

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE TORTA DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) E AVALIAÇÃO DA LETALIDADE DA TORTA HIDROLISADA PARA CAMUNDONGOS**Walber Carvalho Melo, Daniele Barreto da Silva e Nei Pereira Jr.***

Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CP 68542, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Lídia Maria Melo Santa Anna

Gerência de Biotecnologia e Tratamentos Ambientais, CENPES/PETROBRAS, Av. Jequitibá, 950, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Alexandre Soares dos Santos

Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rua da Glória, 187, 39100-000 Diamantina - MG, Brasil

Recebido em 17/5/07; aceito em 31/10/07; publicado na web em 15/5/08

ETHANOL PRODUCTION FROM CASTOR BEAN CAKE (*Ricinus communis* L.) AND EVALUATION OF THE LETHALITY OF THE CAKE FOR MICE. The castor bean cake is rich in starch ($48 \pm 0.53\%$) and bears a problem linked to the occurrence of a toxic protein (ricin). The chemical hydrolysis (ratio solid:liquid = 1:6; $H_2SO_4 = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$; $120 \text{ }^\circ\text{C}$; 40 min) generated a medium with 27 g L^{-1} of reducing sugars (hydrolysis efficiency = 32%). The hydrolyzed product was fermented and produced 11 g L^{-1} of ethanol (volumetric productivity = $1.38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and ethanol yield on substrate consumed = 0.45 g g^{-1}). *In vivo* experiments (DL50) revealed a reduction of roughly 240 times in the CBC toxicity ($2.11 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$).

Keywords: castor bean cake; acid hydrolysis; ethanol.

INTRODUÇÃO

A pesquisa e o desenvolvimento no setor de combustíveis obtidos de fontes renováveis são responsáveis por uma crescente demanda por biomassas de origem vegetal.¹ O uso de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) para extração de óleo e emprego na produção de biodiesel é responsável pela geração diária de toneladas de um resíduo sólido proveniente da prensagem das sementes, a torta de mamona.² Esse resíduo possui alto teor de proteínas e é produzido na proporção de 1,2 t por tonelada de óleo extraído,³ o que corresponde a 55% do peso médio das sementes, valor que pode variar de acordo com o teor de óleo da semente e do processo industrial de extração do óleo. Segundo algumas projeções, espera-se uma produção de até 20000 t anuais de torta de mamona associada à indústria do biodiesel.⁴ Esse resíduo, embora rico em proteínas, não pode ser usado na alimentação animal e exige cuidados com a manipulação devido à toxicidade atribuída a peptídeos alergênicos presentes nas sementes.⁵ Por outro lado, a torta de mamona traz consigo potencial emprego na geração de bioetanol, por conta de seu alto teor de amido.⁶

A cultura da mamona sempre foi considerada uma atividade de pequenos produtores, especialmente na região de clima semi-árido do Brasil. No entanto, algumas ações do governo brasileiro vêm mudando esse cenário. Através de estímulos para a cultura da mamona no Nordeste do Brasil, o governo pretende criar condições para o desenvolvimento da região. Nesta parte do Brasil, há quase 4 milhões de ha com características edafoclimáticas apropriadas, onde se alcançaria o rendimento de até 1,5 t de sementes por hectare, enquanto a média anual é de apenas 750 kg.⁴

O uso da torta de mamona como matéria-prima para produção de bioetanol atende a uma tendência de integração dos processos de obtenção de etanol e biodiesel, pois de acordo com estudos em an-

damento no CENPES/PETROBRAS sobre o processo de transesterificação do óleo de mamona em biodiesel, se forem gerados 160 L de etanol para cada 1000 kg de torta de mamona produzida com a prensagem das sementes, o processo de conversão química do óleo extraído em ésteres etílicos tornar-se-ia auto-suficiente em relação à demanda de etanol. Ademais, o uso da torta ainda observa as Diretrizes de Política de Agroenergia 2006-2011 brasileiras (Ministérios da Agricultura, das Minas e Energia e da Ciência e Tecnologia; versão 0.01 de 6/10/2006), que demandam por aproveitamento e valorização dos resíduos da indústria do biodiesel, elevando à condição de co-produto o resíduo da extração do óleo das sementes de mamona.

Com vistas ao aproveitamento da torta de mamona como fonte de açúcares fermentáveis para produção de bioetanol e à formulação de tratamento adequado para a destoxificação deste resíduo para uso como matéria-prima na indústria de ração, é apresentado neste trabalho resultado de fermentabilidade do mosto obtido por sacarificação química do amido da torta de mamona e análises de toxicidade (expressa em DL_{50}) do resíduo sólido gerado sob condições pré-estabelecidas.⁷

PARTE EXPERIMENTAL**Torta de mamona**

Esta biomassa foi fornecida pela Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS). O resíduo sólido triturado, obtido de processos de produção de biodiesel, passou por secagem durante 24 h sob temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa.

Análise do teor de amido da torta de mamona

O percentual de amido presente na biomassa foi determinado, em base seca, de acordo com a metodologia enzimático-colorimétrica para determinação de amido em grãos que contém

*e-mail: nei@eq.ufrrj.br

amilose e amilopectina.^{8,9} Amostra com 1,0 g de massa foram submetidas, em triplicata à hidrólise enzimática e o teor de amido foi calculado com base na quantificação da glicose liberada.

Obtenção do hidrolisado ácido

A hidrólise química em triplicata foi realizada em frascos cônicos de 250 mL contendo 10,0 g de torta de mamona seca e solução de H_2SO_4 0,25 mol L⁻¹ (relação sólido-líquido 1:6). O processo hidrolítico transcorreu durante 40 min a 121±2 °C em autoclave de 4000 W (Fabbe-Primar®, Brasil). Essas condições experimentais são decorrentes de estudos de hidrólise da torta com uso de metodologia multivariada, onde foram avaliados os efeitos de tempo, temperatura, razão sólido/líquido e concentração de ácido.⁷

Análise de toxicidade (DL₅₀ %) da torta de mamona e do resíduo sólido após a hidrólise

As análises da toxicidade por determinação da DL₅₀, tanto para a torta *in natura* quanto para o resíduo sólido derivado do processo hidrolítico, foram realizadas em camundongos Suíços brancos SW-55. Os resíduos sólidos avaliados foram triturados em gral de vidro. Massas correspondentes a 5,0000 ± 0,0050 g de cada amostra foram transferidas quantitativamente para frascos de erlenmeyer com auxílio de 80 mL de solução salina estéril pH 6,5-7,2. Após processo de dissolução em ultra-som, por 30 min, as suspensões foram mantidas em repouso, por uma noite, sob refrigeração a 4 °C para decantação dos sólidos. O sobrenadante de cada frasco foi filtrado individualmente através de papel de filtro Whatman n° 1 e os filtrados, recolhidos em frascos erlenmeyers com tampa. Aos sólidos decantados foram adicionados mais 20 mL de solução salina, centrifugados 2 vezes em centrífuga analítica por 15 min a 1300 rpm e recolhidos os sobrenadantes obtidos, após filtração, em seus respectivos frascos. O pH dos filtrados, quando necessário, foi corrigido para a faixa de 6,5 a 7,2. As amostras filtradas foram diluídas (10¹, 10², 10³ e 10⁴), novamente filtradas em filtro Millipore RC 25 0,45 µ e inoculadas em volumes de 0,2 mL por via intra-peritoneal em lotes de 10 animais. As mortes dos animais foram registradas nos períodos de 48 e 96 h. O número total de animais utilizados no foi de 210 camundongos com peso médio de 20 g, dos quais 10 foram utilizados para controle. Após o período de observação, a DL₅₀ foi calculada conforme o Método de Reed e Muench.¹⁰

Processo fermentativo

Como mosto, foi usada a fração solúvel obtida após a etapa hidrolítica. O mosto teve o pH corrigido para 5,0 com uso de hidróxido de cálcio hidratado. As fermentações foram realizadas em biorreator instrumentado modelo Biostat® (B.Braun Biotech International) com volume nominal de 2,0 L. O sistema não aerado foi mantido sob agitação de 100 rpm durante 8 h a 33 °C. Como agente fermentador foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a uma concentração de 10 g L⁻¹.

Métodos analíticos

Para realização das análises do processo fermentativo, foram amostradas alíquotas de 1,0 mL em intervalos de 1 h. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante seguiu para a quantificação de açúcares e etanol. A biomassa centrifugada foi ressuspensa ao volume original com água destilada e quantificada através da leitura de absorbância em espectrofotômetro (Spectrumlab modelo 22PC) a 570 nm com posterior

correlação com curva de calibração que relaciona biomassa, em g L⁻¹, com absorbância ($y = 2,03x$; $R^2 = 0,9954$).

O sobrenadante, após filtração em membrana de acetato de celulose (Millex™ 0.22 µ, Millipore) e diluição de 10 vezes com água destilada, foi analisado utilizando o equipamento de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) da Waters® Corporation, contendo o sistema de bombeamento modelo 510 (Waters), injetor Rheodyne, detector de índice de refração modelo 2487 (Waters) e integrador HP 3390A (Hewlett Packard). Foi utilizada a coluna de troca iônica Aminex® HPX-87P (BioRad®). Como fase móvel foi utilizada água deionizada a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ sob pressão de 500 psi. As amostras foram injetadas através de *loop* de 5 µL. As temperaturas do forno e do detector foram de 80 e 40 °C, respectivamente. Açúcares e etanol foram quantificados com base em padrões externos.

Paralelamente, os açúcares redutores totais foram analisados pelo método do ácido dinitro-salicílico (DNSA).¹¹ As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do teor de amido da torta de mamona foi fundamental para o estabelecimento de todas as correlações mássicas e determinação dos rendimentos de hidrólise e de fermentação. A torta de mamona apresentou um teor de amido igual a 48 ± 0,53% (m/m). Isso significa, considerando um processo hidrolítico com eficiência de 100%, que a hidrólise de 100 g de torta pode gerar 53 g de glicose. Esta quantidade de glicose, após fermentação, pode gerar até 25,3 g de etanol por 100 g de torta de mamona.

Na condição hidrolítica trabalhada, empregando ácido sulfúrico a 0,25 mol L⁻¹, temperatura de 120 °C, tempo de hidrólise de 40 min e razão sólido: líquido de 1:6, foi obtido um hidrolisado contendo 28,5 ± 1,3 g L⁻¹ de açúcares redutores totais. Isso significa que a eficiência do processo hidrolítico foi de 32,2% ou que foram produzidos 17,1 g de açúcares redutores por 100 g de torta. Esse valor é compatível com a concentração de açúcares redutores obtida em estudos recentes de hidrólise ácida de biomassas residuais (20,9 a 40,3 g L⁻¹ de açúcares) e guarda relação com as variáveis concentração de ácido sulfúrico, tempo e temperatura de hidrólise.¹²

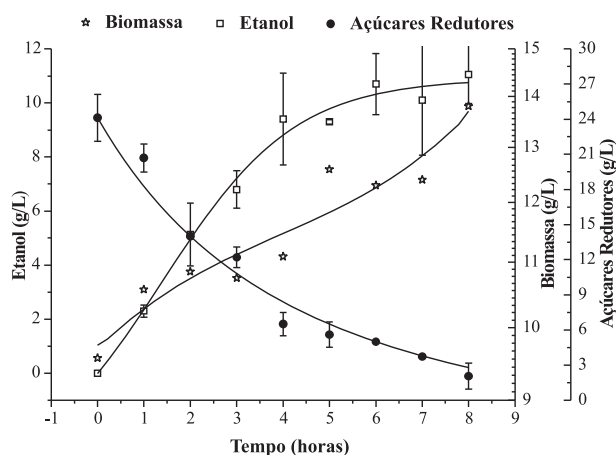
A análise cromatográfica do hidrolisado revelou a existência de outros açúcares além da glicose e a presença de hidroximetil-furfural (Tabela 1). Todos os açúcares identificados cromatograficamente no hidrolisado são passíveis de fermentação por *S. cerevisiae* e, portanto, conversíveis a etanol.¹³ A presença de 0,51 g L⁻¹ de hidroximetil-furfural, um reconhecido agente inibidor do processo fermentativo, não interferiu na fermentação conduzida com *Saccharomyces cerevisiae*, tendo sido observada a completa conversão dos açúcares redutores após 8 h (Figura 1). A produtividade volumétrica (Q_p) do processo fermentativo foi igual a 1,38 g L⁻¹ h⁻¹, sendo atingida uma concentração de 11 g L⁻¹ ao final do processo, o equivalente a um rendimento ($Y_{p/s}$) de 0,44 g g⁻¹. O vinhoto obtido após a destilação do etanol presente no mosto fermentado, de acordo com testes de toxicidade expresso em IC₅₀, não se mostrou tóxico.⁷ A partir desses resultados e da eficiência de 32,2% observada na hidrólise ácida, podemos projetar um rendimento de cerca de 102 L de etanol por tonelada de torta de mamona processada, o que corresponde a 64% do etanol demandado na etapa de transesterificação do óleo de mamona para obtenção dos ésteres etílicos.

A avaliação da dose letal em camundongos (DL₅₀) para soluções de peptídeos alergênicos extraídos da torta de mamona e do resíduo sólido, obtido após a hidrólise, mostrou que o tratamento com H_2SO_4 , na temperatura e tempo estabelecidos para a hidrólise do amido, foi responsável pela redução, em pelo menos 237 vezes,

Tabela 1. Composição de açúcares e hidróxi-metilfurfural presentes no hidrolisado químico da torta de mamona analisados por CLAE

Análitos	Tempo de retenção	Concentração (g/L)
Glicerol	18,32	0
Frutose	16,2	9,05
Glicose	10,38	13,46
Maltose	10,05	0
Etanol	15,57	0
Sacarose	9,98	5,49
HMF	28,5	0,51
Total	—	28,51

HMF – hidróxi-metilfurfural

**Figura 1.** Perfil cinético obtido para a fermentação alcoólica do hidrolisado químico da torta de mamona

da letalidade da torta de mamona *in natura* (Tabelas 2 e 3), não resultando em morte de camundongos em período de até 96 h. A destoxificação da torta de mamona submetida à hidrólise por H_2SO_4 a alta temperatura pode ser atribuída à hidrólise e/ou desnaturação térmica dos peptídeos tóxicos da mamona, mormente a ricina, a ricinina e CB-1.^{14,15}

Podemos, assim, considerar que o subproduto sólido da hidrólise ácida da torta de mamona, majoritariamente constituído por fibras e proteínas,¹⁶ apresenta potencial emprego na composição de rações.¹⁷

Tabela 2. Determinação da DL_{50} para amostras de torta de mamona *in natura*

Diluição	Resultados Acumulados			
	Animais Mortos	Animais Vivos	Totais	Mortalidade (%)
10^{-4}	0	22	22	0
10^{-3}	0	12	12	0
10^{-2}	8	2	10	80
10^{-1}	18	0	18	100
Não Diluída	28	0	28	100

A DL_{50} , calculada entre as diluições 10^{-2} e 10^{-3} segundo o método de Reed e Muench,¹⁰ resultou no fator de diluição $x = [(80-50) / (80-0)] = 0,375$ que, adicionado ao coeficiente da dose mais alta (10^{-2}), resultou na diluição de $10^{-2.375}$. A DL_{50} da amostra 'torta de mamona *in natura*', correspondente a uma diluição de $1/237$, equivale à concentração de $2,11 \mu\text{g/g}$ de animal.

Tabela 3. Determinação da DL_{50} para amostras do resíduo sólido obtido após hidrólise ácida

Diluição	Resultados Acumulados			
	Animais Mortos	Animais Vivos	Totais	Mortalidade (%)
10^{-4}	0	50	50	0
10^{-3}	0	40	40	0
10^{-2}	0	30	30	0
10^{-1}	0	20	20	0
Não Diluída	0	10	10	0

Não houve nenhuma morte nos ensaios realizados com o resíduo sólido obtido com a hidrólise ácida. Portanto, a DL_{50} está acima da concentração da amostra "Não Diluída" com toxicidade maior que $500,0 \mu\text{g/g}$ de animal.

CONCLUSÕES

A torta de mamona, além de mostrar-se apta como matéria-prima para produção de etanol, sofreu um efeito colateral através do processamento hidrolítico, sob condições ácidas, que a tornou isenta de letalidade quando testada em camundongos. Esse resultado indica a possibilidade do uso do resíduo sólido obtido pós-tratamento hidrolítico como matéria-prima para o fabrico de rações. Essas informações permitem propor um modelo industrial onde estejam integrados processos de extração de óleo de mamona, esterificação etílica com o álcool produzido a partir do resíduo da extração do óleo de mamona e a destinação do resíduo sólido do processo de sacarificação química da torta de mamona para o fabrico de ração.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio da Gerência de Biotecnologia e Tratamentos Ambientais do CENPES/PETROBRAS e ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da UFRJ por todo auxílio.

REFERÊNCIAS

- Demirbas, A.; *Prog. Energ. Comb. Sci.* **2007**, *33*, 1.
- Leiras, A.; *Dissertação de Mestrado*, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.
- Azevedo, D. M. P.; Lima, E. F.; *O Agronegócio da Mamona no Brasil*, 1ª ed., Embrapa: Paraíba, 2001.
- Freitas, S. M.; Fredo, C. E.; *Inf. Econ.* **2005**, *35*, 1.
- <http://cnpa.embrapa.br/plataformamamona>, acessada em Fevereiro 2007.
- Silva, J. G.; Machado, O. L.; Izumi, C.; Padovan, J. C.; Chait, B. T.; Mirza, U. A.; Greene, L. J.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *336*, 10.
- Melo, W. C.; Pereira Jr., N.; Santos, A. S.; Santa Anna, L. M. M.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.
- Gupta, M. N.; Roy, I.; *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*, 26.
- Quigley, M. E.; Hudson, G. F.; Englyst, H. N.; *Food Chem.* **1999**, *65*, 381.
- Reed, L. J.; Muench, H. A.; *Am. J. Hyg.* **1938**, *27*, 494.
- Miller, L. G.; *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426.
- Del Campo, I.; Alegria, I.; Zazpe, M.; Echeverria, M.; Echeverria, I.; *Ind. Crops Prod.* **2006**, *24*, 214.
- Lodder, J. Em *The Yeasts a Taxonomic study*; Lodder, J., ed.; North-Holland Company: London, 1970, cap. 4.
- Moshkin, V. A.; *Castor*, 1ª ed., Amerind: New Delhi, 1986.
- Gardner Jr., H. K.; D'aquin, E. L.; Koulturn, S. P.; McCourtney, E. J.; Vix, H. L. E.; Gastrock, E. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *37*, 142.
- Souza, R. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 1979.
- <http://sistemadeproducao.cnpa.embrapa.br>, acessada em Janeiro 2007.