****

**RELATÓRIO FINAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**ESTUDO DA** **CALABURA (*Muntingia calabura*) PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

 **DEZEMBRO 2016**

**RESUMO**

A calabura (*Muntingia calabura*) é uma planta exótica, com grande produtividade de frutos durante o ano todo, os frutos são pequenos com média de 1,42 cm de diâmetro, apresentando alto teor de açúcares, o que possibilita estudo aprofundado para sua aplicação alternativa na produção de etanol. A calabura não vem recebendo grande atenção científica, sendo encontrados apenas alguns trabalhos para aplicação como medicamento ou reflorestamento. É planta rústica que tolera condições ácida, alcalina e seca, possibilitando cultivo em solos degradados, em grande ocorrencia no Brasil. Importante também considerar sua aplicação como alternativa suscedânea às monoculturas. O trabalho consistiu em testar a eficiência fermentativa da polpa da calabura e comparar com os resultados de eficiência fermentativa obtidos com caldo de cana-de-açúcar. Foram realizadas análises de umidade, cinzas, teor de lipídeo, teor de etanol e ART. Os resultados demonstraram que o material é passível de fermentação, porém o trabalho necessita de continuidade para melhor estimativa de eficiência.

**Palavras-chave:** *Biocombustíveis alternativos, Fermentação, Energia renovável, Muntingia calabura, etanol*

**ABSTRACT**

 The calabura (Muntingia calabura) is an exotic plant, with great fruit productivity throughout the year, the fruits are small with an average of 1.42 cm in diameter, presenting a high sugar content, which allows a thorough study for its alternative application in ethanol production. The calabura has not received great scientific attention, being found only some papers for application as medicine or reforestation. It is a rustic plant that tolerates acidic, alkaline and dry conditions, allowing cultivation in degraded soils, which is a major occurrence in Brazil. It is also important to consider its application as a substitute alternative to monocultures. The work consisted in testing the fermentative efficiency of the calabura pulp and comparing it with the results of fermentative efficiency obtained with sugarcane juice. Analyzes of moisture, ash, lipid content, ethanol content and ART were performed. The results showed that the material is susceptible to fermentation, but the work requires continuity for a better estimation of efficiency.

**Keywords: *Alternative biofuels, Fermentation, Renewable energy, Muntingia calabura, ethanol***

**SUMÁRIO**

[1. INTRODUÇÃO 5](#_Toc469577623)

[2. REVISÃO DA LITERATURA 5](#_Toc469577624)

[2.1 Calabura 5](#_Toc469577625)

[3. OBJETIVOS 8](#_Toc469577626)

[3.1 Objetivo geral 8](#_Toc469577627)

[3.2 Objetivos específicos 8](#_Toc469577628)

[4 MATERIAL E MÉTODOS 8](#_Toc469577629)

[4.1 Coletas de amostras 8](#_Toc469577630)

[4.2 Análise físico-química: umidade 8](#_Toc469577631)

[4.3 Análise físico-química: cinzas 9](#_Toc469577632)

[4.4 Análise físico-química: lipídios 9](#_Toc469577633)

[4.5 Teor de Açúcares Redutores e Totais 10](#_Toc469577634)

[4.6 Testes fermentativos 12](#_Toc469577635)

[4.7 Etanol 12](#_Toc469577636)

[4.8 pH 12](#_Toc469577637)

[4.9 Eficiência da Fermentação 12](#_Toc469577638)

[5. RESULTADOS 13](#_Toc469577639)

[5.1 Umidade 13](#_Toc469577640)

[5.2 Cinzas 13](#_Toc469577641)

[5.3 Lipídios 14](#_Toc469577642)

[5.4 Teor de açúcares redutores e totais - ART 15](#_Toc469577643)

[5.5 Densidade 17](#_Toc469577644)

[5.6 pH 17](#_Toc469577645)

[5.7 Teor alcoólico 18](#_Toc469577646)

[5.8 Eficiência do processo fermentativo 19](#_Toc469577647)

[5.9 Considerações finais 19](#_Toc469577648)

[6. CONCLUSÕES 20](#_Toc469577649)

[7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20](#_Toc469577650)

# INTRODUÇÃO

A calabura (*Muntingia calabura*) é uma planta exótica, com grande produtividade de frutos durante o ano todo, os frutos são pequenos com média de 1,42 cm de diâmetro, apresentando alto teor de açúcares, o que possibilita estudo aprofundado para sua aplicação alternativa na produção de etanol. A *calabura* não vem recebendo grande atenção científica, sendo encontrados apenas alguns trabalhos para aplicação como medicamento ou reflorestamento. É planta rústica que tolera condições ácida, alcalina e seca, possibilitando cultivo em solos degradados, em grande ocorrência no Brasil. Importante também considerar sua aplicação como alternativa sucedânea a monocultura. O trabalho consistirá em testar a eficiência fermentativa da polpa da *calabura* e comparar com os resultados de eficiência obtido com caldo de cana-de-açúcar.

## 2. **REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Calabura

A espécie *Muntingia calabura* é conhecida vulgarmente como *calabura*, pertence à família Tiliaceae, exótica, pioneira, de rápido crescimento, que frutifica um ano após o plantio. Os frutos contêm muitas sementes pequenas que são apreciados pela avifauna, morcegos e outros animais. A árvore é bastante ornamental, proporcionando boa sombra durante o ano todo. A madeira apresenta baixa densidade, própria para a fabricação de pequenos tonéis, caixotes, réguas, caixas e engradados de embalagens de frutos. Essas características credenciam a espécie para ser utilizada em futuros programas de reflorestamento. Foi introduzida no Brasil pelo IAC - Instituto Agronômico de Campinas e é popularmente conhecida na região Nordeste como pau de seda, hoje amplamente distribuída pelo Brasil, mas sem grande utilização comercial. A planta tem altura em torno de 14 m e caule de aproximadamente 20 cm de diâmetro, sua copa apresenta-se achatada e esparramada com longos ramos. Quando jovem o caule e os ramos possuem coloração escura com traços brancos. As flores são brancas com 2 cm de diâmetro, possuindo 5 sépalas e 5 pétalas, dispostas em cimeiras, com número livres de estames. O fruto é pequeno, do tipo baga arredondada e plurilocular de cor vermelha e com várias sementes por fruto, sendo sua colheita realizada geralmente, na primavera e início do verão (CORRÊA, 1978 e JOLY, 1998).

Os frutos são comestíveis, adocicados e ricos em vitamina C, ferro, cálcio, além de ser utilizada para a alimentação da ave-fauna, especialmente peixes. O peso médio dos frutos é de 1,42 g, testes separados obtiveram aproximadamente as seguintes composições (RAHMAN, 2010).

O conhecimento das condições adequadas para a germinação de sementes de uma espécie é de fundamental importância, principalmente pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar devido a diversos fatores, como dormência, condições ambientais: água, luz, temperatura e oxigênio e ocorrência de agentes patogênicos, associados ao tipo de substrato para sua germinação (RAMOS e BIANCHETTI, 1984; POPINIGIS, 1985; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Lopes et al (2002) realizaram trabalho extenso testando sementes e demonstrando a grande diferença na germinação da *calabura,* onde sem qualquer tratamento não houve germinação e quando submetidas à nitrato de potássio e condições adequadas o índice de germinação foi de cerca de 80%, demonstrando que ajustes de manejo podem fomentar o uso de diferentes espécies.

O crescimento rápido, frutificação intensa e abundante também tornam a *Muntingia calabura* uma ótima opção para plantio. Trata-se de uma espécie pioneira que prospera em solos pobres, capaz de tolerar condições ácida, alcalina e seca. Estes fatos conferem grande potencial para a *calabura* tendo em vista os tipos de solos brasileiros. (CORRÊA, 1978 e JOLY, 1998). Também Webb (1984), já observara a frutificação em todos meses do ano na América do Sul, aumentando o potencial de exploração pela facilidade logística.

Para citar outras qualidades, descobertas recentes sugerem alta capacidade antioxidante, inibição da atividade de peroxidação lipídica, além de ser um potente agente de clareamento de pele, provavelmente, decorrente da presença de compostos fenólicos, tornando-se candidato apropriado para correção de distúrbios de hiper-pigmentação (BALAKRISHNAN, 2011), além de atividade cardioprotetora (NIVETHETHA, 2011). Extratos da planta são usados na medicina popular nordestina por possuir propriedades anti-bacterianas (RAMOS, 2009), apresentando atividade em extratos foliares para o controle de *Corynebacterium diphtheria, Proteus vulgaris, Staphylococcus epidermidis e Aeromonas hydrophila* (ZAKARIA, 2006) e *Staphylococcus aureus* (ZAKARIA, 2010), causadores de doenças como: difteria, cistite, infecções urinárias e gastroenterite, dentre outras. A planta pode ser utilizada como ornamental, além do uso em restauração de áreas degradadas e que necessitam de sombreamento, sendo caracterizada com uma espécie pioneira, normalmente, multiplicada por sementes. Morcegos e periquitos são os principais dispersores das sementes de *M. calabura*. Solos de florestas apresentam grande número de sementes em áreas com alta atividade de animais frugívoros. Espécies de morcegos como *Artibeus lituratus, Glossophaga soricina e Platyrrhinus lineatus*, são comprovadamente consumidores e dispersores na região central do Brasil.

A fermentação alcoólica é a biotransformação de substrato (açúcar) em álcool por meio de um micro-organismo. Usualmente é utilizada a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, a qual realiza a fermentação dos açúcares com um único objetivo: conseguir energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto desse processo (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

A levedura é o principal agente da fermentação alcoólica, sendo responsável pela transformação do açúcar em etanol. Para um bom desempenho na indústria, ela deve apresentar algumas características, tais como: elevada velocidade de fermentação, tolerância ao álcool, bom rendimento, resistência e estabilidade (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999). Segundo os mesmos autores, a eficiência do processo de fermentação alcoólica pode ser avaliada por meio do método de rendimento de subproduto (análises de ART, glicerol, ART residual, % de álcool, acidez, teor de levedo e floculação do fermento) e rendimento convencional (balanço de massa).

A *Muntingia calabura* tem recebido pouca atenção científica no Brasil. O grande apelo atual com relação à sustentabilidade, a exemplo da fabricação e uso de biocombustíveis não fósseis, ou seja, renováveis, conferem grande importância e potencial a este projeto. Vale citar que por tratar-se de planta resistente e rústica oferece também potencial para exploração com baixo custo como alternativa de geração de trabalho e renda na agricultura familiar.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1 Objetivo geral

Analisar físico-quimicamente *Muntingia calabura* e testar seu uso alternativo na fabricação de biocombustíveis, especialmente etanol.

## 3.2 Objetivos específicos

 1. Coletar amostras;

 2. Realizar análise físico-química: umidade;

 3. Realizar análise físico-química: cinzas;

 4. Realizar análise físico-química: lipídios;

 5. Teor de açúcares;

 6. Realizar testes de fermentação e eficiência para produção de etanol.

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Coletas de amostras

Coletaram-se as amostras nas árvores localizadas no município de São Carlos-SP nas coordenadas (-22.035014, -47.898697), e (-22.038977, -47.886006). Coletou-se os frutos, transferiu-se para baldes de 10 L identificou-se e congelou-se em freezer a -20o C no Instituto Federal de São Paulo-Campus Matão.

## 4.2 Análise físico-química: umidade

Utilizou-se metodologia gravimétrica do Instituto Adolfo Lutz, onde pesou-se 10 g da amostra de frutos de *calabura* em cápsula de porcelana com a balança previamente tarada, anotou-se os valores para futuros cálculos. Aqueceu-se a estufa a temperatura de 105°C, adicionou-se as cápsulas de porcelana, onde permaneceram por 3 horas.

 Em seguida retirou-se as cápsulas de porcelana da estufa levando-as para um dessecador onde permaneceram por 30 minutos até atingirem temperatura ambiente, pesou-se as cápsulas de porcelana. Repetiu-se a operação de aquecimento e resfriamento até peso constante. Os testes foram realizados em triplicata e o cálculo pela equação:

$$Umidade = \frac{Peso do cadinho sem umidade - peso do cadinho }{Peso da amostra}$$

## 4.3 Análise físico-química: cinzas

Utilizou-se as amostras advindas do processo de teor de umidade, Pesou-se o cadinho com amostras sem umidade em balança previamente tarada, anotou-se os valores para futuros cálculos. Levou-se as mesmas para mufla onde permaneceram por 6 horas (11:30 às 17:30h), sendo então transferidas para dessecador até atingirem a temperatura ambiente para pesagem. Abaixo segue a equação utilizada para cálculos:

$$ Cinzas =Peso cadinho com amostra sem umidade -peso do cadinho= x$$

$$Cinzas=\frac{x - Peso da amostra}{Peso da amostra} . 100$$

## 4.4 Análise físico-química: lipídios

Pesou-se 3 g da amostra em papel de filtro, grampeou-se, transferiu-se o cartucho para o aparelho extrator tipo Soxhlet. O extrator foi acoplado ao balão de fundo chato previamente regulado à 105°C. Adicionou-se 100 mL de éter de petróleo no balão fundo chato. O éter de petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos, composta por pentano e o hexano, sua composição pode variar e o seu ponto de ebulição varia entre 60-75ºC permitindo o retorno do mesmo para o balão de fundo chato. Adaptou-se o refrigerador de água no condensador, ligou-se a chapa aquecedora, realizou-se a extração contínua por 3 horas.

 Retirou-se o cartucho, destilou-se o éter e transferiu-se o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C, mantendo por cerca de uma hora. Resfriou-se em dessecador até a temperatura ambiente, pesou-se o balão.

Abaixo segue a equação utilizada para cálculos:

$Lipídios = \frac{peso do balão mais lipídios - Peso do balão sem lipídios }{Peso da amostra} $ x 100

## 4.5 Teor de Açúcares Redutores e Totais

A quantidade de Açúcares Redutores Totais foi determinada pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (ADNS) de acordo com Summer, citado por Martelli & Panek (1968), onde alíquotas de 1 mL de amostras foram colocadas em tubo de ensaio, acrescentando-se 2,5 mL de ácido clorídrico 2 Molar para a hidrólise, com aquecimento em ebulição por 5 minutos. Após resfriamento em água corrente foram adicionados 2,5 mL de NaOH 2 Molar, completando-se o volume com água Milli-Q para 100 mL. Em seguida transferiu-se uma alíquota de 1 mL de tal amostra para tubos de ensaio e adicionou-se a estes tubos 1 mL da solução estoque do reagente ADNS e, após homogeneização, os tubos foram aquecidos em banho-maria por 5 minutos. Após resfriamento em água corrente, adicionou-se 8 mL de água destilada em cada tubo agitou-se e efetuou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital PerkinElmer espetrômetro UV/VIS modelo lambda 35. O aparelho foi zerado previamente com o branco da reação, onde a amostra de vinho foi substituída por água destilada, sendo submetida a todas as outras operações.

Os resultados foram obtidos, em gramas de Açúcares Redutores Totais (ART) por 100 mL do material analisado. Em seguida, os resultados foram transformados em g/100g, considerando-se a densidade da solução, que foi obtida com o auxílio do densímetro.

 A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi obtida através de uma curva padrão de glicose (Tabela 1; Gráfico 1), pesando-se 1,2 g de glicose previamente seca em estufa à 70°C durante 2 horas. A glicose foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com água destilada. Alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mL, foram transferidas para balões de 100 mL, completados com água ultra-pura (Milli-Q) até o menisco. Assim cada mL dessas soluções, considerando-se a diluição, contém, respectivamente, 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84; 0,96; 1,08; 1,20 mg de glicose. Para a leitura da absorbância a 540 nm, melhor comprimento de onda para açúcares, foram misturadas 1 mL de cada solução, 1 mL da solução-estoque de ADNS e 8 mL de água destilada e tais amostras foram submetidas ao banho térmico durante 5 minutos e submetidas à leitura de Absorbância no espectrofotômetro PerkinElmer espetrômetro UV/VIS modelo lambda 35. Este último procedimento é realizado tanto para a construção da curva-padrão como para a leitura das amostras da fermentação.

Tabela 1. Glicose x Absorbância

|  |  |
| --- | --- |
| Tabela 1. Glicose x Absorbância | Gráfico 1. Correlação entre glicose e absorbância |
|

|  |  |
| --- | --- |
| Glicose (mg/mL) | Absorbância (540 nm) |
| 0,12 | 0,003 |
| 0,24 | 0,017 |
| 0,36 | 0,036 |
| 0,48 | 0,054 |
| 0,60 | 0,076 |
| 0,72 | 0,093 |
| 0,84 | 0,123 |
| 0,96 | 0,150 |
| 1,08 | 0,165 |
| 1,2 | 0,190 |

 |  |

Para o preparo da solução estoque de ADNS, diluiu-se com agitação e aquecimento em capela de exaustão, 5g de ácido 3,5-dinitrossalicílico da marca Sigma-Aldrich (USA) em 100 mL de solução de NaOH 2N (solução 1). Dissolveu-se 150g de Tartarato duplo de sódio e potássio em 250 mL de água destilada (solução 2). Misturou-se a solução 2 na 1 vagarosamente até diluir por completo o ADNS (obs: a solução 1 estava em processo de agitação e aquecimento, adicionou-se a solução 2 pré preparada vagarosamente), após diluir transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se até o menisco.

## 4.6 Testes fermentativos

 Os testes fermentativos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 g de mosto de cana e calabura à 12° Brix, em agitador à 80 rpm e 28°C por um período de 18 horas, com três repetições. Utilizou-se 3 tipos de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, duas marcas de levedura liofilizada (Dona Benta e Fleischmann) e levedura prensada da marca Levapan.

## 4.7 Etanol

 Para avaliação do teor de etanol pelas leveduras, amostras de 10 mL dos fermentados foram destiladas em microdestilador da marca Solab. Tais amostras foram recolhidas em balão volumétrico de 25 mL. Após recolhimento de 10 mL de destilado, completou-se o balão com água ultrapura. Tais amostras foram submetidas à leitura de densidade em densímetro Rudolph Research Analytical modelo DDM 2911 que já efetuou o cálculo do teor alcoólico em g de álcool para cada 100 mL da amostra, conforme Amorim et al., (1979). O teor final foi multiplicado pelo fator de diluição de 2,5 X (10 mL de amostra completado com água em balão de 25 mL)

## 4.8 pH

O pH foi determinado com o auxílio de potenciômetro digital com compensação automática de temperatura da MS Tecnopon Instrumentação modelo mPA 310.

## 4.9 Eficiência da Fermentação

VAILANT (1980) esclarece que Pasteur considerou a ocorrência de outros produtos formados na fermentação, além do etanol e CO2 e estabeleceu o rendimento teórico como sendo igual a 95% do rendimento ideal e que o rendimento prático é, em média, igual a 95% de tal valor, ou seja, 1 g de ART deve fornecer, ao final da fermentação, 0,46g de etanol. Os cálculos tiveram por base a estequiometria das fermentações, onde 1 grama de Açúcares Redutores Totais produz 0,64755 mL de álcool etílico a 20°C.

As eficiências dos processos fermentativos foram calculadas utilizando-se o teor alcoólico final do vinho e a quantidade de Açúcares Redutores Totais consumidos na fermentação.

# 5. RESULTADOS

## 5.1 Umidade

A umidade relaciona-se com a estabilidade, qualidade e composição da amostra, afetando sua estocagem e deterioração devido ao crescimento de fungos. Para manutenção de demais processos é necessário conhecer a umidade da amostra a ser trabalhada. Quando a umidade é determinada por dessecação, ocorre a perda de peso pois a água é removida, também substancias voláteis, o resíduo obtido é chamado de resíduo seco. Resultados expressos na tabela 1.

Tabela 1: Resultado de teor umidade em porcentagem (%)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Numero do cadinho | Peso do cadinho (g) | Peso da amostra (g) | Cadinho mais amostraSem humidade (g) | Amostra sem umidade (g) | Umidade (%) |
| 1 | 38,0714 | 10,2617 | 40,5470 | 2,4756 | 76,9% |
| 2 | 31,4432 | 10,0830 | 33,8698 | 2,4266 | 75,9% |
| 3 | 38,0636 | 10,0606 | 40,4884 | 2,4248 | 75,9% |

Os frutos da calabura apresentam alto teor de umidade quando comparados com outros frutos, porém sabendo-se do brix elevado do fruto (entre 18 a 21) ocorre a necessidade de diluição em água para permitir a fermentação.

## 5.2 Cinzas

No método de determinação de cinzas totais utiliza-se o calor produzido em um forno mufla onde ocorre a destruição total da matéria orgânica presente na amostra, onde somente restarão os minerais Macronutrientes como: K, Na, Ca, P, S, Cl e Mg, Micronutrientes como: Al, Fe, Cu, Mn e Zn e elementos traços, entre esses se destacam: Ar, I, F, Cr, Co, Cd. Cinzas correspondem ao resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, entre 550 – 570ºC, a matéria orgânica é transformada em CO2, H2O e NO2. Utilizou-se os resíduos adquiridos no teste anterior teor de umidade. Resultados expressos na tabela 2:

Tabela 2: Resultado de teor cinzas em porcentagem (%)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Numero do cadinho | Peso do cadinho (vazio)(g) | Peso da amostra(g) | Cadinho mais cinzas (g) | Porcentagem deCinzas (%) |
| 1 | 38,0714 | 10,2617 | 38,1905 | 1,16% |
| 2 | 31,4432 | 10,0830 | 31,5478 | 1,03% |
| 3 | 38,0636 | 10,0606 | 38,1905 | 1,26% |

Os resultados de cinzas foram os esperados, conforme teor comum para a maioria de frutos.

## 5.3 Lipídios

A determinação do teor de lipídeos em um substrato que será utilizado para realizar fermentação é importante, pois testes realizados apontam que na fermentação alcóolica, a presença de muita gordura leva ao agrupamento ou floculação das as leveduras. Utilizou-se os resíduos adquiridos no teste teor de umidade. Resultados expressos na tabela 3.

Tabela 3: Resultado de teor de lipídios em porcentagem (%)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Numero doBalão | Peso do balão(vazio)(g) | Peso da amostra (g) | Peso do balão maisLipídios (g) | Porcentagem delipídios (%) |
| 1 | 113,907 | 3,042 | 113,999 | 3,02% |
| 2 | 127,825 | 3,029 | 127,918 | 3,07% |
| 3 | 154,995 | 3,041 | 155,089 | 3,09% |

O teor de lipídios presente nos frutos da *Muntingia calabura* não são expressivos, ficaram em torno de 3%, teor relativamente baixo indicando que não haverá problemas nos processos fermentativos, com teores elevados de lipídios no mosto pode ocorrer a floculação das leveduras, deixando-as presas diminuindo a superfície de contato com o mosto diminuindo assim a eficiência no processo fermentativo.

## 5.4 Teor de açúcares redutores e totais - ART

 Com a projeção da curva padrão de glicose obteve-se a equação de correlação entre absorbância e glicose, onde:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Teor de glicose (mg/mL)** | **=** | **Absorbância**  | **+ 0,0264** |
|  |  | **0,1774** |  |

Apesar do R² obtido de 0,994 indicar confiabilidade da curva padrão construída, apresentando alta correlação entre glicose e absorbância verificou-se na fase de análise dos resultados que o teor de ART obtido não corresponde ao esperado, provavelmente devido a efeitos de reagente vencido e erro experimental com a informação das análises em branco (*blanks* das reações). Basicamente verificou-se que existem duas informações de branco de reações, uma delas deve ser realizada com apenas água ultrapura indicando ao espectrofotômetro a correspondência a absorbância igual a zero e outro branco de reação utilizando-se o reagente de ADNS e demais diluições, este branco apresentará absorbância mas deverá indicar ao espectrofotômetro que a mesma equivale a zero de glicose. Avaliou-se o teor de ART antes e após o processo fermentativo, obtendo-se a quantidade de açúcares fermentescíveis efetivamente consumidos, conforme resultados expressos nas tabelas 4 e 5 abaixo:

Tabela 4: ART das amostras de calabura e cana de açúcar antes do processo fermentativo.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Mosto | ABS (540 nm) | ART (mg/mL) | ART x FD\* mg/mL |
| Calabura | 0,052 | 0,3195 | 319,5 |
| Calabura rep. 1 | 0,050 | 0,3082 | 308,2 |
| Calabura rep. 2 | 0,049 | 0,3026 | 302,6 |
| **Média calabura** | **0,050** | **0,3082** | **308,2** |
| Cana | 0,072 | 0,4322 | 432,3 |
| Cana rep. 1 | 0,071 | 0,4266 | 426,6 |
| Cana rep. 2 | 0,073 | 0,4379 | 437,9 |
| **Média cana** | **0,072** | **0,4323** | **432,3** |

 \* - Fator de diluição 1 mL em 1 L de água.

 Inicialmente calculou-se a quantidade de açúcares no mosto e no vinho, obtendo-se a quantidade consumida por diferença, conforme tabela 5 abaixo:

 Tabela 5: Quantidade de ART no *vinho* de calabura e cana de açúcar.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| *Vinho*/Marca levedura | Absorbância média (540nm)e desvio padrão | ART(mg/mL) | ART consumidomg/mL |
| Calabura mosto | 0,050 ± 0,001247 | 308,2 | - |
| Calabura/Dona Benta | 0,024 ± 0,000471  | 16,169 | 292.03 |
| Calabura/Fleischmann | 0,012 ± 0,001247 | 9,404 | 298,80 |
| Calabura/Prensada | 0,011 ± 0,001247 | 8,840 | 299,36 |
| Cana mosto | 0,072 ± 0,000471 | 432,3 | - |
| Cana Dona Benta | 0,008 ± 0,000471 | 7,150 | 425,15 |
| Cana/Fleischmann | 0,005 ± 0,001247 | 5,459 | 426,84 |
| Cana/Prensada | 0,003 ± 0,000471 | 4,331 | 427,97 |

Os resultados acima não foram condizentes com os geralmente obtidos em testes fermentativos com 12 brix, onde esperava-se ART em torno de 100 a 110 mg de glicose/mL e os resultados foram da ordem de 308 e 432 mg de glicose/mL. Inicialmente cogitou-se que sólidos do tipo celulose não teriam sido computados em brix, mas como na análise de ART existe hidrólise ácida, podem ter aparecido como fermentescíveis, quando na verdade não o são efetivamente no mosto. Porém o mesmo problema repetiu-se com o caldo de cana que não apresenta teor de celulose considerável e também em várias outras repetições executadas buscando alguma falha de procedimento ou na marcha analítica, logo supõe-se que algum problema possa ter ocorrido com o reagente ADNS, pois estava acondicionado em embalagem diferente da original e sem o prazo de validade.

## 5.5 Densidade

 A densidade pode ser correlacionada com a massa volumétrica ou massa específica e define o quociente entre a massa e o volume desse corpo, assim densidade mede o grau de concentração de massa em determinado volume. Resultados na tabela 6:

 Tabela 6: Densidade do *vinho* de calabura.

|  |  |
| --- | --- |
| Tratamentos | Densidade |
| Calabura/Levedura Dona Benta | 1,00604 |
| Calabura/Fleischmann | 1,00791 |
| Calabura/Prensada | 1,00538 |
| Cana-de-açúcar/Dona Benta | 0,99372 |
| Cana-de-açúcar/Fleischmann | 0,99531 |
| Cana-de-açúcar/Prensada | 0,99411 |

## 5.6 pH

 Considerando o pH uma das características mais importantes durante e depois no processo fermentativo, o pH básico indica que não houve consumo dos teores de ART, já o pH ácido indica que houve diferença na acidez do mosto indicando consumo do ART. Resultados de pH estão expressos na tabela 7:

 Tabela 7: Indice de pH do Mosto sem fermentar e Fermentado

|  |  |
| --- | --- |
| Mosto/Marca levedura | pH |
| Calabura sem Fermentar | 5,1 |
| Calabura/Dona Benta | 4,0 |
| Calabura/Fleischmann | 3,8 |
| Calabura/Prensada | 4,0 |
| Cana sem Fermentar | 4,7 |
| Cana/Dona Benta | 2,8 |
| Cana/Fleishimann | 3,0 |
| Cana/Prensada | 2,8 |

 O pH médio da cana de açúcar foi 2,9 enquanto o da calabura 3,9. A maior acidez no processo fermentativo da cana-de-açúcar indica melhor eficiência, quando comparada com a calabura.

## 5.7 Teor alcoólico

 Obteve-se o teor alcoólico utilizando o densímetro Rudolph Research Analytical modelo DDM 2911 que já efetuou o cálculo do teor alcoólico em g de álcool para cada 100 mL da amostra, porém foi necessário multiplicar pelo fator de diluição (2,5 vezes) do processo de destilação onde 10 mL da amostra é destilado em balão de 25 mL e em seguida completado com agua destilada até o menisco, resultados expressos na tabela 8:

Tabela 8: Teor alcoólico na solução hidroalcoolica.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Solução hidroalcóolica Amostra/ Levedura | Etanol ABNT INPM 20ºC Triplicata | Teor alcoólico com correção da diluiçãoABNT INPM 20oC - % p/p | Quantidade de etanol por repetição (g/100g) |
| Calabura/Dona benta | 1,52/1,53/1,56 | 3,84 | 13,433 |
| Calabura/Fleischmann | 1,54/1,49/1,47 | 3,75 | 13,745 |
| Calabura/Prensada | 1,35/1,38/1,37 | 3,42 | 13,770 |
| Cana/Dona Benta | 1,76/1,76/1,75 | 4,39 | 19,557 |
| Cana/Fleischmann | 2,08/2,31/2,14 | 5,44 | 19,635 |
| Cana/Prensada | 1,72/1,75/1,74 | 4,34 | 19,687 |

## 5.8 Eficiência do processo fermentativo

A eficiência na fermentação foi obtida da relação entre a quantidade de etanol produzida em função dos açúcares consumidos, conforme estequiometria das reações e os índices práticos conhecidos, resultados expressos na tabela 9:

 Tabela 9: Resultado da eficiência na fermentação em porcentagem

|  |  |
| --- | --- |
| Amostra/Levedura | E.F (%) |
| Calabura/Dona Benta | 28,6 |
| Calabura/Fleischmann | 27,3 |
| Calabura/Prensada | 24,8 |
| Cana/Dona Benta | 22,4 |
| Cana/Fleischmann | 27,7 |
| Cana/Prensada |  22,0 |

Em média a eficiência no processo fermentativo usando a cultura da calabura foi de 26,9 % maior se comparado com o da cana-de-açúcar que foi em média de 22,4 %, isso devido os valores de ART computados no mosto, o da calabura foi menor que o da cana, assim a eficiência da fermentação é calculado em cima destes valores, tendo menos açucar no recipiente o resultado apresenta mais eficiência.

## 5.9 Considerações finais

 Nesta proposta de estudo de uso da calabura para produção de etanol, já esperava-se que a produção não seria tão competitiva como a de cana-de-açúcar, mesmo porque o fato de a calabura ser planta C3, fixando carbono com uso da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase em fosfoglicerato (3 Carbonos) já a deixa em desvantagem, quando comparada às plantas C4, que fixam em oxalacetato (4 Carbonos), porém o forte apelo desta alternativa tem maior relevância quando seu potencial se relaciona com a agroecologia e agricultura familiar. Por exemplo, determinado pequeno produtor poderá utilizar-se da produção da calabura obtida mesmo em áreas de reserva, ou seja, será uma complementação na geração de trabalho e renda, além de contribuir na mitigação do desmatamento (MARZZOCO E ANITA, 2011).

# 6. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a calabura pode ser utilizada para produção de etanol, no entanto para cálculo de eficiência do processo fermentativo os resultados obtidos não foram conclusivos. As causas podem ser de origem metodológica (reagente ADNS degradado) ou mesmo por necessidade de ajuste metodológico para isolar efeito de sólidos não fermentescíveis computados como fermentescíveis por hidrólise ácida nas análises de quantificação de açúcares redutores e totais. Conclui-se também, portanto que os estudos devem ser continuados.

# 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D .M. G. **Processos de produção de álcool**. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1996.

BALAKRISHNAN, K. P.; NARAYANASWAMY, N.; DURAISAMY A. **Tyrosinase inhibition and anti-oxidant properties of Muntigia calabura extracts: In vitro studies. International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p. 294-303, 2011.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p 2000.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das planta úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1978. v.1, 747p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

JOLY, A. B., **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12.ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777p.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007 p. 186-187

NIVETHETHA, M.; JAYASRI, J.; BRINDHA, P. Effects of Muntigia calabura L. on isoproterenol-induced myocardial infartion.Singapore, **Medical Journal**, v. 50, n.3, p. 300-302, 2009.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente. Brasília**: AGIPLAN, 1985. 289p.

RAHMAN, m.; FAKIR, S. A.; RAHMAN, M. fruit growth of China berry (Muntigia calabura). **Botany Research International**, v. 3, n.2, p. 56-60, 2010.

RAMOS, A. & BIANCHETTI, A. Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes florestais. In: **SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DE SEMENTES FLORESTAIS**, Curitiba, 1984. Anais... Curitiba, UFPr, 1984. p.252-275.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; CASTELAR, I.; CARVALHO, F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. **Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. 2A, p. 376-381, 2009.

RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. Texto para aula; Apostila; Impresso. Piracicaba, v. 2, p. 7-25, 1999.

VAILANT, L.P.M.; GONÇALVES, L.A. de C.; LUCAS, S.M.A.; GOMES, C.H.F.; **Tecnologia da fabricação do álcool**. IAA – PLANALSUCAR. Coordenadoria Regional Leste, 1980, 129p.

WEBB, D. B.; WOOD, P. J.; SMITH, J. P.; HENMAN, G. S. **A guide to species selecton for tropical and subtropical plantations**. 2. ed. Oxford: Commonwealth Forestry Institute, 1984. 256 p. (Tropical Forestry Papers, 15).

ZAKARIA, Z. A.; FATIMAH, C. A.; MAT JAIS, A. M.; ZAITON, H.; HENIE, E. F. P.; SULAIMAN, M. R.; SOMCHIT, M. N.; THENAMUTHA, M.; KASTTHURI, D. The in vitro antibacterial activities of Muntigia calabura extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 439-432, 2006.

ZAKARIA, Z. A.; SUFIAN, A. S.; RAMASAMY, K.; AHMAT, N.; SULAIMAN, M. R.; ARIFAH, A. K.; ZURAINI, A.; SOMCHIT, M. N.IN vitro antimicrobial activity of Muntingia calabura extracts and fractions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 4, p. 304-308, 2010.