

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

Área de concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente

Tese de Doutorado

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE
RESÍDUOS DE FRUTAS

Danúbia Paula Cadore Favaretto

Passo Fundo

2023



CIP – Catalogação na Publicação

F272p Favaretto, Danúbia Paula Cadore
Produção de bioetanol a partir de resíduos de frutas
[recurso eletrônico] / Danúbia Paula Cadore Favaretto. –
2023.

1 MB ; PDF.

Orientador: Prof. Dr. Vandré Barbosa Brião.

Coorientadora: Profa. Dra. Helen Treichel.

Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de
Passo Fundo, 2023.

1. Biocombustíveis. 2. Fermentação. 3. Frutas - Resíduos
como combustível. 4. Microorganismos. 5. Hidrólise. I. Brião,
Vandré Barbosa, orientador. II. Treichel, Helen, coorientadora.
III. Título.

CDU: 620.91

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Produção de bioetanol a partir de resíduos de frutas

Danúbia Paula Cadore Favaretto

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Passo Fundo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr^o Vandrê Barbosa Brião.
Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Helen Treichel

Comissão Examinadora:
Prof. Dr. Luciane Maria Colla - Universidade de Passo Fundo.
Prof. Dr^a. Marcelo Hemkemeir - Universidade de Passo Fundo.
Prof. Dr^a. Eliane Colla - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Prof. Dr^a. Juliane Steffens - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.

Passo Fundo
2023

RESUMO

Os combustíveis fósseis, além de serem irrenováveis, emitem gases poluentes, que contribuem para o efeito estufa, aceleram o aquecimento global e interferem na qualidade do ar. Com isso, surge a necessidade de produção de bicombustíveis, sendo o resíduo lignocelulósico uma matéria-prima com potencial para auxiliar nessa demanda. Com o intuito de contribuir com essa realidade, a presente pesquisa utilizou resíduos de frutas para produção de bioetanol. Esses resíduos são quimicamente complexos, porém biodegradáveis e que contém uma grande variedade de compostos, incluindo açúcares fermentescíveis, proporcionando uma oportunidade para a produção de bioetanol de segunda geração. Por ter uma estrutura complexa, formada por celulose, hemicelulose e lignina, essa biomassa necessita de pré-tratamentos eficazes para romper sua estrutura, a fim de possibilitar acesso aos açúcares fermentescíveis que serão usados posteriormente pelos microrganismos no processo fermentativo. Inicialmente, essa pesquisa utilizou resíduos de uma indústria de suco de laranja para para testar a eficiência de tratamentos físicos, químicos e enzimático para acessar o máximo de açúcares redutores (ARs), atingindo resultados de 69,17 mg/mL no pré-tratamento realizado com ácido sulfúrico (H₂SO₄) em autoclave e 61,12 mg/mL a partir da hidrólise enzimática. Após a obtenção dos resultados de ARs em biomassa de laranja, passou-se para a segunda etapa da pesquisa, onde o processo foi realizado utilizando-se resíduos de outras frutas, como a banana, a maçã, a manga e o mamão. A biomassa foi preparada e submetida a hidrólise enzimática por 8 enzimas diferentes, obtendo-se assim a geração de 268,08 mg/mL de ARs em resíduo de banana, sendo que com o processo fermentativo gerou concentrações de bioetanol de até 31 g/L. Os resultados obtidos confirmam a eficiência dos pré-tratamentos testados, sendo a hidrólise enzimática o mais eficiente para obtenção de açúcares redutores, pois possibilita a liberação de açúcares de cadeias complexas, facilitando a fermentação por leveduras. Entre as biomassas testadas, a da banana obteve destaque tanto pelo rendimento de açúcares redutores, quanto pela geração de bioetanol, se mostrando um resíduo em potencial para esse fim, levando em conta também a disponibilidade em que se encontra.

Palavras-chave: Pré-tratamentos; hidrólise; açúcares; fermentação; microrganismos.

ABSTRACT

Fossil fuels, in addition to being irreplaceable, emit polluting gases that contribute to the greenhouse effect, accelerate global warming and interfere with air quality. As a result, the need to produce biofuels arises, with lignocellulosic waste being a raw material with the potential to assist in this demand. In order to contribute to this reality, this research used fruit residues to produce bioethanol. These residues are chemically complex but biodegradable and contain a wide variety of compounds, including fermentable sugars, providing an opportunity for the production of second-generation bioethanol. Because it has a complex structure, formed by cellulose, hemicellulose and lignin, this biomass needs effective pre-treatments to break its structure, in order to allow access to fermentable sugars that will be used later by microorganisms in the fermentation process. Initially, this research used waste from an orange juice industry to test the efficiency of physical, chemical and biological treatments to access the maximum amount of reducing sugars (ARs), reaching results of 69.17 mg/mL in the pre-treatment performed with sulfuric acid (H₂SO₄) in autoclave and 61.12 mg/mL from enzymatic hydrolysis. After obtaining the results of ARs in orange biomass, the second stage of the research was carried out, where the process was carried out using residues from other fruits, such as banana, apple, mango and papaya. The biomass was prepared and subjected to enzymatic hydrolysis by 8 different enzymes, thus obtaining the generation of 268.08 mg/mL of ARs in banana residue, with the fermentation process generating bioethanol concentrations of up to 31 g/L. The results obtained confirm the efficiency of the pre-treatments tested, with enzymatic hydrolysis being the most efficient way to obtain reducing sugars, as it enables the release of sugars from complex chains, facilitating fermentation by yeasts. Among the tested biomasses, the banana obtained prominence both for the yield of reducing sugars and for the generation of bioethanol, proving to be a potential residue for this purpose, also taking into account the availability in which it is found.

Key-words: Pretreatments; hydrolysis; sugars; fermentation; microorganisms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	6
1.1 Objetivos	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 A substituição dos combustíveis fósseis	8
2.2 Bioetanol lignocelulósico	9
2.2.1 Estrutura química da biomassa lignocelulósica.....	11
2.2.2 Pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica.....	14
2.2.2.1 Métodos físicos.....	21
2.2.2.2 Métodos químicos.....	22
2.2.2.3 Métodos biológicos.....	22
2.2.2.4 Geração de subprodutos.....	23
2.2.3 Hidrólise ou sacarificação.....	24
2.2.4 Fermentação.....	26
REFERÊNCIAS	27
3 CAPÍTULO I – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO	32
3.1 Introdução	32
3.2 Material e Métodos	34
3.2.1 Caracterização físico-química dos resíduos da laranja.....	35
3.2.2 Pré-tratamentos físicos e químicos aplicados à biomassa da laranja.....	35
3.2.3 Pré-tratamento ultrassônico aplicado à biomassa da laranja.....	36
3.2.4 Hidrólise enzimática aplicada à biomassa da laranja.....	37
3.2.5 Metodologia analítica.....	37
3.2.5.1 Remoção de proteína.....	37
3.2.5.2 Açúcares redutores.....	38
3.2.6 Tratamento de dados.....	38
3.3 Resultados e Discussão	38
3.3.1 Caracterização físico-química realizada no resíduo da laranja.....	38
3.3.2 Pré-tratamentos aplicados aos resíduos da laranja.....	39
3.3.3 Pré-tratamentos com sonda ultrassônica.....	41
3.3.4 Hidrólise enzimática.....	44
3.4 Conclusão	46
REFERÊNCIAS	47
4 CAPÍTULO II – ARTIGO PUBLICADO	50
4.1 Introduction	51
4.2 Material and Methods	53
4.2.1 Collection of fruit residues and sample preparation.....	53
4.2.2 Starch gelatinization.....	53
4.2.3 Characteristics of the enzymes.....	53
4.2.4 Enzymatic hydrolysis.....	54
4.2.5 Alcohol fermentation.....	55
4.2.6 Analytical methods.....	56
4.2.6.1 Determination of Reducing Sugars.....	56
4.2.6.2 Ethanol.....	56
4.2.6.3 Reducing Sugars to Etanol conversion.....	56
4.2.7 Date treatments.....	57
4.3 Results and Discussion	57
4.3.1 Enzymatic hydrolysis of fruit biomass.....	57
4.3.2 Production of bioethanol from hydrolyzed fruit biomass.....	66

4.4 Conclusion.....	69
REFERENCES.....	70
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção do bioetanol, um biocombustível que surge para substituir o uso de combustíveis fósseis, pode ser realizada a partir de diferentes biomassas. Além das biomassas açucaradas (cana-de-açúcar e beterraba), ou amiláceas (sorgo, milho, trigo e batata), que constituem o etanol de primeira geração, existem as lignocelulósicas (bagaço da cana-de-açúcar e caule do milho), que são ricas em açúcares fermentáveis e vem a compor o etanol de segunda geração (SINGH et al., 2022).

Os materiais lignocelulósicos são considerados uma fonte orgânica abundante na terra, sendo a lignocelulose o principal componente da parede celular vegetal (KOUAIE et al., 2019). Esta biomassa tem despertado interesse, devido ao seu alto teor de carboidratos e à presença de polifenóis, ambos capazes de liberar uma quantidade considerável de energia (TORRE et al., 2017).

A biomassa lignocelulósica é formada por uma estrutura complexa, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Para seu uso na produção de bioetanol são necessários diversos processos, a começar pelos pré-tratamentos, que devem romper essas estruturas para possibilitar o acesso aos açúcares existentes (BARROS et al., 2017).

O Brasil é um dos pioneiros na produção de bioetanol lignocelulósico, utilizando como biomassa o bagaço da cana-de-açúcar. Acredita-se que em 10 anos o combustível gerado ganhe força no mercado, chegando a produzir 2 bilhões de litros/ano. Apesar da grande exploração desse resíduo, a biomassa variada de culturas agrícolas já está sendo utilizada; nesse contexto, o uso do resíduo da indústria de frutas é uma alternativa promissora para o Brasil (CYPRIANO et al., 2018).

A biomassa de frutas é composta por celulose (30% - 50%), hemicelulose (20-40%) e polímeros potencialmente hidrolisáveis em mono e dissacarídeos fermentáveis. A lignina (15-25%) é rica em carboidratos (glicose, frutose, sacarose, amido) e fibras (pectina), que podem ser explorados através da hidrólise para a conversação em bioetanol (PANAHI et al., 2022).

Diversos pré-tratamentos podem ser utilizados para quebrar as estruturas complexas de lignina-celulose-hemicelulose da biomassa. Eles podem ser físicos, químicos, físico-químicos e biológicos e têm a capacidade de fracionar a lignocelulose, solubilizar a hemicelulose e reduzir a cristalinidade da celulose, melhorando a acessibilidade aos polissacarídeos e aos açúcares monômeros, que podem ser convertidos em bioetanol por microrganismos fermentadores (ZABED et al., 2019).

Esta temática está inserida na linha de pesquisa “Infraestrutura Sustentável” do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental (PPGEng). O uso de resíduos para a produção de energias limpas e renováveis encontra-se dentro da linha de pesquisa do programa e está sendo desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo. Foi organizada iniciando por uma introdução geral, que apresenta a problemática e justificativas da realização do trabalho, os objetivos e a revisão de literatura. Após este item a tese foi organizada em 2 capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo científico, contendo resumo, introdução, materiais e métodos, resultados e discussões, conclusões e referências bibliográficas. Por fim, apresenta-se as considerações finais da tese. Até o momento 1 artigo está publicado em periódico internacional com Qualis A3 e 1 enviado para periódico internacional com Qualis A2, conforme regimento do programa.

1.1 Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa foi utilizar resíduos de frutas para produzir bioetanol, pensando na utilização de energia limpas e renováveis e na valorização de resíduos para uma economia circular.

Os objetivos específicos foram:

- a) Caracterizar física e quimicamente as matérias primas;
- b) Aplicar pré-tratamentos físicos e químicos, individuais e combinados para acessar o máximo de açúcares fermentescíveis da biomassa;
- c) Encontrar a melhor condição de pré-tratamentos para uso da matriz lignocelulósica;
- d) Realizar a sacarificação por processo enzimático utilizando enzimas comerciais;
- e) Testar leveduras, analisando a capacidade de fermentação;
- f) Submeter a biomassa pré-tratada à fermentação alcoólica para obtenção de bioetanol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A substituição dos combustíveis fósseis

As consequências do consumo descontrolado de combustíveis fósseis, por ser a fonte de energia mais disponível, são o rápido esgotamento do recurso e as preocupações sobre a poluição ambiental gerada. Muitos métodos de produção renovável e sustentável de combustíveis estão sendo mundialmente examinados e estão levando a um aumento do interesse em fontes de energia alternativas, como o uso da biomassa lignocelulósica, por ser uma fonte abundante de matéria orgânica e ter potencial de ser utilizada para produção de energia (KOUPAIE et al., 2019).

O uso de combustíveis alternativos em motores de combustão está crescendo graças à atenção aos níveis de emissões e a sustentabilidade da produção. A combustão de motores está envolvida nas questões ambientais mais polêmicas. Tanto o transporte quanto a conversão de energia elétrica e térmica são globalmente responsáveis por 64% do total de dióxido de carbono produzido. A gasolina e o óleo diesel são os dois principais combustíveis que satisfazem a demanda de energia necessária para o transporte e a conversão de energia em pequena escala (CALIGIURI et al., 2019).

A produção convencional de petróleo logo enfrentará um declínio devido a menor disponibilidade e as limitações ambientais. As necessidades futuras precisam ser atendidas pela exploração de recursos não convencionais, o que pode levar ao aumento do preço dos derivados do petróleo. Assim, os preços instáveis, a rápida redução das reservas de combustíveis fósseis e a introdução de regulamentações mais rigorosas estão pressionando os pesquisadores a aumentar as alternativas para o uso de motores de combustão (CALIGIURI et al., 2019).

Os biocombustíveis são derivados de biomassa renovável e podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. São fontes de energia alternativa que apresentam baixo índice de emissão de poluentes. Com base na seleção das matérias-primas, os biocombustíveis são classificados de primeira a quarta geração. A biomassa das culturas alimentares foi a primeira a ser utilizada como substrato para a produção de biocombustíveis. Alternativamente, os resíduos ricos em lignocelulósicos conteúdo usado para a produção de biocombustíveis são denominados recursos de segunda geração (SARAVANAN et al., 2023).

2.2 Bioetanol lignocelulósico

O bioetanol a partir de matéria-prima lignocelulósica é uma alternativa promissora para substituir os combustíveis fósseis, o que possibilitará reduzir as emissões de gases de efeito estufa e limitar o aquecimento global. Sem competir com culturas alimentares, é uma opção interessante para substituir os combustíveis de transportes e pode ser produzido a partir de diferentes tipos de biomassa. Entre essas biomassas estão os resíduos florestais, agrícolas e industriais, as culturas energéticas e os resíduos sólidos urbanos (SILVA et al., 2018).

A biomassa lignocelulósica apresenta grande potencial como substrato para a produção de biocombustíveis, é renovável, abundante e não compete com fontes de alimento (Hong-Joo, et al., 2013). É uma fonte de açúcares fermentáveis não alimentares e causa impacto ambiental em caso de disposição inadequada, sendo que pode ser atenuada quando transformada em bioetanol (CARRILLO-NIEVES et al., 2019).

A produção de bioetanol envolve quatro etapas que inclui, o pré-tratamento da lignocelulose (que compreende a degradação da estrutura recalcitrante em frações de lignina, hemicelulose e celulose), seguido pela hidrólise enzimática da celulose para açúcares fermentáveis que posteriormente vai ser convertida em etanol por fermentação de leveduras e a destilação do bioetanol produzido (SILVELLO et al., 2019).

Diversas são as alternativas para a produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais, como a hidrólise e a fermentação separadas, a hidrólise e co-fermentação separadas, a sacarificação e fermentação simultâneas, a sacarificação e a co-fermentação simultâneas, a pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas e o bioprocessamento consolidado (JAYAKUMAR et al., 2023).

Uma grande quantidade, por exemplo, de pseudo-frutas de caju é processada anualmente para obter a castanha e mais de 80% dos pedúnculos são descartados como resíduos industriais. Esse resíduo passou a ser pesquisado para a produção de bioetanol através do processo de sacarificação e fermentação simultâneas com pré-tratamento ácido/alcalino (BARROS et al., 2017).

Os microrganismos são um fator crucial para a utilização da biomassa lignocelulósica na produção de bioetanol, particularmente para a utilização das hexoses (glicose) e pentoses (xilose) durante a fermentação. Uma vez que os microrganismos isolados bem conhecidos não são capazes de utilizar os dois tipos de açúcares (hexoses e pentoses), os microrganismos recombinantes têm sido desenvolvidos através da introdução de uma via metabólica nos microrganismos que são capazes de fermentar a xilose (ZABED et al., 2016).

Alguns pesquisadores implementaram uma estratégia que envolve tanto a seleção de cultivares quanto a engenharia genética de plantas para desenvolver genótipos de plantas projetados que tenham maior capacidade de desconstrução da parede celular. O foco inclui não só a compreensão da bioquímica de características específicas da biomassa vegetal, mas também os sistemas metabólicos e seus genes correspondentes e a regulação negativa de etapas específicas na biossíntese de lignina (MUPONDWA et al., 2017).

Anualmente, o mundo produz uma quantidade exponencial de resíduos alimentares, o que traz sérias implicações ambientais. Entre a enorme quantidade de resíduos, os lignocelulósicos, podem ser empregados como um recurso promissor de energia renovável (AHMED et al., 2020).

Resíduos de frutas são abundantes como resíduos em todo o planeta. Na verdade, produtos de valor agregado devem ser recuperados desses resíduos. Os resíduos de frutas contêm muitos açúcares e carboidratos que podem ser coletados e usados para produzir bioetanol (MISRA et al., 2022).

Na produção de suco de laranja, a fruta passa pelo processo de extração de suco e o resíduo sólido gerado (cerca de 50% do fruto), obtido após esmagamento, contém casca (60–65%), tecidos internos (30–35%) e sementes (0–10%) e possui altos níveis de açúcares solúveis, pectina, proteínas, hemiceluloses e fibras de celulose (CYPRIANO et al., 2018).

A disposição inadequada desse resíduo gera poluição ambiental, sendo necessário tratamento adicional, o que é oneroso para a indústria. Para minimizar esses problemas, as indústrias de sucos usam esse resíduo para produzir rações para gado, a fim de evitar seu descarte, ou ainda pode ser usado como material de cama de aves, mas esse processo não é lucrativo (CYPRIANO et al., 2018).

A valorização de resíduos requer conhecimento de sua composição química. No caso das frutas, os resíduos apresentam uma composição rica em carboidratos solúveis e insolúveis, por isso esse subproduto apresenta grande potencial para uso em produtos com alto valor agregado, obtidos por meio de hidrólise química ou enzimática e posterior conversão biológica (RIVAS et al., 2008).

Os açúcares solúveis presentes nas frutas, são glicose, frutose e sacarose. Os polissacarídeos insolúveis são compostos de pectina, celulose e hemicelulose. A pectina e a hemicelulose são ricas em ácido galacturônico, arabinose e galactose, e também contêm pequenas quantidades de xilose, ramnose e glicose (JAYAKUMAR et al., 2023).

Os resíduos de de frutas contêm cerca de 78% de umidade e o restante de sólidos, 22%, consiste em 18% de material orgânico composto de proteínas, celulose, hemicelulose, lignina, pectina e açúcares livres, como descrito na Tabela 1 (CYPRIANO et al., 2018).

Tabela 1: Composição química do resíduo de laranja em base seca.

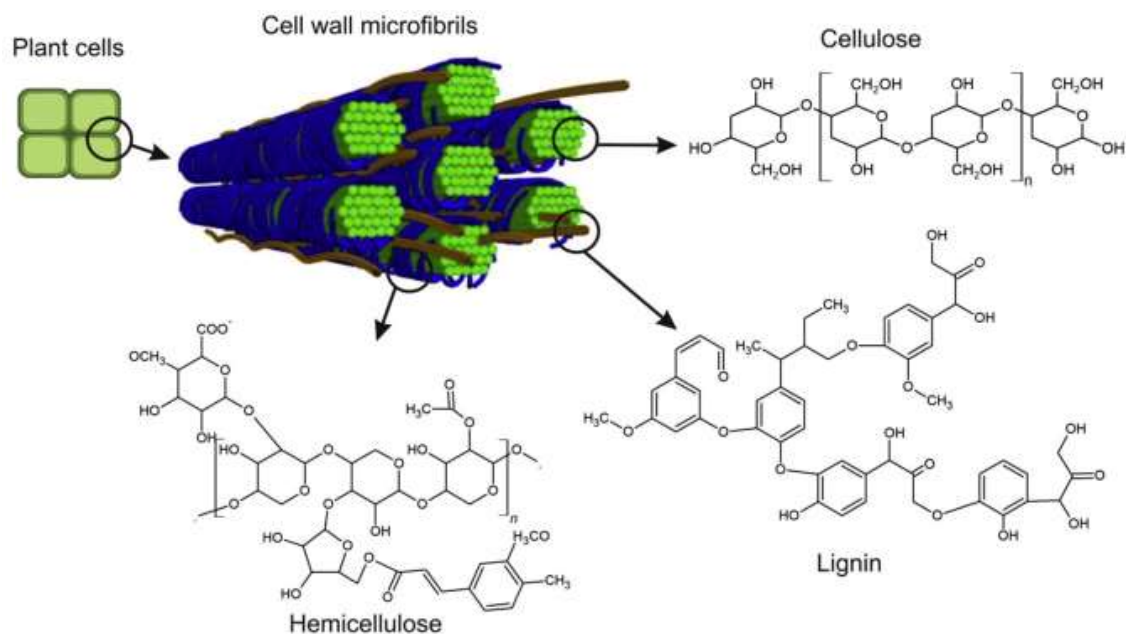
Composição	Concentração em base seca (%)
Proteína	19,78 ± 0,14
Celulose	19,73 ± 0,93
Hemicelulose	6,33 ± 0,14
Lignina	4,18 ± 0,69
Pectina	18,49 ± 1,74
Açúcares Livres	21,06 ± 1,93
Cinza (inorgânica)	3,39 ± 0,18
Outras	7,02 ± 1,38

Fonte: Adaptada de Cypriano et al., 2018.

2.2.1 Estrutura química da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica usada para a produção de bioetanol, por ser de origem vegetal, possui uma estrutura química, composta principalmente por paredes celulares, que fornecem força, resistência e formam o tecido lenhoso das plantas. A parede celular consiste principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, que são organizadas em uma estrutura complexa, como apresenta a Figura 2. As porcentagens típicas de peso seco são de 35 a 50% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e 5 a 30% de lignina, dependendo do tipo de biomassa, da fonte e até do tempo de colheita. Geralmente, os resíduos da cultura contêm mais hemicelulose e os resíduos lenhosos têm maior teor de lignina. Esses principais constituintes da biomassa existem como uma rede rígida intimamente associada, o que a torna recalcitrante à decomposição por enzimas e microrganismos (RAUD et al., 2019).

Figura 1: Estrutura química da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Raud et al (2019).

A celulose presente no material lignocelulósico é um polímero cristalino linear de β-D-glicose, com uma estrutura rígida difícil de ser quebrada, enquanto a hemicelulose é composta por heteropolímeros lineares e ramificados, com uma estrutura amorfa, mais propensa à hidrólise (TORRE et al., 2017).

O percentual de celulose, hemicelulose e lignina são variados entre diferentes materiais lignocelulósicos. Em geral, o conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina em materiais lignocelulósicos está na faixa de 30 a 60%, 20 a 40% e 15 a 25%, respectivamente (KOUAIE et al., 2019).

As cadeias de celulose lineares estão associadas entre si através de ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares para formar fibras de celulose longas e compactadas. Estas microfibras são estruturas altamente compactadas e altamente cristalinas, são insolúveis em água e altamente resistentes à despolimerização. Existem também algumas partes de celulose que são menos cristalinas - regiões amorfas. Essas áreas são menos resistentes à biodegradação e, assim, as enzimas são capazes de se ligar à celulose e iniciar o processo de hidrólise. A propriedade mais importante da biomassa lignocelulósica é o alto conteúdo de celulose ($C_6H_{10}O_5$), pois o bioetanol é produzido a partir da glicose formada durante a hidrólise da celulose, enquanto o baixo teor de lignina é preferido, pois os produtos de degradação da lignina e hemicelulose inibem a hidrólise da celulose a açúcares (RAUD et al., 2019).

O total de unidades de glicose em uma molécula de celulose varia de centenas a mais de 10.000, com um peso molecular médio de cerca de 100.000. Constitui cerca de 15 - 30% da massa seca da parede celular primária e até 40% da parede celular secundária nas células vegetais. As extensas ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose resultam em uma estrutura matricial cristalina e formam microfibrilas por meio de ligações cruzadas entre numerosos grupos hidroxila que tornam as moléculas de celulose mais rígidas. Esta estrutura específica de celulose a torna insolúvel em água e resistente à de-polimerização (ZABED et al., 2016).

Já a hemicelulose é um polímero heterogêneo aleatório e ramificado de diferentes polissacarídeos, incluindo pentoses (xilose e arabinose), hexoses (glicose, galactose e manose) e ácidos de açúcar. É responsável por 15 a 35% da biomassa vegetal. A natureza ramificada da hemicelulose permite que ela forme fortes ligações com celulose (ligações de hidrogênio) e lignina (ligações covalentes) que aumentam a rigidez geral do material lignocelulósico. A solubilidade da hemicelulose na água inicia a uma temperatura de aproximadamente 150 - 180°C (KOUPAIE et al., 2019).

Certos ácidos de açúcar, chamados ácidos urônicos, também podem estar presentes em uma molécula típica de hemiceluloses, como α -D-glicurônico, α -D-galacturônico e ácido α -D-4-O-metilgalacturônico. Às vezes outros açúcares, incluindo α -L-ramnose e α -L-frutose presente em pequena quantidade quando os grupos hidroxila de açúcares são parcialmente substituídos por grupos acetila. Sua cadeia principal é composta principalmente de xilana através de ligações $\beta \rightarrow 1, 4$ que incluem D - xilose (em torno de 90%) e L-arabinose (aproximadamente 10%). As hemiceluloses vulgarmente conhecidas são xilanas e glucomananas. Os xilanos são as hemiceluloses principais em madeiras de fibra curta, resíduos florestais, resíduos agrícolas e resíduos municipais e industriais, enquanto a fibra longa é tipicamente rica em glucomananas (ZABED et al., 2016).

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante em biomassa. Ao contrário da celulose, a hemicelulose não é quimicamente homogênea. Hemiceluloses $(C_5H_8O_4)_m$ são um grupo de polissacarídeos localizados em paredes celulares secundárias, que interagem com celulose e lignina. São biopolímeros amorfos ramificados heterogêneos de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e açúcares acetilados. Devido ao seu baixo peso molecular e estrutura ramificada com cadeias laterais curtas, as hemiceluloses são facilmente hidrolisadas. Se ligam a microfibras de celulose via ligações de hidrogênio, cobrindo-as e, assim, formam uma rede que fornece o esqueleto estrutural para a parede celular da planta. Esta cobertura de hemicelulose dificulta o acesso das fibras de celulose às enzimas,

necessárias para converter a biomassa em combustíveis. Para aumentar significativamente a digestibilidade da celulose e a eficiência de conversão, pelo menos 50% da hemicelulose deve ser removida com o pré-tratamento. Durante o processamento, os parâmetros de severidade como temperatura e tempo de retenção devem ser controlados para evitar a formação de produtos de degradação de hemicelulose, como furfurals e hidroximetil furfurals, que posteriormente inibem o processo de fermentação açúcares (RAUD et al., 2019).

A lignina é um complexo feito de unidades de fenilpropano ligadas por uma estrutura tridimensional. Os principais monômeros da lignina são o álcool p-hidroxifenílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico. A lignina atua como um cimento que une celulose e hemicelulose para formar a estrutura tridimensional rígida da parede celular da planta. Além disso, a lignina é insolúvel em água e é considerada um material inerte que se dissolve apenas em água a temperaturas elevadas (180 °C). Tais propriedades fazem da lignina o componente mais resistente da biomassa lignocelulósica para a degradação biológica e química (KOUAIE et al., 2019).

A lignina $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}]_n$ um heteropolímero aromático amorfo sintetizado a partir de unidades de fenilpropanoide, principalmente de siringilo, guaiacil e p-hidroxifenol, que são mantidas juntas por diferentes ligações e formam uma complexa matriz. A lignina forma uma rede tridimensional, na qual fibras de celulose e hemicelulose são embutidas e, portanto, a lignina é geralmente aceita como a 'cola' que une os diferentes componentes da biomassa lignocelulósica. Esta estrutura fornece suporte estrutural, reforço mecânico, impermeabilização e barreira à digestão enzimática para biomassa. Em comparação com a celulose e outros polissacarídeos estruturais, a lignina é mais resistente ao ataque biológico (RAUD et al., 2019).

2.2.2 Pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica

A utilização de celulose para produção de etanol, não só consome grande quantidade de enzimas, mas também resulta em baixo rendimento de digestibilidade enzimática. Portanto, é necessária alguma modificação estrutural do material lignocelulósico, efeito esse realizado pelos pré-tratamentos. E para selecionar uma tecnologia de pré-tratamento adequada, o reconhecimento dos principais fatores limitantes estruturais é uma etapa crítica. Esses fatores incluem a área de superfície específica, o índice de cristalinidade da celulose, o grau de polimerização, o revestimento de celulose por hemiceluloses, o teor de lignina e o conteúdo acetil (PAN et al., 2006).

O pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica é necessário para abrir sua superfície e destruir sua estrutura fibrosa, para o subsequente ataque enzimático ou de microrganismos. Vários processos de pré-tratamento são sugeridos, incluindo químicos, físicos, físico-químicos e biológicos (HONG-JOO et al., 2013).

Segundo Zabed et al. (2016) um método de pré-tratamento efetivo deve ter alguns critérios a serem usados na produção de etanol lignocelulósico:

a) Deve liberar celulose e hemicelulose do complexo lignocelulósico e alterar esses polímeros de carboidratos com alta digestibilidade para enzimas ou outros tratamentos aplicados nas etapas subsequentes para produzir açúcares fermentáveis;

b) Deve causar um dano mínimo de hemicelulose e celulose sob as condições de pré-tratamento, com uma recuperação máxima desses polissacarídeos;

c) Deve mostrar pouca ou nenhuma degradação de açúcares, perda de açúcares e produção de inibidores derivados do açúcar;

d) Deve gerar compostos tóxicos mínimos sob as condições de pré-tratamento;

e) Deve exigir uma redução mínima de tamanho da biomassa;

f) Deve ter capacidade de operar em tamanho razoável de lote e reatores de custo moderado;

g) Deve produzir um alto rendimento de biomassa pré-tratada com alta compatibilidade de fermentação;

h) Deve mostrar uma alta recuperação de lignina para produzir co-produtos valiosos;

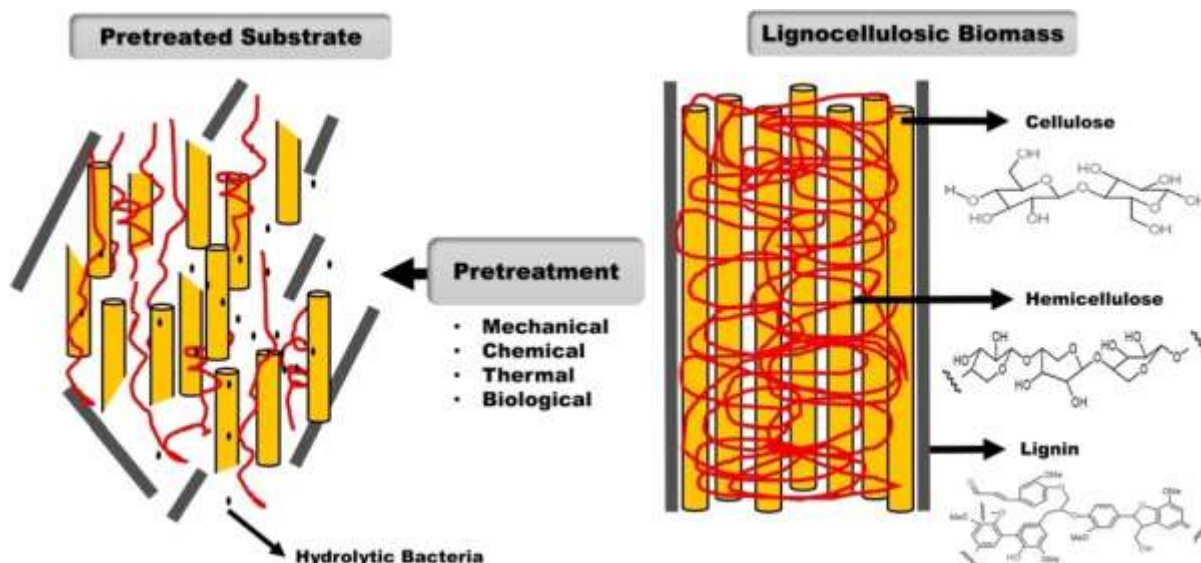
i) Deve exigir calor e energia mínimos para completar o processo;

j) Deve exigir baixo capital e custos operacionais.

A eficiência do pré-tratamento é grandemente influenciada pela natureza e composição da biomassa lignocelulósica. Portanto, é essencial que todo material lignocelulósico promissor para a produção de bioetanol, seja testado para obtenção do pré-tratamento mais eficaz e para a otimização de suas condições (GABHANE et al., 2014).

A etapa de pré-tratamento é essencial para melhorar a degradabilidade da biomassa e obter maior taxa de rendimento (Figura 3). Vários métodos de pré-tratamento já foram usados, incluindo pré-tratamento físico, térmico, químico e biológico. A seleção da técnica depende de múltiplos fatores, como a natureza do resíduo orgânico a ser tratado, o custo de capital e operacional do pré-tratamento, a facilidade da operação, entre outros (KOUAIE et al., 2019).

Figura 2: Efeito dos pré-tratamento em biomassa lignocelulósica



Fonte: Mosier, et al. (2005).

O pré-tratamento possui uma grande importância no processo, pois influencia grandemente a hidrólise, a liberação de açúcares, as concentrações e rendimentos do produto nos passos subsequentes. Um pré-tratamento efetivo deve ser focado na descristalização e despolimerização parcial da celulose; na despolimerização e solubilização de hemiceluloses; no aumento do tamanho do poro e do acesso à superfície; na minimização e na perda de açúcares incluindo as frações de pentose; na formação de componentes tóxicos (fenólicos, aldeídos), que inibem o crescimento de microrganismos; na formação de açúcares simples, de modo a atingir concentrações acima de 10% p/p; evitar a degradação ou perda de carboidratos; e possuir um custo viável (TORRE et al., 2017).

Cada método de pré-tratamento pode ser feito por diferentes técnicas que podem exercer diferentes efeitos sobre a biomassa lignocelulósica, como apresentado no Quadro 1 (ZABED et al., 2019).

Quadro 1: Métodos de pré-tratamento para biomassa lignocelulósica

Métodos	Especificações	Tempo	Efeitos	Vantagens	Desvantagens
Mecânico (Físico)	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-condicionamento de 10-50 mm • Forma de 10-30 mm • Moagem e trituração de 0,2 a 2 mm • Cominuição mecânica ao tamanho fino 	<ul style="list-style-type: none"> • Poucos minutos 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Diminuição da cristalinidade da celulose • Densidade do volume aprimorada • Melhor acessibilidade a enzimas • Aumento da porosidade • Propriedades de fluxo aprimoradas 	<ul style="list-style-type: none"> • Manuseio fácil • Maior massa e transferência de calor na hidrólise e fermentação • Alto rendimento de hidrólise 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta energia de entrada • Sem remoção de lignina • Economicamente inviável
Irradiação (físico)	<ul style="list-style-type: none"> • Irradiação gama • Irradiação feixe de elétrons • Irradiação de microondas • Tratamento ultrassônico 	<ul style="list-style-type: none"> • Minutos a horas 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Diminuição da cristalinidade da celulose • Solubilização de hemicelulose • Degradação parcial de lignina • Diminuição do peso molecular 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhora a taxa de hidrólise enzimática • Eficiência de alta energia 	<ul style="list-style-type: none"> • Caro • Taxa de alteração lenta • Não <i>eco-friendly</i>

<p>Ácido (químico)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-tratamentos com ácidos inorgânicos H_2SO_4, HCl, H_3PO_4, HNO_3 • Ácidos orgânicos (fumárico e maleico) • A concentração de ácido é inferior a 4% em ácido diluído e 70 a 77% em tratamentos com ácido concentrado • A temperatura varia de 130°C a 210°C em ácido diluído e 40°C a 100°C em tratamentos com ácido concentrado 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 a 90 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Remoção de Hemicelulose • Estrutura de lignina alterada • Digestibilidade aprimorada 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta taxa de reação • Técnicas bem estudadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa solubilização de lignina • Alta formação de inibidores • Corrosão de equipamento • Requisito de neutralização
<p>Alcalino (químico)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • $NaOH$, KOH e $Ca(OH)_2$ são amplamente utilizados para pré-tratamento alcalino 	<ul style="list-style-type: none"> • Vários minutos a horas 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Solubilização de hemicelulose • Degradação de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Requisito de baixa temperatura e pressão • Hidrólise a jusante melhorada • Bom para baixa biomassa contendo lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de reação longo • Dificuldades na neutralização
<p>Ozonólise (química)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição de biomassa ao gás ozônio 	<ul style="list-style-type: none"> • 15 a 90 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilização seletiva de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa formação de inibidores • Temperatura ambiente e pressão atmosférica 	<ul style="list-style-type: none"> • Custos elevados para produção e utilização de ozono no local • Questões de segurança para inflamabilidade e toxicidade do ozônio

Líquidos iônicos ILS (químico)	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição de biomassa a ILS que são líquidos à temperatura ambiente e permanecem líquidos até uma • Certa faixa de temperaturas de até 100 ° C 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 a 60 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície ampliada • Solubilização de hemicelulose e celulose • Remoção de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • As ILS são recicláveis e reutilizáveis • Baixo consumo • Alta carga de biomassa 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo elevado de ILS • Requisito de recuperação de IL
Organosolventes (químico)	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição de biomassa a uma mistura de líquido orgânico e água na proporção de 1:1 • O ácido mineral pode ser usado como catalisador para diminuir a temperatura do processo ou melhorar a remoção de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Solubilização de hemicelulose e lignina • Remoção de celulose da biomassa na forma sólida 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa temperatura e pressão • Condição de pH neutro baixa perda de celulose • Rendimento de celulose pura • Eficaz para alta biomassa contendo lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Precisa remover solventes • Altos custos • Geração de inibidor
Explosão a vapor (físico-química)	<ul style="list-style-type: none"> • Inclui auto-hidrólise e um passo de explosão • Aquecimento rápido por vapor saturado de alta pressão a 160–260 ° C e 5–50 atm • Pode ser feito com ou sem adição de um ácido como catalisador. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cerca de 5 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Solubilização de hemicelulose • Solubilização de lignina • Alteração da estrutura da lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem custos de reciclagem ou ambientais • Curta duração • Exigência de baixa energia 	<ul style="list-style-type: none"> • Perda de açúcar durante o processo pós hidrólise • Formação de inibidores

Água quente líquida (físico-química)	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de água como meio de reação em altas temperaturas (180–220 ° C) e pressão. 	<ul style="list-style-type: none"> • 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Solubilização de hemicelulose • Solubilização de lignina 	<ul style="list-style-type: none"> • Nenhuma exigência de catalisadores ou produtos químicos • Nenhuma ou pouca formação de inibidores • Alta recuperação de açúcar 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta exigência de água • Alta energia de entrada • Altos custos • Baixo rendimento de açúcares fermentáveis
Oxidação úmida (físico-química)	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição de biomassa a altas temperaturas (140–210 ° C) e pressão (até 20.0 MPa) usando oxigênio ou ar. 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 a 120 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície estendida • Decomposição de lignina • Cristalização reduzida da celulose 	<ul style="list-style-type: none"> • Custos de capital moderado • Boa remoção de lignina • Boa recuperação de carboidratos • Melhor digestibilidade enzimática 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta energia de entrada • Recuperação de hemicelulose baixa • Requisitos de materiais caro para reator
Fluido supercrítico (físico-químico)	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de solvente na temperatura e pressão acima do ponto crítico • O pré-tratamento com CO₂ supercrítico é amplamente utilizado por sua temperatura e pressão críticas moderadas 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superfície aumentada • Remoção efetiva de lignina • Maior digestibilidade da celulose 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta carga sólida • Temperatura baixa • Baixa degradação do açúcar • Custos operacionais mínimos 	<ul style="list-style-type: none"> • Custos totais de serviços públicos são maiores • A saída é afetada por alguns fatores

Explosão de fibras de amônia (AFEX) (físico-química)	<ul style="list-style-type: none"> Exposição de biomassa a amônia líquida a 60–120 ° C e pressão de mais de 3 MPa por aproximadamente 30 min, que então segue uma descompressão rápida 	<ul style="list-style-type: none"> 30 a 60 minutos 	<ul style="list-style-type: none"> Área de superfície estendida Solubilização de celulose e hemicelulose Remoção de lignina e estrutura de lignina alterada 	<ul style="list-style-type: none"> Muito eficaz para baixa biomassa contendo lignina 	<ul style="list-style-type: none"> Custos elevados de amônia e equipamentos
Pré-tratamento biológico	<ul style="list-style-type: none"> Cultivo de fungos e bactérias degradantes de lignina em biomassa na temperatura ótima e condições culturais dos respectivos microrganismos 	<ul style="list-style-type: none"> 4 a 8 semanas 	<ul style="list-style-type: none"> Deslignificação de biomassa Alteração da estrutura de celulose e hemicelulose 	<ul style="list-style-type: none"> Baixo custo Eco-friendly Nenhuma liberação de compostos tóxicos Sem geração de efluentes Sem formação de inibidores 	<ul style="list-style-type: none"> Longo tempo de incubação Taxa lenta de deslignificação

Fonte: Adaptado de Zabed et al. (2019).

Os pré-tratamentos utilizados para romper estruturas e facilitar o acesso aos açúcares de interesse à fermentação, podem ser aplicados individualmente ou combinados entre si, para aumentar a eficiência do processo.

2.2.2.1 Métodos físicos

Métodos físicos de pré-tratamento podem ser usados para romper a estrutura da biomassa lignocelulósica por força física, reduzindo o tamanho das partículas, quebrando o material particulado e aumentando a área de superfície disponível para o ataque dos microrganismos (KOUPIAIE et al., 2019). Também diminuem o grau de polimerização da celulose e sua cristalinidade, a hidrólise das hemiceluloses e a despolimerização parcial da lignina, porém são caros e geralmente não podem ser usados em um processo de grande escala (ZABED et al., 2016).

A extração é uma operação unitária importante no isolamento de compostos bioativos (pigmentos, polifenóis e pectinas) nas fontes vegetais, como a extração ultrassônica

que possibilitou a remoção de pectina em figueiras-da-índia, caracterizando um tratamento físico (BAYAR et al., 2017). As ondas ultrassônicas destruíram a parede celular criando cavitações que aumentaram o contato entre o solvente e os materiais vegetais e conseqüentemente melhoraram a transferência de massa e o rendimento de pectina (MOORTHY et al., 2017).

2.2.2.2 Métodos químicos

O pré-tratamento químico se dá com o uso de substâncias como ácidos, bases e líquidos iônicos para alterar as características químicas e físicas das lignoceluloses. O pré-tratamento químico é frequentemente usado para modificar ou remover a lignina e hemicelulose, bem como reduzir a cristalinidade da celulose. Apesar da eficácia, estes métodos possuem alto custo (KOUPAIE et al., 2019).

O pré-tratamento ácido e o pré-tratamento alcalino, são considerados uma das tecnologias mais usadas de tratamentos químicos. O pré-tratamento com ácido solubiliza a fração hemicelulósica da biomassa e aumenta a acessibilidade da celulose às enzimas. Outro benefício do pré-tratamento com ácido é a possibilidade de utilizar açúcares hemicelulósicos. Os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para a solubilização de lignina (BARROS et al., 2017). Ácidos como H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 e HNO_3 são utilizados durante o pré-tratamento ácido da biomassa. Entre esses produtos químicos, o H_2SO_4 é o ácido mais comumente usado, enquanto o $NaOH$ é o principal álcali. O pré-tratamento ácido é aplicado para solubilizar a fração hemicelulósica na biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas. Ácidos orgânicos como os ácidos fumárico ou maleico também são usados como ácidos alternativos que aumentam a hidrólise da celulose e reduzem a produção de inibidores (ZABED et al., 2016).

2.2.2.3 Métodos biológicos

O pré-tratamento biológico é uma alternativa sustentável, já que usa microrganismos ou suas enzimas. As principais vantagens do tratamento biológico são o baixo consumo de energia, as condições simples de operação, a formação mínima de inibidores, os baixos custos de processamento e não há necessidade de reciclar os produtos químicos após o pré-tratamento (ZABED et al., 2019).

O pré-tratamento biológico depende de bactérias, fungos e enzimas para degradar a biomassa. A lignina e a hemicelulose são as mais vulneráveis aos ataques. É frequentemente conhecido como uma tecnologia simples, barata e ecológica. Isto se deve ao fato de não requererem altos aportes de energia ou adição de produtos químicos. O conceito fundamental do pré-tratamento biológico é melhorar a biodegradabilidade de lignoceluloses (KOUAIE et al., 2019).

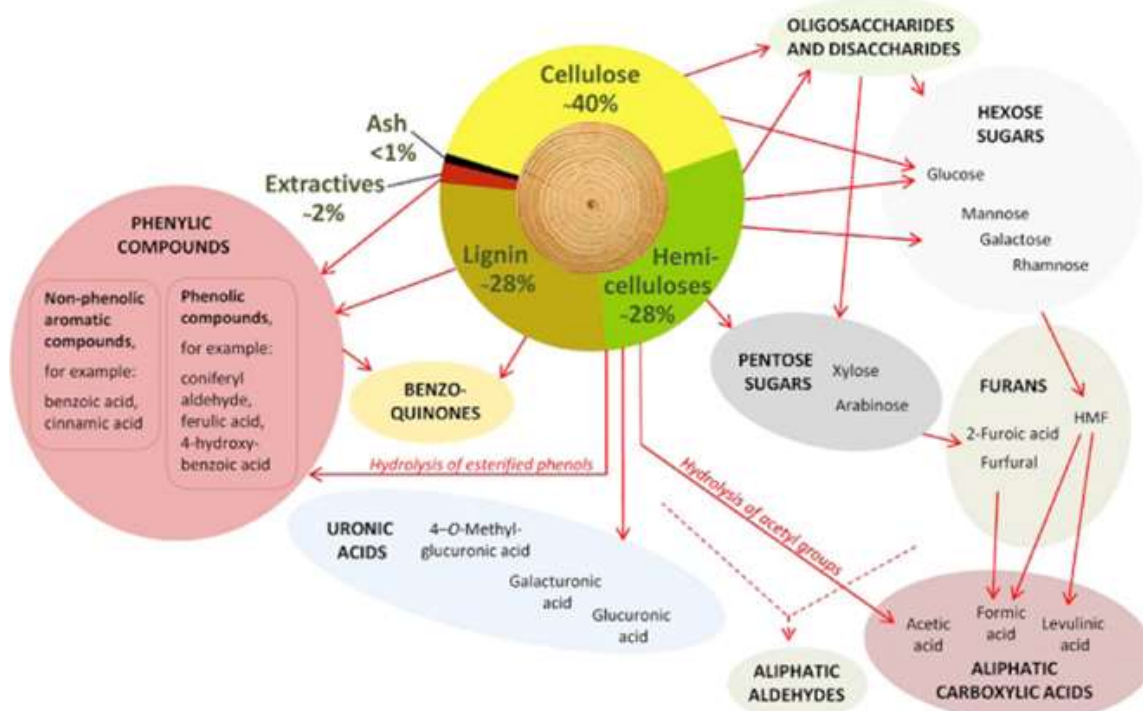
O pré-tratamento enzimático apresenta potencial para melhorar o processo de pré-tratamento, ele envolve enzimas oxidativas e hidrolíticas, produzidas pelas bactérias e fungos, o tempo de reação é relativamente curto, necessita de baixa nutrição para as reações e também devido ao fato de que a maioria das enzimas não é afetada pela presença de inibidores (KOUAIE et al., 2019). A hidrólise enzimática é vantajosa em relação a outros processos físico-químicos porque as enzimas catalisam apenas reações específicas, não ocorrendo nenhuma reação colateral, nem a formação de subprodutos. Com isso tem o potencial de atingir maior rendimento de açúcares (MUKHOPADHYAY et al., 2011).

2.2.2.4 Geração de subprodutos

A maioria dos pré-tratamentos induz inibidores de fermentação que são produtos de degradação de açúcares e lignina que podem ter um potencial efeito inibitório sobre microrganismos durante a fermentação. São conhecidos como ácidos alifáticos (acético, fórmico e levulínico), furaldeídos (furfural e 5-hydroximetilfurfural), compostos aromáticos (fenólicos) e extrativos. O alto teor de óleo essencial, composto principalmente de d-limoneno, um antioxidante bem conhecido, também pode causar a inibição da atividade biológica (HONG-JOO et al., 2013; CALABRÒ et al., 2018).

Os subprodutos produzidos durante os pré-tratamentos incluem açúcares ácidos, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, hidroximetilfurfural e furfural. A maioria dos inibidores derivados da lignocelulose são produzidos quando as hemiceluloses e a lignina se degradam, enquanto que a celulose e os extrativos da biomassa podem ser a fonte de inibidores afetados involuntariamente pelas condições de pré-tratamento. Com base em sua origem, podem ser classificados em três grupos principais, que são os ácidos alifáticos, os derivados de furano e os compostos fenólicos, conforme Figura 4 (ZABED et al., 2016).

Figura 3: Inibidores gerados a partir da degradação da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Zabed et al. (2016).

Existem estratégias para neutralizar os problemas com inibidores, no entanto, o tipo e a quantidade de inibidores formados dependem dos métodos de pré-tratamento aplicados. Isso deve ser levado em consideração antes de selecionar um método de desintoxicação. A desintoxicação pode ser essencial se ocorrer a inibição do posterior processo fermentativo. Os métodos de desintoxicação devem remover seletivamente os inibidores e ser barato e fácil de integrá-los ao processo (ZABED et al., 2016).

Algumas estratégias para reduzir a formação de inibidores estão baseadas na seleção da biomassa com menor recalcitrância, no uso de inóculos de tamanho grande, na triagem de microrganismos de ambientes naturais, no uso de microrganismos resistentes a ácidos fenólicos, furfurais e carboxílicos, na extração de fluido supercrítico, no uso de tratamento térmico, no uso de carvão ativado, entre outros (ZABED et al., 2016).

2.2.3 Hidrólise ou sacarificação

Os resultados do processo de pré-tratamento são os sólidos insolúveis em água contendo celulose e lignina e uma fração líquida contendo hemicelulose. No pré-tratamento a hemicelulose pode ser hidrolisada em açúcares monoméricos e na fermentação convertida em etanol, sem necessitar do processo de hidrólise, ou convertida em oligossacarídeos e sofrer

despolimerização incompleta e necessitar de hidrólise adicional antes de ser submetido à fermentação. A celulose e a hemicelulose presentes na biomassa lignocelulósica são convertidas em açúcares fermentáveis através do processo de hidrólise. (ZABED et al., 2019).

Os açúcares dominantes nas hemiceluloses são manoses e xiloses e uma pequena quantidade de arabinose e galactose. Mesmo que uma pequena porção de celulose também possa ser convertida em glicose no pré-tratamento, a maior parte desse carboidrato permanece sem reação, e requer uma hidrólise adicional, mas em geral, a conversão da hemicelulose e da celulose em açúcares monoméricos requer hidrólise ácida ou enzimática (ZABED et al., 2016).

A hidrólise envolve a despolimerização da celulose em glicose, que é subsequentemente utilizado para fermentação em etanol juntamente com outros açúcares liberados da hidrólise de hemiceluloses durante o passo de pré-tratamento. Este passo basicamente desconstrói celulose e hemicelulose em monômeros, seguido por uma etapa de fermentação para converter monômeros em etanol celulósico (MUPONDWA et al., 2017).

Devido à presença de cinco açúcares (glucose, galactose, manose, xilose, arabinose) contidos na biomassa lignocelulósica, o passo de hidrólise é mais complicado em comparação com o amido que envolve um único açúcar (glicose). Assim, em termos de economia da biorrefinaria de etanol celulósico, resulta em custos de capital e complexidade de processo mais altos em relação às usinas de bioetanol de primeira geração, baseadas em açúcar e amido (MUPONDWA et al., 2017).

A hidrólise ácida pode ocorrer com ácidos diluídos a altas temperaturas e pressões, com um curto tempo de reação ou com tratamentos ácidos concentrados a baixas temperaturas. Os principais problemas com a hidrólise ácida são a recuperação ou a neutralização dos ácidos antes da fermentação. O ácido sulfúrico (H_2SO_4) é o mais usado, entre outros ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), ácidos trifluoracéticos (TFA), ácido fosfórico (H_3PO_4). A hidrólise ácida diluída é geralmente aplicada com a finalidade de hidrólise da hemicelulose e como pré-tratamento da celulose para torná-la mais acessível às enzimas. A hidrólise ácida concentrada pode ser aplicada para despolimerizar a hemicelulose e a celulose (ZABED et al., 2016).

A hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica é realizada por enzimas secretadas por microrganismos durante seu crescimento ou por enzimas comercialmente disponíveis. A hidrólise enzimática é eficaz devido à especificidade da enzima para o substrato, trabalhando a temperaturas baixas e gerando o mínimo de inibidores (ZABED et al., 2016).

A rota enzimática tem recebido grande atenção como alternativa tecnológica para a hidrólise na produção de etanol de segunda geração, devido à condição de operação leve e

mínima formação de compostos degradadores. Enzimas celulolíticas, por exemplo, possuem capacidade de hidrolisar a celulose da biomassa do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol (SILVA et al., 2015).

2.2.4 Fermentação

Após os pré-tratamentos e a hidrólise da biomassa lignocelulósica, os açúcares simples são produzidos como resultado da despolimerização de celulose e hemicelulose, que passam então para a fermentação de microrganismos e são convertidos em etanol. A fermentação para a produção de etanol geralmente é feita por fermentação submersa (ZABED et al., 2016).

A biomassa lignocelulósica consiste de hexoses (açúcares carbono C₆ de glucose, manose e galactose) e pentoses (C₅ açúcares carbono xilose e arabinose). Os açúcares primários da biomassa lignocelulósica são a glicose da celulose e a xilose da hemicelulose, além de pequenas quantidades de arabinose, galactose, manose e ácido galacturônico, que também são liberados durante os pré-tratamentos e a hidrólise. O processo de fermentação envolve a conversão desses açúcares em etanol e co-produtos usando microrganismos. Para a bioconversão lignocelulósica requer-se microrganismos que podem fermentar os açúcares hexose e pentose ao mesmo tempo, sem a formação de produtos inibidores tóxicos (MUPONDWA et al., 2017 e WANG et al., 2019).

A *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo fermentativo mais comum para a indústria de alimentos e para conversão de açúcares em etanol, mas não tem a capacidade de fermentar pentoses, como a xilose. Microrganismos que naturalmente fermentam tanto hexoses quanto pentoses também preferem glicose sobre xilose e outros açúcares. Na busca do microrganismo ideal, estão sendo desenvolvidas cepas de leveduras recombinantes e até mesmo geneticamente modificadas, que co-fermentam tanto hexoses quanto pentoses, o que torna promissor o futuro do bioetanol (WANG et al., 2019).

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. BAKAR, M. S. A, R. HAMDANI, Y. PARK, K. LAM, S. S. SUKRI, S. S. HUSSAIN, M. MAJEED, M. PHUSUNTI, M. JAMIL, F. ASLAM, M.
Valorização da biomassa residual subutilizada de espécies invasoras para produzir biocarvão para energia e outras aplicações de valor agregado. *Ambiente*. V. 186, p. 109596, 2020.
- BARROS, E. M.; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 307, p. 939-947, 2017.
- BAYAR, N.; BOUALLEGUE, T.; ACHOUR, M.; KRIAA, M.; BOUGATEF, A.; KAMMOUN, R. Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food chemistry*, v. 235, p. 275-282, 2017.
- BAZOTI, S. F. GOLUNSKI, S. SIQUEIRA, D. P. SCAPINI, T. BARRILLI, E. T. MAYER, D. A. VALÉRIO, A. OLIVEIRA, D. TREICHEL, H. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresource technology*, v. 244, p. 582-587, 2017.
- BOUKROUFA, M. BOUTEKEDJIRET, C. PETIGNY, L. RAKOTOMANOMANA, N. CHEMAT, F. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 24, p. 72-79, 2015.
- CALABRÒ, P. S. PAONE, E. KOMILIS, D. Strategies for the sustainable management of orange peel waste through anaerobic digestion. *Journal of environmental management*, v. 212, p. 462-468, 2018.
- CARRILLO-NIEVES, D. ALANÍS, M. J. R. CRUZ- QUIROZ, R. RUIZ, H. A. IQBAL, H. M. PARRA-SALDIVAR, R. Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 102, p. 63-74, 2019.
- CHEN, X. LUO, Y. QI, B. LUO, J. WAN, Y. Improving the hydrolysis efficiency of soy sauce residue using ultrasonic probe-assisted enzymolysis technology. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 35, p. 351-358, 2017.
- CIRIMINNA, R. SCURRIA, A. DANZÌ, C. TIMPANARO, G. STEFANO, V. AVELLONE, G. PAGLIARO, M. Fragrant bioethanol: A valued bioproduct from orange juice and essential oil extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 9, p. 42-45, 2018.
- CORREIA, J. A. C. MARQUES JÚNIOR, J. E. GONÇALVES, L. R. B. ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. *Bioresource Technology*, v. 139, p. 249-256, 2013.

CYPRIANO, D. Z. SILVA, L. L. TASIC, L. High value-added products from the orange juice industry waste. *Waste management*, v. 79, p. 71-78, 2018.

HSU, T. C. GUO, G. L. CHEN, W. H. HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, v. 101, p. 4907-4913, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para a análise de alimentos. 4^a ed. São Paulo, 2008.

JAHNAVI, G. PRASHANTHI, G. S. SRAVANTHI, K. RAO, L. V. Status of availability of lignocellulosic feed stocks in India: biotechnological strategies involved in the production of bioethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 798-820, 2017.

JAYAKUMAR, P. A., TOKUMA, G., GINDABA, A., BIZUNEH, K., GEBEYEHU, B., SELVAKUMAR PERIYASAMY C, ABDISA JABESA A, GURUNATHAN BASKAR D, BEULA ISABEL JOHN E, ARIVALAGAN PUGAZHENDHI F G. Bioethanol production from agricultural residues as lignocellulosic biomass feedstock's waste valorization approach: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, v. 879, p. 163158, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163158>

KAPARAJU, P. FELBY, C. Lignin characterization during oxidative and hydrothermal processes of wheat straw and corn straw pretreatment. *Bioresource technology*, v. p. 3175-3181, 2010.

KOUPAIE, E. H. DAHADHA, S. LAKEH, A. B. AZIZI, A. ELBESHBISHY, E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of environmental management*, v. 233, p. 774-784, 2019.

LANDAETA, R. AROCA, G. ACEVEDO, F. TEIXEIRA, J. A. MUSSATTO, S. I. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Applied energy*, v. 102, p. 124-130, 2013.

LI, C. KNIERIM, B. MANISSERI, C. ARORA, R. SCHELLER, H. V. AUER, M. Singh, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, v. 101, p. 4900-4906, 2010.

KRISHNA MISRA, MANSI RATHORE, JANVAHI TICKOO, ABHISHEK KUMAR SINGH. Produção de bioetanol a partir de resíduos de frutas. V. 68, p. 1167-117, 2022.
Journal Materials Today: Proceedings

MOHAPATRA, S. MISHRA, C. BEHERA, S. S. THATOI, H. Application of pretreatment fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 78, p. 1007-1032, 2017.

MOOD, S. H. GOLFESHAN, A. H. TABATABAEI, M. JOUZANI, G. S. NAJAFI, G. H. GHOLAMI, M. ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77-93, 2013.

- MOORTHY, I. G. MARAN, J. P. ILAKYA, S. ANITHA, S. L. SABARIMA, S. P. PRIYA, B. Ultrasound assisted extraction of pectin from waste *Artocarpus heterophyllus* fruit peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 525-530, 2017.
- MOSIER, N. HENDRICKSON, R. HO, N. SEDLAK, M. LADISCH, M. R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, v. 96, p. 1986-1993, 2005.
- MUKHOPADHYAY, M. KUILA, A. TULI, D. K. BANERJEE, R. Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. *Biomass and bioenergy*, v. 35, p. 3584-3591, 2011.
- MUPONDWA, E. LI, X. TABIL, L. SOKHANSANJ, S. ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 79, p. 1535-1555, 2017.
- OZTURK, B. WINTERBURN, J. GONZALEZ-MIQUEL, M. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering Journal*, v. 151, p. 107-298, 2019.
- PALMQVIST, E. HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource technology*, v. 74, p. 17-24, 2000.
- PAN, X. GILKES, N. SADDLER, J. N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Holzforschung*, v. 60, p. 398-401, 2006.
- POURBAFRANI, M. FORGÁCS, G. HORVÁTH, I. S. NIKLASSON, C. TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource technology*, v. 101, p. 4246-4250, 2010.
- RAUD, M. KIKAS, T. SIPPULA, O. SHURPALI, N. J. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 111, p. 44-56, 2019.
- REZENDE, C. A. LIMA, M. A. MAZIERO, P. AZEVEDO, E. R. GARCIA, W. POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process to improve enzymatic digestibility. *Biotechnol for biocombustíveis*, v. 4, p. 1-18, 2011.
- REZZADORI, K. BENEDETTI, S. AMANTE, E. R. Proposals for the residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food and bioproducts processing*, v. 90, p. 606-614, 2012.
- RIVAS, B. TORRADO, A. TORRE, P. CONVERTI, A. DOMÍNGUEZ, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2380-2387, 2008.

SANCHEZ, A. HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, P. PUENTE, R. Hydration of lignocellulosic biomass. Modelling and experimental validation. *Industrial Crops and Products*, v. 131, p. 70-77, 2019.

A. SARAVANAN A, R P YAASHIKAA A, P. SENTHIL KUMAR B C, AS VICKRAM A, S. KARISHMA A, R. KAMALESH A, GAYATHRI RANGASAMY. Perspectivas de sustentabilidade técnico-econômica e ambiental na conversão bioquímica de biomassa agrícola e de algas em biocombustíveis. *Journal of Cleaner Production*. V. 414, p. 137749, 2023.

SILVA, A. R. G. ERRICO, M. RONG, B. G. Systematic procedure and framework for synthesis and evaluation of bioethanol production processes from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology Reports*, v. 4, p. 29-39, 2018.

SILVA, J. R. CANTELLI, K. C. SOARES, M. B. TRES, M. V. OLIVEIRA, D. MEIRELES, M. A. A. MAZUTTI, M. A. Enzymatic hydrolysis of non-treated sugarcane bagasse using pressurized liquefied petroleum gas with and without ultrasound assistance. *Renewable Energy*, v. 83, p. 674-679, 2015.

SILVELLO, M. A. C. MARTÍNEZ, J. GOLDBECK, R. Increase of reducing sugars release by enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse intensified by ultrasonic treatment. *Biomass and Bioenergy*, v. 122, p. 481-489, 2019.

SPYRIDON, A. EUVERINK, W. JAN, G. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 19, p. 44-53, 2016.

TAHERZADEH, M. KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

THAMMASITTIRONG, S. N. R. CHATWACHIRAWONG, P. CHAMDUANG, T. THAMMASITTIRONG, A. Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. *Industrial crops and products*, v. 108, p. 598-603, 2017.

TEDESCO, M. J. GIANELLO, C. BISSANI, C. A. BOHNEN, H. VOKWEISS, S.J. Análise de solo plantas e outros materiais. Porto Alegre. P. 106, 1995.

TORRE, I. RAVELO, M. SEGARRA, S. TORTAJADA, M. SANTOS, V. E. LADERO, M. Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresource technology*, v. 245, p. 906-915, 2017.

USDA. Unidet State department of agriculture. Disponível em: <https://www.usda.gov>. Acesso em 10/06/2019.

WANG, L. YORK, S. W. INGRAM, L. O. SHANMUGAM, K. T. Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, v. 273, p. 269-276, 2019.

WILKINS, M. R. WIDMER, W. W. CAMERO, R. G. GROHMANN, K. Effect of seasonal variation on enzymatic hydrolysis of Valencia orange peel waste. In Proc. Fla. State Hort. Soc, v. 118, p. 419-422, 2005.

XU, J. CHENG, J. J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. Bioresource technology, v. 102, p. 3861-3868, 2011.

ZABED, H. M. AKTER, S. YUN, J. ZHANG, G. AWAD, F. N. QI, X. SAHU, J. N. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 105, p. 105-128, 2019

ZABED, H. SAHU, J. N. BOYCE, A. N. FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 66, p. 751-774, 2016.

3 CAPÍTULO I - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

RESÍDUOS DE LARANJA PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL UTILIZANDO TECNOLOGIAS ATUAIS

Danúbia Paula Cadore Favaretto^{1*} and Vandr e Barbosa Bri o¹

¹ Universidade de Passo Fundo, Campus I, km 171, BR 285, P. O. Box 611. 99001-970, Passo Fundo. Rio Grande do Sul. Brasil.

*E-mail: danubiafcp@hotmail.com

RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos são uma matéria-prima com potencial para atender a demanda por combustíveis mais disponíveis e menos poluentes. Esta pesquisa utilizou resíduos da indústria de suco de laranja para produzir bioetanol. Este resíduo   quimicamente complexo, mas biodegradável e cont m uma grande variedade de compostos, incluindo a c ares fermentáveis, proporcionando uma oportunidade para a produ o de bioetanol de segunda gera o. Por possuir uma estrutura complexa, formada por celulose, hemicelulose e lignina, essa biomassa precisou de pré-tratamentos eficazes para quebrar sua estrutura, de forma a permitir o acesso aos a c ares que serão utilizados posteriormente pelos microrganismos no processo de fermenta o. Os pré-tratamentos utilizados foram físicos, químicos e enzimáticos, ou seja, autoclavagem, banho termostatzado, agita o orbital, testados com H₂SO₄, NaOH e H₂O₂, além de sonda ultrassônica e hidrólise enzimática. Os resultados obtidos foram positivos para as concentra es de a c ares redutores (AR), chegando a 69,17 mg/mL no pré-tratamento com autoclavagem e ácido sulfúrico (H₂SO₄) e 61,12 mg/mL na etapa de hidrólise enzimática.

Highlights

- Matéria prima alternative para produ o de bioethanol;
- Um destino mais nobre para os resíduos de frutas;
- Pré-tratamentos parabiomassas lignocelulósicas.

Palavras-chave: Biocombustíveis, resíduos, matéria prima, reúso e valora o.

3.1 Introdu o

A produ o de bioetanol como alternativa   substitui o de combustíveis fósseis pode ser realizada a partir de diferentes matérias-primas. Além das matérias-primas de primeira gera o, produzidas a partir de fontes alimentares, como cana-de-a car, milho e beterraba, existem as matérias-primas de segunda gera o, compostas por materiais lignocelulósicos, que geralmente são resíduos vegetais e vêm para compor o etanol de segunda gera o [1].

A laranja é consumida mundialmente e sua produção chega a mais de 70 milhões de toneladas anualmente em todo o mundo. No processamento do suco de laranja, cerca de 50% do peso total da fruta são resíduos (cascas, polpa, sementes, folhas e laranjas de má qualidade) [2]. As características físico-químicas desses resíduos, como pH ácido, alto teor de água e presença de óleo essencial, tornam seu gerenciamento problemático, assim, grande parte desses resíduos é espalhada no solo, descartada em aterros sanitários ou mesmo incinerada, e estes métodos de manejo podem afetar o solo e as águas superficiais [3, 4].

Essa biomassa de resíduo de laranja possui altas quantidades de polissacarídeos e grande quantidade de açúcares livres, como glicose e frutose, sendo uma biomassa promissora para a produção de bioetanol [5]. Além do limoneno e da pectina, diversos polímeros de carboidratos, como celulose, hemiceluloses e lignina, são outros componentes dos resíduos da laranja com potencial para a produção de biocombustíveis, como o etanol e o biogás [6, 7].

No entanto, para quebrar as estruturas lignocelulósicas dos resíduos de laranja, são necessários pré-tratamentos. Eles podem ser físicos, químicos e biológicos e têm a capacidade de fracionar lignocelulose, solubilizar hemicelulose e reduzir a cristalinidade da celulose, melhorando a acessibilidade a polissacarídeos e monômeros de açúcar [8].

O pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica é necessário para abrir sua superfície e destruir sua estrutura fibrosa, para posterior ataque enzimático ou microbiano. Vários processos de pré-tratamento são sugeridos, incluindo químicos, físicos, físico-químicos e biológicos [9].

O objetivo dos pré-tratamentos físicos é reduzir o tamanho das partículas e aumentar a área superficial sem a formação de produtos tóxicos durante o processo. Estes incluem pré-tratamentos mecânicos, como moagem, britagem, lascamento, congelamento e extrusão, que podem ser úmidos, secos, compressão, atrito, criogênicos, pirólise e explosão de vapor. Também inclui radiação como micro-ondas, radiação gama, irradiação por feixe de elétrons e ondas ultrassônicas [34].

O pré-tratamento químico refere-se ao uso de ácidos, como H_2SO_4 , $HClO_4$, CH_3COOH , $HCOOH$, HNO_3 , H_3PO_4 , ácido maleico, entre outros, bem como o uso de álcalis, líquidos iônicos ou sais, principalmente $NaOH$. Alguns avanços recentes no pré-tratamento químico incluem o uso de líquidos iônicos (chamados de solventes verdes) e solventes eutéticos profundos. Isso aumenta o custo-benefício do processo e os torna uma boa escolha como agente de pré-tratamento [35].

O pré-tratamento enzimático da biomassa lignocelulósica inclui o uso de enzimas, que permitem a degradação das fibras lignocelulósica [35]. Enzimas bacterianas também foram

usadas recentemente para degradar a lignina. Eles podem converter eficientemente compostos de degradação de lignina ou lignina modificada [37].

Após os pré-tratamentos, açúcares simples são produzidos como resultado da despolimerização de celulose e hemicelulose, que podem então ser convertidos em bioetanol por meio da fermentação de microrganismos [8].

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os principais pré-tratamentos químicos, físicos e enzimáticos em biomassa lignocelulósica de resíduos de laranja para obtenção de açúcares redutores, visando a produção de bioetanol.

3.2 Material e Métodos

O resíduo de laranja foi coletado em uma indústria de sucos localizada na cidade de Bento Gonçalves/RS. A indústria extrai o suco de laranja e extrai também o óleo essencial, ambos para venda, sendo descartado o resíduo (casca, bagaço e semente), o qual foi adquirido para esta pesquisa, passando pelas etapas de pré-tratamento apresentadas no fluxograma da Figura 1.

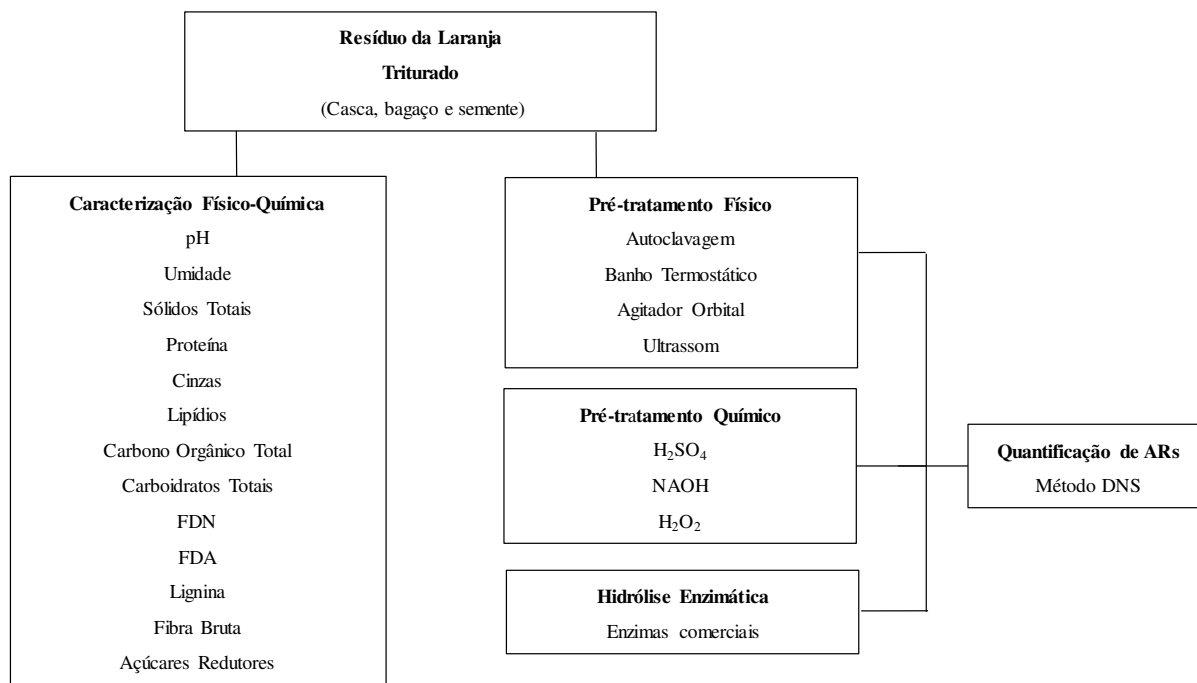


Figura 1: Fluxograma dos processos de pré-tratamento aplicados ao resíduo de laranja.

3.2.1 Caracterização físico-química dos resíduos da laranja

Na caracterização físico-química, foram analisados os parâmetros apresentados na Tabela 1, através das metodologias referenciadas [10, 11 e 12].

Parâmetros	Métodos	Referências
pH	Potenciometria	[10]
Umidade	Gravimetria	[10]
Sólidos Totais	Gravimetria	[10]
Proteína	Digestão ácida e titulação	[10]
Cinzas	Gravimetria	[10]
Lipídios	Extração com solventes	[10]
Carbono Orgânico Total	Ignição da amostra	[11]
Carboidratos Totais	Calculado por diferenciação	[10]
FDN	Digestão enzimática	[10]
FDA	Digestão enzimática	[10]
Lignina	Digestão ácida e gravimetria	[10]
Fibra Bruta	Digestão enzimática	[10]
Açúcares Redutores	Cromatografia	[12]
Ácido acético	Cromatografia	[12]
Etanol	Cromatografia	[12]

Tabela 1: Parâmetros de caracterização físico-química e os métodos usados.

3.2.2 Pré-tratamentos físicos e químicos aplicados à biomassa da laranja

O pré-tratamento hidrotérmico aplicado à biomassa de laranja, foi realizado com o auxílio do equipamento de autoclave (CS Primatec), a 120 °C, a 1 atm, variando-se o pH. O pré-tratamento em banho termostático com temperatura controlada e agitação, foi realizado em equipamento da marca Dubnoff e modelo TE – 0532, a 100 °C e 150 rpm. O pré-tratamento utilizando agitação orbital foi realizado em agitador orbital (Oxylab – 305) a 47 °C, 150 rpm e variação de pH. Todos os testes foram feitos em triplicata e como variável resposta, foram quantificados os açúcares redutores. As especificações desses pré-tratamentos estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Especificações dos pré-tratamentos utilizados.

Pré-tratamento	Biomassa	Solução	Tempo
Autoclavagem	100 g	100 mL de NaOH	15 min
	100 g	100 mL de NaOH	60 min
	100 g	100 mL de H ₂ SO ₄	15 min
	100 g	100 mL de H ₂ SO ₄	60 min
Banho termostátizado	100 g	100 mL de H ₂ O	30 min
	100 g	100 mL de H ₂ O	8 horas
Agitação orbital	100 g	70 mL de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e pH 11,5 (NaOH)	3 horas
	100 g	70 mL de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e Ph 11,5 (NaOH)	8 horas
	100 g	70 ml de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e pH 3 (H ₂ SO ₄)	3 horas
	100 g	70 mL de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e pH 3 (H ₂ SO ₄)	8 horas

3.2.3 Pré-tratamento ultrassônico aplicado à biomassa da laranja

Um delineamento Composto Central (CCD) foi feito para o estudo da influência das variáveis: potência da sonda, concentração de biomassa (m/v) e concentração de H₂SO₄, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Especificações do pré-tratamento ultrassônico aplicado à biomassa da laranja

Delineamento composto central (CCD)			
Pré-tratamento	[] biomassa	[] ácido	potência (%)
Ultrassônico	- (5)	- (1)	- (20)
	+ (15)	- (1)	- (20)
	- (5)	+ (5)	- (20)
	+ (15)	+ (5)	- (20)
	- (5)	- (1)	+ (100)
	+ (15)	- (1)	+ (100)
	- (5)	+ (5)	+ (100)
	+ (15)	+ (5)	+ (100)
	0 (10)	0 (3)	0 (60)
	0 (10)	0 (3)	0 (60)
	0 (10)	0 (3)	0 (60)
	0 (10)	0 (3)	0 (60)

A avaliação da quantidade de ARs liberados nos tempos de 20 e 40 min, foi realizada pelo método DNS. Os pontos centrais foram usados para testar a repetibilidade do processo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.4 Hidrólise enzimática aplicada à biomassa da laranja

Para a hidrólise enzimática foi selecionada o pré-tratamento que atingiu a maior quantidade de açúcares redutores na biomassa.

As enzimas utilizadas foram cedidas gentilmente pela empresa Novozymes®, sendo cinco pectinases: Pectinex® Ultra SP-L; Pectinex® Ultra Tropical; Pectinex® Ultra Pulp; Pectinex® Ultra Clear. 2 amilases: Amylase™ AGXXL; Saczyme® Go 2X. Uma xilanase: Ultraflo® Max. Uma celulase: Celluclast® 1.5 L.

As amostras pré-tratadas foram imersas em banho termostático (Tecnal, TE-2005, Piracicaba, Brasil) com agitação até atingir 90 °C, mantida por 5 min e resfriada a 52 °C para gelatinização do amido [1]. O pH foi ajustado para 4,5 e adicionadas as enzimas.

As enzimas foram adicionadas individualmente e após em conjunto, em cada amostra contendo resíduos de laranja para verificar qual o melhor desempenho para os experimentos de fermentação, sendo que a hidrólise foi realizada em reatores (volume de trabalho de 50 mL) em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-421, Piracicaba, Brasil) à temperatura de 50 °C por 180 min. As amostras foram coletadas nos tempos zero, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min para determinar a concentração de açúcares redutores liberados. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.2.5 Métodos analíticos

3.2.5.1 Remoção de proteína

As proteínas foram removidas usando a metodologia descrita por [28], onde 0,4 mL das soluções de Carrez I e II (solução de ferrocianeto de potássio 15% e solução de sulfato de zinco 30%, respectivamente) foram adicionados a cada amostra de frutas hidrolisadas contendo 1 mL, a fim de precipitá-los. Água destilada foi então adicionada à amostra até um volume total de 25 mL, seguida de centrifugação a 1320g por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810). A filtração foi então realizada e 1 ml do filtrado foi usado para determinar a concentração dos açúcares redutores.

3.2.5.2 Açúcares redutores

Açúcares redutores (AR) foram medidos pelo método colorimétrico com ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por [29], usando uma curva padrão obtida a partir de uma solução estoque de glicose anidra. Todas as medições foram realizadas em triplicado.

3.2.6 Tratamento de dados e análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram tratados e avaliados por análise de variância com nível de confiança de 95%, com posterior análise pelo teste de Tukey no software Statsoft (Statistica 7.0, StateSoft Academic Solution, São Paulo, SP, Brasil).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Caracterização físico-química realizada nos resíduos de laranja

Na Tabela 4 está apresentada a caracterização físico-química dos resíduos da laranja.

Tabela 4: Caracterização físico-química do resíduo de laranja.

Parâmetros	Resultados
pH	3,74 \pm 0,54
Sólidos totais (%)	12,24 \pm 0,83
Proteínas (%)	0,65 \pm 0,34
Cinzas (%)	0,50 \pm 0,28
Lipídios (%)	5,70 \pm 0,26
Carbono orgânico total (%)	41,29 \pm 0,88
Carboidratos totais (%)	9,20 \pm 0,76
FDN (celulose, hemicelulose e lignina) (%)	21,28 \pm 0,45
FDA (celulose e lignina) (%)	23,01 \pm 0,23
Lignina (%)	1,8 \pm 0,89
Fibra bruta (%)	14,59 \pm 0,76
Glicose (mg/mL)	0,41 \pm 0,46
Frutose (mg/mL)	7,50 \pm 0,71
Celobiose (mg/mL)	0,56 \pm 0,33
Ácido acético (mg/mL)	1,27 \pm 0,34
Etanol (mg/mL)	2,36 \pm 0,51

(FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido)

*Resultados em base seca.

*Umidade 87,86%.

[13] usou resíduos de laranja para a produção de hesperidina, nanocelulose e bioetanol. Na análise físico-química realizada pelos autores, foram obtidos resultados semelhantes aos dessa pesquisa para os parâmetros de Umidade (78%), Proteína (6,4%), Carboidratos totais (9,20%) e Cinzas (3,39%). A identificação dos açúcares livres mostra que há a presença de glicose, frutose e celobiose (0,41, 7,50 e 0,56 mg/mL) no resíduo, antes mesmo de passar pela etapa de pré-tratamento, o que torna promissor seu uso na produção de bioetanol.

Além dos açúcares, foi observado a formação de inibidores de fermentação, como o ácido acético. Por outro lado, um ponto positivo e a ausência de ácido fórmico (outro inibidor fermentativo), identificado em outros resíduos lignocelulósicos, o que necessitaria de uma etapa de purificação para sua remoção antes da fermentação.

As quantidades de açúcares redutores são baixas para que se fermente e obtenha-se um processo comercialmente viável, motivo pelo qual necessita-se realizar o pré-tratamento e hidrólise, liberando mais açúcares para que sejam fermentados e convertidos em etanol. A nível de simples comparação, o mosto de cana de açúcar tem 12% de açúcares (120 g/L), enquanto o mosto de beterraba possui 10% (100 g/L) de açúcares livres [14].

3.3.2 Pré-tratamentos aplicados aos resíduos de laranjas

Os resultados de açúcares redutores obtidos pelos pré-tratamentos físico e químicos realizados estão apresentados na Tabela 5.

Pré-tratamento	AR (mg/mL)	Solução	Tempo
Autoclavagem	18,26 ^a ±0,20	100 mL de NaOH	15 min
	21,30 ^b ±1,09	100 mL de NaOH	60 min
	37,18 ^c ±0,05	100 mL de H ₂ SO ₄	15 min
	69,17^d±2,48	100 mL de H₂SO₄	60 min
Banho termostátizado	14,55 ^a ±0,94	100 mL de H ₂ O	30 min
	23,98^b±0,46	100 mL de H₂O	8 horas
Agitação orbital	0,18 ^a ±0,11	70 mL de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e pH 11,5 (NaOH)	3 horas
	0,20 ^a ±0,04	70 mL de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e Ph 11,5 (NaOH)	8 horas
	2,47 ^a ±0,27	70 ml de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e pH 3 (H ₂ SO ₄)	3 horas
	1,97 ^a ±0,05	70 mL de H ₂ O, 12 mL de H ₂ O ₂ e pH 3 (H ₂ SO ₄)	8 horas

*Letras iguais indicam que não houve diferença significativa baseado no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5: Açúcares redutores produzidos nos pré-tratamentos preliminares aplicados aos resíduos de laranja.

Os melhores resultados de açúcares redutores foram obtidos pelo pré-tratamento realizado em autoclave com a adição de H_2SO_4 tempo de 60 minutos (69,17 mg/mL). Em estudo realizado por [15] foi avaliada a adequação dos resíduos de bananeira para a produção de biocombustível em relação ao pré-tratamento de autoclavagem em meio ácido (H_2SO_4), aplicado durante 60 minutos em temperatura de 121 °C e obteve em torno de 30% de açúcares redutores [15].

O pré-tratamento com ácido solubiliza a fração hemicelulósica da biomassa e aumenta a acessibilidade da celulose às enzimas [8]. Outro benefício do pré-tratamento com ácido é a possibilidade de utilizar açúcares hemicelulósicos. Os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para a solubilização de lignina [16]. Ácidos como H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 e HNO_3 são utilizados durante o pré-tratamento ácido da biomassa, sendo que entre esses produtos químicos, o H_2SO_4 é o ácido mais comumente usado, enquanto o NaOH é o principal álcali [21].

O pré-tratamento ácido e o pré-tratamento alcalino, são considerados uma das tecnologias mais usadas de tratamentos químicos. O pré-tratamento enzimático é uma alternativa sustentável, já que usa microrganismos ou suas enzimas [17].

O pré-tratamento ácido (geralmente com ácido sulfúrico) é o pré-tratamento químico mais comumente empregado para a biomassa lignocelulósica, onde os polissacarídeos (principalmente hemiceluloses) são hidrolisados em monossacarídeos, levando a maior acessibilidade da celulose à hidrólise da enzima [18]. O ácido diluído gera menores quantidades de inibidores de fermentação. A palha de arroz foi pré-tratada com 1% (p/p) de ácido sulfúrico com 1-5 minutos de retenção a 160 °C ou 180 °C seguido de hidrólise enzimática, que resultou na produção máxima de açúcar de 83% [19]

Os pré-tratamentos realizados em banho termostatizado, apenas sob as condições de alta temperatura (100 °C) e agitação, apresentaram como melhor resultado 23,98 mg/mL de AR em 8 horas. [21] comparou pré-tratamentos realizados com água e temperatura em torno de 220 °C por 15 min, em palha de milho, bagaço de cana, palha de trigo e palha de centeio, sem adição de quaisquer produtos químicos ou catalisadores e obteve um método eficiente para pré-tratar diferentes tipos de material lignocelulósico. Este método solubilizou a hemicelulose em torno de 80% e conseqüentemente, aumentou a digestibilidade da celulose para o processo de hidrólise. O resultado foi uma biomassa com celulose e a fração líquida com hemiceluloses solubilizadas, com baixo ou nenhum inibidor. No entanto, para a obtenção dessa temperatura, é necessário a elevação da pressão do sistema, obtida principalmente em autoclaves ou reatores de hidrólise, retornando ao processo de autoclavagem discutido no item anterior.

O uso do peróxido de hidrogênio, alcalinizado ou acidificado, em agitador orbital, não permitiu a produção de grandes quantidades de açúcares redutores totais (máximo de 2,47 mg/mL), como pode-se verificar na Tabela 5. Verificou-se que condições extremas (tratamentos ácidos ou alcalinos) são melhores para liberação dos açúcares, com a obtenção de 69 mg/mL de açúcares redutores.

O pré-tratamento de material lignocelulósico pelo peróxido de hidrogênio aumenta a digestibilidade enzimática em até 90-95% dissolvendo a lignina e expondo celulose e hemicelulose ao ataque de enzimas [22], com isso, é provável que o processo de hidrólise enzimática utilizado como tratamento posterior a esse, seja facilitado pelo pré-tratamento inicial com peróxido de hidrogênio.

Em pré-tratamento alcalino realizado com NaOH (hidróxido de sódio) e CaOH₂ em biomassa bruta, aplicado em gramíneas, levou a rendimentos de glicose e xilose de 59,4% e 57,3%, respectivamente. A cal Ca(OH)₂, que é muito barata, mas constitui uma base fraca, insuficiente para funcionar eficazmente à temperatura ambiente, no entanto, auxiliou a reduzir a necessidade de NaOH (base forte e mais cara), mantendo o pH alto e mitigando a solubilização de carboidratos durante o pré-tratamento, contribuindo assim para uma nova tecnologia com boa relação custo-benefício [23].

A solubilização de hemicelulose e celulose em métodos de pré-tratamento usando álcalis é menor do que em processos ácidos ou térmicos. Porém causa inchaço químico de celulose fibrosa, no qual ocorrem reações de saponificação e salvatação, que levam à ruptura das ligações cruzadas entre hemiceluloses e outros componentes, aumentando, assim, a porosidade da biomassa [21].

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (pH 11,5) em bagaço de caju usado na produção de bioetanol, aumentou significativamente a quantidade de celulose, tornando sua estrutura mais suave. Consequentemente, a hidrólise enzimática foi significativa (87% de digestibilidade), o que levou a um rendimento de glicose de 161 mg/mL à baixas cargas enzimáticas. Além disso, não houve produção de inibidores [22].

3.3.3 Pré-tratamentos com sonda ultrassônica

Os melhores resultados do pré-tratamento com sonda ultrassônica apresentados na Tabela 6 são os correspondentes ao tempo 40 minutos e a potência 100%, seguidos pelos resultados correspondentes ao tempo 40 minutos e potência 60%, sendo que os testes feitos em tempos e potências inferiores obtiveram menores resultados de açúcares redutores.

Pré-tratamento Ultrassônico (biomassa/ácido/potência)	AR (mg/mL) tempo 20	AR (mg/mL) tempo 40
(5/1/20)	9,37 ^{ab} ±0,12	8,35 ^{ab} ±0,26
(15/1/20)	8,21 ^{ab} ±0,34	8,80 ^{ab} ±0,04
(5/5/20)	1,45 ^a ±0,24	3,21 ^a ±0,01
(15/5/20)	0,97 ^a ±0,17	0,62 ^a ±0,39
(5/1/100)	15,51^{bc}±0,40	16,07^{bc}±0,06
(15/1/100)	12,68^b±0,02	14,30^{bc}±0,55
(5/5/100)	10,34^b±0,34	11,11^{bc}±0,03
(15/5/100)	20,75^c±0,05	21,86^c±0,70
(10/3/60)	1,17 ^a ±1,12	1,67 ^a ±0,78

**Letras equivalentes indicam que o tratamento foi estatisticamente igual baseado no teste de Tukey (p < 0,05).*

Tabela 6: Açúcares redutores obtidos após o pré-tratamento realizado com sonda ultrassônica nos resíduos de laranja.

A análise estatística demonstrou que as variáveis significativas foram a amplitude de potência (100%), o tempo (40 min) e a concentração de ácido, resultando em 21,86 mg/mL de açúcares redutores. O restante das variáveis, não tiveram efeitos significativos (p>0,05) na concentração final de açúcares redutores produzidos.

O tempo de tratamento por ultrassom é uma variável importante, [24] identificaram que o grau de desintegração aumentou progressivamente com o aumento do tempo de ultrassom e houve ruptura quase completa de estruturas de resíduos de soja, para ser usado como um ingrediente funcional na indústria de alimentos ou rações, além de um grande número de células fragmentadas. A análise em microscópio eletrônico de varredura mostrou que a superfície ficou particulada com uma textura esponjosa após o tempo de ultrassom de 30 min, indicando que o tratamento teve um sério efeito de destruição de estruturas lignocelulósicas. Um procedimento de pré-tratamento adequado envolve romper ligações de hidrogênio na celulose cristalina, decompor a matriz de hemicelulose e lignina e aumentar a porosidade e a área superficial da celulose para hidrólise enzimática subsequente [25].

Os complexos lignina-carboidrato são partes recalcitrantes na estrutura da biomassa e não se incorporam no processo de fermentação da produção de bioetanol. A deslignificação é definida como a remoção da lignina empregando diferentes métodos enzimáticos ou químicos naturais. Por exemplo, a fração de lignina do bagaço de cana contém 17-32% da biomassa, que é a quantidade mais alta do que vários resíduos de biomassa não madeireiros. O tamanho da

área de superfície é um parâmetro importante para uma deslignificação efetiva. Após a remoção de compostos recalcitrantes da biomassa, ela pode ser degradável quimicamente ou biologicamente. Além disso, os parâmetros mais importantes de uma deslignificação ideal são a produção de uma quantidade limitada de açúcar e lignina residual, fornecendo celulose degradável e alto potencial para recuperar todos os carboidratos [26].

O ácido diluído gera menores quantidades de inibidores de fermentação. A palha de arroz foi pré-tratada com 1% (p/p) de ácido sulfúrico com 1-5 minutos de retenção a 160 ° C ou 180 ° C seguido de hidrólise enzimática, que resultou na produção máxima de açúcar de 83% [19].

Expandir a área superficial da biomassa, dissolver hemicelulose e a lignina e reduzir o tamanho das partículas da biomassa são os objetivos mais importantes da etapa de pré-tratamento. Isso pode ser feito por modificação química ou física da estrutura. Posteriormente, a hidrólise da celulose melhora aumentando as acessibilidades de ácidos ou enzimas à superfície da celulose. Os pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos e combinados são os métodos mais utilizados [26].

O efeito da passagem de ondas de ultrassom de alta frequência para a solução de biomassa causa cavitação e, como resultado, interrupção da estrutura lignocelulósica. As ligações C-H também são afetadas pela cavitação. Vários fatores devem ser considerados durante o processo de sonicação para obter um tratamento eficaz da biomassa de lignocelulose. A duração da sonicação tem o maior impacto no pré-tratamento. O aumento da duração da sonicação aumenta a deslignificação da biomassa. O nível de potência, frequência e amplitude também são parâmetros importantes. Quando o nível de amplitude é aumentado correspondentemente, o nível de potência também é aumentado, o que afeta diretamente a intensidade da cavitação.

O uso do pré-tratamento por ultrassom com vários materiais de lenhocelulose mostrou um aumento no rendimento de glicose de 21,3%. [27] relataram que o pré-tratamento do bagaço da cana, misturando-o com água destilada (DI) e tratando-o com 22 kHz e 100 W de potência por 5 a 35 minutos sob temperatura de 55 °C, resultou na extração de 90% da hemicelulose e lignina. A eficiência do pré-tratamento também depende do tamanho das partículas da biomassa lignocelulósica. É relatado que quanto menor o tamanho da partícula, melhor é a separação [26].

Outra experiência foi realizada por [28] em que os pré-tratamentos com ácido e ultrassom foram combinados em um processo. Após 12 h de pré-tratamento com ácido, o bagaço foi pré-tratado diretamente com as ondas de ultrassom contenciosas. As concentrações

de ácido utilizadas nesta experiência foram de 2,5%, 3% e 3,5% (H_2SO_4 diluído) e os níveis de amplitude do ultrassom foram 50, 60 e 70. Após a fase de pré-tratamento, o bagaço foi enxaguado abundantemente com água antes da fermentação. O fermento foi adicionado aos reatores (3 g) e depois fermentado por seis dias. O resultado mostra que, à medida que o tempo de pré-tratamento e o nível de amplitude aumentam, a produção de etanol aumenta. Ao combinar os dois métodos de pré-tratamento em um processo, a produção de etanol foi de cerca de 820 mg/mL. Esse resultado é 22% superior aos resultados obtidos com o experimento de pré-tratamento com ácido e com o ultrassom, realizado separadamente.

Os valores máximos obtidos após o pré-tratamento realizado com sonda ultrassônica em biomassa lignocelulósica foram de 1,56 mg/mL de glicose (0,15%), 22,86 mg/mL de frutose (2,26%) e 1,49 mg/mL de celobiose (0,14%), sendo que os açúcares livres presentes na biomassa eram de 0,41 mg/mL de glicose (0,04%), 7,50 mg/mL de frutose (0,75%) e 0,56 mg/mL de celobiose (0,05%). [13] também analisou por HPLC a quantidade de açúcares livres contidos no resíduo de laranja e obteve resultados de 1,26% de glicose, 0,75% de frutose e 0,50% celobiose. É importante ressaltar que é difícil comparar esta composição de biomassa de diferentes estudos, pois a composição final do bagaço de laranja é fortemente influenciada pela fonte da amostra, variedade de plantas, constituição do solo, clima (umidade, temperatura), época de colheita e até mesmo pelo método de plantio [29].

Independentemente do método de pré-tratamento utilizado, alguns compostos inibitórios são produzidos durante o processo, os quais têm efeitos negativos sobre a atividade microbiana na etapa de hidrólise. Os inibidores podem ser ácidos fracos, tais como levulínico, ácido acético e ácido fórmico, derivados de furano, como HMF (5-hidroxi-2-metilfurfural) e furfural, bem como compostos fenólicos [30].

3.3.4 Hidrólise enzimática

A biomassa da laranja também passou pela etapa de hidrólise enzimática e os resultados após a hidrólise estão apresentados na Figura 2.

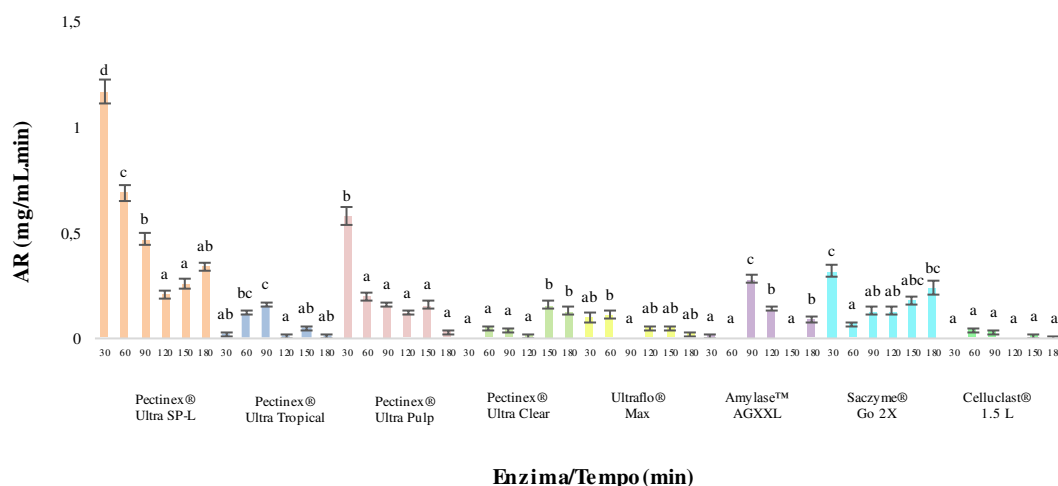


Figura 2: Produtividade de AR a partir da biomassa de laranja pelas 8 enzimas testadas.

Na biomassa da laranja teve destaque a enzima Pectinex® Ultra SP-L com 1,17 mg/mL.min de AR liberado. A quantidade de AR era de 26 mg/mL inicialmente e após a hidrólise enzimática passou para 61,12 mg/mL.

Os resíduos de laranja possuem grande quantidade de açúcares fermentescíveis, principalmente glicose, frutose e sacarose, além de polímeros insolúveis, incluindo hemicelulose, celulose e pectina. A presença da pectina reduz o acesso à celulose, sendo necessário otimizar o processo enzimático com pectinases e associações que levaram a rendimentos de glicose acima de 80% e concentrações globais de monossacarídeos próximas a 40 g/L [31, 5].

[33] estudou a aplicação de explosão a vapor para o pré-tratamento de resíduos da indústria de suco de laranja, sob várias condições de pH, temperatura e tempo para determinar seu efeito nos rendimentos de etanol, após Sacarificação Simultânea à Fermentação, utilizando uma mistura de enzimas contendo pectinase, celulase e β -glicosidase e a quantidade de AR inicial que era de 24,43% passou para 54,66%, com um rendimento de etanol de 76% a 94%.

As principais vantagens do tratamento enzimático são o baixo consumo de energia, as condições simples de operação, a formação mínima de inibidores, os baixos custos de processamento e não há necessidade de reciclar os produtos químicos após o pré-tratamento [8]. O pré-tratamento biológico depende de bactérias, fungos e enzimas para degradar a biomassa. A lignina e a hemicelulose são as mais vulneráveis aos ataques. É frequentemente conhecido como uma tecnologia simples, barata e ecológica. Isto se deve ao fato de não

requererem altos aportes de energia ou adição de produtos químicos. O conceito fundamental do pré-tratamento biológico é melhorar a biodegradabilidade de lignoceluloses [17].

O pré-tratamento enzimático apresenta potencial para melhorar o processo de pré-tratamento, ele envolve enzimas oxidativas e hidrolíticas, produzidas pelas bactérias e fungos, o tempo de reação é relativamente curto, necessita de baixa nutrição para as reações e também devido ao fato de que a maioria das enzimas não é afetada pela presença de inibidores[17].

A hidrólise enzimática é vantajosa em relação a outros processos físico-químicos porque as enzimas catalisam apenas reações específicas, não ocorrendo nenhuma reação colateral, nem a formação de subprodutos. Com isso tem o potencial de atingir maior rendimento de açúcares [17].

Os principais objetivos do pré-tratamento biológico utilizando cepas de fungos e bactérias ou suas enzimas são criar a estrutura mais suscetível da celulose a um ataque enzimático ou microbiano, rompendo sua estrutura cristalina, rompendo e removendo o selo de lignina e minimizando a perda de carboidratos. Portanto, usando microrganismos celulolíticos e hemicelulolíticos, a celulose e a hemicelulose são geralmente hidrolisadas em açúcares monoméricos. Os benefícios mais importantes dos métodos biológicos incluem nenhuma reciclagem química após o pré-tratamento, baixos custos de processamento a jusante, formação mínima de inibidores, operação simples e baixo consumo de energia. A *celulase* é a enzima mais comumente aplicada seguida pela *β -glucosidase* e *xilanase* [26]

3.4 Conclusão

Com essa pesquisa pode-se concluir que os resíduos da indústria de sucos de laranja possuem potencial para produção de bioetanol e que os pré-tratamentos aplicados possibilitaram o acesso aos açúcares fermentáveis. A atuação do peróxido de hidrogênio como agente de quebra de ligações glicosídicas foi limitada, porém o uso de ácido sulfúrico foi eficiente, o que resultou nas melhores concentrações de ARs obtidos a partir dos pré-tratamentos físicos e químico. A hidrólise enzimática também apresentou alta produtividade, com a vantagem de ser melhor aceita para o posterior processo fermentativo por não conter nenhum ácido. Outro ponto importante foi a utilização de resíduos da indústria de alimentos para a produção de bioetanol, o que enobrece essa pesquisa, evitando seu descarte e desperdício e possibilitando o uso de uma matéria prima alternativa.

REFERÊNCIAS

- 1 Rempel A, Sossella FS, Margarites AC, Astolfi AL, Steinmetz RLR, Kunz A, Treichel H, Colla LM (2019) Bioethanol from spirulina platensis biomass and the use of residuals to produce biomethane: an energy efficient approach. *Bioresource technology* 288: 121588. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10177-w>
- 2 Ozturk, B. Winterburn, J. Gonzalez-Miquel, M. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. *Biochemical Engineering Journal*, v. 151, p. 107-298, 2019.
- 3 Calabrò, P. S. Paone, E. Komilis, D. Strategies for the sustainable management of orange peel waste through anaerobic digestion. *Journal of environmental management*, v. 212, p. 462-468, 2018.
- 4 Chitranshi R, Kapoor R (2021) Utilization of over-ripened fruit (waste fruit) for the eco-friendly production of ethanol. *International Journal of Plant Research* 33: 270-276. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00185-8>
- 5 Torre, I. Ravelo, M. Segarra, S. Tortajada, M. Santos, V. E. Ladero, M. Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresource technology*, v. 245, p. 906-915, 2017.
- 6 Mohapatra, S. Mishra, C. Behera, S. S. Thatoi, H. Application of pretreatment fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 78, p. 1007-1032, 2017.
- 7 Martin M.A., R. Fernández, M.C. Gutiérrez, J.A. Siles Thermophilic anaerobic digestion of pre-treated orange peel: modelling of methane production *Process Saf. Environ*, 117 (2018), pp. 245-253, 10.1016/j.psep.2018.05.008
- 8 Zabed, H. M. Akter, S. Yun, J. Zhang, G. Awad, F. N. Qi, X. Sahu, J. N. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 105, p. 105-128, 2019.
- 9 Carrillo-Nieves, D. Alanís, M. J. R. Cruz- Quiroz, R. Ruiz, H. A. Iqbal, H. M. Parra-Saldivar, R. Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 102, p. 63-74, 2019.
- 10 Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para a análise de alimentos. 4ª ed. São Paulo, 2008.
- 11 Tedesco, M. J. Gianello, C. Bissani, C. A. Bohnen, H. Vokweiss, S. J. Análise de solo plantas e outros materiais. Porto Alegre. P. 106, 1995.
- 12 Bazoti, S. F. Golunski, S. Siqueira, D. P. Scapini, T. Barrilli, E. T. Mayer, D. A. Valério, A. Oliveira, D. Treichel, H. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresource technology*, v. 244, p. 582-587, 2017.
- 13 Cypriano, D. Z. Silva, L. L. Tasic, L. High value-added products from the orange juice industry waste. *Waste management*, v. 79, p. 71-78, 2018.
- 14 Thammasittirong, S. N. R. Chatwachirawong, P. Chamduang, T. Thammasittirong, A. Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. *Industrial crops and products*, v. 108, p. 598-603, 2017.
- 15 Raud, M. Kikas, T. Sippula, O. Shurpali, N. J. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 111, p. 44-56, 2019.

- 16 Barros, E. M, Carvalho, V. M. Rodrigues, T. H. S. Rocha, M. V. P. Gonçalves, L. R. B. Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 307, p. 939-947, 2017.
- 17 koupaie, E. H. Dahadha, S. Lakeh, A. B. Azizi, A. Elbeshbishy, E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of environmental management*, v. 233, p. 774-784, 2019.
- 18 Taherzadeh, M. Karimi, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, v. 9, p. 1621-1651, 2008.
- 19 Hsu, T. C. Guo, G. L. Chen, W. H. Hwang, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, v. 101, p. 4907-4913, 2010.
- 20 Mosier, N. Hendrickson, R. Ho, N. Sedlak, M. Ladisch, M. R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, v. 96, p. 1986-1993, 2005.
- 21 Mood, S. H. Golfeshan, A. H. Tabatabaei, M. Jouzani, G. S. Najafi, G. H. Gholami, A. Ardjmand, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77-93, 2013.
- 22 Correia, J. A. C. Marques Júnior, J. E. Gonçalves, L. R. B. Rocha, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: study of parameters. *Bioresource Technology*, v. 139, p. 249-256, 2013.
- 23 Xu, J. Cheng, J. J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresource technology*, v. 102, p. 3861-3868, 2011.
- 24 Chen, X. Luo, Y. Qi, B. Luo, J. Wan, Y. Improving the hydrolysis efficiency of soy sauce residue using ultrasonic probe-assisted enzymolysis technology. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 35, p. 351-358, 2017.
- 25 Li, C. Knierim, B. Manisseri, C. Arora, R. Scheller, H. V. Auer, M. Singh, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, v. 101, p. 4900-4906, 2010.
- 26 Rezaia S, Oryani B, Cho J, Talaiekhosani A, Sabbagh F, Hashemi B, Rupani P F, Mohammad A A (2020) Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy* Volume 199, 15 May 2020, 117457
- 27 Rehman MSU, Kim I, Chist Y, Han JY (2012) Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic. *Energy Education Science and Technology Part A: Energy Science and Research*, 30: **1391-1410**
- 28 Kandasamy M, Hamawand I, Bowtell L, Seneweera S, Chakrabarty S, Yusaf T, Shakoob Z, Algayyim S, Eberhard F (2017). Investigation of ethanol production potential from lignocellulosic material without enzymatic hydrolysis using the ultrasound technique. *Energies* v. 10, 62; doi:10.3390/en10010062
- 29 Mukhopadhyay, M. Kuila, A. Tuli, D. K. Banerjee, R. Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. *Biomass and bioenergy*, v. 35, p. 3584-3591, 2011.
- 30 Palmqvist, E. Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource technology*, v. 74, p. 17-24, 2000.

- 31 Ciriminna, R. Scurria, A. Danzi, C. Timpanaro, G. Stefano, V. Avellone, G. Pagliaro, M. Fragrant bioethanol: A valued bioproduct from orange juice and essential oil extraction. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, v. 9, p. 42-45, 2018.
- 32 Wilkins, M. R. Widmer, W. W. Camero, R. G. Grohmann, K. Effect of seasonal variation on enzymatic hydrolysis of valencia orange peel waste. In *proc. Fla. State hort. Soc*, v. 118, p. 419-422, 2005.
- 33 Singh P, kumar A, Sivakumar N, Verm JP (2022) Deconstruction of lignocellulosic biomass for bioethanol production: recent advances and future prospects. *Fuel* v 327: 125109.
- 34 Demirbas A, Arin G (2002). Uma visão geral da pirólise de biomassa. *Energy Sources*, 24: 471 – 482.
- 35 Khan, M.U. Ahring B.K (2019) Lignin degradation under anaerobic digestion: Influence of lignin modifications - A review. *Biomass Bioenergy*, 128: 105325
- 36 Gupta, V.G. Treichel H, Kuhad R. C, Rodriguez-Couto S (2020) Recent developments in bioenergy research Elsevier.

4 CAPÍTULO II – ARTIGO PUBLICADO¹

FRUIT RESIDUES AS BIOMASS FOR BIOETHANOL PRODUCTION USING ENZYMATIC HYDROLYSIS AS PRETREATMENT

Danúbia Paula Cadore Favaretto^{1*}, Alan Rempel¹, Julia Roberta Lanzini¹, Ana Carolina Mattana Silva¹, Tauane Lazzari¹, Luiza Desengrini Barbizan¹, Vandr e Barbosa Bri o¹, Luciane Maria Colla¹ and Helen Treichel²

¹ University of Passo Fundo, Campus I, km 171, BR 285, P. O. Box 611. 99001-970, Passo Fundo City. Rio Grande do Sul State. Brazil.

² Federal University of the South Border – Campus Erechim, RS 135, Km 72, 99700-000, Erechim City. Rio Grande do Sul State. Brazil.

*Corresponding author. E-mail: danubiafcp@hotmail.com

ABSTRACT

The commercialization of fruits in markets generates a large amount of waste because they are perishable and have a short shelf life, so, they are discarded. This study aimed to provide a noble end to discarded fruits that have fermentable sugars. Banana, apple, mango and papaya residues were collected from supermarkets and underwent an enzymatic hydrolysis process. The ability of four pectinases, two amylases, one xylanase and one cellulase to release reducing sugars from fruit biomass before fermentation with two yeast strains (*S. cerevisiae* CAT-1 and *S. cerevisiae* Angel) for bioethanol production was investigated, obtaining a total of RS (Reducing sugar) of 268.08 mg/mL in banana residues. A fermentation with yeast *S. cerevisiae* CAT-1 resulted in 98 % consumption of RS and the production of a total of 28.02 g/L of ethanol. Furthermore, fermentation with the yeast *S. cerevisiae* Angel, resulted in 97 % RS consumption and 31.87 g/L ethanol production, which was the best result obtained throughout all the tests of hydrolysis, highlighting the banana residue as a promising biomass for the production of bioethanol.

Highlights

- We converted of fruit sugars to bioethanol;
- We use alternative raw material for the production of biofuels;
- We realized a screening of enzymes to be used in hydrolysis of fruit residues;
- We studied mix of enzymes in the hydrolysis of fruit residues;
- Yields of 268.08 mg/mL and 150.22 mg/mL of RS were obtained using the hydrolysis with enzyme Pectinex Ultra SP - L in the fruits Banana and Apple respectively;
- We realized the fermentations using two different strains of yeast with similar results.

Keywords: biofuels, waste, raw material, reuse, value.¹

¹ World Journal of Microbiology and Biotechnology.

4.1 Introduction

The use of fossil fuels has led to increased greenhouse gas emissions and has all known environmental impacts on the planet. In addition, global geopolitical conflicts have led to price instability of this resource, which is irreplaceable and its exploitation is finite. The side effects, along with rapid depletion of fossil fuels, promote the concept of alternative and renewable energy sources, such as biofuels [1, 2]. First-generation biofuels provide a greater balance of sustainability in the energy matrix, but this balance is still deficient. For example, the bioethanol industry still depends on agricultural crops, such as sugarcane and corn, sequestering large fertile lands that would otherwise be used for food production [3]. However, second-generation biofuels can be obtained from different types of waste, which originate a lignocellulosic biomass, such as fruit and vegetable waste. These wastes are plentiful and sustainable and their use can result in low carbon emissions [4].

Consumers tend to reject fruits and vegetables with surface imperfections in supermarkets, and the value of this waste is approximately 34.8 billion dollars annually in the United States alone [5]. In India, 12 million tons of fruit is wasted annually [6]. In Brazil, in 2020 alone, the value of the waste in all the 228 supermarket chains participating in ABRAS (Brazilian Association of Supermarkets) reached 7.6 billion of reals [7]. Fruit and vegetable residues are commonly ignored, and their loss causes nutritional, economic, and environmental problems. Losses and residues originate from unused or unconsumed parts of fruits and vegetables, usually because of flavor requirements and improper handling during operations [8]. For example, waste from mango can constitute 20 - 50 % of the weight of the fruit, and banana can generate 20 % waste during handling and processing [9]. Peels and pips, which are the by-products of papaya handling and processing, represent up to 25 % of the fruit weight [10]. However, the inedible parts of underused crops can be used in the production of biofuels, thereby reducing the waste generated for a sustainable and greener future [3]. These discarded residues gain a noble purpose when they are used as biomass for the production of biofuels. Depending on the characteristics of underutilized waste, one promising option among emerging recovery technologies is the production of biofuels with a low carbon footprint that does not compete with the food sector [11].

Fruit biomass is composed of cellulose (30 - 50 %), hemicellulose (20 - 40 %), and polymers potentially hydrolyzable into fermentable mono- and disaccharides [12]. Lignin (15 - 25 %) is rich in carbohydrates (glucose, fructose, sucrose, starch) and fiber (pectin), which can be exploited through hydrolysis for conversion into bioethanol [6]. In fact, fruit wastes rich in

cellulose and lignine can generate several products to substitute oil base products as methanol, methane, acetic acid [57, 58], furfural [59], food flavours [60]. All these products and biofuel use natural resources searching a sustainable production.

Cellulose is a polysaccharide with a crystalline structure formed by D-glucose molecules that are linearly connected by β - (1,4) glycosidic bonds. Hemicellulose is an amorphous polysaccharide consisting of sugar molecules with five and six carbons, mainly xylose, whereas lignin is a complex polymer composed of aromatic alcohols [13].

However, the pretreatment, hydrolysis, and fermentation of biomass residues have not yet been established on an industrial scale, which can make it difficult to replace the energy matrix in the short term [14]. Therefore, researchers worldwide are searching for alternative raw materials, such as underutilized fruits and vegetables that are usually wasted or discarded and have potential as a source of bioethanol [15]. The obstacle to using these lignocellulosic biomasses is the need for advanced technologies and pretreatments, which makes the final product more expensive than 1G-ethanol [2]. Thus, further studies are needed to investigate the release of sugars from fruit biomass and their subsequent conversion into ethanol.

Pretreatment of fruits has been studied by physical methods, which disrupt the structure of lignocellulosic biomass [16] including ultrasonic treatment catalyzed by nano-sized particles [17], chemical methods that use acids and bases to change the chemical and physical characteristics of the biomass [18], and enzymatic hydrolysis [19]. Degradation of hemicellulose gives rise to both glucose and other sugars such as xylose, arabinose, mannose, galactose, and rhamnose prior to fermentation, which converts the released sugars into bioethanol and CO₂ [6, 20]. Nevertheless, the best treatment of fruit biomass for the industrial production of bioethanol is still not determined, and enzymatic hydrolysis can be a good strategy, as it can break complex molecules such as lignin, pectin, cellulose, and hemicellulose to release sugars. However, the rate of enzymatic hydrolysis is affected by the source of the enzyme, as product inhibition can be influenced by the resistance [3]. Thus, combination of enzymes can help release sugars for further fermentation to produce bioethanol.

The use of residues from the main fruits sold in supermarkets can add to the production of bioethanol, but the fruit biomass is not ready for fermentation. The contents of lignin, cellulose, hemicellulose, and pectin in fruit residues must be subjected to pretreatment, aiming at the release of reducing sugars that can be fermented [6].

[25] explored the feasibility of pomegranate fruit residue as a possible raw material for the production of second-generation ethanol. However, this work did not include enzymatic pretreatment for a greater release of sugars. [26] used domestic fruit waste for bacterial

fermentation, and reported a yield of 0.30 grams of ethanol per gram of fruit waste used, although the authors did not use pretreatment treatments for a greater release of sugars.

This research aimed to use fruit residues generated during their commercialization for the production of bioethanol, using enzymes to assist in the process of transforming complex carbohydrates into sugars that can be fermented by microorganisms to bioethanol.

4.2 Material and methods

4.2.1 Collection of fruit residues and sample preparation

Fruit residues were collected from supermarkets in Passo Fundo/RS, Brazil. The most commonly discarded fruits were those rejected by consumers for marks, stains, or overmaturing. We collected bananas, apples, mangoes and papayas.

Each sample containing 50 g of whole fruit (peel, seed, and pulp) plus 50 mL of water, were added in an industrial blender for crushing (Skymesen, Model LI-1,5-N, Brazil). This preparation was carried out for each fruit individually and added in 125 mL Erlenmeyer flasks, and the pH was adjusted to 4.5 using 1 M citric acid.

4.2.2 Starch gelatinization

After sample preparation, starch gelatinization was performed. The samples were immersed in a thermostated bath (Tecnal, TE-2005, Piracicaba, Brazil) with agitation until reaching 90 °C, maintained for 5 min, and cooled to 52 °C (Rempel et al., 2019).

4.2.3 Characteristics of the enzymes

The enzymes used for biomass hydrolysis were donated by Novozymes® and had specific characteristics.

Pectinex® Ultra SP-L is a Polygalacturonase, which hydrolyzes (1,4)-alpha-D-galactosiduronic ligaments in pectate and other galacturonans, with a declared activity of 3300 PGNU/g. A volume of 150 mL/m³ was used for each sample.

Pectinex® Ultra Tropical is a Pectin lyase catalyzes the eliminative cleavage of (1,4)-alpha-D-galacturonan methyl ester, forming oligosaccharides with 4-deoxy-6-O-methyl-alpha-

D-galacto- 4-enurosonil at the non-reducing ends, with a declared activity of 5000 PECTU/g. A volume of 150 mL/m³ was used for each sample.

Pectinex® Ultra Pulp is a Pectin lyase, which catalyzes the eliminative cleavage of (1,4)-alpha-D-galacturonan methyl ester, forming oligosaccharides with 4-deoxy-6-O-methyl-alpha-D-galacto-4-enurosonyl groups at non-reducers, with a declared activity of 8600 PECTU/g. A volume of 150 mL/m³ was used for each sample.

Pectinex® Ultra Clear is a Polygalacturonase, which hydrolyzes (1,4)-alpha-D-galactosiduronic bonds in pectate and other galacturonans, with a reported activity of 8600 PGNU/g. A volume of 150 mL/m³ was used for each sample.

Amylase™ AGXXL is a Glycoamylase, which hydrolyzes (1,4)- and (1,6)-alpha-D-glucose bonds at the non-reducing ends of polysaccharides with a declared activity of 400 AGU/g. A volume of 150 mL/m³ was used for each sample. **Saczyme® Go 2X** is a Glycoamylase, which hydrolyzes (1,4)- and (1,6)-alpha-D-glucose bonds at the non-reducing ends of polysaccharides with a declared activity of 1725 AGU/g. A volume of 100 mL/m³ was used for each sample.

A Ultraflo® Max is a Endo-beta-glucanase, which hydrolyzes (1,3)- or (1,4)- bonds in beta-D-glucan xylanase, which hydrolyzes (1,4)-beta-D-xylosidic bonds to form xylans, with stated activity 250 FXU-S/g and 700 EGU/g. A volume of 100 mL/m³ was used for each sample.

A Celluclast® 1.5 L is a Cellulase, which hydrolyzes (1,4)-beta-D-glycosidic bonds in cellulose and other beta-D-glucans with a reported activity of 700 EGU/g. A volume of 100 mL/m³ was used for each sample.

The enzymes were tested separately and in combinations, assuming that the matrix is complex and that several groups could be hydrolyzed by the parallel and/or synergistic action of the enzymes.

4.2.4 Enzymatic hydrolysis

For the hydrolysis process, enzymes were added to the samples containing fruits after starch gelatinization. Eight samples were prepared for each of the four fruits (32 assays, with replicates), and one enzyme was added to each sample to verify which enzyme would perform best for each tested fruit biomass.

After the first tests using only one enzyme, the combination of all enzymes in each fruit biomass was tested to verify the joint performance. For the fermentation experiments, only the

enzymes that showed better activity regarding the release of reducing sugars during the hydrolysis of biomass and fruits were used.

Hydrolysis was carried out in 125 mL- Erlenmeyers (working volume of 50 mL) in a incubator with agitation (Tecnal, model TE-421, Piracicaba, Brazil) at a temperature of 50 °C for 180 min. Samples were collected at times zero, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 min to determine the concentration of released reducing sugars

4.2.5 Alcohol fermentation

For alcoholic fermentation, the fruit residues were hydrolyzed only by the enzymes that presented the best results in the enzymatic tests. Fermentation took place using two yeasts, *S. cerevisiae* CAT-1, belonging to the Laboratory of Biochemistry and Bioprocesses of the Uniniversidade de Passo Fundo, and *S. cerevisiae* Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast, kindly donated by Novozymes®.

S. cerevisiae CAT-1 was maintained in test tubes at 4°C in slanted solid media (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose, and 2 % agar). Yeast cells were activated using a pre-inoculum prepared in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of sterile culture medium (1 % yeast extract, 2 % peptone and 2 % glucose). Afterwards, the *S. cerevisiae* CAT-1 yeast cells from the tube with inclined medium were added to the culture medium and kept in a refrigerated incubator with shaking (Tecnal, model TE-421, Piracicaba, Brazil) for 48 h at 30 °C. After yeast activation, 10 % (v/v) of the pre-inoculum was used to inoculate 100 mL of the same culture medium in a 250 mL Erlenmeyer flask, kept in a refrigerated incubator with agitation (Tecnal, model TE- 421, Piracicaba, Brazil) for 10 h (time required for the yeast to be in an exponential growth phase).

S. cerevisiae Angel Thermal Resistance Alcohol Yeast was activated by adding 0.1 g of dry, stable and concentrated form of the yeast in 100 mL of water, at a concentration of 100 g/L in a thermostated bath (Tecnal, TE- 2005, Brazil) at 35 °C, for 30 minutes. The hydrolyzed fruit biomass had sterilized in an autoclave at 121°C for 20 min, cooled and subjected to fermentation with the two yeasts separately. Inoculation was performed using 10 % (v/v) yeast inoculum. Fermentation was carried out in a 500 mL Erlenmeyer flask with a useful volume of 250 mL at 30°C in an incubator without agitation (P.H.D, model IA0H125, Piracicaba, Brazil). This process was performed under anaerobic conditions. Samples were collected at time zero and every 12 h to determine the concentrations of reducing sugars (RS) and ethanol. The duration

of the process was 72 h. Fermentation was conducted according to [27] in an oven at a temperature of 30°C and without stirring.

4.2.6 Analytical methods

4.2.6.1 Determination of reducing sugars

Before the determinations of RS in each sample, proteins were removed using the methodology described by [28], where 0.4 mL of Carrez solutions I and II (15 % potassium ferrocyanide solution and 30 % zinc sulfate solution, respectively) were added to each sample of hydrolyzed fruits containing 1 mL, in order to precipitate them. Distilled water was then added to the sample to a total volume of 25 mL, followed by centrifugation at 1320g for 5 min (Eppendorf Centrifuge 5810). Filtration was then performed, and 1 ml of the filtrate was used to determine the concentration of the reducing sugars

Reducing sugars (RS) were measured by the colorimetric method with 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS), as described by [29], using a standard curve obtained from an anhydrous glucose stock solution. All measurements were performed in triplicate.

4.2.6.2 Ethanol

The fermented samples were distilled in a benchtop microstill (Tecnal, model TE-012), and the recovered ethanol was analyzed using the acid potassium dichromate method at 600 nm [30].

4.2.6.3 Reducing sugars to ethanol conversion

The results conversion of RS to Ethanol was obtained in each fermentation test, by the conversion factor from RS to P ($Y_{P/RS}$ in g/g) and the volumetric productivity in P (Q_P in g/L.h) were calculated using Equations (1) and (2), respectively [50].

$$Y_{P/RS} = \frac{P_f - P_0}{RS_0 - RS_f} \quad (1)$$

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (2)$$

4.2.7 Data treatments

All experiments were performed in duplicate, and the results are presented as the mean \pm standard deviation. Data were treated and evaluated by analysis of variance with a confidence level of 95 %, with further analysis using the Tukey test using the Statsoft software (Statistica 7.0, StateSoft Academic Solution, São Paulo, SP, Brazil).

4.3 Results and discussion

4.3.1 Enzymatic hydrolysis of fruit biomass

Figure 1 shows the concentration of reducing sugars over time for each enzymatic treatment applied to biomass from fruit waste.

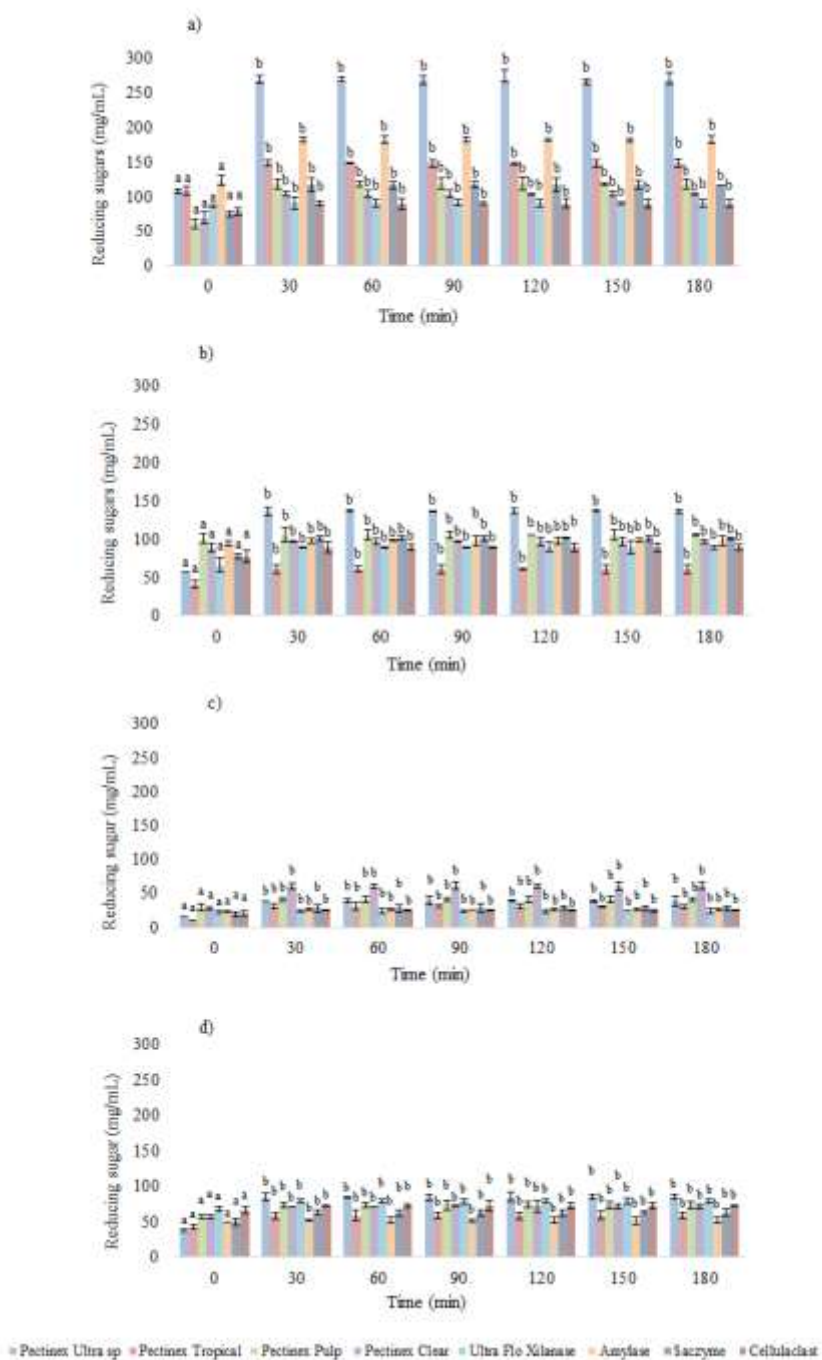


Figure 1: The levels of reducing sugars (RS) along time of hydrolysis for each fruit biomass with different enzymes. (a) banana; (b) apple; (c) mango; (d) papaya.

A higher concentration of reducing sugars was obtained with banana biomass using the enzyme Pectinex Ultra SP-L. The banana biomass had an initial concentration of RS of 109.39 mg/mL and after the hydrolysis the concentration of RS reached 268.08 mg/mL. Pectin is the second most important structural component of bananas that affects their mechanical, structural,

and functional properties causing firmness. It is a complex carbohydrate with homogalacturonon chains (smooth regions) and rhamnogalacturonan regions (hairy regions) [31]. The insoluble dietary fiber components present in 100 g of bark of banana are cellulose (18.7 g), hemicellulose (20.3 g) and lignin (16.8 g) [55], while pectin (15.9 g / 100 g) is a component of dietary fiber soluble [56]. As banana ripening advances, more soluble pectin is generated [32]. We added whole banana (peel and pulp) in the advanced stage of ripening to the hydrolysate. In the high stage of ripening, the pectin content in the peel is lower and pectin is more soluble, making facilitating enzymatic hydrolysis. In addition, pectin is soluble in water and acid media [31] and the pH was adjusted to 4.5 to facilitate hydrolysis. Furthermore, we also tested others pectinases (Pectinex tropical, Pectinex Pulp, and Pectinex Clear) and these enzymes did not produce higher concentration of reducing sugars compared to Pectinex Ultra SP-L. However, the other pectinases act on 4-deoxy-6-O-metil-alfa-D-galacto-4-enurosonil (Pectinex Ultra Tropical) and (1,4)-alfa-Dgalacturonana methyl ether (Pectinex Ultra Pulp), and is expected that pectin is approximately 65 % in the form of homogalacturonan and only 20 - 35 % in other forms. Thus, the Pectinex Ultra SP-L enzyme is more specific for the hydrolysis of banana biomass, whic has pectin as the major carbohydrate in the homogalacturonan form.

Árias et al. [33] reported that pectin in banana peels can be extracted by approximately 54 % in dry mass (or 10 % in wet basins). Thus, pectin in banana biomass is a potential substrate for generating sugars for further fermentation, and our hydrolysis results show that pectin esterase can generate high concentrations of RS.

Another highlighted result was the hydrolysis of banana biomass by amylase. After hydrolysis, the biomass had an RS concentration of 181 mg/ml. However, the substrate of the amylase (starch) is higher in unripe bananas - approximately 70 - 80 % [19] and is reduced to less than 1 % in overripe bananas [34]. However, the starch content of the banana biomass was sufficient to achieve a high concentration of reducing sugars after hydrolysis.

The pretreatment of apple biomass with Pectinex Ultra SP-L produced the higher concentration of RS (150.22 mg/mL) after 180 min of hydrolysis when compared to the other enzymes utilized. However, the initial concentration of RS in apple biomass was lower than that for banana biomass, and thus, the final concentration of RS in apple was lower than that in banana biomass. Pectin is a major multifunctional component usually found in association with other structural constituents such as cellulose and lignin present in the cell walls of plants [35], including apples. The cellulose concentration in apple is 20.4% (glucan content), hemicelluloses 30.8% (xylan, araban, rhamnosan and polygalacturonan), lignin is 13.2% and ash content 0.9%, being the pectin in the range of 0.5% to 1.6% [36], [61] and the

current technology to produce apple juice already includes an enzymatic treatment of the cell walls to increase the extraction yield, reducing sugars, soluble dry matter content, and galacturonic acid [37]. In addition, the initial presence of free sugars makes apple waste a potential biomass for the production of bioproducts [24], including bioethanol. [38] applied a pretreatment of apple biomass to release sugars for the production of bioethanol. The pretreatment included heating followed by acidification with citric acid and further enzymatic treatment using CellicCTec®2 (a mixture of cellulase, β -glucosidases, and hemicellulases) and Viscozyme® L (a mixture of beta-glucanases, pectinases, hemicellulases, and xylanases). The apple hydrolysate contained 153 g/L of RS. In contrast, we used only one enzyme, and obtained a similar concentration of 150.22 mg/L RS. This yield indicates that apple biomass can be used to produce bioethanol. Apple waste is a good source of biomass. Several studies have used apple pomace to produce bioethanol. Different strategies have been proposed to improve ethanol production, such as the combination of heating and enzymatic hydrolysis of lignocellulose material [38], removal of lignin using organosolv [23] or direct fermentation of cocultures [24]. However, all strategies to release sugars and further fermentation are still conducted at the laboratory scale, as the final concentration of ethanol is not enough to compete with first generation ethanol production. Therefore, further studies are necessary to improve the production steps.

The hydrolysis of mango biomass produced three times the initial concentration of RS using Pectinex Clear and Saczyme enzymes. The initial RS concentration was approximately 20 mg/mL, and after 180 min of hydrolysis, the value was 59 mg/mL. The sugar released was only 10.7 % of the initial mass of mango biomass. These enzymes use different substrates to produce free sugar, Pectinex Clear acts on the (1,4)- α -D-galacturonic acid chain, and Saczyme is a glucoamylase acting on (1,4)- and (1,6)- α -D-glucose at the non-reducing ends of polysaccharides. We used both peel and pulp of mango, and the peel comprised 46 % cellulose, 25 % lignin, 32 % pectin and 28 % hemicellulose [22], [62], [63]. However, the enzyme Cellulacast released only 14 mg/mL of RS after 180 min of hydrolysis. [22] performed an alkaline pretreatment to remove lignin before the enzymatic reaction with cellulase to release 58 mg/mL of glucose from mango peel, but 24 h were necessary to achieve this concentration. Thus, the use of pulp and peel wastes from mangoes can be a good source to obtain sugars for fermentation, as only 180 min was sufficient to generate a similar concentration.

Two pectin esterases (Pectinex Ultra SP-L and Pectinex Clear) and glucoamylase (Saczyme) increased the initial concentration of sugars from ~50 to ~90 g/L in papaya biomass.

Papaya peel is rich in pectin, consists of low methyl-esterified, linear Ca^{2+} -cross-linked homogalacturonan with high molar mass pectin, and can be a potential source of this polysaccharide [10, 21]. In addition, the cell-wall of papaya is a good source of pectin, as it constitutes of 35 % pectin, 30 % cellulose, 30 % hemicellulose, and 5 % protein [39]. Thus, this polysaccharide could be a source of sugar after the action enzymatic hydrolysis using esterases of pectin. However, we did not observe the release of sugars following hydrolysis with a cellulase (Celluclast). Comparing the three enzymes, Pectinex Ultra SP-L required only 60 min to hydrolyze and to reach the maximum concentration of RS, and both Saczyme and Pectinex Clear required 120 min and 180 min, respectively, to reach the same concentration of RS. [40] crushed papaya waste to produce bioethanol without any pretreatment in a waste:water ratio of 3:1, and the concentration of soluble solids was 4.02 %. On the other hand, our enzymatic treatment produced twice this value, as the concentration of RS was approximately 90 mg/mL. Thus, enzymatic treatment can be an alternative to increase the yield of bioethanol production from papaya wastes, as the enzymes Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Clear, and Celluclast produced high concentrations of RS. Figure 2 shows the rate of hydrolysis over time for each fruit using the different enzymes.

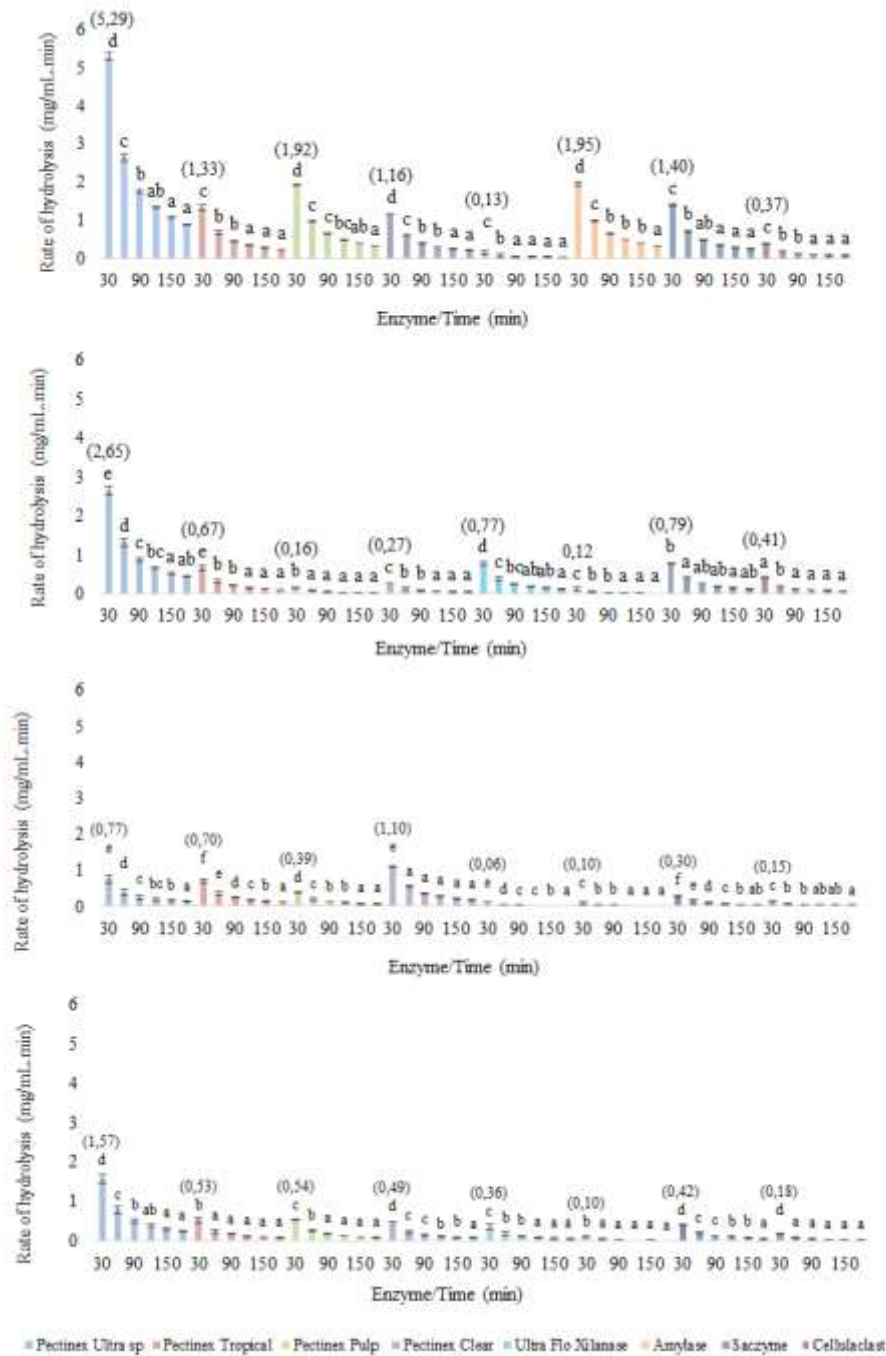
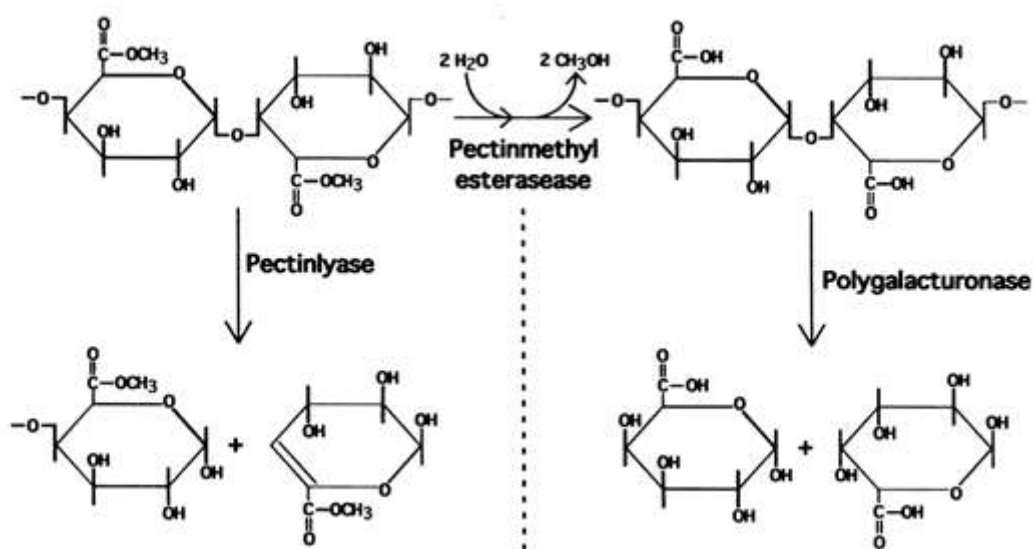


Figure 2: Rate of hydrolysis for the release of reducing sugars from each fruit biomass with different enzymes. (a) banana; (b) apple; (c) mango; (d) papaya.

The Pectinex Ultra SP-L enzyme showed high conversion rates in fruit biomass, except for mango. The conversion rate was higher than 5 mg/mL.min in the banana biomass at the beginning of hydrolysis. The concentration of reducing sugars increased from 109 mg/mL to 268 mg/mL in 30 min (Figure 1). Subsequently, the concentration of RS was stable, and thus,

the rate of hydrolysis decreased with time. Pectinex Ultra SP-L is a polygalacturonase, and the simplified mechanism of pectin hydrolysis is shown in Figure 3. Banana peel is a good source of pectin [41] and its hydrolysis generates sugars for fermentation. In addition, homogalacturonan is the major pectin form in the cell walls of plants [31]. Thus, it is expected that Pectinex Ultra SP-L produces more sugars than other pectin esterases that hydrolyze pectin by the de-esterification of methoxylated galacturonic acid (Pectinex Ultra Pulp and Pectinex Ultra Tropical).



Source: [54]

Figure 3. Different types of pectinases and their action mechanisms on pectin substrates.

Pectin is usually found in association with other compounds, such as cellulose, lignin, or polyphenols, present in the cell walls of plants [31]. The association with other cell wall compounds can impair the access of the enzyme to its substrate, and reduce the production of sugars. Some studies [42, 43] have applied an alkaline pretreatment in mango fruit to decrease the degree of polymerization and crystallinity of the biomass, swell fibers, and disrupt the lignin structure. We preferred the direct application of enzymes as sustainability points to a lower application of chemical treatment in the biomass, but the release of sugars was not high. Mango stem bark is a source of lignocellulosic material as it comprises 46.8 % cellulose (estimated as glucan), 28.1 % hemicellulose, and 23.2 % lignin [43]. However, the Celluclast enzyme (a cellulase) did not release enough sugars for further fermentation, as we used both pulp and peel from mango and did not perform alkaline pretreatment.

The rate of hydrolysis using apple biomass was the second-best for generating RS. The best productivities were achieved by two pectin esterases (Pectinex Ultra SP-L and Pectinex Ultra Clear). In fact, pectin esterases are well known enzymes to hydrolyze pectin in the apple matrix as the clarification of apple juice involves the treatment with a mixture of polygalacturonases, pectinase and glucoamylase for 100 min at 55°C followed by ultrafiltration (UF) using tubular membranes of molecular weight cut-off (MWCO) of 100 kDa [44]. Our enzymatic treatment confirmed the efficiency of pectinases to release reducing sugars from apple biomass.

The Ultraflo Max enzyme (an endo-beta-glucanase) also produced reducing sugars, but the hydrolysis rate was lower than that of pectin esterases, as the concentration of homogalacturonan is higher in the fruits than beta-glucans.

Although fruit residues are characterized as biomass composed of cellulose, hemicellulose, and lignin, which can be used for the production of second-generation biofuels, they present some particularities in their chemical composition, which is important for the enzymatic hydrolysis process. Bananas, apples, mangoes and papayas are composed of pectin, fiber, starch, protein and total reducing sugars, such as fructose, sucrose and glucose [45, 23, 46, 47] and each enzyme acts on different substrates.

The hydrolysis of bananas using the enzyme Pectinex Ultra SP-L was the best condition for obtaining RS. Furthermore, the enzyme Pectinex Ultra SP-L was also the best enzyme to hydrolyze apple and papaya biomass. Thus, we performed fermentation with biomass from all fruits. Figure 4 shows the initial, final, and released RS by enzymatic hydrolysis.

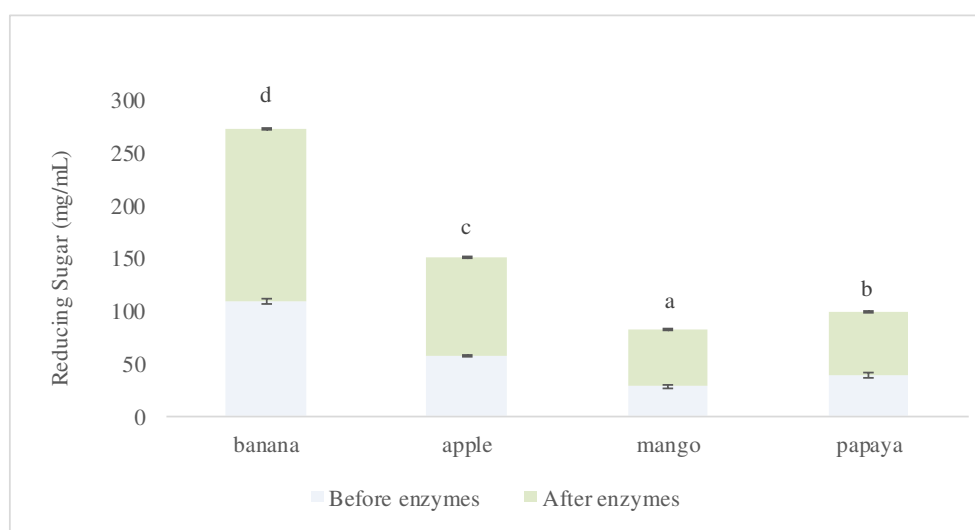


Figure 4: Initial, final, and added concentration of reducing sugars by the enzymatic hydrolysis with the Pectinex Ultra SP-L in biomass from banana, apple, and papaya and with Pectinex Ultra Clear in the biomass from mango.

Simultaneous hydrolysis with the eight enzymes for each fruit biomass did not show better results in relation to the tests carried out with individual enzymes. Figure 5 shows the results of the enzymatic hydrolysis performed with the mixture of eight enzymes, tested for the hydrolysis of each fruit biomass.

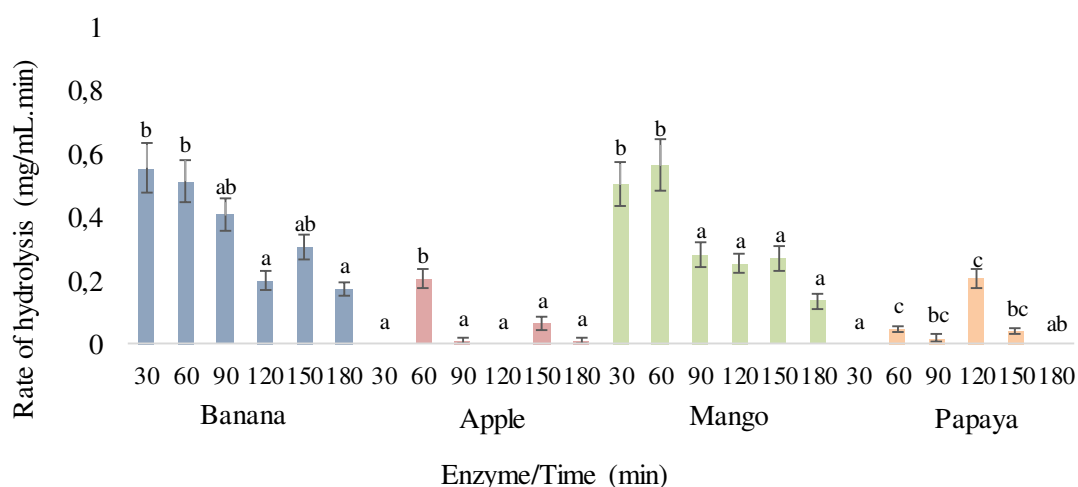


Figura 5: Rate of hydrolysis using a mixing of enzymes in each fruit biomass.

The maximum results occurred with the banana biomass, producing 0.62 mg/mL.min in 30 min, which is statistically equal to that obtained in 60 min (0.52 mg/mL.min) and the amount of available RS went from 108.84 mg/mL to 127.48 mg/mL. This result was lower than that obtained in banana biomass exclusively by the enzyme Pectinex Ultra SP-L, which increased from 109.39 mg/mL to 268.08 mg/mL, that is, 5.29 mg/mL.min, this case may have occurred due to the competition for the substrate that one enzyme can cause the other, which could have been solved by supplementation or increased biomass concentration [66].

Another alternative would be the use of pretreatment techniques to soften the crystalline structure of the biomass before enzymatic hydrolysis. Enzymatic systems containing cocktails of several hydrolytic enzymes are efficient for the complete and simultaneous hydrolysis of all carbohydrates in several raw materials for the production of second generation bioethanol, but before that the biomass must pass through the pretreatment stage, making it more accessible for enzymatic hydrolysis [67].

4.3.2 Production of bioethanol from hydrolyzed fruit biomass

Afterwards, banana, apple, mango, and papaya biomass was hydrolyzed by the enzyme Pectinex Ultra SP-L and subjected to fermentation with two yeast strains to evaluate the production of bioethanol: *S. cerevisiae* CAT-1 and *S. cerevisiae* Angel. Figure 6 shows the concentrations of RS and ethanol over the course of the fermentation, and Table 1 shows the ethanol yields and ethanol productivity. In general, banana waste produced higher ethanol concentrations (28 – 31 g/L) and higher productivity (0.442 g/L.h), and papaya produced low ethanol concentrations (9 – 12 g/L). However, mango waste showed a higher ethanol yield with regard to sugar consumption.

Lignocellulosic fruit biomass can generate non-fermentable sugars in the hydrolysis process, such as pentoses, in addition to hexoses. Pentoses are also reducing sugars but not always possible to be fermented by common yeasts like *S. cerevisiae*. Also being a side effect of the pre-treatment applied to these biomasses, the formation of inhibitory by-products, such as furfural. Cofermentation of pentose and hexose is considered the first and most important prerequisite for economically viable conversion of ligno-cellulosic biomass to ethanol. However, lack of robust organisms or fermentation process to convert both hexose and pentose efficiently compromises the overall fermentation performance [64, 65, 66, 67].

Both yeasts (*S. cerevisiae* Angel and *S. cerevisiae* CAT-1) used to the fermentation of the hydrolyzed biomass produced ethanol. However, there was no optimal strain for all fruit biomasses. Similar concentrations of ethanol were produced by both strains using banana and mango biomass (Figures 6-a and 6-c). The CAT-1 strain produced more ethanol from apple biomass, and the Angel strain produced more ethanol from papaya biomass. Thus, there was no standard behavior regarding ethanol yield.

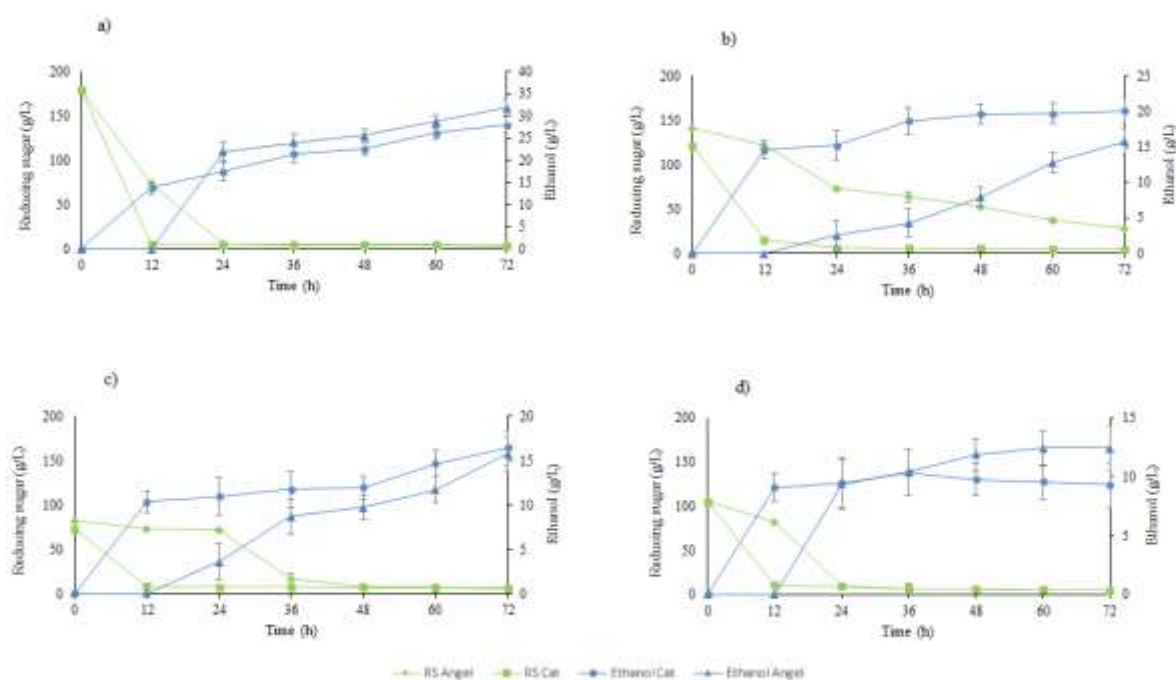


Figure 6. Concentration of RS and ethanol generated by both yeasts (Angel and Cat) with time in the fermentation of hydrolyzed biomass from (a) banana; (b) apple; (c) mango; (d) papaya.

Table 1: Fermentation kinetics data at the beginning and end of the process.

Assay	t_f (h)	RS_0 (g/L)	RS_f (g/L)	P_0 (g/L)	P_f (g/L)	Q_p (g/L.h)	$Y_{P/RS}$ (g/g)
S. Cerevisae CAT 1							
Banana	72	179.69±5.31 ^d	3.28±1.77	0.02±0.01	28.02±1.87 ^c	0.388±0.02	0.159±0.01
Apple	72	121.74±4.49 ^c	4.83±1.66	0.02±0.01	20.11±1.24 ^d	0.279±0.01	0.172±0.01
Mango	72	73.05±4.25 ^a	5.32±1.35	0.01±0.01	16.42±1.87 ^c	0.228±0.01	0.242±0.01
Papaya	72	105.36±6.22 ^b	4.66±1.23	0.01±0.00	9.34±1.99 ^a	0.129±0.01	0.093±0.01
S. Cerevisae Angel							
Banana	72	179.69±5.31 ^d	4.67±1.98	0.03±0.02	31.87±2.23 ^f	0.442±0.03	0.182±0.02
Apple	72	121.74±4.49 ^c	28.18±2.45	0.01±0.01	15.80±1.69 ^c	0.219±0.01	0.169±0.02
Mango	72	73.05±4.25 ^a	5.98±1.32	0.01±0.01	15.77±2.45 ^c	0.219±0.01	0.235±0.02
Papaya	72	105.36±6.22 ^b	4.47±1.13	0.01±0.01	12.40±1.72 ^b	0.172±0.01	0.123±0.01

*Equal letters among the different tests indicate no significant difference by the Tukey test with 95 % confidence.

The banana biomass produced higher concentrations of ethanol. The initial RS concentration of 151.9 mg/mL increased after hydrolysis to 359.08 mg/mL. The strain Angel used 97 % of RS and produced 31.87 g/L of ethanol whereas the CAT-1 produced 28.02 g/L. The yeast *CAT-1* consumed 98 % of RS, and most of sugars were used in the first 12 h of fermentation. If the global production of banana is approximately 114 million tons [48, 49] it

is estimated that 460 kg of banana per ton is rejected. Therefore, banana waste has the potential to produce 3.3 billion liters of ethanol. A total of 7.1 million tons of bananas were produced in Brazil in 2020 [50], and there is potential to produce 200 million liters of ethanol per year.

[50] used banana waste composed of a mixture of pulp, peel, and pseudostem in a proportion of 1:2:10 to produce ethanol. They used acid and enzymatic processes with the application of cellulose and hemicellulose, and the biomass contained 150 g/L of RS. After the fermentation, similar to our results, the broth contained 37.8 g/L of ethanol, but the higher concentration of ethanol was reached after 48 h of fermentation. [48] suggested that the minimum concentration of ethanol should be 40 g/L to reduce the cost of the distillation step. As we used a ratio of 1 g/g (biomass to water) for hydrolysis, we believe that a slight adjustment in the ratio of biomass to water can be done to reach a concentration of 40 g/L, and, thus, reduce the cost.

The hydrolyzed apple biomass produced 20.11 g/L of ethanol using *S. cerevisiae* Angel and the consumption of sugars was 96 %. On the other hand, the *CAT-1* strain produced 15.80 g/L of ethanol, and the consumption of RS was only 76 %. Thus, the performance of different strains of *S. cerevisiae* can vary for the same substrate, and different ethanol yields can be obtained. [38] studied apple pomace as a biomass to produce bioethanol. After pretreatment by heating and enzymatic hydrolysis of lignocellulose material, the consumption of RS was 84 % and the ethanol concentration was 51 g/L after 72 h of fermentation by *S. cerevisiae* Ethanol Red® with a yield of 0.398 g of ethanol for each gram of sugar consumed. However, the xylose released during the hydrolysis of lignocellulosic biomass cannot be used by *S. cerevisiae*; therefore, some studies have focused on the application of cocultures using *S. cerevisiae* and filamentous fungi such as *Trichoderma* and *Aspergillus* species to produce bioethanol [24]. In addition, approximately 10 % of the fermented sugars are consumed by the microorganisms for cell mass synthesis, yeast maintenance, and side reactions that produce lactic acid, acetic acid, and glycerol [51]. Thus, the search for high productivity and high ethanol concentration must continue, as different fruit wastes can be used as substrates, and different microorganisms can be used for fermentation.

The fermentation of hydrolysed mango fruit by both strains of *S. cerevisiae* produced approximately 15 and 16 g/L of ethanol, and the RS consumption was 91 - 92 %. Several studies have been conducted to produce bioethanol from mango waste. [52] produced a fermented broth by *S. cerevisiae* with 15 % (v/v) of ethanol using mango waste. [43] dried mango stem bark residues and applied alkaline pretreatment to the waste. After fermentation with *S. cerevisiae* using simultaneous saccharification and fermentation, the authors reported an ethanol

concentration of 43 g/L and a productivity of 0.914 g/L/h. [53] supplemented mango waste with leachate from vermicomposting to add nutrients to the broth and produced 44 g/L of ethanol after fermentation. We did not add any nutrient supplements as we focused on the application of fruit waste without the addition of chemicals, but the enzyme treatment.

Hydrolyzed papaya waste produced the lowest concentration of ethanol. *S. cerevisiae* CAT-1 consumed 95 % of RS, but the concentration of ethanol in the fermented broth was only 9.32 g/L. *S. cerevisiae* Angel consumed 95 % of RS and produced 12.40 g/L of ethanol. [40] tested the direct fermentation of several fruit wastes, such as banana, apple, papaya, and orange, to produce bioethanol. The authors identified that banana has a higher concentration of soluble solids (10.32 Brix) and produced the highest concentration of ethanol (12 % v/v). However, using chromatography, the authors identified several co-generated products, including acetaldehyde, acetone, methanol, ethyl acetate, propanol, isobutanol, isoamyl acetate, and isoamyl alcohol. Acetaldehyde is a byproduct of fermentation and can be used to generate high alcohols, such as propanol, isobutanol, and isoamyl alcohol.

4.4 Conclusions

Banana, apple, mango, and papaya residues, which are unsuitable for human consumption, were subjected to enzymatic hydrolysis and fermentation to produce bioethanol. Several commercial enzymes were tested for the hydrolysis of fruit waste, but pectin esterase was the best enzyme to release reducing sugars from biomass. The enzyme Pectinex Ultra SP-L doubled the initial concentration of reducing sugars from all fruit biomass, achieving 257 mg of reducing sugar per milligram of bananabiomass.

Both yeast strains of *S. cerevisiae* (CAT-1 and Angel) produced ethanol by fermentation of reducing sugars from fruit biomass. Fermented hydrolyzed banana waste generated 30 g/L ethanol.

Banana biomass was highlighted both for the yield of reducing sugars and for the generation of bioethanol, showing the potential of this residue for this purpose, considering the availability in which it is found.

REFERENCES

- 1 Saravanan A, Kumar PS, Jeevanantham S, Karishma S, V DVN (2022) Recent advances and sustainable development of biofuel production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 344: 126203.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126203>
- 2 Kumar M, Sun Y, Rathour R, Pandey A, Thakur IS, Tsang DCW (2020) Algae are potential feedstocks for the production of biofuels and value-added products: opportunities and challenges. *Science of The Total Environment* 716: 137116.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137116>
- 3 Pocha, CKR, Chia, SR, Chia WY, Koyande AK, Nomanbhay S, Chew KW (2022) Utilization of agricultural lignocellulosic wastes for biofuels and green diesel production. *Chemosphere* 290: 133246.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133246>
- 4 Lin CY, Lu C (2021) Development perspectives of promising lignocellulose feedstocks for the production of advanced generation biofuels: a review. *Review of renewable and sustainable energy* 136: 110445.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110445>
- 5 Hingston ST, Noseworthy TJ (2020) On the epidemic of food waste: Idealized prototypes and aversion to misshaping fruits and vegetables. *Food quality and preferences* 86: 103999. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.103999>
- 6 Panahi HKS, Dehghani M, Guillemain GJ, Gupta VK, Lam SS, Aghbashlo M, Tabatabaei M (2022) Bioethanol production from carbohydrate-rich food waste. *Current Opinions on Food Science* 43: 71-81.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.001>
- 7 ABRAS - Associação Brasileira de Supermercados (2021).
<https://www.abras.com.br/>. Accessed 01 October 2022.
- 8 Sagar NA, Pareek S, Sharma S, Yahia EM, Lobo MG (2018) Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 512-531.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- 9 Banerjee J, Singh R, Vijayaraghavan R, MacFarlane D, Patti AF, Arora A (2017) Bioactives from fruit processing waste: green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry* 225: 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>
- 10 Koubala BB, Christiaens S, Kansci G, Loey AMV, Hendrickx ME (2014) Isolation and structural characterization of papaya peel pectin. *Food Research International* 55: 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.009>
- 11 Esparza I, Jiménez-Moreno N, Bimbela F, Ancín-Azpilicueta C, Gandía LM (2020) Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *Journal of Environmental Management* 265: 110510.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110510>
- 12 Conesa C, Seguí L, Laguarda-Miró N, Fito P (2016) Microwaves are a pretreatment method for enhancing the enzymatic hydrolysis of pineapple industrial waste for bioethanol production. *Food and bioproduct processing* 100: 203-213.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.07.001>
- 13 Musci JJ, Montaña M, Rodríguez-Castellón E, Lick ID, Casella ML (2020) Selective aqueous-phase hydrogenation of glucose and xylose over ruthenium-based catalysts: Influence of the support. *Molecular Catalysis* 495: 111150.
<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.111150>

- 14 Rempel A, Biolchi GN, Antunes ACF, Gutkoski JP, Treichel H, Colla LM (2021) Cultivation of microalgae in media containing emergent pollutants and effects on growth, chemical composition, and use of biomass for enzymatic hydrolysis. *BioEnergy Research* 14: 265-277. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10177-w>
- 15 Chitranshi R, Kapoor R (2021) Utilization of over-ripened fruit (waste fruit) for the eco-friendly production of ethanol. *International Journal of Plant Research* 33: 270-276. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00185-8>
- 16 Bayar N, Bouallegue T, Achour M, Kriaa M, Bougatef A, Kammoun R (2017) Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food chemistry* 235: 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.029>
- 17 Rekha B, Saravanathamizhan R (2021) Preparation and characterization of biomass-based nanocatalysts for hydrolysis and fermentation of catalytic hydrolysates to bioethanol. *Biomass conversion and biorefineries* 20: 01207. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01207-w>
- 18 Koupaie EH, Dahadha S, Lakeh AB, Azizi A, Elbeshbishy E (2019) Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production: a review. *Journal of Environmental Management* 233: 774-784. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.106>
- 19 Zabed HM, Akter S, Yun J, Zhang G, Awad FN, Qi X, Sahu JN (2019) Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 105: 105-128. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>
- 20 Fakayode OA, Akpabli-Tsigbe NDK, Wahia H, Tu S, Ren M, Zhou C, Ma H (2021) Integrated bioprocess for bioethanol production from watermelon rind biomass: Ultrasound-assisted deep eutectic solvent pretreatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation. *Renewable Energy* 180: 258-270. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.08.057>
- 21 Abdulla R, Derman E, Ravintaran PT, Jambo SA (2018) Fuel ethanol production from papaya waste using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Sanrem* 11: 112-123. <http://drs.nio.org/drs/handle/2264/5162>
- 22 Nieves DC, Ruiz HA, Cárdenas LZ, Alvarez GM, Aguilar CN, Ilyina A, Hernández JLM (2016) Enzymatic hydrolysis of chemically pretreated mango stem bark residues at high solid loading. *Industrial Crops and Products* 83: 500-508. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.079>
- 23 Borujeni NE, Karimi K, Denayer JFM, Kumar R (2022) Apple pomace biorefinery for ethanol, mycoprotein, and value-added biochemicals production by *Mucor indicus*. *Energy* 240: 122-469. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.122469>
- 24 Evcan E, Tari C (2015) Production of bioethanol from apple pomace using cocultures: conversion of agro-industrial waste to value-added products. *Energy* 88: 775-782. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.05.090>
- 25 Dhande DY, Nighot DV, Sinaga N, Dahe KB (2021) Extraction of bioethanol from waste pomegranate fruits as a potential feedstock and its blending effects on the performance of a single-cylinder SI engine. *Renewable Sustainable Energy Reviews* 149: 111-349. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111349>
- 26 Sarkar D, Gupta K, Poddar K, Biswas R, Sarkar A (2019) The direct conversion of fruit waste to ethanol using the marine bacterial strain *Citrobacter* sp. E4. *Process Safety and Environmental Protection* 128: 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.05.051>

- 27 Rempel A, Sossella FS, Margarites AC, Astolfi AL, Steinmetz RLR, Kunz A, Treichel H, Colla LM (2019) Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: an energy-efficient approach. *Bioresource Technology* 288: 121588. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121588>
- 28 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- 29 Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- 30 Salik FLM, Povh NP (1993) Electrophotometric method for developing alcohol contents in hydroalcoholic mixtures. In: *Annals of the National Congress of the Society of Sugar and Alcohol Technicians of Brazil* 262-266.
- 31 Mellinas C, Ramos M, Jiménez A, Garrigós MC (2020) Recent trends in the use of pectin from agro-waste residues as a natural biopolymer for food packaging applications. *Materials* 13: 673. <https://doi.org/10.3390/ma13030673>
- 32 Mugampoza D, Gafuma S, Kyosaba P, Namakajjo R (2020) Characterization of Pectin from Pulp and Peel of Ugandan Cooking Bananas at Different Stages of Ripening. *Journal of Food Research* 9: 67-77. <https://doi.org/10.5539/jfr.v9n5p67>
- 33 Árias D, Rodríguez J, Lopez B, Mendez P (2021) Evaluation of the physicochemical properties of pectin extracted from *Musa paradisiaca* banana peel under different pH conditions in the formation of nanoparticles. *Heliyon* 7: 06-059. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06059>
- 34 Phillips KM, McGinty RC, Couture G, Pehrsson PR, McKillop K, Fukagawa NK (2021) Dietary fiber, starch, and sugars in bananas at different stages of ripeness in the retail Market. *PubMed Central* 16: 0253366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253366>
- 35 Noreen A, Nazli ZH, Akram J, Rasul I, Mansha A, Yaqoob N, Iqbal R, Tabasum S, Zuber M, Zia KM (2017) Pectin-functionalized biomaterials: A new viable approach for biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 254-272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029>
- 36 Canteri MHG, Moreno L, Wosiacki G, Scheer AP (2012) Pectin: from raw material to final product. *Polímeros* 22: 149-157. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000024>
- 37 Sharma HP, Sugandha, HP (2017) Enzymatic extraction and clarification of fruit juices: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57: 1215-1227. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.977434>
- 38 Molinuevo-Salces B, Riaño B, Hijosa-Valsero M, González-García I, Paniagua-García AI, Hernández D, Garita-Cambronero J, Díez-Antolínez R, García-González MC (2020) Valorization of apple pomace for biofuel production: A biorefinery approach. *Biomass and Bioenergy* 142: 105785. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105785>
- 39 Brasil IM, Gomes C, Puerta-Gomez A, Castell-Perez ME, Moreira RG (2012) Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. *LWT - Food Science and Technology* 47: 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.005>
- 40 Da Silva JM, Pereira NF, De Campos DVB, Izolani AO, Carraro VM, Cardoso CE, Pereira, CSS (2018) Study of the Fermentation Process of Different Fruit Biomasses. *Teccen* 11: 58-64. <https://doi.org/10.21727/teccen.v11i2.1331>

- 41 Maneerat N, Tangsuphoom N, Nitithamyong A (2017) Effect of extraction conditions on the properties of pectin from banana peels and its function as a fat substitute in salad cream. *Journal of Food Science and Technology* 54: 386–397. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2475-6>
- 42 Camesasca L, Ramírez MB, Guigou M, Ferrari MD, Lareo C (2015) Evaluation of dilute acid and alkaline pretreatments, enzymatic hydrolysis, and fermentation of napiergrass for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 74: 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.01.017>
- 43 Carrillo-Nieves D, Ruiz HA, Aguilar CN, Ilyina A, Parra-Saldivar R, Torres JA, Hernández JLM (2017) Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues. *Bioresource Technology* 239: 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.131>
- 44 Ramos-Aguilar AL, Victoria-Campos CI, Ochoa-Reyes E, Ornelas-Paz JJ, Zamudio-Flores PB, Rios-Velasco C, Reyes-Hernandez J, Perez-Martínez JD, Ibarra-Junquera V (2017) Physicochemical properties of apple juice during sequential steps of industrial processing and functional properties of pectin fractions from the generated pomace. *LWT Food Science and Technology* 86: 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.030>
- 45 Emaga TH, Andrianaivo RH, Wathélet B, Tchango JT, Paquot M (2007) Effects of maturation stage and variety on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry* 103: 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006>
- 46 Arora A, Banerjee J, Ranganathan V (2018) Process design and techno-economic analysis of an integrated mango-processing waste biorefinery. *Industrial Crops and Products* 116: 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.061>
- 47 Cypriano DZ, Silva LL, Tasic L (2018) High-value-added products from orange juice industrial waste. *Waste management* 79: 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.028>
- 48 Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2018) The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. *Fuel* 174: 114170. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.10.105>
- 49 Santos SF, Cardoso RCV, Borges IMP, Almeida AC, Andrade ES, Ferreira IO, Ramos LC (2020) Post-harvest losses of fruits and vegetables in supply centers in Salvador, Brazil: analysis of determinants, volumes, and reduction strategies. *Waste Management* 101: 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.007>
- 50 Uchôa PZ, Porto RCT, Battisti R, Marangoni C, Sellin N, Souza O (2021) Ethanol from residual biomass of banana harvest and commercialization: A three-waste simultaneous fermentation approach and a logistic-economic assessment of the process scaling-up towards a sustainable biorefinery in Brazil. *Industrial Crops & Products* 174: 114170. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114170>
- 51 Ballesteros M, Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by simultaneous saccharification and fermentation (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* 39: 1843–1848. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>
- 52 Saifuddin M, Khandaker MM, Hossain ABMS, Jahan S, Mat NB, Boyce AN (2014) Bioethanol Production from Mango Waste (*Mangifera indica* L. cv chokanan): Biomass as Renewable Energy. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 8: 229–237. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- 53 Aleman-Ramirez JL, Pérez-Sariñana BY, Torres-Arellano S, Saldaña-Trinidad S, Longoria A, Sebastian PJ (2020) Bioethanol production from Ataulfo mango

- supplemented with vermicompost leachate. *Catalysis Today* 353: 173-179.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2019.07.028>
- 54 Diano N, Grimaldi T, Bianco M, Rossi S, Gabrovska K, Yordanova G, Godjevargova T, Grano V, Nicolucci C, Mita L, Bencivenga U, Canciglia P, Mita DG (2008) Apple juice clarification using immobilized pectolytic enzymes in packed or fluidized bed reactors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11477. <https://doi.org/10.1021/jf8019437>
 - 55 Oberoi HS, Sandhu SK, Vadlani PV (2012) Statistical optimization of hydrolysis process for banana peels using cellulolytic and pectinolytic enzymes. *Food and Bioproducts Processing* 90: 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.05.002>
 - 56 Oliveira TIS, Morsyleide FR, Cavalcante FL, Pereira PHF, Moates GK, Wellner N, Mazzetto SE, Waldron KW, Azevedo HMC (2016) Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry* 198: 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080>
 - 57 Cheng Y-S, Mutrakulcharoen P, Chuetor S, Cheenkachorn K, Tantayotai P, Panakkal EJ, Sriariyanun M (2020) Recent Situation and Progress in Biorefining Process of Lignocellulosic Biomass: Toward Green Economy. *Applied Science and Engineering Progress* 13: 299-311. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2020.08.002>
 - 58 Sriariyanun M, Heitz JH, Yasurin P, Asavasanti S, Tantayotai P (2019) *Itaconic Acid: A Promising and Sustainable Platform Chemical?* *Applied Science and Engineering Progress* 12: 75-82. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2019.05.002>
 - 59 Rachamontree P, Douzou T, Cheenkachorn K, Sriariyanun M, Rattanaporn K (2020) Furfural: A Sustainable Platform Chemical and Fuel. *Applied Science and Engineering Progress* 13: 3-10. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2020.01.003>
 - 60 Panakkal EJ, Kitiborwornkul N, Sriariyanun M, Ratanapoompinyo J, Yasurin P, Asavasanti S (2021) Production of Food Flavouring Agents by Enzymatic Reaction and Microbial Fermentation. *Applied Science and Engineering Progress* 14: 297-312. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2021.04.006>
 - 61 Luo J, Ma Y, Xu Y (2020) Valorization of apple pomace using a two-step slightly acidic processing strategy. *Renewable Energy* 152: 793-798. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.120>
 - 62 Bello F, Chimphango A (2021) Optimization of lignin extraction from alkaline treated mango seed husk by high shear homogenization-assisted organosolv process using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* 167: 1379-1392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.092>
 - 63 Karim R, Nahar K, Zohora FT, Islam MM, Bhuiyan RH, Jahan MS, Shaikh MM (2022) Pectin from lemon and mango peel: Extraction, characterisation and application in biodegradable film. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 4: 100258. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100258>
 - 64 Pornkamol U, Friedrich S 2010 Continuous production of ethanol from hexoses and pentoses using immobilized mixed cultures of *Escherichia coli* strains. *Journal of Biotechnology* 150: 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.08.002>
 - 65 Soares LB, Bonan CIDG, Biazzi LE, Dionísio SR, Bonatelli ML, Andrade ALD, Renzano EC, Costa AC, Ienczak JL (2020) Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. *Biomass and Bioenergy* 137: 105549. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105549>
 - 66 Kai L, Jin-Cheng Q, Chen-Guang L, Feng-Wu B (2016) Optimization of pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation for more efficient ethanol

production by Jerusalem artichoke stalk. *Bioresource Technology* 221: 188-194.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.021>

- 67 Soni SK, Sharma A, Soni R 2023 Microbial Enzyme Systems in the Production of Second Generation Bioethanol. *Sustainability* 15: 3590
<https://doi.org/10.3390/su15043590>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biomassa lignocelulósica como fonte barata e disponível está ganhando popularidade como fonte de açúcares fermentáveis para a produção de combustíveis líquidos. Um dos passos mais caros da produção de bioetanol a partir dessa biomassa é o pré-tratamento, seguido pelo tratamento enzimático. Extensas pesquisas têm sido realizadas para aumentar a recuperação de carboidratos fermentáveis, diminuir os inibidores produzidos pela degradação do açúcar durante o processo de pré-tratamento, diminuir a utilização de materiais químicos e insumos energéticos, produzir subprodutos valiosos e diminuir o custo do processo de bioetanol.

Os resultados obtidos confirmam a eficiência da hidrólise enzimática, como forma de obtenção de açúcares redutores da biomassa de frutas para fermentação alcoólica e obtenção de bioetanol. Conforme estudado por muitos autores, a fermentação direta pode ser eficiente, mas o pré-tratamento enzimático possibilita a liberação de açúcares de cadeias complexas, facilitando a fermentação por leveduras.

Entre as biomassas testadas, a da banana obteve destaque tanto pelo rendimento de açúcares redutores, quanto pela geração de bioetanol, se mostrando um resíduo em potencial para esse fim, levando em conta também a disponibilidade em que se encontra.



UPF
UNIVERSIDADE
DE PASSO FUNDO

UPF Campus I - BR 285, São José
Passo Fundo - RS - CEP: 99052-900
(54) 3316 7000 - www.upf.br