



PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA BIOMASSA DE *Eichhornia crassipes* VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA FÚNGICA

MARIA CRISTINA SOUZA; CYNTHIA BEATRIZ FURSTENBERGER; GABRIELA DE CÁSSIA JAVORSKI; CAMILA CAMARGO GOMES; EVERSON DO PRADO BANCZEK

RESUMO

Os biocombustíveis surgem como uma alternativa para os combustíveis fósseis, que são recursos limitados. Dentre eles, o bioetanol se destaca como uma opção promissora, pois pode ser produzido a partir de diversas fontes de biomassa renovável, isso o torna uma alternativa mais sustentável, pois não está sujeito à escassez dos recursos e sua queima libera menos gases poluentes causadores do efeito estufa. Este estudo teve como objetivo comparar a eficiência da hidrólise enzimática do fungo *Grifola frondosa* em biomassa de Aguapé (*Eichhornia crassipes*), após 07 e 21 dias de crescimento, para a produção de etanol de segunda geração, fermentado pela bactéria *Escherichia coli*. Os resultados obtidos, após destilação fracionada, foram comparados com os padrões estabelecidos pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para etanol hidratado combustível. Embora os teores alcoólicos ainda estejam abaixo do exigido pela regulamentação, os resultados foram consistentes. O teor alcoólico máximo obtido foi de 82,3%, com o crescimento de 21 dias do fungo na biomassa. As massas específicas obtidas estão acima dos limites devido ao baixo teor alcoólico, uma vez que esses parâmetros são inversamente proporcionais. A cor e o aspecto visual das amostras estavam adequados, sendo límpidas e sem impurezas. Quanto ao pH, todas as amostras estavam dentro dos limites estabelecidos pela regulamentação. Esses resultados indicam que a biomassa de Aguapé, pode ser uma fonte viável para a produção de etanol de segunda geração. É um passo promissor para a pesquisa futura e o desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis aos combustíveis fósseis.

Palavras-chave: Aguapé; *Grifola frondosa*; Fermentação; Lignocelulose; Fungo.

1 INTRODUÇÃO

O bioetanol é o biocombustível com expectativas mais otimistas para o futuro (FURLAN, 2009), em especial, o de segunda geração, que é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, de resíduos de origem vegetal (TEIXEIRA, 2019), o componente orgânico mais abundante e renovável da biosfera (CHAMPAGNE, 2017).

O Aguapé (*Eichhornia crassipes*) apresenta uma grande vantagem perante diversas fontes de biomassa, pois por se tratar de uma planta aquática, não compete com os recursos terrestres usados no cultivo de alimentos aráveis além de possuir uma rápida capacidade de disseminação e crescimento populacional (REZANIA, et al., 2015), com isso, a necessidade de estabelecer medidas para o controle do seu crescimento são fatores que contribuem para o desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a produção de bioetanol a partir de sua biomassa (TEIXEIRA, et al., 2019).

Na tecnologia para a produção de etanol de segunda geração é necessária uma etapa de hidrólise, que pode ser química ou enzimática, para a conversão da celulose em açúcares, para posterior fermentação dos microrganismos (BRONZATO, 2016; MORAIS et al., 2019), sendo

que a enzimática é mais barata, branda e menos agressiva ambientalmente (CARMINATTI, 2001; DUFF e MURRAY, 1996; FERREIRA et al., 2013).

Os fungos são responsáveis pela grande maioria da degradação da biomassa na natureza. *Grifola frondosa*, é conhecido por produzir uma ampla gama de enzimas hidrolíticas e oxidativas, que através de sua ação combinada, lhes permitem colonizar, degradar e bioconverter com sucesso muitos substratos lignocelulósicos (BARRETO, ALZETE e LEVIN, 2011). O uso do fungo *Grifola frondosa*, apresenta vantagens sobre a utilização de enzimas purificadas, uma vez que estas apresentam maiores custos de aquisição, o que pode ocasionar inviabilidade econômica da produção (LORENZETTI, 2018)

O objetivo deste trabalho é produzir bioetanol de segunda geração a partir da hidrólise enzimática do fungo *Grifola frondosa* sobre a biomassa de *Eicchornia crassipes*, fermentada pela bactéria *Escherichia coli* e compara-lo com a regulamentação técnica da Agência Natural do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) nº 907/2022

2 MATERIAL E MÉTODOS

A biomassa utilizada neste trabalho, foi coletada na estação de tratamento de esgoto (ETE) da Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), localizada no município de Pitanga- PR, nas coordenadas 24° 45' 26" S e 51° 45' 41" W.

A primeira etapa no processo de produção do etanol, consiste no pré-tratamento, onde a biomassa foi higienizada e cortada em pedaços menores, em seguida foi levada para uma estufa de secagem onde permaneceu a 105 °C, até a perda total de água. Posteriormente foi processada em liquidificador a fim de diminuir a superfície de contato e seguir para as próximas etapas.

A etapa seguinte, que consiste na hidrólise, que é quebra do polímero de celulose da biomassa em monômeros de glicose. A hidrólise enzimática foi realizada pelo fungo *Grifola frondosa*, previamente cultivado em estufa bacteriológica. Estes ensaios foram realizados em triplicata, onde foram pesados 10g de biomassa seca e adicionados 10mL de água destilada e submetidos a autoclavagem, após isso, o fungo foi inoculado na biomassa e levado para a estufa bacteriológica durante 07 e 21 dias, a fim de comparação.

Após esse tempo de incubação, o conteúdo do Erlenmeyer foi completado para 100ml com água deionizada.

Para o processo de fermentação foi utilizada a bactéria *Escherichia coli*, previamente cultivada em meio líquido, após a sua inserção no meio, as amostras foram levadas para dentro de jaras de anaerobiose e acondicionadas em estufa bacteriológica por 48h.

Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de destilação fracionada, que tem como objetivo separar líquidos de volatilidades distintas, separando dessa forma, o etanol dos demais componentes do mosto, como a água, por exemplo.

O etanol obtido foi analisado conforme a regulamentação técnica da ANP nº 907/2022. Para os parâmetros de cor e Aspecto, onde os limites estabelecidos são Incolor e Límpido e Isento de Impurezas (LII), respectivamente. O método para este teste é visual, onde o etanol é levado a um recipiente translúcido, e colocado contra a luz, a fim de observar suas características visuais.

O potencial hidrogeniônico (pH), foi analisado com o auxílio de fitas indicadoras universais de pH, sendo o seu limite estabelecido entre 6,0 a 8,0.

O teor alcoólico foi obtido através da metodologia NBR- 13920, com a preparação de uma curva de calibração e leitura das amostras e padrões em espectrofotômetro UV-VIS, a 600nm, sendo o limite aceito entre 92,5 a 95,4 %.

A Massa específica a 20°C foi analisada através do teor alcoólico com o auxílio do Software “Tabelas Alcoolométricas” da ABNT, sendo o limite aceito entre 802,9 a 811,2 Kg/m³.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão relacionados os resultados das análises físico-químicas do etanol que foi obtido após o processo de destilação

Tabela 1: resultados obtidos das análises do etanol produzido após a destilação

ID	Tempo de hidrólise	Cor Visual	Aspecto Visual	Teor alcoólico (%)	Média teor alcoólico	Massa específica (Kg/m ³)	Média Massa específica	Média pH	Média pH
1	07 dias	Incolor	*L.I.I.	71,0	68,3	865,22	871,62	6,0	6,0
2	07 dias	Incolor	*L.I.I.	65,6		878,03		6,0	
1	21 dias	Incolor	*L.I.I.	78,4	80,3	847,32	842,49	6,5	6,5
2	21 dias	Incolor	*L.I.I.	82,3		837,67		6,5	

*L.I.I. = Límpido e Isento de Impurezas

Todos os resultados de pH ficaram dentro dos limites estabelecidos pela ANP para etanol combustível, quanto as análises visuais, todas as amostras apresentaram-se límpidas e isentas de impurezas para o aspecto, e quanto a cor, todas estavam incolores.

Os teores alcoólicos obtidos em todas as hidrólises ainda estão baixos de acordo com o exigido pela ANP, porém, pode-se perceber que houve um aumento no teor alcoólico obtido com 21 dias de hidrólise em comparação com o de 07 dias, indicando que o fungo está cumprindo seu papel de decompositor e conseguindo liberar a celulose em forma de açúcar para posteriormente ser fermentada pela bactéria.

Como a massa específica e o teor alcoólico são fatores codependentes, e o teor alcoólico ainda ficou abaixo do estabelecido para combustível pela ANP, as massas específicas ficaram todas acima dos limites, uma vez que esses fatores são inversamente proporcionais.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho comprovou que o fungo *Grifola frondosa* possui um grande potencial de realizar hidrólise da biomassa de *Eicchornia crassipes*.

O maior fator limitante da hidrólise enzimática para esta metodologia é o tempo, uma vez que o fungo demorou 21 dias para crescer na biomassa e chegar a este resultado, mas tratando-se de uma escala industrial, após estes 21 dias pode-se estabelecer um sistema de fluxo contínuo diário dessas hidrólises, o que não afetaria a produção. Outro fator importante a ser considerado, seria que por tratar-se de um organismo vivo, o fungo necessita de cuidados para evitar contaminação de outros microrganismos e não afetar assim a sua ação hidrolítica.

Apesar dos fatores citados acima, vale salientar que a hidrólise enzimática ocorre em condições muito mais brandas que as químicas, e são ambientalmente menos degradantes, vantagem ainda que se estende perante a utilização das enzimas brutas do fungo, que é uma técnica muito mais barata quando comparada à utilização de enzimas purificadas, o que poderia deixar o processo economicamente inviável.

REFERÊNCIAS

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução da ANP 907/2022. Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-907-2022-dispoe-sobre-as-especificacoes-do-etanol-combustivel-e-suas-regras-de-comercializacao-em-todo-o-territorio-nacional?origin=instituicao>. Acesso em 29 de abril de 2023.

BARRETO, S. M. ; ALZATE, C. O. E.; LEVIN, L. Modeling Grifola frondosa fungal growth during solid-state fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 3, p. 316-321, 2011.

BRONZATO, G.R.F. **Investigação da biomassa de Eichhornia crassipes (aguapé) para a obtenção de etanol de segunda geração como um processo mitigatório da poluição aquática**. 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

CARMINATTI, C.A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase Kluyveromyces lactis**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

CHAMPAGNE, P. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada. **Resources Conservation e Recycling**. v. 50, p. 211-230, 2007.

DUFF, S.J., MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.** n. 55, p. 1-33, 1996.

FERREIRA, S.M.; CALIARI, M.; JÚNIOR, M.S.; BELEIA, A.P. produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.4, p.383-390, 2013.

LORENZETTI, A. **Efeito do ultrassom na hidrólise enzimática das proteínas do soro lácteo e disponibilidade in vitro**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

MORAIS, P.P; PASCOAL, P.V.R.; ROCHA, E.S.M.; MARTINS, E.C.A. Etanol de 2 geração: atual produção e perspectivas. **Bioenergia em revista: diálogos**, n. 1, p. 45-57, 2017.

REZANIA, S., PONRAJ, M., TALAIEKHOZANI, A., MOHAMAD, S. E., DIN, M. F. M., TAIB, S. M., SAIRAN, F. M. Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. **Journal of environmental management**, v. 163, p. 125-133, 2015.

TEIXEIRA, D. A. **Produção de etanol de segunda geração a partir de aguapé (Eichhornia crassipes)**. 2019. Dissertação (Mestrado em biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.