

## DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO INTEGRADO UTILIZANDO RESÍDUOS DE FRUTAS PARA PRODUÇÃO DE D-LIMONENO E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

LAURA HELENA DOS SANTOS<sup>1,2\*</sup>, CHARLINE BONATTO<sup>3</sup>, SUZANA BAZOTTI<sup>4</sup>, HELEN TREICHEL<sup>2,5</sup>

### 1. Introdução

Na última década, com o surgimento e o fortalecimento do conceito de biorrefinarias e economia circular, ampliaram-se as discussões sobre gerenciamento de resíduos pela valorização em cadeia, para minimização de impactos para saúde e meio ambiente (MORONE et al., 2019). Resíduos industriais são extensivamente estudados como matérias-primas de processos integrados por serem gerados em grandes quantidades e por não dependerem de terras agrícolas para produção.

Considerando as limitações dos processos convencionais e a necessidade de explorar novos cenários para conversão de resíduos de frutas, este estudo propõe processos alternativos para produção de etanol a partir de misturas de resíduos de frutas utilizando processos integrados, com etapa para remoção e recuperação de D-limoneno.

### 2. Objetivos

#### 2.1 Geral

Avaliar a integração do processo de recuperação de D-limoneno e produção de etanol de segunda geração utilizando resíduos de frutas cítricas e não-cítricas como matéria-prima.

#### 2.2 Específicos

- Realizar bioprospecção de fungos filamentosos e otimizar o processo de produção de enzimas microbianas para hidrólise enzimática dos resíduos de frutas;
- Avaliar e otimizar o processo de hidrólise enzimática dos resíduos de frutas;
- Otimizar o processo de remoção e recuperação de D-limoneno e avaliar o processo fermentativo para produção de etanol

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Erechim*, contato:lauraahds1@gmail.com

<sup>2</sup>Grupo de Pesquisa: Agroenergia.

<sup>3</sup>Mestra em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

<sup>4</sup>Doutoranda em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

<sup>5</sup>Doutora em Engenharia de Alimentos, UFFS, *campus Erechim*, ORIENTADORA.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Resíduos de frutas

Os resíduos de frutas de banana, manga, abacaxi, laranja e limão foram coletados no restaurante universitário da Universidade Federal da Fronteira Sul, e também após o uso comercial e residencial das frutas. Os resíduos foram secos em estufa (40°C), moídos separadamente em moinho de facas na granulometria de 20 mesh, e armazenados no freezer a -20°C até utilização.

#### 3.2 Composição química

O teor de pectina foi determinado segundo metodologias descritas em Sudhakar; Maini (2000). O teor de sólidos totais, cinzas, extrativos, celulose, hemicelulose e lignina foram determinados com base na metodologia do National Renewable Energy Laboratory (NREL).

#### 3.3 Extração dos açúcares solúveis

Os resíduos de frutas secas e moídos foram misturados entre si em proporções iguais, formando uma mistura de resíduos de fruta (MRF). A MRF foi misturada com água destilada em uma proporção de 10% (m/v) e mantida sob agitação mecânica durante 5 minutos (BONATTO et al., 2021). Para determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART) foi utilizada metodologia colorimétrica com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) e também por cromatografia de alta eficiência (HPLC) A fração líquida resultante desta etapa foi posteriormente fermentada.

#### 3.4 Prospeção de fungos filamentosos para a produção de enzimas visando a etapa de hidrólise

##### 3.4.1 Microrganismos

Para a produção enzimática foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* que tem sido estudado como produtor de enzimas de interesse biotecnológico (CASABAR et al., 2020; MARQUES et al., 2018; PRAJAPATI et al., 2020).

##### 3.4.2 Produção enzimática e hidrólise

A produção de enzimas foi conduzida utilizando os resíduos de laranja, limão, abacaxi, banana e manga como substrato em fermentação submersa. Esta etapa foi realizada com objetivo de determinar se o microrganismo *Aspergillus niger* possui potencial para a produção do coquetel enzimático.

Assim, o microrganismo foi cultivado em meio de cultura BDA durante 7 dias a 28°C.

Posteriormente, cada inóculo contendo  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  foi transferido para Erlenmeyers com substrato ( $10\% \text{ m v}^{-1}$ ) e meio tampão citrato de sódio  $0,05\text{M}$  pH 4,8. As amostras foram mantidas em agitador orbital 150 rpm por  $28^\circ\text{C}$ , e as alíquotas foram coletadas em 72 e 120 horas para quantificação da atividade enzimática. Além disso, foi mantido na fermentação um controle negativo contendo resíduo de frutas e tampão citrato de sódio pH 4,8  $0,05\text{M}$  na proporção ( $10\% \text{ m v}^{-1}$ ). A fração sólida foi separada do sobrenadante por filtração e a fração líquida resultante foi considerada como o coquetel enzimático e avaliada quanto a produção de enzimas pectinase e celulase (endo e exoglucanase).

A capacidade de hidrólise enzimática dos coquetéis produzidos foi realizada com base na metodologia proposta por Prajapati et al. (2020). Os coquetéis enzimáticos produzidos foram misturados com a MRF na proporção de  $1\% (\text{m v}^{-1})$ . O meio foi mantido sob incubação em condições controladas de temperatura ( $45^\circ\text{C}$ ) e agitação (150 rpm) e amostras foram coletadas em 72 e 120 horas. Um controle negativo foi monitorado ao longo da hidrólise para confirmação da capacidade hidrolítica. O experimento foi avaliado em termos de quantidade de açúcar obtido ( $\text{mg}$  açúcar  $\text{g}^{-1}$  de biomassa), mensurado pelo método de Miller (1959) e também por HPLC.

### 3.4.3 Hidrólise com coquetel comercial

A etapa de hidrólise enzimática utilizando celulase comercial foi baseada na metodologia descrita por Gabhane et al (2014). A MRF foi misturada com tampão citrato de sódio  $0,05\text{M}$  pH 4,8 na proporção de  $1\% (\text{m v}^{-1})$  e posteriormente esterilizada. Após, foi adicionado 50 FPU/g de enzima celulase e o sistema foi incubado em shaker a  $45^\circ\text{C}$  e 150 rpm. Amostras foram coletadas em 72 e 120 horas. Um controle negativo foi monitorado ao longo da hidrólise para confirmação da capacidade hidrolítica.

### 3.4.4 Remoção e recuperação de d-limoneno

A recuperação do D-limoneno foi realizada em aparelho extrator Soxhlet, por 4 horas, utilizando 8 gramas de biomassa contendo a MRF e 200 mL de hexano. Após a extração foi realizada a purificação do D-limoneno utilizando rota-evaporador. Foram utilizados 16 mL da amostra extraída anteriormente a 120 rpm a  $100^\circ\text{C}$ . Após a separação completa do D-limoneno e do hexano, o teor de D-limoneno foi determinado por Cromatografia Gasosa- GC (CP-9100, Chrompack), usando uma coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 5 CB (25 m  $0,32 \text{ mm d.i.}$ , espessura de filme de 1,2  $\mu\text{m}$ , Chrompack) operado com gás hélio, temperatura do injetor  $280^\circ\text{C}$ , FID e programação de temperatura do forno a  $110^\circ\text{C}$  por 5 min e  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  a  $220^\circ\text{C}$ , que foi

mantida constante por 10 min.

Após a remoção do D-limoneno o resíduo sólido foi hidrolisado com o coquetel produzido pelo microrganismo *Aspergillus niger* e também pelo coquetel comercial conforme o item 3.4.3.

### 3.4.5 Fermentação Alcoólica

As amostras hidrolisadas utilizando o coquetel enzimático produzido e comercial foram fermentadas, assim como a fração líquida resultante da extração de açúcares solúveis. As condições de fermentação foram baseadas na metodologia de Bonatto et al. (2021), e as análises foram feitas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para analisar o perfil de consumo de açúcares e produção do etanol.

## 4. Resultados e Discussão

O coquetel enzimático produzido apresentou alta atividade de endoglucanase e exoglucanase, apresentando atividades de  $16,75 \pm 2,77$  U/g e  $51,58 \pm 1,11$  U/g, respectivamente. A avaliação da produção de açúcares após a hidrólise mostrou-se mais alta em 120 horas, obtendo-se  $5,69 \pm 0,32$  g/L e  $23,30 \text{ g/L} \pm 0,09$  para a hidrólise utilizando a celulase comercial e o coquetel enzimático produzido pelo *Aspergillus niger*, respectivamente. Os controles negativos do coquetel enzimático produzido e da celulase comercial indicaram a atuação das enzimas na MRF.

A biomassa hidrolisada com a celulase comercial que não passou pela extração de D-limoneno apresentou valores maiores de produção de etanol, sendo o maior rendimento em 12 horas de fermentação com cerca de  $8,51 \pm 2,21$  g/L e  $4,35,60 \pm 0,98$  g/L de ácido cítrico. Já a biomassa que passou pela extração de D-limoneno apresentou rendimento menor na produção de etanol sendo com celulase comercial  $0,94 \pm 0,05$  g/L e  $4,60 \pm 0,30$  g/L de ácido cítrico, e com o coquetel produzido foi de  $0,90 \pm 0,04$  g/L e  $3,43,60 \pm 0,31$  g/L de ácido cítrico.

## 5. Conclusão

O microrganismo *Aspergillus niger* possui potencial para a produção do coquetel enzimático. O alto teor de ácido cítrico pode ter sido uma das causas para o baixo rendimento de etanol durante a fermentação. A remoção de D-limoneno em aparelho extrator Soxhlet, utilizando hexano como solvente mostrou-se eficaz, sendo uma extração de baixo custo.

## Referências

BONATTO, C.; SCAPINI, T.; ZANIVAN, J.; DALASTRA, C.; BAZOTI, S. F.; ALVES, S.;

FONGARO, G.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Utilization of seawater and wastewater from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol. *Bioresource Technology*, v. 321, p. 124501, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124501>

CASABAR, J. T.; RAMARAJ, R.; TIPNEE, S.; UNPAPROM, Y. Enhancement of hydrolysis with *Trichoderma harzianum* for bioethanol production of sonicated pineapple fruit peel. *Fuel*, v. 279, p. 118437, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118437>

MARQUES, N. P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, v. 122, p. 66–75, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MORONE, P.; KOUTINAS, A.; GATHERGOOD, N.; ARSHADI, M.; MATHARU, A. Food waste: Challenges and opportunities for enhancing the emerging bio-economy. *Journal of Cleaner Production*, v. 221, p. 10–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.258>

PRAJAPATI, B. P.; JANA, U. K.; SURYAWANSHI, R. K.; KANGO, N. Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. *Renewable Energy*, v. 152, p. 653–663, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.063>

SCHNEIDER, W. D. H.; GONÇALVES, T. A.; UCHIMA, C. A.; REIS, L. dos; FONTANA, R. C.; SQUINA, F. M.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocellulosic biomass. *Process Biochemistry*, v. 66, p. 162–170, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.004>

TREICHEL, H.; FONGARO, G.; SCAPINI, T.; FRUMI CAMARGO, A.; SPITZA STEFANSKI, F.; VENTURIN, B. Waste Biomass Pretreatment Methods. In: TREICHEL, H.; FONGARO, G.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F. S.; VENTURIN, B. (org.). *Utilising Biomass in Biotechnology*. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 19–48. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-22853-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-22853-8_3)

**Palavras-chave:** *Aspergillus Niger*, Etanol, D-limoneno

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES-2022-0110

**Financiamento CNPq**