

## DELINAMENTO EXPERIMENTAL COMBINANDO O USO DA *TRICHODERMA SG2* COM AS BIOMASSAS DE PAPEL E DE RESÍDUO DE PESCADO PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

FERNANDA DIAS DE ÁVILA<sup>1</sup>; JOSIANE PINHEIRO FARIAS<sup>2</sup>; MARCELA DA SILVA AFONSO<sup>3</sup>; CAROLINA FACCIO DEMARCO<sup>4</sup>; BENEDICT C. OKEKE<sup>5</sup>; ROBSON ANDREAZZA<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – fehavila@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – jo.anetst@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – marcelamafonso@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – carol\_demarco@hotmail.com

<sup>5</sup>Auburn University at Montgomery– bokeke@aum.edu

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – robsonandreazza@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

É inegável que os combustíveis fósseis foram importantes para o crescimento da economia mundial, mas é impossível excluir o fato de que estes contribuíram para o aumento da concentração dos Gases de Efeito Estufa possivelmente acelerando o aquecimento global, e que tais emissões possam ter contribuído para o avanço de doenças respiratórias (ALVES, 2017). A substituição desses combustíveis por fontes renováveis de energia é um passo importante para a sustentabilidade do planeta. Energias a partir de fontes como a eólica, a solar e através de biomassas são uma possibilidade para tal demanda. Porém, a utilização de biomassas, por exemplo, não pode vir a comprometer a segurança alimentar (SACHS, 2011).

Como uma alternativa surgem os biocombustíveis gerados a partir de microrganismos como fungos e bactérias, é o caso do biodiesel de 3<sup>a</sup> geração a partir de óleos microbianos (BUŠIĆ et al, 2018) e do etanol de 2<sup>a</sup> geração a partir da hidrólise enzimática realizada por fungos (SANTOS, 2012; OKEKE, 2014). Os fungos são como biodegradadores naturais, possuem a capacidade de degradação de macromoléculas insolúveis em unidades monoméricas solúveis. Para isso, esses organismos secretam enzimas específicas para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e aumentar a sua solubilidade (OLIVEIRA; LEMOS; BARROS; LEITE, 2008). Neste sentido, os resultados apresentados por OKEKE (2014) indicam que as cepas fúngicas de *Trichoderma* SG2 possuem potenciais para a produção interna de enzimas celulolíticas e xilanolíticas para sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Tendo em vista o potencial de atividade enzimática da *Trichoderma* SG2 descrita nos estudos realizados por Okeke (2014) surge o objetivo de verificar a possibilidade de atividade enzimática a partir da degradação do resíduo de pescado e resíduo de papel. O uso do papel por ser uma biomassa lignocelulósica e a utilização do resíduo de pescado justifica-se pela grande quantidade em que é gerado e pelos dados ambientais que pode ocasionar quando descartado incorretamente. Estima-se que a produção pesqueira mundial tenha atingido 171 milhões de toneladas no ano de 2016 (FAO, 2018) gerando pelo menos 85,5 milhões de toneladas de resíduos, pois, em média, de 50% a 70% do pescado é descartado como resíduo durante seu processo de beneficiamento (DECKER, 2016. AGUIAR; LIMBERGER; SILVEIRA, 2014). Além disso, o uso de resíduo para a produção de energia é uma alternativa que não afeta a disponibilidade de alimentos.

Para atingir este objetivo, delineou-se o experimento que será apresentado neste trabalho. Cabe aqui ressaltar que este trabalho apresenta o processo de construção do método experimental com suas variáveis e não os resultados dos experimentos, pois estes ainda estão em processo de realização.

## 2. METODOLOGIA

O presente trabalho busca descrever o delineamento de um experimento que será realizado no laboratório de química ambiental da Universidade Federal de Pelotas no projeto em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Auburn University at Montgomery. A idealização do delineamento experimental foi possível a partir das leituras realizadas em artigos e livros, caracterizando esta pesquisa também como bibliográfica.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Pré-tratamento das biomassas

O papel escolhido para realização do experimento é papel utilizado após impressões e que seria descartado. O papel será picotado e terá seu tamanho diminuído para que aumente a superfície de contato e acelere as reações. Além disso, tendo em vista que o material utilizado para coloração após impressão possa alterar os resultados, o papel ficará de molho na água por dois dias e será lavado cinco vezes com água da torneira. Após passará por um processo de secagem em estufa com circulação de vento e temperatura de 30°C.

O resíduo de pescado não será selecionado por espécie, será coletado de acordo com a disponibilidade das peixarias e pescadores na Colônia de Pescadores Z-3. Será armazenado em caixa térmica e encaminhado para o Laboratório de Química Ambiental (Ceng – UFPEL) onde será separado em porções de 0,500 kg ou 1 kg e logo após será congelado para que se mantenham suas principais características. Os resíduos passarão por um processo de extração de óleo a partir do método utilizado por MEDEIROS et al. (2019), pois a intenção é que o experimento seja realizado com o resíduo gerado a partir da extração de óleo do resíduo do pescado, tendo em vista que este óleo já tem sua utilidade conhecida para a produção de biodiesel.

### 3.2 Condições para Produção Enzimática de *Trichoderma SG2*

Será preparado um meio (EPM1) já conhecido de enriquecimento para produção de enzimas composto por (em g.L-1): 1,0 g de peptona, 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de Tween 80, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,1 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,003 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,003 g de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (Okeke, 2014) e 2 mL de solução de elemento mineral. A solução mineral contém: 169mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 288 mg de ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 250 mg de CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O; 26 mg de NiSO<sub>4</sub> 6H<sub>2</sub>O; 28 mg de CoSO<sub>4</sub> e 24 mg de NaMoO<sub>4</sub>. Porém, em alguns dos tratamentos realizados esse meio de produção de enzimas sofrerá alterações com a finalidade de descobrir a influência das biomassas selecionadas. O EPM2 será composto sem: sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>), extrato de levedura e peptona. E o EPM3 sem extrato de levedura e peptona.

O desenho do experimento será composto por quatro diferentes possibilidades variando concentração de papel, resíduo de pescado e meio

enriquecido. Em erlenmeyers de 125 mL serão adicionados os meios enriquecidos e depois serão autoclavado em 121°C por 20 minutos. Após resfriarem até temperatura ambiente, será inoculada em cada erlenmeyer uma porção de ágarbatata-dextrose de cultivo de *Trichoderma SG2* com tamanho aproximado de 1cm<sup>2</sup>. Estes erlenmeyers serão incubados de 5 a 6 dias a temperatura de 30°C e agitação de 200rpm.

Após as enzimas serão recuperadas por centrifugação (10 min; 5000 rpm), e os sobrenadantes serão utilizados para os ensaios de atividades enzimáticas celulase e xilanase.

### 3.3 Análises de Atividade Enzimática

Para o ensaio de celulase serão preparados 12 tubos contendo 0,033 a 0,035 gramas de papel de filtro cada. Após serão adicionados 0,5 ml de enzima e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5. Para controle serão preparados mais 3 tubos, estes contendo 0,033 a 0,035 gramas de papel filtro, 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5.

12 tubos também serão preparados para ensaio de xilanase, ambos contendo 0,01g de xilanase, 0,5 ml de enzima e 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5. Além dos 12 tubos, mais 3 servirão como controle. Nestes serão adicionados 0,01 gramas de xilanase, 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml 0,5 ml de ácido acético 0,1 M pH 5.

O cálculo para determinar a atividade enzimática será realizado com a seguinte fórmula:

Atividade enzimática (U.mL-1) = (A/mol) x Fd, onde:

A = concentração calculada a partir da curva;

Mol = massa molar de glicose (0,18 mg);

Fd = fator de diluição em relação ao meio de reação (0,5 mL de enzima + 0,5 mL de tampão, meio de reação total 1 mL). Fd = 2

## 4. CONCLUSÕES

A utilização da *Trichoderma SG2* é um passo importante para otimização e diminuição dos custos para fabricação de biocombustíveis (OKEKE, 2014). Acredita-se que o método elaborado e aqui descrito, por já ter tido aplicações semelhantes com outros tipos de resíduos, seja adequado para o experimento. E que a partir das análises de celulase e xilanase seja possível determinar a atividade enzimática produzida por meio da *Trichoderma SG2* com a combinação do uso de papel e resíduo de pescado. Além disso, verificar a possibilidade de substituição da fonte de nitrogênio do meio enriquecido, o sulfato de amônio, por resíduo de pescado. Dessa forma, espera-se que a realização do experimento possa vir a contribuir para o avanço dos usos e implementações da *Trichoderma SG2* dando uma finalidade mais branda para resíduos que se descartados incorretamente podem trazer danos ao meio ambiente.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. P.; LIMBERGER, G.; SILVEIRA, É. Alternativas tecnológicas para o aproveitamento de resíduos provenientes da industrialização de pescados. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 1, p. 225-229, 2014. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/265049992\\_ALTERNATIVAS\\_TECNOLÓGICAS\\_PARA\\_O\\_APROVEITAMENTO\\_DE\\_RESIDUOS\\_PROVENIENTES\\_DA\\_INDUSTRIALIZACAO\\_DE\\_PESCADOS](https://www.researchgate.net/publication/265049992_ALTERNATIVAS_TECNOLÓGICAS_PARA_O_APROVEITAMENTO_DE_RESIDUOS_PROVENIENTES_DA_INDUSTRIALIZACAO_DE_PESCADOS)>. Acesso em: dez 2019.
- ALVES, J. E. D. Sustentabilidade, Aquecimento Global e o Decrescimento Demoeconômico. **Revista Espinhaço | UFVJM**, p. 4-16, mar. 2017. ISSN 2317-0611. Disponível em: <http://www.revistaespinhaco.com/index.php/journal/article/view/44>. Acesso em: 12 maio 2020.
- BUŠIĆ, A. et al. Recent Trends in Biodiesel and Biogas Production. **Food technology and biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 152–173, 2018. DOI:10.17113/ftb.56.02.18.5547.
- DECKER, A. T. **Gestão Socioambiental de Comunidade de Pescadores Artesanais Colônia de Pescadores Z-3, Pelotas/RS**. 2016. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Territorial e Sistemas Agroindustriais) - Faculdade de Administração e Turismo, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MEDEIROS, E. F. de et al. Physicochemical characterization of oil extraction from fishing waste for biofuel production. **Renewable Energy**, v. 143, p. 471-477, 2019.
- OKEKE, B. C. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High  $\beta$ -Glucosidase-Producing *Trichoderma* from Decaying Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1581–1598, 2014.
- OLIVEIRA, Sabrina Dias de; LEMOS, Judith Liliana Solórzano; BARROS, Claudia Afonso; LEITE, Selma Gomes Ferreira. **Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018**. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2018.
- SACHS, I. Entering the anthropocene: ‘Geonauts’ or ‘sorcerer’s apprentices? **Social Science Information**, v.50, n.3–4, p.462–471, 2011. DOI: 10.1177/0539018411411028.
- SANTOS, D. da S. dos. **Produção de etanol de segunda geração por Zymomonas mobilis naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. 218f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.