



Pré-tratamento termo-ácido e hidrólise enzimática de uma mistura de casca de cacau e bagaço de malte

Thermo-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of a mixture of cocoa pod shell and brewer's spent grain

G. A. Garcia¹, F. P. Lobo¹, K. S. Morais², M. B. D. Bezerra¹, E. Aguiar-Oliveira^{1,2*}

¹Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas (DCET), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), 45662-900, Ilhéus-BA, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos (PPGBBM), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), 45662-900, Ilhéus-BA, Brasil

*eaoliveira@uesc.br

(Recebido em 16 de dezembro de 2021; aceite em 15 de junho de 2023)

O uso dos resíduos agroindustriais (RAI) tem se destacado por sua constituição (celulose, hemicelulose, amido etc.) – que ao ser hidrolisada, libera açúcares fermentescíveis – e, devido ao fato de o Brasil possuir um forte setor agroindustrial, o país apresenta uma grande disponibilidade e variedade de RAI. Assim, tendo em vista propor a utilização de RAIs disponíveis no Sul da Bahia para obtenção de bioetanol, investigou-se uma mistura equivalente (p/p) de casca de cacau (CC) e bagaço de malte (BM). As melhores condições de processo, que resultaram em 224,37 $\mu\text{mol/g}$ de açúcares redutores (glicose) por peso de resíduos, foram definidas com o auxílio da ferramenta estatística de Planejamento Experimental para o pré-tratamento [razão de sólidos totais de 5,3% (p/v), 0,5% (v/v) de HCl, 15 min de autoclavagem] e para a hidrólise [pH = 4,0, carga enzimática total de amilases comerciais por peso de sólidos totais de 40 U/g, 70 °C e 30 min]. O meio hidrolisado obtido foi então fermentado por 18 h, resultando em 4,06% (v/v) de etanol, e os resultados obtidos até o momento indicam que a mistura de CC e BM, ao invés do uso individual destes resíduos, pode ser destinada a diferentes bioprocessos. Observou-se também que o aumento da proporção de CC na mistura diminui a massa hidrolisada, devido à sua diferente composição química, o que comprova a necessidade de avaliar diferentes técnicas de pré-tratamento para diferentes proporções de RAI e assim otimizar a obtenção de açúcares fermentescíveis.

Palavras-chave: bioetanol, planejamento experimental, valorização de resíduos lignocelulósicos.

The use of agro-industrial residues (AIR) has stood out due to its constitution (cellulose, hemicellulose, starch, etc.) – which, when hydrolyzed, releases fermentable sugars – and, due to the fact that Brazil has a strong agro-industrial sector, this country has a great availability and variety of RAI. Thus, with a view to proposing the use of RAIs available in southern Bahia to obtain bioethanol, an equivalent mixture (w/w) of cocoa husk (CC) and brewer's spent grain (BSG) was investigated. The best process conditions, which resulted in 224.37 $\mu\text{mol/g}$ of reducing sugars (glucose) per weight of total solids, were defined with the aid of the Experimental Design statistical tool for the pretreatment [ratio of total solids of 5.3% (w/v), 0.5% (v/v) HCl and autoclaving time of 15 min] and for the hydrolysis [pH = 4.0, total enzymatic charge by weight of total solids of 40 U/g (commercial amylases), 70 °C and 30 min]. The hydrolyzed medium obtained was then fermented for 18 h, resulting in 4.6% (v/v) of ethanol, and the results obtained so far indicate that the mixture of CC and BM, instead of the individual use of these residues, can be destined to different bioprocesses. It was also observed that increasing the proportion of CC in the mixture decreases the hydrolyzed mass, due to its different chemical composition, which proves the need to evaluate different pre-treatment techniques for different proportions of RAI and thus optimize the obtainment of sugars fermentable.

Keywords: bioethanol, experimental design, valorization of lignocellulosic residues.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais (RAI), como cascas, aparas, bagaços etc., são basicamente constituídos por celulose, hemicelulose, amido, lignina e outros compostos; celulose, hemicelulose e amido são polissacarídeos formados, por exemplo, por glicose e xilose que por sua vez podem ser fermentadas por microrganismos específicos e a lignina é um composto inerte

que confere rigidez ao vegetal [1, 2]. No entanto, essas estruturas vegetais precisam ser apropriadamente degradadas para se obter os monossacarídeos fermentescíveis (ou açúcares redutores – AR, em especial, a glicose) e assim obter produtos de maior valor agregado [3], por exemplo, o bioetanol (ou etanol de segunda geração). Considerando as diferentes composições de cada RAI, diferentes combinações de técnicas podem ser aplicadas para se promover inicialmente a degradação da estrutura vegetal, denominada de etapa de pré-tratamento (físicos, químicos, mecânicos etc.) seguida da etapa específica de hidrólise enzimática para liberação dos AR. É durante a etapa de pré-tratamento que também se deve promover a remoção da lignina que tende a ser tóxica para a etapa fermentativa [3-5].

É importante mencionar que o Brasil, por ser um país com setores agropecuário e agroindustrial fortes, possui uma grande variedade de resíduos que podem ser valorizados. Um dos mais tradicionais é o bagaço da cana de açúcar que já tem seu destino bem estabelecido na produção de bioetanol [6]. Considerando-se ainda que cada região do Brasil possui atividades agroindustriais diferentes, é possível compreender como é importante que se proponha o uso dos resíduos locais e se estimule os princípios de economia circular e biorrefinaria [7]. Para este presente trabalho, foram selecionados dois resíduos comuns na região Sul da Bahia: cascas de cacau (CC), provenientes do processamento do cacau a chocolate, e bagaço de malte (BM), proveniente da produção de cerveja. O Brasil foi o sétimo maior produtor de cacau em 2022, com o estado da Bahia sendo responsável por 47% da produção nacional que foi de 310 mil toneladas [8, 9]. As cascas de cacau podem chegar a representar 75% do peso do fruto, e correspondem ao resíduo gerado em maior quantidade no beneficiamento do fruto [10, 11]. Já em relação à produção de cerveja, o Brasil ocupa o terceiro lugar mundial com a indústria cervejeira nacional produzindo cerca de 14,1 bilhões de litros de cerveja por ano [12] e vale ressaltar que o bagaço de malte corresponde a 85% dos resíduos produzidos e estima-se que para cada litro de cerveja produzida seja gerado 0,2 kg de BM [13, 14].

Levando em consideração que as composições químicas dos RAI variam em função de fatores climáticos, geográficos e sazonais, tem sido relatado composições médias para a CC de aproximadamente 22% de celulose e 11% de hemicelulose [10] e para o BM valores médios aproximados são de 17% de celulose e 23% de polissacarídeos não celulósicos [13]. Para o pré-tratamento de CC [15-18] e BM [19-22] tem sido propostas diferentes metodologias, por exemplo, moagem, calor úmido, calor gerado por eletromagnetismo, pressão, uso de químicos como bases, ácidos e líquidos iônicos, plasma pressurizado etc. Porém, alguns desses tratamentos utilizados são onerosos ou requerem equipamentos complexos ou reagentes de alta toxicidade, o que muitas vezes inviabiliza sua aplicação em uma maior escala.

Sendo assim, o presente trabalho se propôs a empregar técnicas de menor complexidade e menor custo para o pré-tratamento e hidrólise de uma mistura (*blend*) equivalente (p:p) de CC e BM, ao invés de estudá-los individualmente, de forma a se estimular o uso de resíduos variados disponíveis localmente. Dessa forma, foi realizado o pré-tratamento termo-ácido e a hidrólise enzimática com amilases comerciais, para se selecionar as melhores condições para obtenção de açúcares redutores (AR); para este fim, empregou-se a ferramenta estatística de Planejamento Experimental. Os resultados obtidos com a fermentação do meio hidrolisado são encorajadores pois demonstram o bom potencial da mistura de resíduos para se obter açúcares fermentescíveis que podem ser empregados em estudos complementares para a obtenção de bioetanol ou outros bioprodutos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos resíduos

Cascas de cacau (*Theobroma cacao*) (CC) foram obtidas de produtores da região de Ilhéus e Itabuna (Bahia, Brasil). Posteriormente foram cortadas manualmente e secas em estufa (QUIMIS Q317M-43) a 70 °C até peso constante (cerca de 24 horas). Em seguida, elas foram trituradas em moinhos de facas (TRF 400, Trap) de forma a se obter uma granulometria semelhante à do bagaço de malte. O bagaço de malte (BM), proveniente da produção de uma cerveja tipo *Pale ale*, foi

obtido na Microcervejaria da UESC (Ilhéus/BA, Brasil). Este foi seco em estufa sob as mesmas condições da (CC), porém, sem a necessidade de trituração. Os resíduos foram reservados em recipientes fechados e armazenados à temperatura ambiente (~ 25 °C) até o momento de uso.

2.2 Hidrólise termo-ácida e enzimática

Com base em Ravindran et al. (2018) [22], a hidrólise de 10 g de uma mistura (*blend*) equivalente (5:5 g/g) dos resíduos CC e BM foi realizada em duas etapas consecutivas, em Erlenmeyers de 250 mL. A primeira etapa, pré-tratamento termo-ácido, foi realizado em autoclave vertical (Primatec CS18) (121 °C / 1 atm) com a adição de um determinado volume de solução ácida por tempo determinado. Após resfriamento, o pH foi ajustado com gotas de solução concentrada de NaOH. Em seguida, a segunda etapa, hidrólise enzimática, foi realizada empregando duas soluções enzimáticas comerciais sugeridas para o preparo de mostos cervejeiros. Essas soluções foram doadas pela empresa Prozyn BioSolutions (São Paulo, Brasil): Maltezyn HT (*E1*) contendo em sua maioria α - e β -amilases, e Star Max Super Beer (*E2*), composta majoritariamente por α -amilases. A reação enzimática foi conduzida em incubadora tipo shaker (SL-221/F) com 120 rpm sob condições definidas de temperatura e tempo. Por fim, para inativação das enzimas, o meio hidrolisado foi mantido em ebulição numa chapa aquecedora (Fiaston, 501) por cerca de 5 min seguida de 5 min de banho de gelo e consequente filtração à vácuo do meio para separação das frações líquida (meio hidrolisado) e sólida (sólidos não hidrolisados).

2.3 Estudo das condições de hidrólise

As melhores condições de hidrólise foram investigadas com o auxílio da ferramenta estatística de Planejamento Experimental [23]. Os fatores (variáveis independentes) selecionados para a etapa de hidrólise termo-ácida foram: volume (V , mL) e concentração (HCl , mL/L) da solução ácida (HCl) e o tempo de autoclavagem (t_a , min). Já para a etapa de hidrólise enzimática, os fatores foram: o pH (pH), as cargas enzimáticas de *E1* e *E2* (U/g), o tempo (t_e , min) e a temperatura (T , °C). As respostas (variáveis dependentes) consideradas foram: açúcares redutores (AR , $\mu\text{mol/g}$), teor de sólidos solúveis (SS , °Brix) e proporção de massa não hidrolisada (R , % p/p). O estudo foi conduzido com a aplicação de duas matrizes (PB12 e DCC 2²) sendo a análise estatística realizada com o software Protimiza Experimental Design® (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>).

2.3.1 Matriz PB12

O estudo se iniciou com uma matriz do tipo Plackett Burman (PB12) com oito fatores variando em: V de 90 a 150 mL, HCl de 5 a 20 mL/L, t_a de 15 a 25 min, pH de 4 a 7, *E1* e *E2* de 0 a 10 U/g, t_e de 30 a 90 min e T de 30 a 70 °C. Com os valores obtidos das respostas foi realizada a Análise dos Efeitos com 80% de confiabilidade.

2.3.2 Matriz DCC 2²

Com a definição, na etapa anterior, dos valores fixos para: $t_a = 15$ minutos, *E1* e *E2* = 10 U/g, $t_e = 30$ min e $pH = 4,0$, foi realizada, em sequência, uma matriz do tipo Delineamento Composto Central (DCC 2²) com dois fatores, V e HCl , variando, respectivamente, de 150 a 190 mL e de 0 a 5 mL/L. Por limitações técnicas momentâneas, não foi possível realizar o ponto central em triplicata e por este motivo foi realizada apenas a Análise dos Efeitos com 85% de confiabilidade.

2.4 Análise da composição dos resíduos e do uso das soluções enzimáticas

Sob as melhores condições de hidrólise definidas para uma mistura 5:5 (g/g) de CC e BM: $V = 190 \text{ mL}$, $HCl = 5 \text{ mL/L}$, $t_a = 15 \text{ minutos}$, $E1 \text{ e } E2 = 10 \text{ U/g}$, $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_e = 30 \text{ min}$ e $pH = 4,0$, foram investigadas duas novas proporções CC:BM (g/g): 9:1 e 1:9. Também foi realizada uma condição apenas com a etapa termo-ácida visto que as amilases são enzimas complementares na hidrólise de material lignocelulósico. Os meios hidrolisados obtidos foram analisados quanto a AR ($\mu\text{mol/g}$), SS ($^\circ\text{Brix}$) e R (%).

2.5 Fermentação e destilação

Para a fermentação, foram empregados 150 mL de meio hidrolisado (clarificado) obtido nas melhores condições definidas para uma mistura 5:5 (g/g) dos resíduos CC e BM contendo $AR = 193,23 \mu\text{mol/mL}$ que foi autoclavado (15 min) e recebeu 5 g/L da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CA-11, doada pela empresa LNF (Bento Gonçalves-RS, Brasil). A incubação foi realizada em shaker (SL-221/F, SoLab) à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18 h, em seguida, o meio foi centrifugado a 10.000 g (Thermo scientific, 16R) por 10 min para separação de sólidos. O meio clarificado foi destinado à destilação realizada em escala de bancada com balão volumétrico de fundo redondo (250 mL) e uma manta aquecedora (FISATON, 201E) com a temperatura mantida entre $78 - 81 \text{ }^\circ\text{C}$ e um condensador encamisado de vidro. O volume do condensado (etanol) foi recolhido em uma proveta graduada de 20 mL e o teor alcoólico foi estimado como % (v/v) considerando o volume da fermentação.

2.6 Determinação dos açúcares redutores (AR) e atividade enzimática

A determinação da concentração de açúcares redutores (AR), expressos como glicose, foi realizada por meio da metodologia do DNS (ácido dinitro-salicílico) [24]. A reação foi conduzida com 0,5 mL da amostra e 0,5 mL do reagente DNS que foram mantidos em banho-maria (15 min) sendo a reação interrompida em banho de gelo (10 min). Antes da leitura da absorbância, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada (fator de diluição $f_{dns} = 10$). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bel, SP2000 UV) a 540 nm. O valor da absorbância (abs) usado no cálculo foi descontado do valor apresentado pela condição branco realizada substituindo a quantidade de amostra por água destilada. Também foi realizada a curva padrão de glicose na faixa de 0,5 a 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ que apresentou uma inclinação (a) de $0,10557 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{abs})$ ($R^2 = 0,9989$). O cálculo foi feito com base na Equação 1, sendo considerado o fator de diluição da amostra (f_{dil}), quando necessário. Os valores obtidos de AR foram também expressos por peso de resíduos utilizado ($\mu\text{mol/g}$); para isso, multiplicou-se pelo volume de meio hidrolisado obtido e dividiu-se pela massa inicial de resíduos (10 g).

$$AR (\mu\text{mol/mL}) = (abs) \cdot (a) \cdot (f_{dil}) \cdot (f_{dns}) \quad (01)$$

Para a atividade de amilase dos extratos comerciais utilizados, foi considerada uma unidade de atividade (U) como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de AR , expresso em glicose, por unidade de tempo. A reação enzimática ocorreu com base em Cunha et al. (2016) [25], com adaptações, em banho termostático (TE-2005) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min com 2 mL de solução tampão acetato (100 mM / pH 6,0) contendo 0,375% (p/v) de amido e 0,5 mL da amostra ($f_{enz} = 5$). Em seguida, a enzima foi inativada com choque térmico e procedeu-se a determinação de AR (Eq. 01) sendo então calculada a atividade de amilase na solução enzimática comercial (U/mL) conforme representado na Equação 2. Sob estas condições a solução Maltezynt HT apresentou atividade de 11,56 U/mL e a Star Max Super Beer de 26,56 U/mL. Para o cálculo do volume (mL) de solução enzimática a ser empregado na hidrólise, multiplicou-se o valor da carga enzimática desejada ($E1$ ou $E2$, U/g) pela massa inicial de resíduos (10 g) e dividiu-se pela atividade de amilase da solução (U/mL).

$$\text{Amilase} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{(AR) \cdot (f_{enz})}{(t)} \quad (02)$$

2.8 Determinação dos sólidos solúveis (SS) e da proporção de massa não hidrolisada (R)

Os sólidos solúveis (SS) foram determinados pela leitura em refratômetro portátil (RHB90), com graduação em °Brix (% p/v), de análise direta. A porcentagem de massa de resíduos não hidrolisada (R, % p/p) foi calculada pela razão percentual entre a massa após a hidrólise (m_f , g) e antes da hidrólise ($m = 10$ g).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Definição das melhores condições de hidrólise

3.1.1 Matriz PB12

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para as respostas: açúcares redutores (AR, $\mu\text{mol/g}$), sólidos solúveis (SS, °Brix) e razão de massa hidrolisada (R, % p/p), com a execução da matriz PB12. A Análise dos Efeitos realizada para as respostas obtidas é apresentada na Tabela 2, sendo que a análise principal foi realizada com base na resposta AR e a análise complementar com as respostas SS e R.

Tabela 1- Matriz Plackett-Burman (PB12) codificada para a hidrólise de 10 g de cascas de cacau e bagaço de malte (5:5, p:p) com os fatores: volume (V, mL) e concentração (HCl, % v/v) de ácido clorídrico, tempo de autoclavagem (t_a , min), pH, cargas enzimáticas de amilases comerciais (E1 e E2, U/g), temperatura de reação (T, °C) e tempo (t_e , min) e as respostas: açúcares redutores (AR, $\mu\text{mol/g}$), sólidos solúveis (SS, °Brix) e proporção de massa não hidrolisada (R, %).

Run	Fatores								Respostas		
	V (mL)	HCl (mL/L)	t_a (min)	pH	E1 (U/g)	E2 (U/g)	T (°C)	t_e (min)	AR ($\mu\text{mol/g}$)	SS (°Brix)	R (% p/p)
1	+1 (150)	-1 (5,0)	+1 (25)	-1 (4,0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (70)	+1 (90)	5,40	3,00	35,18
2	+1 (150)	+1 (20,0)	-1 (15)	+1 (7,0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (30)	+1 (90)	15,00	3,20	36,88
3	-1 (90)	+1 (20,0)	+1 (25)	-1 (4,0)	+1 (10)	-1 (0)	-1 (30)	-1 (30)	58,73	6,00	68,85
4	+1(150)	-1 (5,0)	+1 (25)	+1 (7,0)	+1 (10)	+1 (10)	-1 (30)	-1 (30)	158,40	4,60	34,77
5	+1 (150)	+1 (20,0)	-1 (15)	+1 (7,0)	+1 (10)	-1 (0)	+1 (70)	-1 (30)	196,20	6,40	50,19
6	+1 (150)	+1 (20,0)	+1 (25)	-1 (4,0)	+1 (10)	+1 (10)	-1 (30)	+1 (90)	101,64	5,60	45,68
7	-1 (90)	+1 (20,0)	+1 (25)	+1 (7,0)	-1 (0)	+1 (10)	+1 (70)	-1 (30)	93,43	8,80	42,11
8	-1 (90)	-1 (5,0)	+1 (25)	+1 (7,0)	+1 (10)	-1 (0)	+1 (70)	+1 (90)	53,46	7,60	48,17
9	-1 (90)	-1 (5,0)	-1 (15)	+1 (7,0)	+1 (10)	+1 (10)	-1 (30)	+1 (90)	59,40	6,00	51,56
10	+1 (150)	-1 (5,0)	-1 (15)	-1 (4,0)	+1 (10)	+1 (10)	+1 (70)	-1 (30)	175,16	4,60	39,21
11	-1 (90)	+1 (20,0)	-1 (15)	-1 (4,0)	-1 (0)	+1 (10)	+1 (70)	+1 (90)	57,02	7,20	53,11
12	-1 (90)	-1 (5,0)	-1 (15)	-1 (4,0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (30)	-1 (30)	101,45	3,00	45,29
13	0 (120)	0 (12,5)	0 (20)	0 (5,5)	0 (5)	0 (5)	0 (50)	0 (60)	45,62	4,80	45,71
14	0 (120)	0 (12,5)	0 (20)	0 (5,5)	0 (5)	0 (5)	0 (50)	0 (60)	51,08	5,00	46,29
15	0 (120)	0 (12,5)	0 (20)	0 (5,5)	0 (5)	0 (5)	0 (50)	0 (60)	88,94	5,20	42,13

Considerando a resposta *AR*, é possível observar que o maior resultado (196,20 $\mu\text{mol/g}$) foi obtido nas condições do ensaio 5 e a segunda maior resposta (175,16 $\mu\text{mol/g}$) foi obtida com o ensaio 10. De acordo com a Análise dos Efeitos (Tabela 2), apenas os fatores *V*, *E1*, *E2* e *t_e* apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0.16$) para esta resposta. Com base nos efeitos positivos e semelhantes de *E1* e *E2* (Tabela 2) e, devido ao volume de soluções disponíveis no momento da pesquisa, optou-se por fixar seus valores no maior nível (10 U/g). Adicionalmente, como o fator *t_e* apresentou um efeito negativo (Tabela 2), assim seu menor nível (30 min) foi selecionado. Para o fator *V*, seu efeito positivo (Tabela 2) sugere melhores resultados de *AR* em condições mais próximas do seu maior nível (150 mL). Dessa forma, considerando que a relação de sólidos por volume é um fator importante para fenômenos de transferência de massa e de calor, optou-se por investigar este fator numa nova etapa de análise variando entre 150 e 190 mL. Shet et al. (2018) [18] observaram para a hidrólise ácida de CC que o aumento da concentração de sólidos por volume de hidrólise (de 3 a 7% p/v) resultou na redução de *AR* devido a uma menor disponibilidade de ácido.

Ainda, considerando a resposta *AR*, os níveis avaliados de *HCl*, *t_a*, *pH* e *T* não foram estatisticamente significativos (Tabela 2), no entanto, foi possível selecionar o menor valor para *t_a* (15 min) e o maior valor de *T* (70 °C), com base nos valores dos seus efeitos. Para o *pH*, o valor de 4.0 foi selecionado visto que ao final da etapa termo-ácida o pH do meio tende a ser mais ácido, o que exigiria uma menor correção do pH antes da etapa enzimática. Já em relação ao fator *HCl* este também foi selecionado para a nova etapa de investigação com uma nova faixa de valores: 0 a 5 mL/L, com menores concentrações. O tempo de autoclavagem definido por Shet et al. (2019) [26] para a hidrólise termo-ácida de 10% (p/p) de CC foi bem maior (~54 min) além do uso de soluções de HCl bem mais concentradas (4,41% v/v), ou seja, foram adotadas condições mais drásticas do que as empregadas neste presente trabalho e por este motivo os autores obtiveram 25,14 g/L de açúcares redutores (não diferenciados entre glicose, arabinose, xilose, celobiose e galactose).

Tabela 2: Análise dos Efeitos principais dos fatores: volume (V, mL) e concentração (HCl, % v/v) de ácido clorídrico, tempo de autoclavagem (t_a, min), cargas enzimáticas de amilases comerciais (E1 e E2, U/g), pH, tempo (t_e, min) e temperatura de reação (T, °C) sobre as respostas: açúcares redutores (AR, $\mu\text{mol/g}$), sólidos solúveis (SS, °Brix) e proporção de massa não hidrolisada (R, % p/p) para a matriz PB12.

	AR ($\mu\text{mol/mL}$)				SS (°Brix)				R (% p/p)			
	Efeito	Er.Pad.	t(6) [#]	valor-p	Efeito	Er.Pad.	t(6) [#]	valor-p	Efeito	Er.Pad.	t(6) [#]	valor-p
Média	84,06	9,87	8,52	0,0001*	5,40	0,12	43,93	<0,0001*	45,68	1,22	37,35	<0,0001*
V	38,05	22,07	1,72	0,1355*	-1,87	0,27	-6,79	0,0005*	-11,20	2,73	-4,09	0,0064*
HCl	-5,21	22,07	-0,24	0,8213	1,40	0,27	5,09	0,0022*	7,11	2,73	2,60	0,0407*
t_a	-22,20	22,07	-1,01	0,3535	0,87	0,27	3,15	0,0197*	-0,25	2,73	-0,09	0,9311
pH	12,75	22,07	0,58	0,5846	1,20	0,27	4,37	0,0047*	-3,94	2,73	-1,44	0,1997*
E1	35,65	22,07	1,61	0,1575*	1,07	0,27	3,88	0,0082*	9,39	2,73	3,43	0,0139*
E2	35,80	22,07	1,62	0,1559*	1,27	0,27	4,61	0,0037*	-3,02	2,73	-1,10	0,3117
T	14,34	22,07	0,65	0,5399	1,53	0,27	5,58	0,0014*	-2,51	2,73	-0,92	0,3941
t_e	-81,91	22,07	-3,71	0,0100*	-0,13	0,27	-0,49	0,6448	-1,64	2,73	-0,60	0,5706

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,20$) com 80% de confiabilidade.

[#] Valor-t para o teste estatístico com 6 Graus de Liberdade.

Os maiores valores da resposta *SS* (> 7.0 °Brix) foram obtidos nos ensaios 7, 8 e 11 que, em comum, foram realizados nos níveis máximos de *V* e *T*, com apenas uma carga enzimática: *E1* ou *E2* (Tabela 1). Estes resultados foram diferentes do observado para *AR*, demonstrando que as condições que resultam nos melhores valores de *SS* não são totalmente equivalentes às que resultam nos melhores valores de *AR*. A Análise dos Efeitos (Tabela 2) para a resposta *SS*

demonstrou que, exceto por t_e , os fatores foram estatisticamente significativos. Dentre estes efeitos, observa-se, de forma diferenciada ao observado para *AR*, que o fator *V* apresentou efeito negativo, sugerindo volumes menores de ácido para aumentar os valores de *SS*, o que pode ser explicado pela menor relação: sólido/volume. É importante ainda ressaltar que outras partículas provenientes da etapa termo-ácida podem contribuir para o aumento de *SS*, não apenas *AR*, e isso pode ser uma forma de compreender o comportamento diferenciado dos fatores *V*, *HCl* e t_a para a resposta *SS* em comparação com a resposta *AR*. Os maiores níveis de *HCl*, t_a , *pH*, *E1*, *E2* e *T* foram indicados (Tabela 2) para o aumento significativo de *SS*, sendo que os efeitos de *E1*, *E2*, *pH* e *T* estão de acordo com o que foi discutido previamente para a resposta *AR*.

Por fim, considerando a resposta *R* [proporção % (p/p) de resíduos não hidrolisados], os melhores resultados [$R < 40\%$ (p/p)] foram obtidos nas condições dos ensaios 1, 2, 4 e 10 (Tabela 1). Dentre estes, o ensaio 10 foi apontado também como a melhor resposta para *AR*. Para *R*, a Análise dos Efeitos indicou como favoráveis à sua redução os maiores níveis de *V* e *E1* e os menores níveis de *HCl* e *E2* (Tabela 2). Estes resultados sugerem que, para uma maior redução da massa de resíduos não hidrolisados, deve-se buscar a aplicação de cargas enzimáticas mais variadas (neste presente trabalho foram aplicadas apenas α - e β -amilases) e a análise de *V* e *HCl* está em acordo com o que foi observado para a resposta *AR*. No estudo da hidrólise enzimática de BM realizado por Ravindran et al. (2019) [20], por exemplo, foram aplicadas celulasas e hemicelulasas e o valor otimizado de *AR* (186 mg/g) foi maior do que o obtido neste presente trabalho, porém, com um tempo de reação consideravelmente maior (120 h). O maior valor de *AR* obtido por estes autores é um reflexo das enzimas utilizadas pois elas são muito específicas para hidrólise de material lignocelulósico e as amilases podem ser entendidas como enzimas complementares para este fim. A aplicação de extratos multienzimáticos é, portanto, uma opção de grande eficiência catalítica, como aplicado por Paz et al. (2019) [21] por exemplo, e deve ser investigada para a mistura dos resíduos CC e BM. Assim, tendo sido fixas as condições de: $t_a = 15$ min, *pH* = 4,0, *E1* = *E2* = 10 U/g, *T* = 70 °C e $t_e = 30$ min, foram definidos novos valores para *V* e *HCl* que foram investigados com uma segunda matriz de planejamento experimental.

3.1.2 Matriz DCC 2²

Os novos resultados obtidos com a segunda matriz realizada (Tabela 3) também foram submetidos a Análise dos Efeitos (Tabela 4).

Tabela 3- Matriz codificada do Delineamento Composto Central (DCC 2²) para a hidrólise de 10 g de cascas de cacau e bagaço de malte (5:5, p/p) com os fatores: volume (*V*, mL) e concentração (*HCl*, % v/v) de ácido clorídrico e as respostas: açúcares redutores (*AR*, $\mu\text{mol/g}$), sólidos solúveis (*SS*, °Brix) e proporção de massa não hidrolisada (*R*, % p/p).

Run	Fatores		Respostas		
	<i>V</i> (mL)	<i>HCl</i> (mL/L)	<i>AR</i> ($\mu\text{mol/g}$)	<i>SS</i> (°Brix)	<i>R</i> (% p/p)
16	-1(150)	-1 (0,0)	150,80	3,2	62,4
17	+1(190)	-1 (0,0)	83,37	2,2	63,7
18	-1(150)	+1 (5,0)	148,53	4,4	51,0
19	+1(190)	+1 (5,0)	224,37	6,6	52,8
20	0 (170)	0 (2,5)	167,47	4,2	51,3

Dentre os ensaios realizados, destaca-se o ensaio 19 (Tabela 3) – realizado nos maiores níveis dos dois fatores analisados – como sendo o de maiores: *AR* (224,37 $\mu\text{mol/mL}$) e *SS* (6,6 °Brix), sendo que este valor de *AR* apresentou um acréscimo de 12,6% em relação ao valor obtido com o ensaio 5 (Tabela 1). Entretanto, os valores de *R* (Tabela 3) foram maiores do que na primeira

etapa do estudo (Tabela 1) o que sugere, semelhante ao que foi observado para *SS*, que uma maior redução da massa de resíduos devido à hidrólise não necessariamente resultará nos maiores valores de *AR* visto que as composições químicas dos resíduos são variadas. De acordo com Torres-Mayanga et al. (2019) [27] a hidrólise hidrotérmica de *BM* resultou na liberação de diferentes monossacarídeos sendo as maiores concentrações (> 10 mg/g) de arabinose e xilose.

A Análise dos Efeitos para a resposta *AR* (Tabela 4) revelou que apenas o fator *HCl* foi estatisticamente significativo com efeito positivo sobre a média, indicando que o emprego do ácido é eficiente mesmo em concentração baixa. Já o fator *V* não foi estatisticamente significativo e devido ao desempenho apresentado pelo ensaio 19 (Tabela 3); assim, foi selecionada a condição de 190 mL de solução ácida (*HCl* = 5 mL/L), o que representa uma razão de sólidos de 5,26% (p/v). As análises complementares das respostas obtidas neste presente trabalho revelaram (Tabela 4) que *V* e *HCl* foram estatisticamente significativos para *SS* mas não foram para *R*.

Tabela 4: Análise dos Efeitos principais dos fatores: volume (*V*, mL) e concentração (*HCl*, % v/v) de ácido clorídrico sobre as respostas: açúcares redutores (*AR*, $\mu\text{mol/g}$), sólidos solúveis (*SS*, °Brix) e proporção de massa não hidrolisada (*R*, % p/p) para a matriz *DCC 22*.

	<i>AR</i> ($\mu\text{mol/mL}$)				<i>SS</i> (°Brix)				<i>R</i> (% p/p)			
	Efeito	Er.Pad.	<i>t</i> (1) [#]	valor- <i>p</i>	Efeito	Er.Pad.	<i>t</i> (1) [#]	valor- <i>p</i>	Efeito	Er.Pad.	<i>t</i> (1) [#]	valor- <i>p</i>
Média	154,91	6,28	24,66	0,0258*	4,12	0,04	103,00	0,0062*	56,24	2,47	22,77	0,0279*
<i>V</i>	2,10	7,02	0,30	0,8148	0,30	0,04	6,71	0,0942*	0,77	2,76	0,28	0,8258
<i>HCl</i>	34,68	7,02	4,94	0,1272*	1,40	0,04	31,30	0,0203*	-5,57	2,76	-2,02	0,2928

* valores estatisticamente significativos ($p < 0,15$) com 85% de confiabilidade.

Valor-*t* para o teste estatístico com 1 Grau de Liberdade.

Vale também ressaltar que diferentes ácidos podem ser investigados para a hidrólise dos resíduos, sendo o H_2SO_4 muito empregado com por exemplo, Rojas-Chamorro et al. (2020) [28] utilizaram H_2SO_4 a 1% (p/v) em *BM* com uma maior proporção de sólidos e líquido (8:1 p/p) nas condições de 130 °C / 26 min. Já Imman et al. (2021) [29] realizou o pré-tratamento de 10 g/mL de folhas de abacaxi com água quente (mantida em fase líquida pela adição de nitrogênio) com adição de 0,6 mol/L de ácido e observaram que o H_2SO_4 (mais do que com *HCl* e HNO_3) era capaz de aumentar a conversão da biomassa em *AR* chegando a quase 92% de conversão.

3.2 Fermentação e avaliação da composição dos resíduos e da etapa enzimática

Nesta etapa do estudo, visou-se: fermentar o meio hidrolisado, avaliar proporções maiores de *CC* e *BM* na mistura de resíduos para a hidrólise e avaliar o impacto da etapa de hidrólise enzimática com amilases.

Assim sendo, o meio hidrolisado obtido sob as melhores condições definidas para a hidrólise termo-ácida da mistura dos resíduos *CC* e *BM* foi fermentado por *S. cerevisiae* CA-11 e foi obtido um teor médio de etanol de $4,6 \pm 0,7\%$ (v/v) (ou $\sim 3,6$ g/L). Comparativamente, a *CC* hidrolisada com *HCl* por Shet et al. (2018) [18], resultou em uma quantidade maior de *AR* (4,09 g/L) porém, quando fermentado por *Pichia stipitis* NCIM 3498, resultou em um teor alcoólico menor (2 g/L). A *S. cerevisiae* CA-11 é uma cepa comercial primariamente destinada à fermentação de caldo de cana para produção de cachaça e outras cepas podem ser investigadas pois cada uma apresenta propriedades diferentes.

Ainda considerando as melhores condições de hidrólise definidas, avaliou-se o efeito de maiores proporções de *CC* e *BM*. A hidrólise da mistura com maior proporção de *BM* [*CC*:*BM* = 1:9 (p:p)] resultou nos seguintes valores de *AR* = 201,67 $\mu\text{mol/g}$, *SS* = 6,2 °Brix e *R* = 36,88% (p/p) e, com uma maior proporção de *CC* [*CC*:*BM* = 9:1 (p:p)] os valores obtidos foram: *AR* = 172,12 $\mu\text{mol/g}$, *SS* = 4,0 °Brix e *R* = 45,18%. Em relação ao ensaio 19 (Tab. 3), a proporção *CC*:*BM* = 1:9 (p/p) apresentou um valor de *AR* 22% menor e com a proporção *CC*:*BM* = 1:9 (p/p) foi obtido um valor de *AR* semelhante (10% menor). Conforme mencionado anteriormente, as frações celulósicas de cada resíduo são diferentes assim como suas composições de lignina,

composto responsável pela rigidez do material vegetal. A composição (% p/p) de lignina em CC pode chegar a valores em torno de 70% o que chega a ser até 3 vezes maior do que no BM [13, 18]. Em relação à rigidez e à redução de massa devido à hidrólise, pode-se ainda observar que a condição CC:BM = 1:9 (p/p) apresentou, favoravelmente, o menor R em comparação com a condição 1:9 (p/p) e o ensaio 19 (Tabela 3). A hidrólise ácida de CC investigada por Shet et al. (2018) [18], por exemplo, resultou em um melhor rendimento, mas foi realizada em condições bastante diferenciadas como: temperatura ambiente, com tempo de 7 h de hidrólise, empregando uma razão entre sólidos maior (8,36% p/v) e uma solução mais concentrada de HCl (3,6 N).

Considerando-se então a hidrólise de uma mistura base dos resíduos (CC:BM = 5:5 p/p) apenas com a etapa termo-ácida, foram obtidos os seguintes resultados: $AR = 22,47 \mu\text{mol/g}$, $SS = 3,1^\circ\text{Brix}$ e $R = 46,82\%$ (p/p). Estes resultados reforçam a importância e eficiência das soluções enzimáticas, pois, em comparação com o ensaio 19 (Tabela 3), houve uma redução de cerca de 90% no valor de AR e 53% no valor de SS . O valor obtido de R pode ser sugerido como um resultado semelhante ao obtido no ensaio 19 (Tab. 3) por ser apenas 11% menor. Vale ainda ressaltar que o emprego de coquetéis multienzimáticos (celulases, hemicelulases, xilanases etc.) também são capazes de aumentar a eficiência da etapa de hidrólise enzimática devido a especificidade de cada enzima. Neste presente estudo, foram investigadas apenas as amilases que apresentam ação limitada sobre a composição lignocelulósica dos resíduos utilizados, e o emprego de outras enzimas possivelmente resultará em melhores desempenhos de hidrólise e devem ser investigados.

4. CONCLUSÃO

A geração de resíduos é inevitável e está associada a diferentes ramos de atividade. Entretanto, a proposta de reutilização dos resíduos agroindustriais tem caráter emergencial e recorrente. Neste estudo foi possível avaliar a hidrólise termo-ácida e enzimática de uma mistura de casca de cacau (CC) e bagaço de malte (BM), ao invés da hidrólise isolada de cada resíduo. Os resultados obtidos foram satisfatórios e foi possível observar que CC é mais resistente à hidrólise que o BM, o que pode ser compreendido pelas diferenças de composição de cada resíduo. O estudo das condições das etapas de pré-tratamento termo-ácido e hidrólise enzimática revelaram, por exemplo, a importância de fatores como a concentração de sólidos totais, a concentração da solução ácida e a carga enzimática a ser empregada por massa de sólidos totais. Em relação às condições e metodologias aplicadas neste presente trabalho, pode-se ainda observar várias possibilidades de estudo em relação à utilização de condições mais drásticas de temperatura e tempo para o pré-tratamento e ao emprego de coquetéis enzimáticos com maior variedade de enzimas para uma atuação mais eficiente sobre a biomassa lignocelulósica. Com meios hidrolisados mais ricos em pentoses e hexoses é possível aumentar consideravelmente a conversão à etanol por meio da fermentação utilizando diferentes cepas de leveduras.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos pelo apoio financeiro: da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) – projeto PROPP 00220.1300.1847 – do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – bolsa IC 123972/2018-3 – e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) – bolsa IC 5160/2018 – além do apoio experimental do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Agroindústria (LABMA, UESC).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz-Gongáliz A, Luna MYP, Morales ER, Saldaña-Trinidad S, Blanco LR, Cruz-Arreola S, et al. Assessment of the pretreatments and bioconversion of lignocellulosic biomass recovered from the husk of the cocoa pod. *Energies*. 2022;15(10):3544. doi: 10.3390/en15103544

2. Igbinador RO, Onilude AA. Bioprocess systems applied for the production of bioethanol from lignocellulosic biomass of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) and other agricultural residues: A review. *Afr J Biotechnol.* 2013;12(35):5375-88. doi: 10.5897/AJB2013.12890
3. Anu, Kumar A, Rapoport A, Kunze G, Kumar S, Singh D, et al. Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review. *Renew Energy.* 2020;160:1228-52. doi: 10.1016/j.renene.2020.07.031
4. Gregg JS, Jürgens J, Happel MK, Strøm-Andersen N, Tanner AN, Bolwig S, et al. Valorization of bio-residuals in the food and forestry sectors in support of a circular bioeconomy: A review. *J Cleaner Prod.* 2020 Set;267:122093. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.122093
5. Sheng Y, Lam SS, Wu Y, Ge S, Wu J, Cai L, et al. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Biores Technol.* 2021 Mar;324:124631. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124631
6. Vandenberghe LPS, Valladares-Diestra KK, Bittencourt GA, Zevallos Torres LA, Vieira S, Karp SG, et al. Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil. *Renew Sust Energ Rev.* 2021 Jan;167:112721. doi: 10.1016/j.rser.2022.112721
7. De Corato U, De Bari I, Viola E, Pugliese M. Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review. *Renew Sust Energ Rev.* 2018 Febv;88:326-46. doi: 10.1016/j.rser.2018.02.041
8. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. FAOSTAT – Food and Agriculture Data. Crops and Live Stock Products [Internet]; [acessado em 09 jun 2023]. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). SIDRA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Tabela 1618 – Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produtos das lavouras [Internet]; [acessado em 09 jun 2023]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>
10. Lu F, Rodriguez-Garcia J, Van Damme I, Westwood NJ, Shaw L, Robinson JS, et al. Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Cur Op Green Sustain Chem.* 2018 Dec;14:80-8. doi: 10.1016/j.cogsc.2018.07.007
11. Vásquez ZS, Carvalho Neto DP, Pereira GVM, Vandenberghe LPS, Oliveira PZ, Tiburcio PB, Rogez HLG, Góes Neto A, Soccol CR. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Manag.* 2019 May;90:72-83. doi: 10.1016/j.wasman.2019.04.030
12. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL). Dados do Setor Cervejeiro Nacional [Internet]. [acessado em 09 jun 2023]. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/
13. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci.* 2006 Jan;43(1):1-14. doi: 10.1016/j.jcs.2005.06.001
14. Agrawal D, Gopaliya D, Willoughby N, Khare SK, Kumar V. Recycling potential of brewer's spent grains for circular biorefineries. *Cur Opin Green Sustain Chem.* 2023;40:100748. doi: 10.1016/j.cogsc.2022.100748
15. Valladares-Diestra KK, Vandenberghe LPS, Soccol CR. A biorefinery approach for pectin extraction and second-generation bioethanol production from cocoa pod husk. *Biores Technol.* 2022;346:126635. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126635
16. Hernández-Mendoza AG, Saldaña-Trinidad S, Martínez-Hernández S, Pérez-Sariñana BY, Láinez M. Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass Bioenerg.* 2021;154:106268. doi: 10.1016/j.biombioe.2021.106268
17. Sandesh K, Shishir RK, Rao CV. Optimization and comparison of induction heating and LPG assisted acid pretreatment of cocoa pod for ABE fermentation. *Fuel.* 2020 Feb;262:116499. doi: 10.1016/j.fuel.2019.116499
18. Shet VB, Sanil N, Bhat M, Naik M, Mascarenhas LN, Goveas LC, et al. Aparna A. Acid hydrolysis optimization of cocoa pod shell using response surface methodology approach toward ethanol production. *Agri Nat Res.* 2018 Dec;52(6):581-7. doi: 10.1016/j.anres.2018.11.022
19. Wagner E, Sierra-Ibarra E, Rojas NL, Martinez A. One-pot bioethanol production from brewery spent grain using the ethanologenic *Escherichia coli* MS04. *Renew Energ.* 2022;189:717-25 doi: 10.1016/j.renene.2022.03.014
20. Ravindran R, Sarangapani C, Jaiswal S, Lu P, Cullen PJ, Bourke P, et al. Improving enzymatic hydrolysis of brewer spent grain with nonthermal plasma. *Biores Technol.* 2019 Jun;282:520-4. doi: 10.1016/j.biortech.2019.03.071
21. Paz A, Outeiriño D, Guerra NP, Domínguez JM. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. *Biores Technol.* 2019 Mar;275:402-9. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.082

22. Ravindran R, Jaiswal S, Abu-Ghannam N, Jaiswal AK. A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Biores Technol.* 2018 Jan;248(A):272-9. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.039
23. Rodrigues MI, Lemma AF. Planejamento experimental e otimização de processos. 2. ed. Campinas (SP): Caritá Editora; 2009.
24. Vasconcelos NM, Pinto GAS, Aragão FAS. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. Fortaleza (CE): EMBRAPA Agroindústria Tropical; 2013. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 88).
25. Cunha JRB, Santos FCP, Assis FGV, Leal PL. Cultivation of *Penicillium* spp. in soy bean crop residues for production of cellulase, protease and amylase. *Rev Ceres.* 2016 Set;63(5):597-604. doi: 10.1590/0034-737X201663050002
26. Shet VB, Rakshith KG, Shetty NJ, Vishwas CS, Siddik A, Goveas LC, et al. The application of response surface methodology for the optimization of autoclave assisted HCl hydrolysis of an agro residue cocoa pod shells for releasing reduced sugars. *J Microb Biotechnol Food Sci.* 2019 Jan;9(3):548-51. doi: 10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.548-551
27. Torres-Mayanga PC, Azambuja SPH, Tyufekchiev M, Tompsett GA, Timko MT, Goldbeck R, et al. Subcritical water hydrolysis of brewer's spent grains: Selective production of hemicellulosic sugars (C-5 sugars). *J Supercritical Fluids.* 2019 Mar;145:19-30. doi: 10.1016/j.supflu.2018.11.019
28. Rojas-Chamorro JA, Romero I, López-Linares JC, Castro E. Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment. *Renew Energy.* 2020 Apr;148:81-90. doi: 10.1016/j.renene.2019.12.030
29. Imman S, Kreetachat T, Khongchamnan P, Laosiripojana N, Champreda V, Suwannahong K, et al. Optimization of sugar recovery from pineapple leaves by acid-catalyzed liquid hot water pretreatment for bioethanol production. *Energ Rep.* 2021 Nov;7:6945-54. doi: 10.1016/j.egyr.2021.10.076