

Monografia de Graduação

PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUO DA CASCA DE ACEROLA VISANDO À PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

MARIA CAROLINA NEVES SILVA

Natal, 2023

MARIA CAROLINA NEVES SILVA

**PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUO DA CASCA DE ACEROLA
VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Campus Natal, como requisito obrigatório à obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios

Co-Orientadora: MSc. Juliene da Câmara Rocha

NATAL

2023

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Horácio Nicolas Solimo -- Engenharia

Química - EQ - CT

Silva, Maria Carolina Neves.

Produção de celulases a partir de resíduo da casca de acerola visando a produção de etanol celulósico / Maria Carolina Neves

Silva. - Natal: UFRN, 2023.

55f.: il.

Monografia (graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química. Natal, RN, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios.

MARIA CAROLINA NEVES SILVA

**PRODUÇÃO DE CELULASES A PARTIR DE RESÍDUO DA CASCA DE ACEROLA
VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Campus Natal, como requisito obrigatório à obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado:30/11/2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Nathalia Saraiva Rios (Orientadora)

MSc. Juliene da Câmara Rocha (Co-orientadora)

Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Profa. Dra. Liana Franco Padilha

**Dedico esse trabalho aos meus pais, pois
é graças aos seus esforços que hoje posso
concluir meu curso.**

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, por tornarem possível a realização do meu sonho de me tornar engenheira, sem eles eu nunca teria chegado tão longe.

Às minhas irmãs, que mesmo de longe nunca deixaram de me apoiar, não apenas durante o período de produção do TCC, mas desde sempre.

À minha orientadora, professora Dra. Nathália Rios, por todos os ensinamentos dentro e fora do laboratório, pela paciência, pela disponibilidade e principalmente por acreditar em mim quando eu mais precisei.

À minha coorientadora, irmã Catarina por todos os ensinamentos dentro do laboratório. Obrigada por todos os incentivos e toda confiança.

À toda equipe do Laboratório de Bioquímica, principalmente a João Pedro, Sandy, Waleska, Carlos, Victor, Marcos, Isabela, por toda ajuda e ensinamento durante esse processo.

À meu amigo Alysson Hebert por toda ajuda e motivação durante a produção desse trabalho.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de resíduo agrícola do mundo, sendo um deles o resíduo da acerola. Esse resíduo é formado principalmente por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e por macromoléculas aromáticas (lignina) tornando-o uma matéria-prima útil para microrganismos produtores de celulase e hemicelulase e, por consequência, um ótimo substrato para a produção de etanol de segunda geração. O presente estudo avaliou o potencial do resíduo da acerola, que foi submetido a um pré-tratamento com ácido sulfúrico 1% (v/v), na produção de enzimas celulolíticas a partir de um cultivo de fermentação em estado sólido (FES), utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei*, e o emprego do extrato enzimático na produção do etanol 2G a partir de um bioprocessamento consolidado. A caracterização físico-química do resíduo foi realizada antes e após o pré-tratamento, através da determinação da umidade, extraíveis, cinzas totais e teores de celulose, hemicelulose e lignina. Enquadrando a caracterização do extrato enzimático foi efetuada através da determinação da temperatura ótima, do melhor tampão para a extração e da estabilidade térmica. A atividade enzimática do extrato enzimático foi determinada por ensaios de atividade enzimática usando os substratos papel de filtro (FPase) e Carboximetilcelulose (CMCase). O pré-tratamento ácido resultou numa diminuição de mais de 90% na quantidade hemicelulose e uma diminuição de quase 15% no teor de lignina na amostra após o pré-tratamento com ácido. Foram encontradas atividades de 3,84 U_{CMC}/g para CMCase e de 3,29 UFP/g para FPase no cultivo de 24 horas utilizando o tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) com solvente de extração, em condições otimizadas. A produção do etanol lignocelulósico foi inibida, mas foram encontrados quantidade 8,26g/L de glicose ao final do processo. O resultado obtido no estudo mostra que o bagaço de acerola é um substrato viável para obtenção de celulases e açúcares fermentescíveis e esta pesquisa contribui para a exploração de uma utilização alternativa dos resíduos da acerola.

Palavras-chave: celulase, hidrólise da biomassa, etanol 2G, resíduo da acerola.

ABSTRACT

Brazil is one of the world's largest producers of agricultural waste, acerola residue being one. This residue, primarily composed of polysaccharides (cellulose and hemicellulose) and aromatic macromolecules (lignin), serves as a valuable raw material for cellulase and hemicellulase-producing microorganisms, thus an excellent substrate for second-generation ethanol production. This study assessed the potential of acerola waste, pre-treated with 1% sulfuric acid, in producing cellulolytic enzymes via solid-state fermentation using *Trichoderma reesei*, and the use of the enzymatic extract in 2G ethanol production through a consolidated bioprocess. The residue underwent physicochemical characterization before and after pre-treatment, measuring moisture, extractables, total ash, and levels of cellulose, hemicellulose, and lignin. The enzymatic extract was characterized for optimal temperature, best extraction buffer and thermal stability. Enzymatic activity was determined using filter paper (FPase) and Carboxymethyl cellulose (CMCase) substrates. Acid pre-treatment led to over 90% reduction in hemicellulose and nearly 15% reduction in lignin content. Activities found were 3.84 UCMC/g for CMCase and 3.29 UFP/g for FPase after 24-hour cultivation in optimized conditions using sodium citrate buffer. Though lignocellulosic ethanol production was inhibited, 8.26g/L glucose was detected at the process's end. The findings indicate that acerola waste is a viable substrate for obtaining cellulases and fermentable sugars, contributing to the exploration of alternative uses for acerola residues.

Keywords: 2G ethanol, acerola residue, biomass hydrolysis, cellulases.

LISTA DE ABREVIATURAS

C_2H_6O – Etanol

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMC – Carboximetilcelulose

DBA – Ágar Batata Dextrose

DNS – Ácido dinitricosalicílico

Etanol 2G – Etanol de Segunda geração

FES – Fermentação em estado sólido

FP – Papel de filtro

FS – Fermentação submersa

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

H_3PO_4 – Ácido fosfórico

HCL – Ácido clorídrico

HMF - Hidroximetilfurfural

HNO_3 – Ácido nítrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia

LEB – Laboratório de Engenharia Bioquímica

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura do material lignocelulósico.	17
Figura 2- Fruta acerola (<i>Malpighia emarginata</i>).....	18
Figura 3- Representação da degradação da celulose em glicose	20
Figura 4- Fluxograma com as principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol de primeira e segunda geração.	24
Figura 5- Estrutura da matéria lignocelulósica antes e após o pré-tratamento físico-químico	25
Figura 6- Resultados de atividade enzimática de celulasas com o tempo de cultivo	42
Figura 7- Ensaio de temperatura ótima das celulasas produzidas usando os substratos carboximetilcelulose e papel de filtro.	44
Figura 8- Resultados de atividade das enzimas produzidas através da extração com diferentes soluções	45
Figura 9- Resultados dos experimentos de estabilidade térmica a 70°C das enzimas produzidas.	46
Figura 10- Resultado do cromatograma obtido por CLAE para avaliação da produção de etanol e açúcares fermentescíveis.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas usando resíduos agroindustriais.	23
Tabela 2 – Comparativo entre a hidrólise ácida e enzimática de materiais lignocelulósicos. .	26
Tabela 3- Componentes presentes no hidrolisado e seus respectivos fatores de conversão. ...	33
Tabela 4- Caracterização físico-química do resíduo de acerola antes e após o pré-tratamento com ácido	40
Tabela 5 - Significância entre as médias dos parâmetros apresentados no cultivo FES.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRAIS	17
3.2 RESÍDUO DA ACEROLA.....	18
3.3 ENZIMAS	19
3.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS	20
3.4.1 Celulases	20
3.4.2 Hemicelulases	20
3.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS	21
3.6 CADEIA DE PRODUÇÃO DO ETANOL	23
3.7 PRÉ-TRATAMENTO	24
3.8 HIDRÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS	25
3.9 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	27
3.10 DESIGN DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL 2G	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	29
4.2. METODOLOGIA.....	29
4.2.1 Obtenção e preparo do resíduo da acerola.....	29
4.2.2 Pré-tratamento ácido	29
4.2.3 Caracterização físico-química do resíduo	30
4.2.4 Fermentação em estado sólido (FES).....	34
4.2.5 Determinação da atividade de celulases usando papel de filtro como substrato (FPase)	36

4.2.6 Determinação da atividade de celulasas usando carboximetilcelulose como substrato (CMCase)	37
4.2.7 Caracterização do extrato produzido na FES.....	37
4.2.8 Fermentação alcoólica.....	38
4.2.9 Determinação do teor de etanol produzido.....	39
4.2.10 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO.....	40
5.2 ANÁLISE DO TEMPO DE CULTIVO	41
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS	43
5.3.1 Temperatura ótima	43
5.3.3 Otimização da solução de extração para a produção de celulasas	45
5.3.2 Estabilidade térmica	46
5.4 APLICAÇÃO DA ENZIMA NA PRODUÇÃO DO ETANOL DE 2ª GERAÇÃO	47
6 CONCLUSÃO	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como fonte de energia renovável vem ganhando espaço nas pesquisas técnico-científicas, devido à busca pela minimização dos impactos ambientais causados pelo uso de combustíveis fósseis (ASEVEDO et al., 2021; DINIZ, 2023; DE ARAÚJO et al., 2023.). Esse aproveitamento é viável não apenas porque resulta numa diminuição nas emissões de gases do efeito estufa, mas também porque diminui o acúmulo do resíduo, transformando-o em produtos com maior valor agregado. Dessa forma, a produção de produtos de maior valor agregado através da conversão de resíduos agroindustriais vem se mostrando um processo viável e sustentável, um exemplo é a produção de enzimas celulolíticas e etanol celulósico (GAETE et al., 2020; COSTA et al, 2021).

O Brasil é um dos três maiores produtores de acerola do mundo, sendo também um dos maiores produtores de resíduos agrícolas. Para a acerola, calcula-se que seja gerado cerca de 40% de resíduo durante o seu processamento (SANCHO et al., 2009). Estes resíduos, na maioria das vezes, são desprezados, causando impactos ambientais. Por isso, a transformação do resíduo da acerola pode ser um processo viável e propulsor, diminuindo danos ao meio ambiente. (JUNIOR et al., 2006).

Os resíduos da acerola são materiais lignocelulósicos formados principalmente por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e por macromoléculas aromáticas (lignina) (COSTA et al., 2021). A lignina é responsável pela resistência física e química, enquanto a celulose e a hemicelulose são polissacarídeos que estão ligados à lignina por ligações covalentes e de hidrogênio, formando uma estrutura forte e complexa. Assim, para a degradação desses materiais lignocelulósicos, inicialmente, deve-se romper com a estrutura da lignina ou removê-la, usando técnicas de pré-tratamento (MANKAR et al., 2021). A escolha do método vai depender dos fatores que limitam à acessibilidade das enzimas celulolíticas à estrutura da celulose. Existem vários tipos de pré-tratamento, dentre eles, pode-se citar os pré-tratamentos físicos (moagem, micro-ondas e extrusão); pré-tratamentos químicos (alcalino e ácido), pré-tratamentos físico-químicos (explosão a vapor, explosão com amônia, oxidação úmida e explosão com CO₂) e pré-tratamentos biológicos (utilizando microrganismos e enzimas) (CAMPOS, 2021).

Após a retirada da lignina e com a exposição dos polissacarídeos, pode-se usar esses carboidratos como fonte de carbono para a produção de enzimas celulolíticas. Assim, pode-se produzir um coquetel de enzimas, tais como celulasas, hemicelulasas e pectinases, a depender da composição inicial da biomassa bem como o tipo de microrganismo usado para a fermentação (GAETE et al., 2020). Os coquetéis enzimáticos podem ser produzidos via fermentação submersa

(FS) ou via fermentação em estado sólido (FES). Entretanto, os processos de purificação e concentração necessários na FS acabam favorecendo a utilização da FES, que além de apresentar uma separação facilitada, mostram um melhor rendimento e menor formação de resíduos líquidos. Além disso, as condições de cultivo para a FES assemelham-se aos ambientes naturais (*habitat*) de certos microrganismos, como os fungos filamentosos, permitindo o seu crescimento e a síntese do produto de interesse em maior rendimento (ROCHA, 2018). Existem uma grande variedade de microrganismos que conseguem produzir enzimas celulolíticas, dentre eles, os fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais utilizados (ALBANO, 2012).

As enzimas celulolíticas são muito usadas na etapa de hidrólise de polissacarídeos para a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G) (WANG et al., 2012; ARAÚJO et al., 2023). Assim, a produção do etanol 2G pode ser realizada em quatro etapas: (1) pré-tratamento para remoção da lignina, tornando a celulose e hemicelulose mais acessíveis às etapas seguintes; (2) hidrólise ácida ou enzimática (usando enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas) para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares simples; (3) fermentação dos açúcares produzidos utilizando microrganismos para a produção do etanol; (4) separação e concentração do etanol produzido (MUSSATTO et al., 2010). Na fermentação alcoólica, o microrganismo é responsável pela conversão da glicose em piruvato (glicólise), que em seguida é convertido em álcool etílico. As leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, são os microrganismos mais empregados na fermentação alcoólica pela sua alta eficiência fermentativa e boa tolerância à produção de etanol (BORGES, 2008).

No processo de produção de etanol, a etapa de hidrólise enzimática é uma das etapas que necessita de maior otimização, uma vez que o custo das celulasas e hemicelulasas representa um dos maiores gargalos da produção de etanol 2G em larga escala (OLIVIERI et al., 2021). Assim, visando atuar nesse problema, a produção de celulasas “*in situ*” vem sendo bastante estudada e alguns autores relatam uma economia de, pelo menos, 10 % no custo de produção de etanol usando essa estratégia (OLIVIERI et al., 2021). Neste contexto, o presente trabalho possui o objetivo de avaliar a produção em batelada de um coquetel enzimático a partir do resíduo da acerola pré-tratado como substrato, utilizando fermentação em estado sólido (FES) e o microrganismo *Trichoderma reesei* CCT 2768. Neste processo, o resíduo da acerola pré-tratado será usado como fonte de carbono para a produção das enzimas celulolíticas, que serão caracterizadas visando a produção de etanol de segunda geração.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas celulolíticas pelo microrganismo *Trichoderma reesei* CCT 2768 em fermentação em estado sólido usando resíduo da acerola pré-tratado como substrato, visando a produção de etanol celulósico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o pré-tratamento do resíduo da acerola usando ácido sulfúrico (1% v/v);
- Determinar a composição físico-química dos resíduos de acerola antes e após o pré-tratamento;
- Avaliar o potencial do resíduo de acerola como substrato para a produção de enzimas celulolíticas por meio do processo de fermentação em estado sólido usando diferentes soluções para extração das enzimas celulolíticas;
- Caracterizar o extrato enzimático produzido através da determinação de atividade (em diferentes substratos), temperatura ótima e estabilidade térmica;
- Analisar a viabilidade de produção do etanol por fermentação alcoólica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

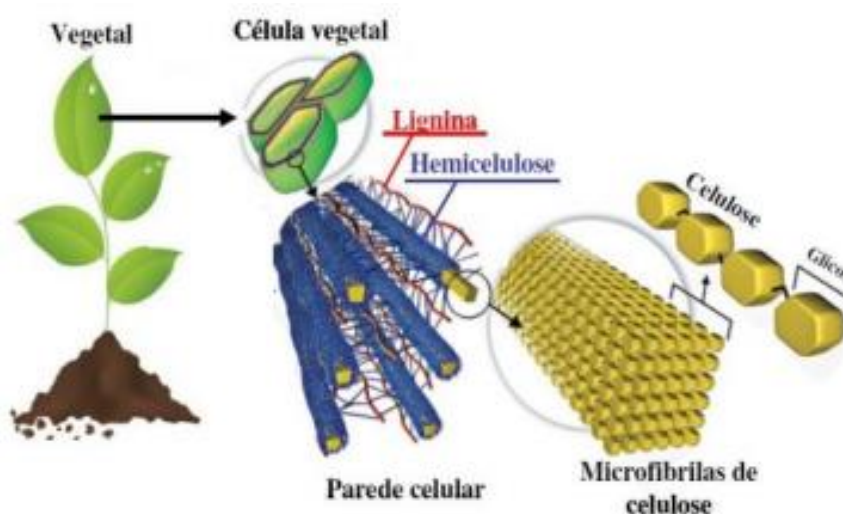
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais são subprodutos gerados durante o processamento industrial de produtos agrícolas. Esses resíduos não apresentam aplicações diretas e possuem pouco ou nenhum valor econômico. Mas, devido a sua composição rica em nutrientes e polissacarídeos, esses resíduos podem ser convertidos em produtos de importância industrial por bioprocessos utilizando microrganismos e enzimas (SANTOS et al., 2012).

A utilização dos resíduos de frutas oriundas do mercado *in natura* ou das agroindústrias, em conjunto com o desenvolvimento de novas tecnologias para minimizar as perdas nos processos produtivos, pode contribuir de forma significativa para a economia do país ajudando a diminuir os impactos ambientais gerados pelo acúmulo desses resíduos. As técnicas de fermentação em estado sólido para a produção de enzimas e fermentação alcoólica para a produção de etanol de segunda geração utilizando resíduos agroindustriais são exemplos de tecnologias que vem ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas de aproveitamento desses resíduos (DAMIANI et al., 2008).

Devido às características bioquímicas desses resíduos, estudos são realizados para transformar o desperdício em produtos com maior importância industrial. Os materiais lignocelulósicos são polímeros complexos compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1).

Figura 1 - Representação da estrutura do material lignocelulósico.



Fonte: MARTINS, 2018

A celulose é um polímero linear de cadeia longa composto de um só monômero (glicose) que são unidos por ligações β -glicosídicas. A hemicelulose é um heteropolímero ramificado composto por pentoses, hexoses e ácidos urônicos que estão ligadas às cadeias de celuloses por pontes de hidrogênio. Quanto à lignina, ela é responsável pela proteção e união da célula vegetal e resistência contra ataques microbianos, pois ela confere rigidez, tendo uma contribuição importante para a recalcitrância do material (CHEMMÉS et al., 2013).

3.2 RESÍDUO DA ACEROLA

A acerola (Figura 2) é uma fruta tropical que encontrou no Brasil condições climáticas favoráveis para o seu cultivo, principalmente nas Regiões Nordeste e Sudeste. É uma cultura atraente devido à grande demanda do produto tanto no mercado interno quanto no mercado externo (RITZINGER; RITZINGER, 2011). Segundo dados oficiais do IBGE no Censo Agropecuário de 2017, os três estados que apresentam as maiores produções no Brasil se encontram na região Nordeste, são eles: Pernambuco, produzindo 21.351 toneladas; Ceará, 7.558 toneladas; e Sergipe, 5.427 toneladas. Ainda segundo o IBGE, o Rio Grande do Norte produziu 551 toneladas de acerola no ano de 2017 e a produção total do Brasil chegou de 60.966 toneladas com valor da produção equivalente a R\$ 91.642.000,00 (NUNES, 2020).

Além da grande demanda na indústria alimentícia, a acerola se destaca pela sua precocidade no início de produção, a possibilidade da ocorrência de várias safras ao longo do ano e o fato de não apresentar, até o momento, problemas limitantes como pragas e doenças (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

Figura 2- Fruta acerola (*Malpighia emarginata*)



Fonte: Google imagens

O Brasil é um dos poucos países que cultivam comercialmente a acerola, que foi, inicialmente, introduzida em 1955 no estado de Pernambuco pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Essa produção foi realizada por meio de sementes provindas de Porto Rico, que inicialmente se espalharam por todo o Nordeste, e em seguida, para todo do país. Atualmente, é cultivada em todos os estados brasileiros, com limitações na Região Sul por causa de suas temperaturas baixas no inverno (RITZINGER; RITZINGER, 2011).

A acerola apresenta um forte potencial para a industrialização, gerando resíduo agroindustrial que resulta em um grande impacto ambiental (CAETANO et al, 2009). Para a acerola, calcula-se que seja gerado cerca de 40% de resíduo durante o seu processamento. A transformação desse resíduo pode ser um processo viável e propulsor devido à praticidade do uso e, por ser uma opção que evita danos ao meio ambiente (JUNIOR, 2006; SANCHO et al., 2009).

3.3 ENZIMAS

A produção de enzimas em escala industrial surgiu no início do século XX e o seu uso vem aumentando a eficiência de processos na indústria farmacêutica, através do melhoramento da pureza de produtos e nas indústrias alimentícias, melhorando as qualidades sensoriais do produto, como cor, sabor, textura e elevação de seu valor nutricional (ALBANO, 2012). Além disso, na indústria química, as enzimas estão presentes em detergentes e são utilizadas no curtimento de couro, entre outros. Além de sua versatilidade, a utilização das enzimas nos processos industriais é vantajosa porque elas são naturais, não tóxicas e específicas para cada reação, gerando menos subprodutos no processo (ALBANO, 2012).

As enzimas são proteínas que catalisam reações nos quais as moléculas podem ser degradadas ou sintetizadas. As enzimas atuam na catálise através da diminuição da energia de ativação, acelerando a reação (NELSON, COX, 2002). A atividade catalítica de uma enzima depende da integridade da sua estrutura 3D e afinidade com o substrato (NELSON, COX, 2002). Diferente dos catalisadores químicos, as enzimas são muito específicas, discriminando substratos com estruturas muito similares. Além disso, elas não são consumidas pelo processo, são biodegradáveis e conseguem atuar em condições de pH e temperaturas brandas (MONTEIRO; NASCIMENTO, 2009).

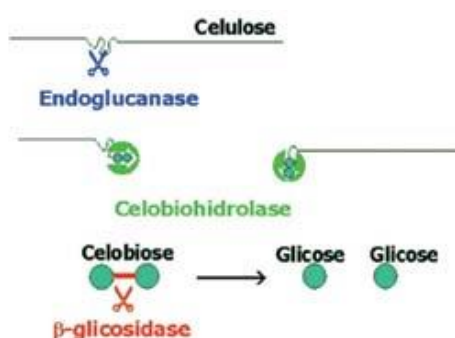
O emprego de enzimas celulolíticas, na hidrólise de materiais lignocelulolíticos, para a degradação da celulose vem se apresentando como uma opção de baixo impacto ambiental devido a sua biodegradabilidade e reação em condições brandas, se comparado com a hidrólise ácida (JUNIOR, 2012; ARAÚJO,2023).

3.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS

3.4.1 Celulases

As celulases estão entre as enzimas mais importantes para a degradação dos materiais lignocelulolíticos para a produção de combustíveis de segunda geração. As celulases trabalham sinergicamente na degradação da celulose rompendo as ligações presentes nas cadeias de celulose (Figura 3). Em termos de atuação da enzima no substrato, as celulases podem ser de três grupos: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (OLIVEIRA, 2010).

Figura 3- Representação da degradação da celulose em glicose



Fonte: Google imagens

As endoglucanases iniciam a hidrólise, clivando as ligações β -1,4 nas regiões mais internas da cadeia da celulose, principalmente nas regiões amorfas das moléculas, reduzindo o tamanho da cadeia e gerando polissacarídeos menores. As exoglucanases, principalmente celobiohidrolases, também atuam de forma sinérgica atacando as extremidades da cadeia das moléculas de celulose, sobretudo nas regiões altamente cristalinas, gerando dímeros de celobiose. E por último, as β -glucosidases atuam hidrolisando a celobiose liberando glicose (CAMPOS, 2021). A glicose liberada pode ser usada como substrato para diversos microrganismos para a produção de produtos de valor agregado, como o etanol 2G.

3.4.2 Hemicelulases

A hemicelulose é um polissacarídeo associado à celulose presente nas paredes celulares de plantas, que possui estrutura complexa formada por unidades de hexoses (como glicose, manose e galactose) e por pentoses (como xilose, arabinose, ácidos hexurônicos e deoxiexoses) (ALBANO, 2012). A hemicelulose apresenta composição variada nos diferentes tipos de vegetais. Devido a sua composição complexa, a transformação da hemicelulose em constituintes mais simples requer um amplo espectro de enzimas com diferentes formas de ação e

especificidade catalítica. Sendo assim, os microrganismos produzem um complexo de enzimas hemicelulolíticas, cujas principais são as xilanases, β -mananases, arabinofuranosidases e β -xilosidases (CAMPOS, 2021). O maior constituinte da hemicelulose em resíduos agrícolas é a xilana (cerca de 70%). Por isso, a maioria dos estudos relacionados a hemiceluloses são dedicados ao estudo de enzimas capazes de hidrolisar esses componentes, as xilanases. Essas enzimas atuam na quebra das ligações glicosídicas β -1,4 da cadeia principal da xilana, originando oligômeros (ALBANO, 2012; CAMPOS, 2021).

3.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS

Atualmente, as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas são amplamente utilizadas em processos industriais, suas aplicações variam entre as indústrias de detergentes, têxtil, indústrias de papel, energéticas, entre outras. Na indústria têxtil, a celulase é capaz de modificar a fibra de celulose melhorando a qualidade dos tecidos. Nos detergentes, melhoram o desempenho deste, permitindo a remoção de pequenas fibrilas difusas do tecido, conferindo assim brilho e maciez ao tecido. Na indústria de papel, são utilizadas quando ainda é polpa (alterando sua resistência) e no biobranqueamento do papel (GAETE et al., 2020). Na área energética, as celulases e hemicelulases vêm sendo empregadas para a obtenção de hidrolisado de celulose e hemicelulose para a produção de biocombustíveis. Mas, devido ao alto custo destas enzimas, diversas pesquisas têm focado em produzir coquetéis enzimáticos através de processos fermentativos acoplados ao próprio processo de produção do etanol 2G (CAMPOS, 2021; OLIVIERI et al., 2021).

As fermentações utilizadas nesse processo são divididas quanto ao teor de água livre: uma apresenta fase aquosa abundante, fermentação submersa (FS) e a outra, apresenta fase não aquosa predominante, conhecida como fermentação em estado sólido (FES) (ALBANO, 2012). A fermentação submersa (FS) apresenta um melhor controle do processo, uma fácil recuperação das enzimas extracelulares e quantificação da biomassa. Neste caso, o sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos (quando as enzimas produzidas são extracelulares) e o crescimento microbiano pode ser quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria, após a separação das células (LIMA et al., 2003). No entanto, a FS produz uma maior quantidade de resíduos líquidos após a fermentação, além do que há dificuldades na separação e purificação da enzima produzida, devido à baixa concentração da enzima em solução.

Por outro lado, a fermentação em estado sólido (FES) se destaca principalmente por apresentar menor custo de operação, maior rendimento do produto, facilidade na extração, espaço físico reduzido e a possibilidade de se usar resíduos agroindustriais como substratos. A FES é

caracterizada pela ausência parcial de água livre, apresentando apenas uma quantidade de água capaz de possibilitar o crescimento de microrganismos. Nesse tipo de fermentação, a única forma de água disponível encontra-se na matriz sólida do substrato ou disposta em uma fina camada adsorvida pela superfície das partículas (ALBANO, 2012).

O substrato escolhido para a fermentação deve conter em sua composição fontes de carbono e nutrientes necessários para o crescimento microbiano. Dessa forma, vários produtos ou resíduos agroindústrias, como farelo de trigo, sabugo de milho, polpas de frutas, sementes e resíduos florestais podem ser utilizados na FES ou na FS para a produção de enzimas celulolíticas (ZANCHETTA, 2012)

Além da escolha do substrato, outro fator importante para uma boa fermentação é a escolha do microrganismo. Existe uma grande variedade de microrganismos que conseguem produzir celulasas, incluindo bactérias anaeróbias e fungos filamentosos. Atualmente, os fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais utilizados na produção das celulasas (JUNIOR, 2012). Os fungos do gênero *Aspergillus* são conhecidos como grandes produtores de celulasas e xilanases, sendo melhores produtores de β -glucosidases quando comparada com os do gênero *Trichoderma*. Os fungos do gênero *Trichoderma*, por sua vez, são bons produtores de exoglucanases (JUNIOR, 2012). A Tabela 1 mostra alguns exemplos de processos de produção de celulasas e hemicelulasas usando resíduos agroindustriais.

Tabela 1- Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas usando resíduos agroindustriais.

Microrganismo	Substrato	Condições da fermentação	Atividade das enzimas produzidas	Referência
<i>Trichoderma reesei</i>	Fibra de coco	Fermentação em estado sólido (FES) com atividade de água de 99% usando 5,25 g de substrato, durante 6 dias.	3,0 U/g usando o substrato CMC e 0,31 U/g usando o substrato Papel de filtro	CAMPOS, 2021
<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de carnaúba	Fermentação em estado sólido (FES), com atividade de água de 60%, durante 7 dias	2,4 U/g usando o substrato Papel de filtro	SILVA et al., 2017
<i>Trichoderma reesei</i>	Resíduos de acerola	Fermentação em estado sólido (FES), com umidade de 40%, usando 5,0 g de substrato durante 10 dias	1,08 U/g usando o substrato Papel de filtro	FERREIRA, 2020
<i>Trichoderma reesei</i>	Bagaço do pedúnculo do caju	Fermentação submersa (FS), 27°C, 150 rpm e pH inicial de 4,8	2,160 U/mL usando o substrato CMC e 0,215 U/mL usando o substrato Papel de filtro	GUEDES, 2010

Fonte: Autora

3.6 CADEIA DE PRODUÇÃO DO ETANOL

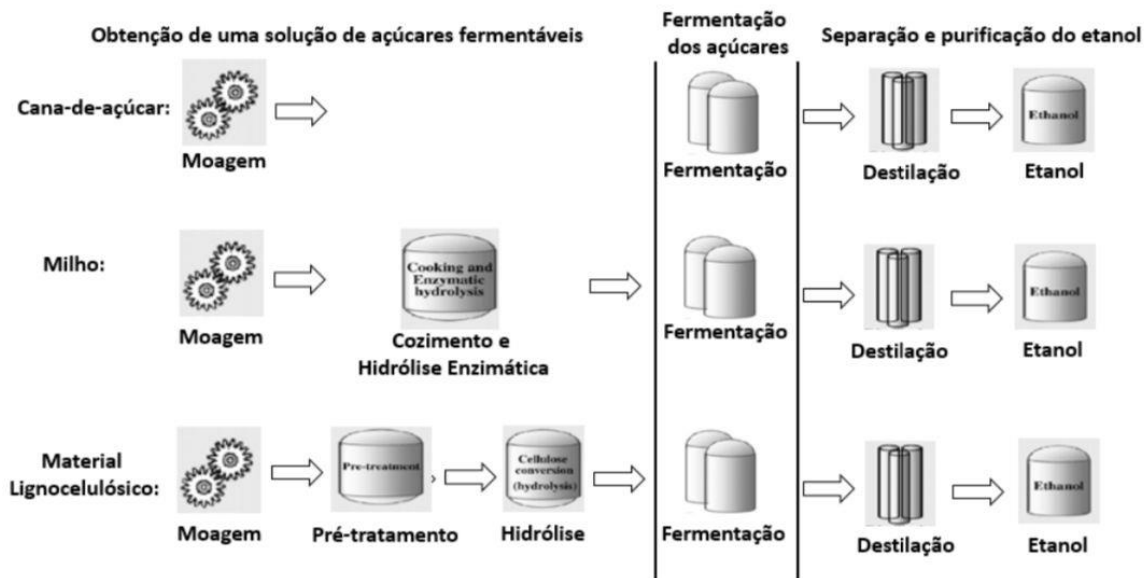
O aumento na demanda por fontes de energia, a escassez das reservas de petróleo e o aumento da emissão de gases na atmosfera têm estimulado cada vez mais o estudo de novos recursos renováveis. Esses motivos têm levado os governos a buscarem estratégias para aumentar a produção dos biocombustíveis (ZHENG et al., 2014; HAO et al., 2021). Dentre os biocombustíveis, o etanol vem ganhando grande destaque nas produções técnico-científicas (ZABED et al., 2017), principalmente o etanol de segunda geração, devido ao uso de resíduos agroindustriais para a sua produção (WANG, 2012).

Atualmente, o etanol de 1º geração é produzido a partir da cana-de-açúcar e do milho. Este etanol é produzido a partir de fontes alimentícias, contendo grandes quantidade de açúcares fermentescíveis. Para evitar a produção de biocombustíveis por fontes alimentícias, existe um

grande incentivo para o desenvolvimento de novas rotas envolvendo o aproveitamento de componentes lignocelulósicos das biomassas para produção de etanol de segunda geração (DESWAL et al., 2014). A Figura 4 compara os processos de produção de etanol de cana-de-açúcar ou de fonte amilácea, como o milho, (etanol de primeira geração) com o processo de produção do etanol de segunda geração.

O etanol de primeira geração geralmente é produzido em três etapas: (1) obtenção de uma solução de açúcares fermentescíveis; (2) fermentação de açúcares e (3) separação e purificação do etanol. Enquanto o etanol de segunda geração é produzido em quatro etapas: (1) pré-tratamento a fim de tornar a celulose e hemicelulose mais acessíveis às etapas seguintes; (2) hidrólise ácida ou enzimática para hidrolisar polissacarídeos em açúcares simples; (3) fermentação dos açúcares utilizando microrganismos para a produção do etanol; (4) separação e concentração do etanol produzido. Dessa forma, a diferença entre os processos de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, do amido ou resíduo lignocelulósico são os passos antes da fermentação (MUSSATTO et al., 2010). (Figura 4)

Figura 4- Fluxograma com as principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol de primeira e segunda geração.



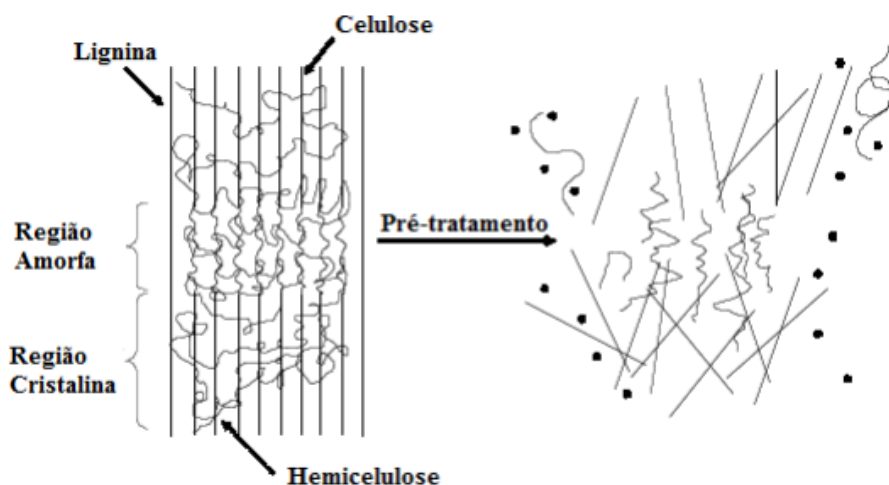
Fonte: MARTINS, 2018

3.7 PRÉ-TRATAMENTO

A biomassa lignocelulósica apresenta resistência à atividade enzimática devido a composição da sua parede celular. Além disso, a hemicelulose e a lignina formam barreiras que

dificultam o acesso destas enzimas à celulose (Figura 5). Dessa forma, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa essencial, e pode chegar a 20% do custo total para a produção de bioetanol (COSTA et al., 2013; TIBONI, 2015).

Figura 5- Estrutura da matéria lignocelulósica antes e após o pré-tratamento físico-químico



Fonte: SILVA, 2016.

O pré-tratamento geralmente envolve um passo mecânico para reduzir o tamanho das partículas e um pré-tratamento químico (alcalino ou ácido) ou um físico (extração de solvente, explosão de vapor, entre outros) a fim de tornar a biomassa mais digerível (MUSSATTO et al., 2010). Dentre os diversos tipos de pré-tratamento, o pré-tratamento através de hidrólise com ácido tem como objetivo facilitar o acesso das enzimas à celulose e solubilizar a fração da hemicelulose presente na biomassa. A utilização de ácidos concentrados no processo acaba sendo uma desvantagem devido a sua elevada toxicidade e corrosividade, fazendo com que ocorra um aumento de custos de processo. Por esse motivo, tem-se optado pela cada vez mais pela utilização de ácidos diluídos (GOMES, 2016).

O pré-tratamento com ácidos diluídos (1-4%) a temperaturas moderadas (120 a 160°C) promove a decomposição de polissacarídeos, e tem sido uma das técnicas mais utilizadas e adequadas para a hidrólise da hemicelulose (GOMES et al, 2016). Para esse efeito MUSSATO et al. (2010) apontam a utilização de H_2SO_4 como a mais adequada, embora também possam ser utilizados outros ácidos, como HCl, HNO_3 e H_3PO_4 .

3.8 HIDRÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS

O processo de hidrólise dos polissacarídeos (celulose e/ou hemicelulose) presentes na biomassa pode ser realizada a partir de duas rotas: hidrólise ácida ou enzimática. É durante a

hidrólise que a celulose e hemicelulose são quebradas em monômeros de açúcares, tornando possível a conversão posterior, por fermentação alcoólica, em bioetanol (SANTOS et al., 2012).

A hidrólise ácida consiste na adição de um ácido concentrado ou diluído para a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. A biomassa celulósica em etanol sob alta temperatura e pressão durante alguns minutos. As condições de temperatura, pressão e concentração de ácido irão depender do material a ser hidrolisado. A hidrólise ácida ocorre em duas etapas: a primeira etapa é realizada com baixas temperaturas para que ocorra a hidrólise da hemicelulose, e a segunda etapa é realizada com temperaturas elevadas para que ocorra a hidrólise da celulose (COSTA et al., 2021).

A hidrólise enzimática ocorre a através da ação das enzimas celulasas e hemicelulasas. No caso específico das celulasas, esse processo catalítico envolve a adsorção das celulasas na superfície do substrato e, posteriormente, a quebra das ligações. A celulase é uma proteína capaz de hidrolisar a celulose de forma sinérgica, sendo uma mistura de endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases. As endoglucanases atacam as cadeias de baixa cristalinidade da fibra da celulose para produzir polissacarídeos de menor tamanho; as exoglucanases atacam as terminações não redutoras e redutoras dessas cadeias e produzem a celobiose; e as β -glucosidases agem na estrutura da celobiose hidrolisando-a em glicose (SANTIAGO; RODRIGUES, 2017; COSTA et al., 2021) A Tabela 2 mostra um comparativo entre a hidrólise ácida e enzimática de materiais lignocelulósicos.

Tabela 2 – Comparativo entre a hidrólise ácida e enzimática de materiais lignocelulósicos.

Catalisador	T (°C)	Tempo	Rendimento do Glicosídico	Custo	Fermentabilidade do hidrolisado
Ácido diluído (H ₂ SO ₄)	245	3 min	Possui rendimento moderado alcançando maiores valores com ácidos concentrados; porém, as condições reacionais requeridas favorecem a formação de produtos de degradação.	O processo se torna economicamente dispendioso devido à corrosão nos equipamentos causada pelo catalisador	A presença do ácido e dos produtos de degradação inibe a atuação dos micro-organismos responsáveis pela fermentação.
Ácido concentrado (H ₂ SO ₄)	70	2-6hrs	Rendimentos elevados e considerável seletividade a produção de glicose.	Elevado custo das celulasas.	Possibilita o processo de sacarificação e fermentação simultâneas com altas conversões

Fonte: Autora, modificado de COSTA et al. 2021

3.9 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Há mais de quatro mil anos os egípcios já utilizavam o processo de fermentação para produzir pão e bebidas alcoólicas. Mas foi, depois de muitos anos, que o cientista Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723) associou a fermentação da cerveja com a levedura. Em seguida, em 1815, Louis Pasteur (1822-1895) conseguiu comprovar a natureza microbiológica da fermentação como um processo anaeróbico. Desde então foram sendo elucidadas as primeiras pesquisas envolvendo as reações químicas do processo de fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001).

Na fermentação alcoólica, as leveduras ou outros microrganismos são responsáveis pela quebra da glicose em piruvato (glicólise), que em seguida é convertido em álcool etílico. Este último, ocorre em duas etapas: (1) o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído e dióxido de carbono; (2) o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase. Esse processo é o mais importante para a obtenção do etanol de primeira e segunda geração (NELSON; COX, 2002).

As leveduras são os microrganismos mais empregados na fermentação alcoólica, principalmente as do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, pela sua alta eficiência fermentativa. Este microrganismo converte facilmente a glicose em etanol e gás carbônico. Entretanto, a *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente é incapaz de assimilar ou de fermentar o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa, as pentoses (BORGES, 2008).

Existem vários fatores que afetam o rendimento do etanol na fermentação (temperatura, concentração de nutrientes, presença de inibidores, entre outros). Para a levedura, o principal fator é a concentração do inóculo, nutrientes e a presença de inibidores. Maiores concentrações de inóculo permite a realização de fermentações com maiores rendimentos. Os inibidores geralmente são compostos hidrossolúveis de baixa massa molar formados nas etapas de pré-tratamentos, por isso a importância na escolha do pré-tratamento mais adequado (LIMA et al., 2001; TURA, 2015).

3.10 DESIGN DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ETANOL 2G

A tecnologia básica usada na conversão da biomassa lignocelulósica em etanol inclui três etapas: pré-tratamento, sacarificação e fermentação dos açúcares hidrolisados. Essas três operações unitárias podem ocorrer em três equipamentos diferentes. Além disso, neste design de

processo não inclui a produção de enzimas celulolíticas, assim as mesmas precisam ser fornecidas por terceiros, sendo este um dos maiores gastos do processo. Dessa forma, a busca pela implementação de uma seção de produção de celulases nas biorrefinarias produtoras de etanol é muito visada economicamente. Essa estratégia pode reduzir até 10% dos custos de operação (OLIVIERI et al., 2021).

Além disso, outra estratégia proposta é a combinação dos processos de sacarificação e fermentação. Nesse processo, a biomassa lignocelulósica e as celulases são colocadas juntas na unidade de fermentação. Uma vantagem do processo é a utilização de dois processos em um só reator, o que torna o processo mais interessante economicamente e a desvantagem seria as diferenças de temperaturas para cada procedimento. (LIU et al., 2015).

Outra estratégia proposta é a combinação de três etapas (produção de celulases, hidrólise da biomassa e fermentação para a produção do bioetanol). Esse processo é chamado de “bioprocesso consolidado”, em que as enzimas para degradação da biomassa são produzidas para serem usadas na etapa de sacarificação, fomentando os açúcares para a fermentação alcoólica. Nessa proposta, faz-se necessário a utilização de um microrganismo capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas da celulose e utilizar os açúcares formados para fermentação alcoólica. Nos casos em que o microrganismo não seja capaz de realizar os dois processos espontaneamente pode ser implementado um novo microrganismo capaz de realizar tanto a fermentação alcoólica como a fermentação sólida, ou pode-se modificar geneticamente o microrganismo, utilizando técnicas da engenharia genética (OLIVIERI et al., 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Resíduo de acerola, água destilada (H₂O), ácido sulfúrico (Dinâmica), tampão citrato de sódio (50,0 mM), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), ágar dextrose batata (Sigma-Aldrich), peptona (Sigma-Aldrich), extrato de levedura (Becton Dickson & Co. Sparks), água deionizada, Tween 80 (INLAB), NaCl (LABSYNTH PRODUTOS), CaOH (LABIMPEX), *Sacharomise Serevise PE* (Fermentec), *Trichoderma reesei* CCT 2768 (Fundação André Tosello), moinho (TE – 670, Tecnal), microscópio (Olympus BX51, Japão), dessecador, balança analítica (SHIMADZU AUW220D), autoclave (Phoenix), câmara de Neubauer (BOECO Germany), banho termostático (TE-184, TECNAL), mufla (SolidSteel), estufa bacteriológica (TE-392, TECNAL), sohxlet (TE-044, TECNAL), shaker (TE- 421, TECNAL), geladeira (BRASTEMP), agitador magnético, fluxo laminar (Pachane), centrífuga (5415 D, Eppendorf), potenciômetro (pHmetro) (MS TECNOPON), vidrarias de uso geral (béqueres, Erlenmeyers, balões volumétricos, cadinho, placa de Petri, provetas, tubos de ensaio), tubos falcon (15 mL e 50 mL), Eppendorfs, pipetas e ponteiras.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1 Obtenção e preparo do resíduo da acerola

O resíduo de acerola foi doado pela empresa Polpa de Frutas Ideal situada em João Pessoa/PB, Brasil. O resíduo foi submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60°C por 48 horas. Em seguida, o material foi triturado em moinho (TE-680 Tipo Willye da Tecnal) com abertura de 20 mesh e armazenados em recipientes fechados à temperatura ambiente.

4.2.2 Pré-tratamento ácido

Inicialmente, foram pesados 40g do resíduo triturado, em seguida, foram adicionados 400 mL de solução de ácido sulfúrico (1% (v/v)). A mistura foi submetida ao aquecimento na autoclave a 121°C e 1,0 atm por uma hora. Após o pré-tratamento, o resíduo foi lavado três vezes com 100 mL de água destilada e foi armazenado em um pote de plástico a temperatura ambiente.

4.2.3 Caracterização físico-química do resíduo

A caracterização físico-química do resíduo foi realizada antes e após o pré-tratamento com ácido, através da determinação da umidade, sólidos extraíveis, cinzas totais e concentração de celulose, hemicelulose e lignina.

4.2.3.1 Determinação da umidade inicial do resíduo

Em uma cápsula previamente pesada e tarada, foram pesados cerca de 1,0 g do resíduo de acerola pré-tratado e não-tratado, separadamente. Em seguida, transferiu-se os conjuntos a uma estufa para secagem a 105°C por 24 horas. Após este tempo, a massa seca foi pesada. O teor de umidade da biomassa foi determinado pela Equação 1.

$$U(\%) = \left(1 - \frac{M_s}{M_u}\right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

U(%): percentual de umidade;

M_s: Massa seca, obtida pela diferença entre a massa do conjunto cápsula/resíduo após estufa e a massa da cápsula.

M_u: Massa úmida, obtida pela diferença entre a massa do conjunto cápsula/resíduo antes da estufa e a massa da cápsula.

4.2.3.2 Determinação da curva de umidade

Para calcular o teor de umidade, mede-se indiretamente esse fator pela relação de água adicionada ao sistema. Dessa forma, é possível fornecer ao sistema a umidade necessária a partir do volume de água. Inicialmente, para cada ensaio foi pesado cerca de 3,0 g do resíduo de acerola pré-tratado, e foram adicionados 300, 600, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 mL de água destilada. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro. Após isso, foram pesados 1,0 g do resíduo úmido obtido da suspensão em cápsulas previamente pesadas e taradas. Transferiu-se o conjunto a uma estufa para secagem a 105°C por 24 horas. Após este tempo, a massa do conjunto foi pesada. O ensaio foi realizado em triplicata e o teor de umidade da biomassa foi determinado pela Equação 1.

4.2.3.3 Determinação de extraíveis

Para determinação de compostos extraíveis, foi pesado 0,2 g de material não-tratado e pré-tratado em filtros de papel para que fosse submetido a uma extração sólido-líquido em duas etapas com dois solventes diferentes, a água deionizada e o álcool etílico (C₂H₆O, 95%, v/v), nas temperaturas de 120°C e 80 °C, respectivamente. A extração ocorreu no aparelho de Soxhlet e o tempo de contato com cada solvente foi de 24 horas. Ao término do tratamento, o tubo do Soxhlet foi seco em estufa a 105 °C durante 24 horas. A porcentagem de extraíveis foi calculada de acordo com Equação (2). O experimento foi realizado em triplicata para cada ensaio.

$$\text{Extraíveis (\%)} = \left(1 - \frac{M_f - M_i}{M_{seca}}\right) * 100 \quad (2)$$

Onde:

M_i = massa do tubo Soxhlet antes da extração

M_f = massa do tubo Soxhlet contendo extraíveis ao término do processo

M_{seca} = massa do resíduo em base seca

4.2.3.4 Teor de celulose, hemicelulose e lignina

4.2.3.4.1 Hidrólise do ácido sulfúrico 72%

Inicialmente, 0,3 g de resíduo já sem os extraíveis foi misturado com 3,0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 72%, v/v). A mistura foi submetida por 1 hora no banho-maria a 30 ± 3°C agitando-se a cada 10 minutos. Após a reação, foi adicionado 84,0 g de água deionizada e a solução foi submetida ao aquecimento na autoclave a 121°C e 1,0 atm por uma hora. Depois, a mistura passou por uma filtração com um papel de filtro previamente pesado. As alíquotas do hidrolisado foram estocadas a -20°C para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e a parte sólida no papel foi lavada com 100 mL de água deionizada e levada para a estufa na temperatura de 105°C por 24 h. Após as 24 h, o sólido retido foi pesado permitindo a determinação do teor de lignina insolúvel.

4.2.3.4.2 Determinação do teor de lignina insolúvel

O material retido no papel foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado, e a amostra foi aquecida à 300°C por 10 minutos. Depois calcinou-se a amostra à 800°C por duas horas. Após as duas horas, o conjunto cadinho/cinzas, foi resfriado no dessecador por

30 minutos, foi pesado em balança analítica e a fração de lignina insolúvel presente na amostra, foi calculada pela Equação (3):

$$Lignina (\%) = \left[\frac{(M_{sólido+filtro} - M_{filtro}) - (M_{cad+cin} - M_{cad})}{M_{sin}} \right] * 100 \quad (3)$$

Onde:

Lignina (%)= percentual de lignina que não se solubilizou;

$M_{Sólidos+filtros}$ (g)= massa de sólidos com papel de filtro seca após a lavagem;

M_{filtro} (g)= massa do papel de filtro pesado antes da filtração;

$M_{cad+cin}$ (g)= massa do cadinho de porcelana com as cinzas após a calcinação;

M_{cad} (g)= massa do cadinho tarado antes da calcinação;

M_{sin} (g)= massa de sólido seco utilizada para hidrólise ácida.

4.2.3.4.2 Análise do hidrolisado por CLAE

Para a análise dos componentes do hidrolisado, a determinação dos teores de celulose, hemicelulose e açúcares foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Acela da Thermo Scientific, em conjunto com a coluna Shim-Pack SCR-101H da Shimadzu Co, Japão, operando a uma temperatura de 65°C. Uma solução de H₂SO₄ (5,0 mM) foi empregada como fase móvel, com uma vazão de 0,6 mL/min.

Antes da injeção na coluna, as amostras passaram por uma etapa de pré-filtração em membranas de 0,22 µm para remover partículas insolúveis. Para quantificar os diferentes componentes, como celulose, hemicelulose, glicose e xilose, foram criadas curvas de calibração, usando fatores de conversão específicos (Tabela 3). Além disso, a determinação de compostos como o HMF e furfural envolveu o uso de uma coluna Shim-Pack CLC-ODS da Shimadzu Co, Japão. Neste caso, a fase móvel consistiu em ácido acético (1,0%) e acetonitrila (ACN) a 25°C, com um fluxo de 0,6 mL/min.

Tabela 3- Componentes presentes no hidrolisado e seus respectivos fatores de conversão.

Celulose		Hemicelulose	
Componentes	Fator de conversão	Componentes	Fator de conversão
Celobiose	0,95	Xilose	0,88
Glicose	0,90	Arabinose	0,90
HMF	1,20	Ácido acético	0,72
		Furfural	1,37

Fonte: Adaptado de PITARELO (2007)

Para o cálculo da concentração de celulose e hemicelulose foram somados os fatores de conversão com a quantidade açúcares encontrados na CLAE, conforme a Equação (4).

$$C_f = \sum f_i * C_i \quad (4)$$

Onde:

C_f (g/mol)= concentração final de celulose ou hemicelulose;

f_i = fator de conversão do componente i ;

C_i (g/mol)= concentração do componente i .

Por fim, o percentual de celulose e hemicelulose foi calculado usando-se a Equação (5):

$$P_i(\%) = \frac{C_f \times V}{M_i} * 100 \quad (5)$$

Onde:

P_i (%)= percentual de celulose ou hemicelulose;

C_f (g/mL) = concentração final de celulose ou hemicelulose;

V (mL) = volume final do hidrolisado após a hidrólise com H₂SO₄;

M_i (g)= massa inicial de sólido usada na hidrólise ácida.

4.2.3.5 Cinza totais

Inicialmente, foi pesado 1,0g de resíduo não-tratado e pré-tratado em cadinhos previamente tarados. Os cadinhos foram levados a mufla por 10 min a temperatura de 300°C e finalmente foram calcinados à 800°C por duas horas a fim de que restasse apenas as cinzas nos cadinhos. O conjunto cadinho/cinzas foi levado ao dessecador e foi pesado. O teor de cinzas

totais foi calculado a partir da Equação (6). O experimento foi realizado em triplicata para cada ensaio.

$$Cinzas (\%) = \frac{M_{cinzas} (g)}{Ma (g)} * 100 \quad (6)$$

Onde:

Cinzas (%) = teor de cinzas totais;

M_{cinzas} (g) = massa de cinzas (diferença entre a massa do conjunto cadinho/resíduo após a mufla e a massa do cadinho);

Ma (g) = massa da amostra em base seca.

4.2.4 Fermentação em estado sólido (FES)

4.2.4.1 Microrganismo e manutenção

O fungo *Trichoderma reesei* CCT 2768 pertence ao banco de microrganismo do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O crescimento do microrganismo ocorreu em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) na estufa a 30°C por 7 dias e sua propagação foi feita no sabugo de milho.

4.2.4.2 Preparação do meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA) e ativação do fungo

Inicialmente, foram pesados: 4,0 g de peptona, 2,0 g de extrato de levedura, 4,0 g de glicose e 7,8 g de ágar dextrose batata. Em seguida, em Erlenmeyer de 250 mL, os componentes foram diluídos em 200 mL de água e transferidos para placas de Petri. Com o auxílio de uma alça de ferro previamente esterilizada, foi feita a transferência do microrganismo para as placas de Petri.

4.2.4.3 Propagação dos esporos

Após 7 dias de ativação no meio BDA, a transferência do microrganismo foi realizada utilizando Tween 80 (0,5% v/v), para um Erlenmeyer contendo 4,6 g de sabugo de milho e 6 mL da solução umidificante (solução de nutrientes). Esta, por sua vez, foi preparada a partir da mistura de 0,19 mL da solução A (contendo 20 g de fosfato de potássio monobásico dissolvidos em 100 mL de água destilada), 0,025 mL da solução B (contendo 3,96 g de sulfato de zinco

(ZnSO₄.7H₂O) e 4,6 g de sulfato de ferro (FeSO₄.7H₂O) dissolvidos em 100 mL de água destilada) e 50 mL de uma solução peptonada (contendo 2,8 g de peptona dissolvidos em 50 mL de água destilada). O conjunto foi levado a uma estufa bacteriológica à 30°C por 15 dias. Após esse período, adicionaram-se 10 mL de solução Tween 80 (0,5%, v/v) aos frascos contendo o fungo crescido a fim de se obter a suspensão de esporos para a contagem no microscópio.

4.2.4.4 Contagem de esporos

A suspensão de esporos foi transferida para um tubo de ensaio, onde foram retirados 40 µL da suspensão e foi feita uma diluição de 125 vezes em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8). Essa solução diluída foi levada para o microscópio para a contagem.

A determinação da quantidade de esporos por mL das suspensões foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, que é composta por uma lâmina de vidro fina com duas áreas de contagem. A concentração de esporos por mL foi determinada a partir da quantidade média de esporos observada, dividido por 2 para representar um dos lados da câmara e multiplicada pelo fator 10.000 (esse fator corresponde a transformação do volume de 0,1 µL), conforme Equação (7).

$$Esporos = \frac{Quantidade\ contada}{2} \times 10.000 \times (Fator\ de\ diluição) \quad (7)$$

Onde:

Esporos: a quantidade de esporos total;

Quantidade contada: quantidade de esporos que foram contadas no microscópio;

Fator de diluição: fator de diluição para contagem na câmara.

4.2.4.5 Condições de cultivo – Fermentação em estado sólido (FES)

Para a fermentação em estado sólido (FES), inicialmente foram pesados 0,5 do resíduo de acerola seco em Erlenmeyer de 50 mL onde foram adicionados uma quantidade de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) contendo os sais KH₂PO₄ 5,0 g/L; (NH₄)₂SO₄ 5,0 g/L; FeSO₄.7H₂O 5,0 g/L; ZnSO₄.7H₂O 3,45 mg/L e uma proporção de 1,0×10⁷ esporos por grama de substrato. Vale ressaltar que o valor adicionado de tampão foi calculado através da curva de umidade do resíduo que foi determinado na seção 1.2.2, com objetivo de atingir uma umidade de 40%. A FES ocorreu em uma estufa bacteriológica a uma temperatura de 30°C durante 6 dias. Para esse ensaio, doze Erlenmeyers foram preparados e três Erlenmeyers foram coletados durante 24, 48, 120 e 144 horas para ser realizadas análises de atividade enzimática usando os

substratos Papel de filtro (FP) e Carboximetilcelulose (CMC) a fim de analisar qual dia resultaria em uma melhor produção de enzimas.

4.2.4.6 Extração das enzimas produzidas usando diferentes solventes

Inicialmente, a extração das enzimas foi realizada adicionando-se 10mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) ao Elernmeyer, após a FES. Depois o Elernmeyer foi levado ao shaker por 30min para que ocorresse a lixiação. Por fim, o extrato foi submetido a uma filtração simples. Após identificar a condição ótima da FES usando tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), foi avaliada a utilização de outros possíveis solventes para extração das enzimas celulolíticas, sendo eles: NaCl, CaOH, Tween 0,1% (v/v) e Tween 0,01% (v/v) para avaliar qual o melhor para a extração. Estes experimentos foram operados nas mesmas condições mencionados no tópico 4.2.4, variando apenas o solvente na fase da extração. As amostras foram armazenadas para análise da atividade enzimática usando os substratos Papel de filtro (FPase) e Carboximetilcelulose (CMCase), conforme os pontos 4.2.5 e 4.2.6.

4.2.5 Determinação da atividade de celulasas usando papel de filtro como substrato (FPase)

Inicialmente, foram adicionados tiras de papel de filtro Whatman nº1 (1,0 x 6,0 cm), enroladas em espiral, em tubos de ensaio com 1,0 mL de tampão citrato de sódio (50,0 mM, pH 4,8). Os tubos foram levados para o banho-maria a 50°C por 5 min para equilíbrio da temperatura. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de extrato de enzima da FES em cada tubo. O conjunto foi levado novamente ao banho-maria para reagir a 50°C por 60 minutos.

Ao término da reação, a quantidade de açúcares redutores liberados foi avaliada por meio do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para isso, foram transferidos 0,25 mL da mistura reacional para tubos limpos contendo também 0,25 mL de DNS. Os tubos com a mistura foram então submetidos à fervura em água a 100°C por 5 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados em um banho de gelo por 5 minutos, seguido pela adição de 2,0 mL de água destilada. A absorbância da solução foi medida em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm, e a concentração de açúcares redutores foi determinada utilizando uma curva de calibração. A atividade enzimática foi calculada conforme Equação (8).

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{\text{FPU}}{\text{g}} \right) = \left(\frac{\text{diluição} * \text{abs} * F * V_{MR} * V_E}{t * V_{EE} * M} \right) \quad (8)$$

Onde:

Abs = absorvância da amostra;

F = fator de conversão da curva de calibração;

V_{MR} (mL) = volume total da mistura reacional;

V_E (mL) = volume usado do solvente de extração utilizado;

T (min) = tempo de incubação da reação enzimática;

V_{EE} (mL) = volume utilizado de extrato enzimático;

M (g) = massa de resíduo.

4.2.6 Determinação da atividade de celulasas usando carboximetilcelulose como substrato (CMCase)

Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de carboximetilcelulose que foram colocados em banho-maria a 50°C por 5 min para equilíbrio da temperatura e, em seguida, foram adicionados 0,5 mL de extrato de enzima da FES. O conjunto foi levado novamente ao banho-maria para reagir a 50°C por 30 minutos. Ao final da reação, determinou-se a quantidade de açúcares redutores liberados, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) citado em 4.5.2. O cálculo da atividade foi feito conforme a Equação (9).

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{\text{CMCU}}{\text{g}} \right) = \left(\frac{\text{diluição} * \text{abs} * F * V_{MR} * V_E}{t * V_{EE} * M} \right) \quad (9)$$

Onde:

Abs = absorvância da amostra;

F = fator de conversão da curva de calibração;

V_{MR} (mL) = volume total da mistura reacional;

V_E (mL) = volume usado do solvente de extração utilizado;

T (min) = tempo de incubação da reação enzimática;

V_{EE} (mL) = volume utilizado de extrato enzimático;

M (g) = massa de resíduo.

4.2.7 Caracterização do extrato produzido na FES

A caracterização do extrato produzido na FES foi realizada através da determinação da temperatura ótima, do melhor tampão para a extração e da estabilidade térmica.

4.2.7.1 Temperatura ótima

Após identificar a condição ótima da FES no tópico 4.2.4 e melhor solvente de extração, foi avaliada o efeito da temperatura na leitura da atividade de FPase e CMCase. Para esse experimento, foram realizados 4 ensaios conforme os tópicos 4.2.5 e 4.2.6 variando apenas as temperaturas de reação. Os ensaios foram conduzidos em triplicata nas temperaturas de 40, 45, 60 e 65°C a fim de avaliar em qual temperatura de reação seria a mais eficiente para obter melhor atividade enzimática.

4.2.7.2 Estabilidade térmica

Para avaliação do efeito da temperatura na estabilidade do extrato produzido, o extrato enzimático obtido por FES que favoreceu maior produção de enzima foi incubado na temperatura de 70°C durante três horas, sendo retiradas amostras a cada 10 min na primeira hora e a cada 20 min nas duas horas subsequentes. Após a retirada, as amostras foram colocadas em banho de gelo. Após o tempo de incubação, determinou-se a atividade FPase e CMCase de acordo com a seção 4.2.5 e 4.2.6. Além disso, também foi medido o tempo zero, que foi usado como referência de 100% de atividade da enzima.

4.2.8 Fermentação alcoólica

4.2.8.1 Microrganismo e manutenção

A levedura *Saccharomyces Cerevisiae* PE-2 foi obtida do banco de microrganismos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O crescimento do microrganismo ocorreu em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) na estufa a 30°C por 7 dias.

4.2.8.2 Preparação do meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA) e ativação da levedura.

Para o preparo do meio BDA e ativação da levedura foram utilizados os mesmos métodos citados no tópico 2.1.1. Vale ressaltar que a ativação do fungo e da levedura foram conduzidas em dias diferentes para evitar uma contaminação cruzada.

4.2.8.3 Contagem de Células

Para a determinação da quantidade de células, foi utilizada uma alça de platina para a transferência da levedura da placa para oito Erlenmeyers contendo meio BDA, mas dessa vez sem o ágar batata dextrose. O Erlenmeyer foi levado para a estufa bacteriológica por 24 horas. Após esse período, a solução foi centrifugada várias vezes a fim de recolher e concentrar o

decantado. A solução final foi diluída 125 vezes em tampão citrato de sódio (50mM, pH 4,8) e foi levada para o microscópio para a contagem da mesma forma descrita no tópico 2.1.2.

4.2.8.4 Condições de cultivo

Após determinado as melhores condições de cultivo nos pontos 4.2.4 e 4.2.7, um novo cultivo de FES foi realizado em triplicada. Em seguida, iniciou-se a fermentação alcoólica em que foram adicionados 20 mL/g de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8) e a uma proporção de $1,0 \times 10^8$ células de levedura por grama de substrato nos Erlenmeyers da FES que obteve maior atividade enzimática. Dessa vez, o valor adicionado de tampão foi na intenção de parar a fermentação em estado sólido. A fermentação ocorreu em shaker a uma temperatura de 30°C e 4000 rpm durante 2 dias.

4.2.9 Determinação do teor de etanol produzido

A concentração de glicose e a concentração do etanol foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O extrato da fermentação alcoólica foi centrifugado e filtrado antes de ser injetado no equipamento. A quantificação foi realizada usando a plataforma Shimadzu VP HPLC Systems (Shimadzu, Japan), a coluna Shim-pack SCR101-H (7.9×300 mm) e a fase móvel de 5 mM ácido sulfúrico foram usadas para separar açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose), ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido acético e ácido levulínico) e etanol. As amostras foram identificadas comparando o tempo de retenção com o tempo de retenção das amostras padrão, sendo 23 min para o etanol e 10,2 min para a glicose.

4.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão dos dados em triplicata. A fim de avaliar a significância dos efeitos nos resultados obtidos, foi realizado uma análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey com nível de confiança de 95% ($p = 0,05$), utilizando o software OriginPro 8.5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO

Os resultados da caracterização físico-química do resíduo antes e após o pré-tratamento encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4- Caracterização físico-química do resíduo de acerola antes e após o pré-tratamento com ácido

Propriedades	Resíduo Não Tratado	Resíduo Pré-tratado
Celulose (%)	25,46 ± 0,63	24,23 ± 0,02
Hemicelulose (%)	16,23 ± 0,98	0,77 ± 0,23
Lignina (%)	19,67 ± 1,39	16,95 ± 0,56
Extraíveis (%)	16,59 ± 0,36	9,86 ± 0,40
Cinzas Totais (%)	1,37 ± 0,89	1,47 ± 0,05
Umidade (%)	10,36 ± 0,86	9,14 ± 0,48

Fonte: Autora

Analisando as concentrações de celulose, hemicelulose e lignina, destaca-se que o teor de celulose permaneceu praticamente a mesma após o pré-tratamento, considerando o erro experimental. Além disso, houve a diminuição da concentração de hemicelulose de 16,23 % para 0,77 %, o que já era esperado devido ao tipo de pré-tratamento que foi submetido. Sabe-se que o pré-tratamento com ácido diluído remove de 80% a 100% da concentração de hemicelulose (SANTOS et al., 2012). Assim, com esses resultados, espera-se que haverá apenas a produção de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei*, já que praticamente não há hemicelulose para degradar no resíduo pré-tratado. Logo, considerando esses resultados, a atividade do extrato produzido foi medida apenas usando substratos apropriados para celulases (Papel de Filtro e Carboximetilcelulose).

Ademais, houve uma leve redução da concentração de lignina, que diminuiu de 19,67 % para 16,95 %. Essa redução também é justificada pelo pré-tratamento escolhido. Ainda segundo Santos et al. (2012), o pré-tratamento com ácido diluído resulta em uma pouca remoção da lignina, porém o ácido pode afetar a estrutura da mesma.

Comparando os resultados da Tabela 2 com os resultados da literatura, Rocha (2018) encontrou valores similares de celulose (em torno de 26,6 %) e de lignina (em torno de 25 %) enquanto Ferreira (2020) obtiveram valores de 21%. Isso indica que os resultados obtidos para neste trabalho estão de acordo com a literatura.

Para a percentagem de extraíveis, os valores encontrados no presente estudo foram de 16,59% para o resíduo não tratado e 9,86% para o resíduo pré-tratado. Os pré-tratamentos são responsáveis por removerem outros componentes presentes na fibra *in natura* e que são facilmente extraídos, podendo ter uma redução de até 50% do teor de extraíveis com relação ao resíduo *in natura* (ARAÚJO et al., 2023). Rocha (2018) e Ferreira (2020) que também estudaram o resíduo da acerola, obtiveram valores de 23,86 % e 19,75 %, respectivamente, para a percentagem de extraíveis.

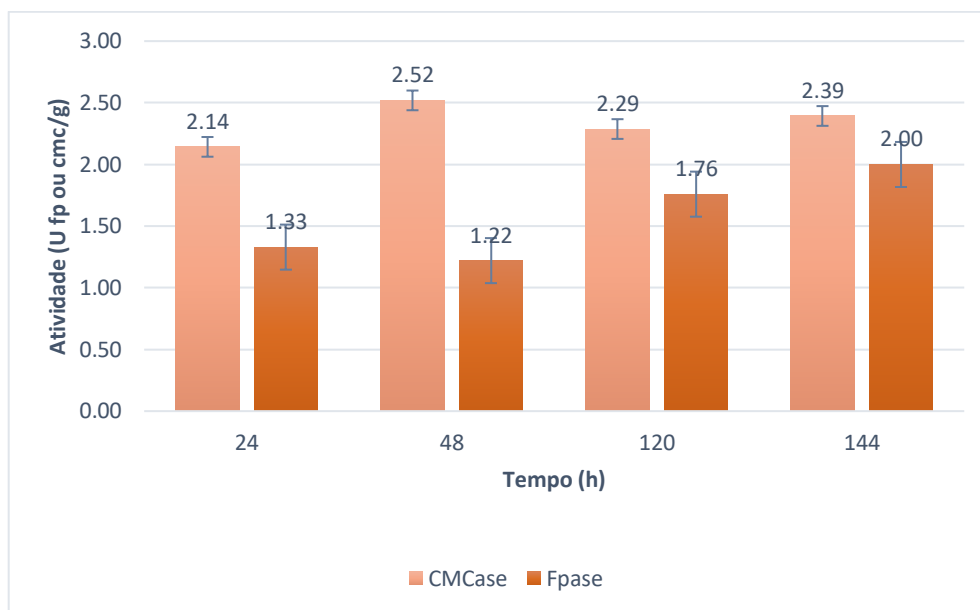
Considerando o erro experimental, a percentagem de cinzas total do resíduo permaneceu inalterada após o pré-tratamento (Tabela 4). Rocha (2018) e Ferreira (2020) encontraram valores de 1,43 e 1,98, respectivamente para cinzas totais. Para esse parâmetro, o valor encontrado antes e depois do pré-tratamento, se encaixa na faixa encontrada por Rocha (2018).

Analisando estatisticamente os valores de umidade do resíduo, estes não apresentam diferença estatística no valor médio antes de depois do pré-tratamento, permanecendo em torno de 9,14 a 10,36 %. Segundo Ferreira (2020), o valor de umidade é variável pois depende de alguns fatores para sua determinação, como o local de armazenamento e metodologia do experimento. Além disso, o valor encontrado neste trabalho apresenta na faixa obtida por Rocha (2018), que encontrou valores de 9,52 a 10,50.

5.2 ANÁLISE DO TEMPO DE CULTIVO

No presente estudo, foram analisados tempos de cultivo de 24, 48, 120 e 144 horas, com o objetivo de identificar qual o tempo de cultivo será mais eficiente para a produção das enzimas. A Figura 6 a seguir apresenta os resultados obtidos.

Figura 6- Resultados de atividade enzimática de celulases com o tempo de cultivo



Fonte: Autora

Observa-se na Figura 6 que a produção atingiu seu máximo valor de atividade em 48 horas para a atividade com substrato carboximetilcelulose (CMCase) e 144 horas para a atividade com substrato papel de filtro (FPase), com valores de 2,52 U_{CMC}/g e 2,00 U_{FP}/g, respectivamente. Porém, de acordo com a análise ANOVA, as atividades apresentadas na Figura 6 não apresentaram diferenças estatísticas, sendo assim, os valores de 24, 48, 120 e 144h não são estatisticamente diferentes. Na Tabela 5, consideram-se a diferença ou a semelhança estatística entre as médias do cultivo em estado sólido para o resíduo da acerola, as letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias.

Tabela 5 - Significância entre as médias dos parâmetros apresentados no cultivo FES

Tempo	CMCase (CMC/g)	Fpase (FPU/g)
24	2,14 ± 0,73 ^a	1,33 ± 0,26 ^b
48	2,52 ± 0,58 ^a	1,22 ± 0,26 ^b
120	2,29 ± 0,24 ^a	1,76 ± 0,28 ^b
144	2,39 ± 0,62 ^a	2,00 ± 0,37 ^b

Fonte: Autora.

Sendo o tempo um fator muito importante nos bioprocessos, pois pode reduzir os custos operacionais (SILVA et al., 2018). Pode-se afirmar que o período de cultivo de 24 horas favoreceu a produção de celulases, sendo mensurado valores de 1,33 U_{FP}/g para atividade de FPase e de 2,14 U_{CMC}/g para atividade de CMCase.

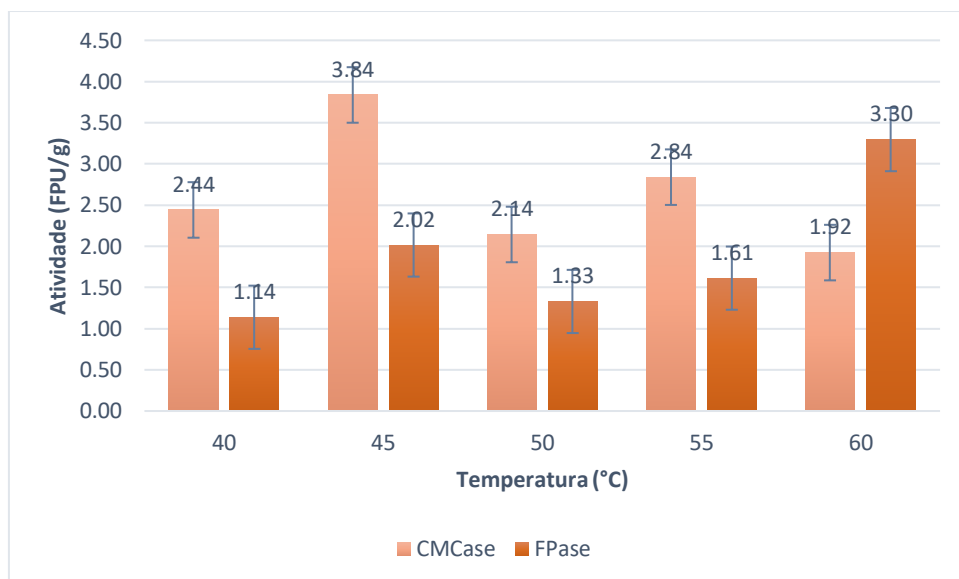
Comparando os resultados obtidos com Campos (2022), que analisou o tempo de cultivo na produção de celulases por FES utilizando a fibra de coco verde pré-tratada por explosão a vapor como substrato por até 168 horas, o melhor dia de produção encontrado foi o sexto dia (144 h), com valores de atividade em torno de 0,31 UI/g para CMC_{Case} e 0,26 UI/g para o FPase. Assim, pode-se afirmar que os resultados encontrados neste estudo foram satisfatórios, pois foram encontradas atividades celulolíticas maiores com um menor tempo de cultivo (24 h). Ferreira (2020) também avaliou a produção de celulases usando resíduo da acerola após os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio alcalino. Neste caso, foi obtida a atividade de celulases em torno de 1,08 U_{FP}/g, após 72 horas de cultivo usando o mesmo fungo filamentosos. Logo, pode-se afirmar que o pré-tratamento com ácido é mais eficiente para a produção de celulases, uma vez que, neste estudo, foi obtida uma atividade maior em apenas 24 horas de cultivo.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS

5.3.1 Temperatura ótima

O controle de temperatura em um bioprocesso é fundamental para seu sucesso, já que enzimas apresentam temperaturas ideais para a sua atividade de acordo com o substrato (GALHARDI et al., 2019). Além disso, a temperatura ótima de operação também reflete na aplicação das enzimas em um ambiente industrial. Dessa forma, foram realizados ensaios de atividade enzimática usando os substratos carboximetilcelulose e papel de filtro (CMC_{Case} e FPase) nas temperaturas de 40°C até 60°C, variando 5°C em cada ensaio com o objetivo de determinar qual a melhor temperatura para que o coquetel enzimático obtenha maior atividades destas enzimas. Os resultados são apresentados no Figura 7.

Figura 7- Ensaio de temperatura ótica das celulases produzidas usando os substratos carboximetilcelulose e papel de filtro.



Fonte: Autora

Na Figura 7, nota-se que a temperatura que obteve os maiores valores de atividade enzimática foi de 45°C para atividade de CMCase e 60°C para atividade de FPase, atingindo valores de 3,84 U_{CMC}/g e 3,30 U_{FP}/g no período de 24 horas de cultivo, chegando a quase o dobro da atividade encontrada a 50°C (seção 5.2). Este resultado mostra a importância da caracterização da enzima na sua reação com o substrato. As temperaturas diferentes encontradas indicam a variação de natureza dos substratos, sendo a carboximetilcelulose um substrato solúvel e o papel de filtro um substrato insolúvel. Para substratos insolúveis, além da etapa de reação, há a etapa de adsorção das celulases ao substrato através do módulo de ligação ao carboidrato. Assim, para estes casos, com o aumento da temperatura há um equilíbrio entre etapas de reação acelerada (ativação térmica) em um lado e uma mudança para menos enzima adsorvida pela superfície, que é potencialmente enzima ativa, por outro lado (SØRENSEN et al., 2015).

Em um estudo realizado por Ferreira (2020), em que foi avaliado a produção da celulase por FES no período de 72 horas com a mesma biomassa sendo pré-tratada com peróxido de hidrogênio e peróxido de hidrogênio alcalino, foram obtidos valores de até 1,08 FPU/g para atividade de FPase. Nesse estudo, após a otimização da temperatura, foi mensurando um valor 3,30 FPU/g para atividade de FPase no período de 24 horas de cultivo, sendo quase o triplo do encontrado por Ferreira (2020). O pré-tratamento empregado é um fator que influencia

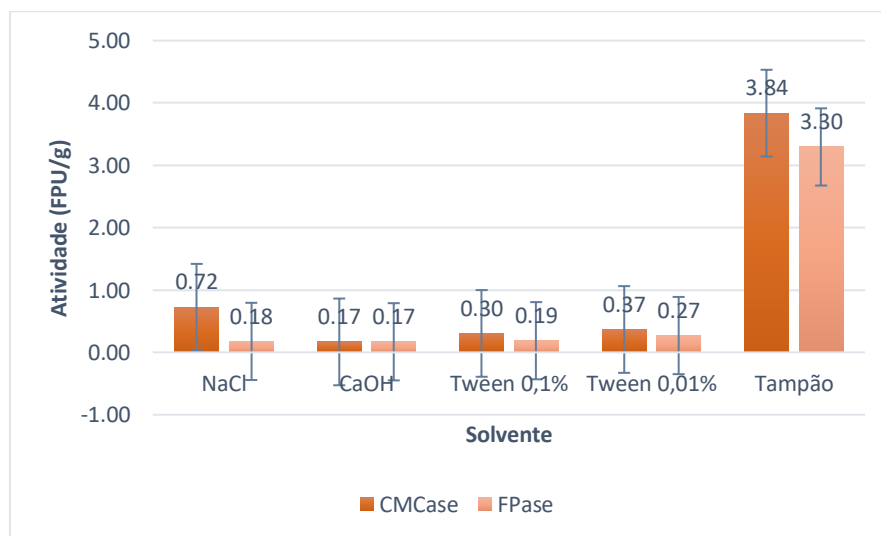
diretamente no custo do etanol produzido, e a sua eficiência pode facilitar ou dificultar a sacarificação enzimática, o que tem efeito direto no rendimento e produtividade na etapa de fermentação devido a quantidade dos açúcares produzidos (SANTIAGO; RODRIGUES, 2017). Assim, para a produção de etanol a partir do bagaço da acerola o pré-tratamento ácido se mostrou mais eficiente, como mencionado anteriormente.

5.3.3 Otimização da solução de extração para a produção de celulases

Existem algumas operações unitárias que podem ser utilizadas na etapa de recuperação e purificação do extrato enzimático sendo a mais comum delas a lixiviação do material sólido fermentado utilizando um solvente adequado. Este, por sua vez, ao entrar em contato com o meio fermentado deve conseguir fazer a extração sem alterar a atividade das enzimas (CAMPOS, 2021). Os principais responsáveis pela eficiência do processo de extração são: tipos de solvente, temperatura e tempo de exposição ao solvente. O resultado de uma baixa eficiência na extração da enzima pode anular economicamente a FES (ROCHA, 2018).

Nesse estudo, foram avaliados o poder de extração dos seguintes solventes: NaCl (154 mM), Ca(OH)₂ (3mM), Tween (0,01% (v/v)), Tween (0,1% (v/v)) e tampão citrato de sódio (50mM, pH 4,8) visando obter o melhor solvente para a extração das enzimas celulolíticas (Figura 8).

Figura 8- Resultados de atividade das enzimas produzidas através da extração com diferentes soluções



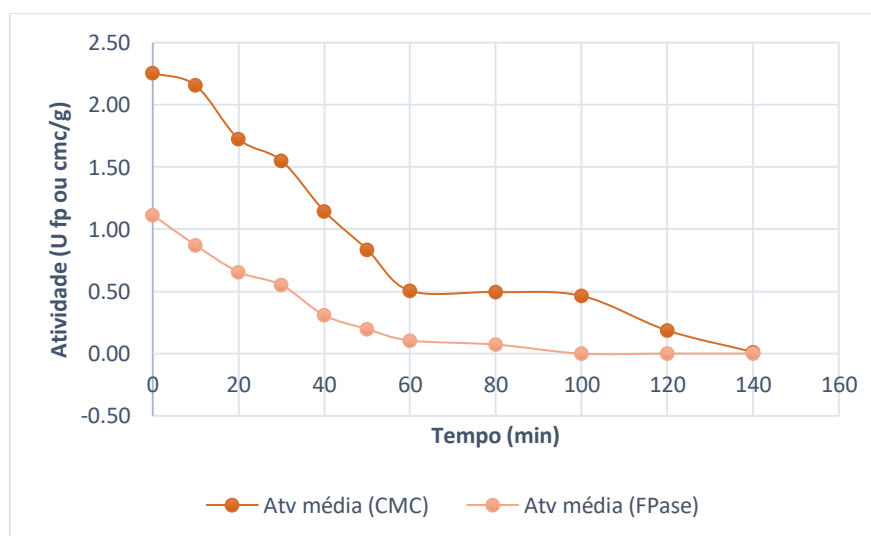
Fonte: Autora

Diferente do resultado encontrado por Campos (2021), que encontrou o NaCl como sendo a melhor solução de extração. No presente estudo, o solvente com melhor desempenho foi o tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8), apresentando uma atividade 3,837 U_{CMC}/g e 3,295 U_{FP}/g. A solução com pior desempenho foi o Ca(OH)₂ que apresentou uma atividade de 0,168 U_{CMC}/g e 0,17 U_{FP}/g. Guoweia et al. (2011) e Kalsoom et al. (2019) avaliaram o efeito do Tween 80 na produção de celulasas a partir de microrganismos do gênero *Trichoderma*. Verificou-se que, em baixas concentrações, o Tween 80 favoreceu a atividade hidrolíticas das enzimas, mas, em concentrações altas, havia a diminuição da atividade. Dessa forma, a tolerância ao Tween 80 variou dependendo da cepa utilizada. No presente estudo, as enzimas produzidas pela cepa *Trichoderma reesei* CCT 2768 não apresentaram tolerância ao Tween 80 quando este foi usado como solvente de extração.

5.3.2 Estabilidade térmica

É imprescindível avaliar a estabilidade térmica da enzima em função do tempo de exposição para a produção de enzimas industriais (ROCHA, 2018). Desse modo, a estabilidade do complexo enzimático produzido por *Trichoderma reesei* a 70°C é apresentada na Figura 9.

Figura 9- Resultados dos experimentos de estabilidade térmica a 70°C das enzimas produzidas.



Fonte: Autora

O extrato enzimático produzido pelo resíduo da acerola quando submetido a temperatura de 70°C apresenta diferentes atividades de CMCase e FPase. Para atividade de FPase, o extrato, no seu tempo zero, apresentou uma atividade de 1,11 U_{FP}/g e em 30 minutos sua atividade

diminuiu quase 50 %, atingindo uma atividade de 0,55 U_{FP}/g. Sua atividade foi zerada em 100 min de incubação, acusando uma desnaturação total da enzima.

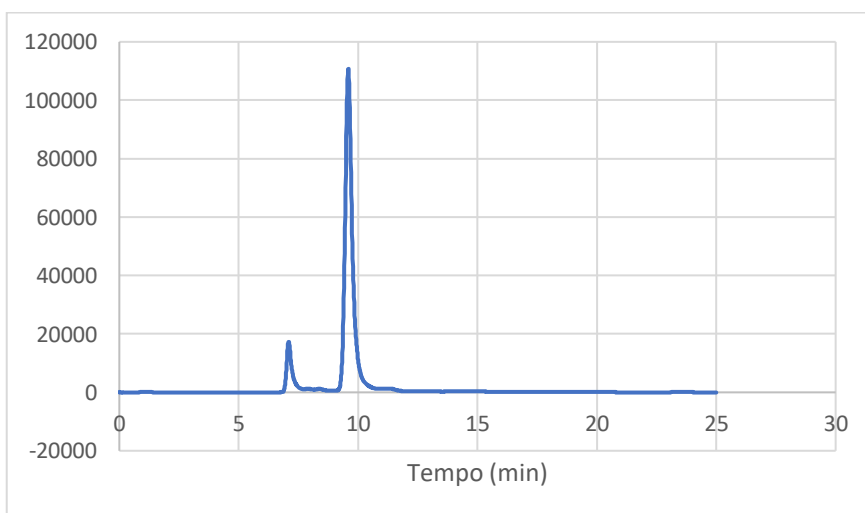
Para atividade de CMC_{Case}, o extrato, no seu tempo zero, apresentou uma atividade de 2,26 U_{CMC}/g e no tempo de 40 minutos sua atividade diminuiu quase 50%, atingindo uma atividade de 1,15 U_{CMC}/g. Sua atividade foi zerada um pouco depois da atividade FPase, no tempo de 140 min de incubação o extrato já havia sido completamente desnaturado.

No estudo realizado por Meló (2016), as celulasas produzidas por meio do processo de fermentação em estado sólido do resíduo agroindustrial da acerola, utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei*, apresentaram boa estabilidade térmica até a temperatura de 50°C, quando exposta a 60°C, por vinte minutos, a atividade caiu para 40,52% da atividade máxima e seu valor chegou a 0% a partir de 70°C. Essa comparação com os dados da literatura mostra que a produção das enzimas celulolíticas nesse estudo foi bem-sucedida devido a estabilidade térmica superior, conseguindo resistir por alguns minutos a temperatura de 70° C.

5.4 APLICAÇÃO DA ENZIMA NA PRODUÇÃO DO ETANOL DE 2ª GERAÇÃO

Os resultados da CLAE sobre a produção de etanol utilizando *Sacharomise Serevise IOC 4003* é apresentado no Figura 11

Figura 10- Resultado do cromatograma obtido por CLAE para avaliação da produção de etanol e açúcares fermentescíveis.



Fonte: Autora

As amostras de etanol e glicose foram identificadas comparando o tempo de retenção com o tempo de retenção das amostras padrão, sendo 23 min para o etanol e 10,2 min para a glicose.

Segundo o gráfico, a amostra mostrou uma quantidade 8,26g/L de glicose e nenhuma quantidade de etanol.

Uma das hipóteses para esse resultado é a presença de 0,39 % furfural na análise dos hidrolisado efetuada na seção 4.3.4.1. Dependendo da temperatura que for utilizada no processo, a utilização de ácidos no pré-tratamento do resíduo pode originar a formação de inibidores que afetam o metabolismo dos microrganismos no passo da fermentação, tais como furfural, hidroximetilfurfural e compostos aromáticos derivados da degradação da lignina (GOMES et al., 2016). Além disso, ainda segundo DE JESUS GOMES et al., 2016, pH baixos, podem também resultar na formação de subprodutos inibidores.

Outra hipótese que se pode considerar neste trabalho é que para a produção de etanol houve o contato da levedura após o cultivo do fungo filamentosos, assim existe a chance que o fungo filamentosos tenha inibido o crescimento da levedura no processo de fermentação.

6 CONCLUSÃO

Neste presente trabalho, foi possível avaliar o potencial da produção de enzimas celulolíticas a partir do resíduo agroindustrial de acerola pré-tratado por ácido diluído. Também foi estudado a viabilidade de emprego dessas enzimas na produção de etanol de segunda geração. A caracterização físico-química do resíduo antes e após o pré-tratamento atingiram os valores esperados pela literatura. Neste caso, houve uma diminuição de mais de 90% na quantidade hemicelulose e uma diminuição de quase 15% no teor de lignina na amostra após o pré-tratamento com ácido. O melhor tempo de cultivo FES para a produção do extrato enzimático foi de 24 horas e o solvente que apresentou melhor performance para extração foi o tampão citrato de sódio (50 μ M, pH 4,8), apresentando uma atividade 3,84 U_{CMC}/g para CMCase e de 3,29 U_{FP}/g para Fpase nas temperaturas ótimas para cada substrato. O extrato enzimático produzido pelo resíduo da acerola quando submetido a temperatura de 70°C atinge a desnaturação em 100 min para atividade de FPase e 140 min para atividade de CMCase. A produção do etanol lignocelulósico foi inibida, mas foram encontrados 8,26g/L de glicose ao final do processo.

Por fim, esta pesquisa contribui para a exploração de uma utilização alternativa dos resíduos da acerola e oferece orientações para investigações futuras relacionadas à otimização do processo de produção de celulasas a partir dessa biomassa lignocelulósica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANO, M. Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido. 2012. 64 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2012.
- ASEVEDO, E.; JÚNIOR, S.; SANTOS, E. Characterization of Filmogenic/Edible Covering Based on Pectin Extracted from Cajá (*Spondias mombin*) Applied to Coating Green Acerolas (*Malpighia emarginata*). *Journal of Chemical Engineering Research Updates*, [S. l.], v. 8, p. 36–47, 2021. DOI: 10.15377/2409-983X.2021.08.3.
- ARAÚJO, B. M. C. Valorização da fibra de coco verde para produção de lignosulfonato aplicado à produção de etanol de segunda geração. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2023
- ARAÚJO, B. M. C.; COSTA, I. O.; BRITO, H. G.; RIOS, N. S.; SANTOS, E. S. Enzyme Technology in Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass: Recent Trends with a Focus on Immobilized Enzymes. *BioResources*, v. 18, n. 4, p. 8653-8687, 2023.
- BACH, F.; MOJERON, C. F. M.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M.; Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de leite. *Engevista*, v. 16, n. 3, p. 392-409, 2014.
- BLISKA, F. M. de M.; LEITE, R S. da S. F. Aspectos econômicos e de mercado. In: SÃO JOSÉ, AR; ALVES, RE. (Ed.). *Acerola no Brasil: produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB, 1995
- BORGES, P. C. S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo embatelada alimentada. 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- CAETANO, A. C. S; MELO, E. A; LIMA V. L. A. G; MACIEL M. I. S; ARAÚJO C. R Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. *Braz. J. Food Technol.*, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.
- CAMPOS, A. O. Produção de enzimas celulolíticas por *Trichoderma reesei* cct-2768 por fermentação em estado sólido usando fibra de coco verde (*Cocos nucifera*) pré-tratada por explosão a vapor como substrato. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Natal/RN, 2021

CHEMMÉS, C. S.; SILVA, F. C.; SOUZA, L. S., JÚNIOR, R. A. A.; CAMPOS, L. M. A. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, v. 12, n. 1, 2013.

COSTA B. E. B.; da CRUZ, R. S.; RANGEL, F. C.; MENEGHETTI, S. M. P. Rev. Comparação entre a Hidrólise Química e Enzimática da Biomassa Lignocelulósica para a Produção de Bioetanol: uma Revisão. Revista Virtual Quim., 2021.

COSTA, T. H. F.; MASARIN, F.; BONIFÁCIO, T. O.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. Industrial Crops and Products, v. 51, p. 202– 211, 2013.

DAMIANI, C. I.; BOAS, E. V. de B. V.; SOARES JUNIOR, M. S. et al. Análise física, sensorial e microbiológica de geléias de manga formuladas com diferentes níveis de cascas em substituição à polpa. Ciênc. Rural, v.38, n.5, p.1418-1423, 2008.

DINIZ, D. S. Imobilização da lipase de Candida Antarctica do tipo B usando como suporte fibra de coco verde pré-tratada por explosão a vapor. Monografia (Graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Natal, 2023.

DESWAL, D.; GUPTA, R.; NANDAL, P.; KUHAD, R. C. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. Carbohydrate Polymers, v. 99, p. 264–269, 2014.

FERREIRA, C. R. R. Produção de enzimas celulolíticas e etanol celulósico a partir do resíduo de acerola. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. de S.; MARTINAZZO, A. P. Use of agro-industrial waste for cellulase production: a review. Research, Society and Development, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e567985785, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5785.

GALHARDI, D. R. V. Estudo da variação de temperatura em biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento para aplicação na produção de exopolissacarídeos. Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Química - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

GOMES, D. S. J. Estudo do Pré-Tratamento Ácido e Hidrólise Enzimática da Borra de Café Visando a Produção de Bioetanol. Tese de Doutorado. Instituto Politecnico do Porto (Portugal), 2016

GUEDES, R. C. Estudo da influência de pré-tratamentos de dois resíduos lignocelulósicos (bagaço do pedúnculo de caju e casca de coco) utilizados como substrato na indução à síntese de enzimas celulolíticas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010

GUOWEIA, S.; HU, M.; SHIKAI, W.; CHEN, H. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Environmental Sciences*, vol. 8, 2011, p. 357-361. Doi: [org/10.1016/j.proenv.2011.10.056](https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.056).

HAO, L. N.; UMAR, M.; KHAN, Z.; ALI, W. Green growth and low carbon emission in G7 countries: How critical the network of environmental taxes, renewable energy and human capital is? *Science of the Total Environment*, v. 752, n. 141853, p. 1–10, 2021.

JUNIOR, G. S. F. Produção de celulasas por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

JUNIOR, J. E L.; NIEVA, J. N. N; RODRIGUEZ, N. M; COSTA, J. M. C. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agrônoma*, v. 37, n. 1, p. 70-76, 2006.

KALSOOM, R.; AHMED, S.; NADEEM, M.; CHOHAN, S.; ABID, M. Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. *International Journal of Environmental Science and Technology*. v. 16, p. 921-928, 2019.

LAUFENBERG, B.; KUNZ, M. Nystroem Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations *Bioresour. Technol.*, 2003

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology*, v.41, p.105-110, 2003.

- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.
- MANKAR, A. R.; PANDEY, A.; MODAK, A.; PANT, K. K. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresour Technol.* 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125235.
- MARCO, E. G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. 2012.
- MARTINS, C. Z. Avaliação da produção de etanol de segunda geração. 2018.
- MÉLO, B. C. A. Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia* sp.) utilizando *Trichoderma reesei*. 2016.
- MONTEIRO, V. N. O.; NASCIMENTO, R. S. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista processos químicos*, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE G.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, J. P.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv.* 2010 doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NUNES, M. H. R. S. Estudo de caso do cultivo de acerola em Maranguape, Ceará. 2020.
- OLIVIERI, G.; WIJFFELS, R. H.; MARZOCHELLA, A.; RUSSO, M. E. Bioreactor and Bioprocess Design Issues in Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Catalysts* 2021, 11, 680. <https://doi.org/10.3390/catal11060680>
- OLIVEIRA, S. L. R. Aproveitamento da casca de coco verde (*Cocos nucifera* L.) para produção de celulases. 2010. 96f. Dissertação, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza/CE.
- PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. UFPR, Curitiba, 2007.
- RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 32, n. 264, p. 17-25, 2011.

ROCHA, J. C. Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando resíduos de frutas tropicais como substrato. 2018. Dissertação de Mestrado. Brasil.

SANCHO S. O; SILVA M. G. V; RODRIGUES S.; MACIEL T. C. Parâmetros físico-químicos dos resíduos desidratados de acerola (*malpighia glabra* I.), abacaxi (*ananas comosus* I. mer.), manga (*mangifera indica* I.) e sapoti (*achras sapota* I.). XI ENPPG, XI ENICIT, III SIMPIT – IFCE 2009.

SANTIAGO B. L. S.; RODRIGUES S. A. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: uma revisão. v.3 n. 07, 2017.

SANTOS, L. A. Potencial de geração de biogás a partir de resíduos agroindustriais de frutas. 2019.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. Química Nova, 2012

SILVA, A. D. A. Produção de Biohidrogênio por fermentação escura empregando materiais lignocelulósicos. 2016. 43 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

SILVA, F. L.; CAMPOS, A. O.; SANTOS, D. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; PADILHA, C. E. A.; SOUSA JÚNIOR, F. C.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. Renewable Energy, v. 116a, p. 299-308, 2018

SØRENSEN, T. H.; CRUYS-BAGGER, N.; WINDAHAL, M. S.; BADINO, S. F.; BORCH, K.; WESTH, P. Temperature effects on kinetic parameters and substrate affinity of Cel7A cellobiohydrolases. Journal of Biological Chemistry, 2015.

TIBONI, M. Produção De Oligossacarídeos Prebióticos a Partir De Diferentes Pré-Tratamentos De Fitobiomassas. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

TU, M; ZHANG, X; PAICE, M; MACFARLANE, P; SADDLER, J.N. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. Bioresource Technology, v. 100, n.24, p. 6407-6415, 2009.

TURA, Â. Fermentação de açúcares liberados de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com líquidos iônicos para a produção de etanol. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade de Caxias do Sul. 2015.

UCHÔA, A. M. A. Adição de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais na formulação de biscoitos. 2007. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, 2007.

WANG M, LI Z, FANG X, WANG L, QU Y. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2012; 128:1-24. doi: 10.1007/10_2011_131

ZABEB, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2017, 71, 475.

ZANCHETTA, A. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica. 2012.

ZHENG, Y.; ZHAO, J.; XU, F; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science* 2014, 42, 35.