 44,69 | 9,04 | 18,22 |
| **5** | 50,76 | 52,74 | 13,21 | 22,56 |
| **6** | 56,24 | 59,35 | 15,19 | 23,06 |
| **7** | 47,90 | 49,84 | 13,40 | 24,22 |

T – Tempo de extração; Ex – Percentual de extrativos; CF – Carga de fibras; CG – Concentração de AR; Ef – Eficiência de hidrólise.

A maior eficiência de hidrólise está associada à biomassa que sofreu o menor tempo de extração. Deste modo, pode-se inferir que o aumento no percentual de remoção de extrativos não influencia positivamente a hidrólise enzimática. De fato, o que se observa é o efeito contrário, quanto maior o percentual de extração, menos eficiente é a hidrólise. Essa conclusão pode ser associada à presença de carboidratos solúveis na palma forrageira [1], que seriam removidos quanto maior a exposição da biomassa à solução extratora.

**Conclusões**

A água se mostrou mais eficiente na remoção de extrativos da palma forrageira, com o tempo de extração de 1h. No entanto, os resultados da hidrólise de diferentes amostras, com diferentes teores de extrativos mostrou que a presença desses componentes solúveis não possui efeito inibitório na conversão dos carboidratos fibrosos em AR. Os resultados sugerem que a exposição da biomassa à solução extratora, durante longos períodos é capaz de remover os carboidratos livres da biomassa de palma forrageira.

**Agradecimentos**

O projeto aqui descrito foi realizado com o apoio financeiro do CNPq e de outras naturezas da UFPE, da UPE e do IPA.

## Referências

1. ALENCAR, Bárbara Ribeiro Alves et al. **Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production**. Bioresource Technology, v. 250, p. 273-280, 2018.
2. ALVES, Rodrigo et al. **Produção de forragem pela palma após 19 anos sob diferentes intensidades de corte e espaçamentos**. Revista Caatinga, v. 20, n. 4, p. 38-44, 2007.
3. HUMBIRD, D. et al. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO., 2011.
4. KULOYO, Olukayode O. et al. **Opuntia ficus-indica cladodes as feedstock for ethanol production by Kluyveromyces marxianus and Saccharomyces cerevisiae**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 30, n. 12, p. 3173-3183, 2014.
5. MENEZES, R.S.C.; DUTRA, E.D.; SANTOS, T.N.; SILVA, A.B.; ALBUQUERQUE, D.A.R.; GONDIM, L.A.P.; PRADO, A.G.; SILVA, F.T.; SANTOS, D.C.; ABREU, C.A.M.; JUNIOR, M.A.M.; SIMÕES, D.A. **Potencial de produção de biocombustíveis a partir da biomassa de palma**. In: Congresso brasileiro de palma e outras cactáces, 2., 2011, Garanhuns. Anais. Garanhuns, 2011.
6. SANTOS, T. N. et al**. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas**. Biomass and Bioenergy, v. 85, p. 215-222, 2016.
7. SILVA, Laerte Marques et al. **Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio**. Ciência Rural, v. 44, n. 11, p. 2064-2071, 2014.
8. VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin, Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, n. 46, p. 829-835, 1963.
1. 1.Bolsista de IC e Graduando – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, diego.ramaral@ufpe.br. ​ ​2. Msc. – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, barbara.ribeiro.dbbs@gmail.com. ​3. Dr. – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, emmanuel.dutra@ufpe.br. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ [↑](#footnote-ref-1)