



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**CAMPUS ERECHIM**  
**ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

**JESSICA ZANIVAN**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO CALDO OBTIDO  
DE UMA MISTURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS UTILIZANDO A LEVEDURA**  
*Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2*

**ERECHIM**

**2020**

**JESSICA ZANIVAN**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO CALDO OBTIDO  
DE UMA MISTURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS UTILIZANDO A LEVEDURA  
*Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na  
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS  
como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.  
Orientadora: Helen Treichel  
Coorientadora: Gislaine Fongaro

ERECHIM

2020

### **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Zanivan, Jessica

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO CALDO  
OBTIDO DE UMA MISTURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS UTILIZANDO A  
LEVEDURA *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 / Jessica  
Zanivan. -- 2020.

25 f.

Orientadora: Doutora Helen Treichel

Co-orientadora: Doutora Gislaine Fongaro

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,  
Erechim, RS, 2020.

1. Bioetanol. 2. Resíduos de frutas. 3. Extração de  
açúcares. 4. Fontes de nitrogênio. 5. Biocombustível. I.  
Treichel, Helen, orient. II. Fongaro, Gislaine,  
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.  
IV. Título.

**JESSICA ZANIVAN**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO CALDO OBTIDO  
DE UMA MISTURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS UTILIZANDO A LEVEDURA  
*Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado como requisito para obtenção de grau de  
Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da  
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 21/09/2020

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dra. Helen Treichel  
Orientadora

---

Prof. Dra. Gislaine Fongaro  
Coorientadora

---

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior  
UFFS

---

Marilia Teresinha Hartmann  
UFFS

## AGRADECIMENTOS

*Bem clichê...*

Agradeço, em primeiro lugar a Deus por ter me guiado pelos melhores caminhos e por ter me permitido chegar até aqui.

À toda minha família é imensurável o sentimento de gratidão. À minha mãe Loreni por suas palavras de amor, apoio e incentivo e ao meu pai Laorindo pelo estímulo, amor e orgulho camuflados no seu jeito durão de ser. Ao Gian por ser esse irmão incrível, por ouvir, aconselhar, rir e chorar comigo. À minha cunhada Maria pelo carinho, compreensão e apoio. Ao meu namorado e companheiro das loucuras da vida, Leonardo, por ser exatamente do jeito que é, pela preocupação, amor, carinho e por sempre acreditar na minha capacidade; e também ao Dudu por ser esse serzinho de luz em minha vida. Gratidão especial aos meus avós Walter e Alzira, à minha tia Isolda e à minha prima Franciele por sempre terem me incentivado a voar!

Agradeço imensamente à família Mulinari por terem sido minha segunda família durante esses 5 anos. Pelos churrascos, cuias de chimarrão, risadas, e também pelas inúmeras velinhas acendidas (e não é que deu certo, vó!). À Karine por ter me suportado em dias que até eu mesma me achava insuportável, pela companhia em dias, noites e finais de semana estudando, por estar comigo nos melhores e nos piores momentos, por ter se tornado essa irmã de vida!

À minha orientadora Helen, que durante esse período tornou-se além de inspiração profissional, uma grande amiga! Gratidão eterna por todo o conhecimento transmitido, pela paciência, amor, carinho, preocupação e por acreditar no meu potencial. À minha coorientadora Gislaine pelo conhecimento repassado, por sua energia contagiante e por ter transformado o nosso laboratório em um lugar ainda melhor (se é que isso é possível!). E por falar em laboratório, meu agradecimento mais que especial a todos os grandes pesquisadores do LAMIBI, por fazerem a ciência acontecer todos os dias! Pela troca de conhecimento, risadas, jantãs, pela ajuda espontânea e por terem tornado meus dias mais leves. Não poderia deixar de registrar um agradecimento especial às minhas grandes amigas e colegas Charline e Thamarys (as meninas do etanol), por tanto terem me ensinado, por tanto terem me auxiliado, pelas indicações de artigos, pela cobrança, leitura e releitura dos trabalhos. À Suzana pelo auxílio, empenho e pela paciência ao realizar a injeção de mais “algumas amostras”.

Agradeço antecipadamente à banca, Prof<sup>a</sup> Marília e Prof<sup>o</sup> Sérgio; tenho certeza que suas contribuições serão de extrema valia para o aperfeiçoamento deste trabalho. A todos os

professores da UFFS pelo conhecimento repassado e principalmente pela paciência ao eu aparecer pela milésima vez em suas salas para tirar dúvidas!

Aos melhores amigos e colegas que a UFFS poderia me dar: Fábio, Natália, Helena, Rafaela, Vinicius e Leonardo. Gratidão por cada trabalho feito com vocês, pelos dias divertidos, pela companhia no RU, biblioteca, visitas técnicas, jantas e festas, enfim, obrigada por estarem comigo em todos os momentos!

A gratidão por todos vocês é maior do que eu consigo colocar em palavras.

*Nada clichê...*

Agradeço a mim mesma por ter me permitido tamanha evolução durante este o período de graduação. Por não ter desistido dos meus sonhos mesmo quando as coisas pareciam não dar certo. Por ter me permitido errar e me perdoar por isso, por ter me tornado a profissional que eu sou hoje, mas principalmente por ter me tornado uma pessoa melhor.

“A vida me ensinou a nunca desistir, nem ganhar, nem perder mas procurar evoluir...”

(CHARLIE BROWN JR, 2005)

## RESUMO

O emprego de resíduos de frutas provenientes do consumo doméstico para a produção de bioetanol é uma perspectiva de inovação que garante o emprego de uma biomassa de baixo custo, gerada em grandes quantidades, e que possui açúcares prontamente disponíveis em sua composição, o que dispensa processos complexos de pré-tratamento e hidrólise do material, assemelhando-se a sistemas de produção de bioetanol de primeira geração. Neste estudo, as condições ideais de extração de açúcares foram determinadas por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, avaliando os efeitos da temperatura e da relação sólido/líquido (S:L) no processo. O caldo extraído nas condições otimizadas foi empregado como meio fermentativo para a produção de bioetanol utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. A influência da suplementação do caldo extraído da mistura de resíduo de frutas também foi investigada com duas diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura e ureia) na produção de bioetanol. Além disso, um estudo preliminar da fermentação alcoólica em um biorreator foi desenvolvido a fim de identificar a possibilidade de ampliação de escala. A condição ideal de extração de açúcares foi determinada utilizando 12% ( $m_{seca} v^{-1}$ ) de uma mistura de resíduos de frutas e agitação mecânica a 100 rpm e 25°C por 5 minutos, conforme resultado do planejamento experimental, e também considerando o volume de caldo obtido pós-filtração. A fermentação sem adição de fonte de nitrogênio resultou em uma produção de bioetanol de  $23,18 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$  em apenas 9 horas de processo fermentativo. Embora a suplementação do caldo de resíduo de frutas com extrato de levedura não tenha aumentado a produção de bioetanol ( $24,72 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ ), a redução do tempo fermentativo em 3 horas é um resultado promissor, por otimizar o processo. Em contrapartida, a adição de ureia ao meio fermentativo resultou em uma menor produção de bioetanol ( $18,31 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$ ), possivelmente ocasionada pelo desvio metabólico das leveduras para a produção de outros biocompostos. O aumento do volume fermentativo em biorreator levou a uma produção de bioetanol ( $20,8 \text{ g L}^{-1}$ ) similar à obtida em frascos, sendo um indicativo positivo da possibilidade de ampliação de escala. Este estudo destaca a potencialidade do uso de resíduos de fruta como um método sustentável a ser explorado na aceleração da cadeia produtiva de bioetanol.

**Palavras-chave:** Biocombustível. Extração de açúcares. Fontes de nitrogênio. Resíduo de fruta. Sustentabilidade.



## ABSTRACT

The use of fruit residues from domestic consumption for bioethanol production is an innovative perspective that guarantees low-cost biomass, generated in large quantities, that have sugars readily available in their composition and do not require complex processes of pretreatment and hydrolysis, resembling first-generation bioethanol production systems. In this study, the ideal conditions for sugar extraction were determined using a Central Rotational Composite Design (CRCD)  $2^2$ , evaluating the temperature and the solid/liquid ratio (S:L) effects on the process. The juice extracted by the optimized conditions was used as a fermentation medium for the bioethanol production using the yeast *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. The supplementation influence of the juice extracted from the fruit residue mixture was also investigated with two different nitrogen sources (yeast extract and urea) in the bioethanol production. Furthermore, a preliminary study of alcoholic fermentation in a bioreactor was developed to identify the possibility of scaling up. The ideal condition for sugars extraction was determined using 12% ( $w_{\text{dried}} v^{-1}$ ) of a fruit residue mixture and mechanical stirring at 100 rpm and 25 ° C for 5 minutes, resulting from experimental planning analysis also considering the juice volume obtained after filtration. Fermentation without nitrogen source addition resulted in a bioethanol production of  $23.18 \pm 0.47 \text{ g L}^{-1}$  in just 9 hours of the fermentation process. Although the juice fruit residues supplementation with yeast extract did not increase bioethanol production ( $24.72 \pm 0.07 \text{ g L}^{-1}$ ), fermentation time reduction in 3 hours is a promising result because it optimizes the process. However, the urea addition of on fermentation medium resulted in a lower bioethanol production ( $18.31 \pm 0.25 \text{ g L}^{-1}$ ), possibly caused by the yeast metabolic deviation for the other biocomposites production. The fermentative volume increase in the bioreactor results in a similar bioethanol production ( $20.8 \text{ g L}^{-1}$ ) obtained in Erlenmeyer, being a positive indication of the scale expansion possibility. This study highlights the potential fruit residues uses as a sustainable method to be explored for accelerating the bioethanol production chain.

**Keywords:** Biofuel. Sugar extraction. Nitrogen source. Fruit residue. Sustainability.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	13
3.1 MICRORGANISMO E INÓCULO.....	13
3.2 RESÍDUOS DE FRUTAS .....	13
3.3 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES DA MRF.....	14
3.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	14
3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BIORREATOR.....	15
3.6 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	15
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
4.1 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES DA MRF.....	16
4.2 COMPOSIÇÃO DO CALDO DE MRF .....	18
4.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA UTILIZANDO CALDO DE MRF .....	18
4.4 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO CALDO DE MRF .....	20
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	21
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

O iminente esgotamento dos combustíveis fósseis, associado à sua intensa dependência e crescente demanda é uma preocupação que atinge níveis globais (ZABED et al., 2014; BARRETO, 2018). Diante dessa problemática, a substituição desses combustíveis por alternativas mais sustentáveis como o bioetanol tornou-se uma opção promissora para o enfrentamento da crise energética e melhoramento da qualidade ambiental (ADITIYA et al., 2016; MIKULSKI, KLOSOWSKI, 2018; TAN et al., 2019)

No cenário mundial, cana-de-açúcar, beterraba e milho são as principais biomassas utilizadas para a produção de bioetanol, o que tem travado uma complexa discussão acerca da sustentabilidade do biocombustível, em virtude da competição do uso de terras agricultáveis com a produção de alimentos (HO et al., 2014; SARKAR et al., 2019). Apesar de inúmeros estudos reportados na literatura se preocuparem com a utilização de resíduos lignocelulósicos para a produção energética líquida, pouca ênfase tem sido dada a exploração de biomassas residuais que possuam açúcares prontamente disponíveis (ABDULLAH et al., 2015; TAN et al., 2019).

Os resíduos de frutas possuem potencial para produção de biocombustíveis por serem uma biomassa de baixo custo, gerada em grandes quantidades e principalmente devido à presença de elevada concentração de açúcares livres (CHOI et al., 2015; SARKAR et al., 2019), o que dispensa processos complexos de pré-tratamento e hidrólise do material, assemelhando-se a sistemas de produção de bioetanol de primeira geração.

Estima-se que o consumo final seja responsável pelo desperdício de até 20% das frutas e verduras comercializadas no mundo em função de sua alta perecibilidade e também em virtude do resíduo natural ou porção não comestível das frutas, o que inclui principalmente sementes, casca e bagaço (SAGAR et al., 2018; FAO, 2019). No Brasil, o consumo de frutas *in natura* é de 57 quilogramas por habitante ao ano (ABHF, 2018), sendo que dentre algumas das frutas mais consumidas no país, a banana, a maçã e o abacaxi geram, em média, 37% de resíduos considerando apenas as partes do fruto não comestíveis (SHALINI, GUPTA, 2010; PATHAK, MANDAVGANE, KULKARNI, 2017; LIMA, 2018). Essas informações sugerem que grandes quantidades de resíduos de frutas de origem doméstica gerados no país diariamente poderiam ser aproveitadas como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Os microrganismos responsáveis por realizar a fermentação alcoólica, além da presença de açúcares, requerem também nutrientes como fontes de nitrogênio, minerais, oligoelementos, vitaminas e fatores de crescimento para o seu adequado desenvolvimento, resultando em uma maior tolerância do estresse causado durante a fermentação e retornando assim melhores rendimentos de bioetanol (LI, WANG, SHI, 2017).

Nesse sentido, esse estudo avaliou o emprego do caldo obtido de uma mistura de resíduos de frutas provenientes do consumo doméstico para a produção de bioetanol utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. Para isso, foram investigadas as condições ideais de extração de açúcares, além da influência da adição de extrato de levedura e ureia como fontes de nitrogênio ao meio fermentativo para a produção de bioetanol. Uma avaliação preliminar da fermentação alcoólica em biorreator também foi realizada a fim de verificar a viabilidade de ampliação de escala do processo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Produzir bioetanol a partir do caldo extraído de uma mistura de resíduos de frutas provenientes do consumo doméstico, utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Otimizar as condições para a extração dos açúcares de uma mistura de resíduos de frutas;
- Avaliar a produção de bioetanol a partir do caldo extraído da mistura de resíduos de frutas sob as condições otimizadas;
- Investigar os efeitos da suplementação do meio fermentativo na produção de bioetanol utilizando extrato de levedura e ureia como fontes de nitrogênio;
- Avaliar a viabilidade de ampliação de escala da produção de bioetanol utilizando um biorreator.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MICRORGANISMO E INÓCULO

A levedura utilizada no processo fermentativo foi isolada recentemente de amostras de madeira apodrecidas e identificada como uma nova cepa de *Wickerhamomyces* (número de acesso GenBank MF538579 e MF538580) pelo estudo conduzido por Bazoti et al. (2017).

O meio para o crescimento das leveduras foi preparado utilizando extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD) composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar. O repique foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio sólido, sendo mantidos por 72 horas em estufa bacteriológica (B.O.D.) a 30 °C. Decorrido este tempo, as estirpes foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de YPD líquido e mantidas em B.O.D. por 24 horas a 30°C. Após, o inóculo foi vertido no meio fermentativo em uma proporção de aproximadamente 10% (v v<sup>-1</sup>).

#### 3.2 RESÍDUOS DE FRUTAS

Resíduos de frutas foram utilizados neste trabalho como fonte de substrato para a produção de bioetanol. Para simular a composição residual de frutas presente no resíduo doméstico, 5 frutas dentre as 20 mais consumidas no Brasil (HORTIFRUTI BRASIL, 2018) foram selecionadas para constituir a mistura de resíduos de frutas (MRF) incluindo sementes, cascas e partes da fruta impróprias para o consumo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Frutas selecionadas para a composição da MRF, montante consumido e percentuais de resíduos em cada fruta.

Fruta	Consumo (ton ano <sup>-1</sup> )	Resíduo (%)	Referências
Abacaxi	92.991,2	50	LIMA (2018)
Maçã	139.692,1	25	SHALINI, GUPTA (2010)
Banana	68.075,4	35	PATHAK, MANDAVGANE, KULKARNI (2017)
Manga	95.871,4	20	AJILA, BHAT, RAO PRASADA (2007)
Melão	79.730,9	23	MOURA, SOUZA, OLIVEIRA (2017)

Fonte: A AUTORA

Considerando o consumo das frutas e o montante de resíduos gerados, chegou-se à porcentagem de cada resíduo de fruta para compor a MRF através da Equação 1. Sendo  $MRF_x(\%)$  a porcentagem de cada fruta empregada na MRF;  $Consumo_x(\text{ton ano}^{-1})$  a quantidade de cada fruta consumida;  $Resíduo_x(\%)$  a porcentagem de resíduo de cada fruta.

$$MRF_x(\%) = \frac{Consumo_x(\text{ton ano}^{-1}) \times Resíduo_x(\%)}{\sum(Consumo_x(\text{ton ano}^{-1}) \times Resíduo_x(\%))} \quad \text{Equação 1}$$

Desta forma, a MRF foi constituída por: 32,9% de abacaxi, 24,7% de maçã, 16,8% de banana, 13,6% de manga e 12,0% de melão.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES DA MRF

Os açúcares presentes na MRF foram extraídos através de extração sólido/líquido com agitação mecânica. Para determinar as condições mais adequadas para condução deste processo foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup> (RODRIGUES, IEMMA, 2014), avaliando a influência da relação sólido/líquido (0,69% a 23,31%  $m_{\text{seca}} v^{-1}$ ) e da temperatura (14,64 °C a 85,36 °C) nas concentrações de açúcares extraídos. O procedimento experimental foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL com volume de trabalho de 100 mL, e conduzido em banho-maria com agitação em 100 rpm durante 10 minutos. Os resultados foram avaliados em termos de concentração de açúcares redutores por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) e também pelo volume de caldo extraído pós-filtração em filtro de papel. Na sequência foi realizada uma avaliação do tempo necessário para extração dos açúcares (5, 10 e 15 minutos de agitação) nas condições otimizadas pelo DCCR 2<sup>2</sup>.

### 3.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica foi conduzida utilizando como meio fermentativo o caldo resultante da extração de açúcares da MRF otimizado com base no DCCR 2<sup>2</sup>. Para avaliar o comportamento do processo fermentativo mediante a adição de fontes de nitrogênio, fermentações foram conduzidas utilizando o caldo extraído da MRF suplementado com

15 g L<sup>-1</sup> de ureia e extrato de levedura, separadamente (TAN et al, 2019). O experimento foi realizado em Erlenmeyer de 250 mL utilizando 90 mL de meio fermentativo (BAZOTI et al. 2017) previamente esterilizado em autoclave (1 atm, 120 °C, 15 min) e 10 mL de inóculo da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. As amostras foram mantidas em agitador orbital a 30 °C e 80 rpm garantindo a homogeneidade do meio (BONATTO et al. 2020). Alíquotas foram coletadas em 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas de fermentação para análise do consumo de açúcares e produção de bioetanol utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

### 3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BIORREATOR

O aumento de volume fermentativo foi realizado utilizando um biorreator de 7 L (BIO-TEC, Tecnal). A fermentação alcoólica, com volume de trabalho de 3,3 litros de meio fermentativo, foi suplementada com extrato de levedura (15 g L<sup>-1</sup>). Após adicionar o inóculo da levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2, o sistema foi mantido a 30 °C e 80 rpm. A amostragem foi realizada em 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas. As análises de consumo de açúcares e produção de bioetanol foram conduzidas por CLAE.

### 3.6 METODOLOGIA ANALÍTICA

As concentrações de açúcar (glicose e frutose) e etanol foram determinadas por HPLC utilizando o cromatógrafo da marca Shimadzu, equipado com detector RID-10 A e operado com coluna AMINEX® BIORAD HPX87H. Para as análises, as amostras foram adequadamente diluídas em fase móvel de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,005 M e filtradas em filtro de 45 µm de acetato de celulose. As injeções das amostras foram conduzidas a 45 °C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M como eluente, o qual foi filtrado a vácuo utilizando uma membrana de 0,45 µm Millipore® e desgaseificado em banho de ultrassom por 15 minutos. A taxa de fluxo do eluente utilizada foi de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A concentração de todos os compostos analisados foi determinada por meio de curvas de calibração (BAZOTI et al., 2017).

A produtividade volumétrica do bioetanol ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) foi determinada através da Equação 2. Sendo  $\text{EtOH}_{\text{produzido}}$  a concentração de bioetanol produzida ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $t$  corresponde ao tempo de fermentação (h) (LAOPAIBOON et al., 2009).

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{EtOH}_{\text{produzido}}}{t} \quad (\text{Equação 2})$$

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística do DCCR 2<sup>2</sup> foi realizada com auxílio do *software* Protimiza Experimental Design (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>). Os resultados dos procedimentos de fermentação alcoólica são expressos em termos de média  $\pm$  desvio padrão. O teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey com nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) foram empregados para avaliar diferenças significativas de produção de bioetanol e consumo de açúcares entre as amostras utilizando o *software* Statistica 8 (Statsoft, Tulsa, USA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES DA MRF

A extração dos açúcares da MRF foi realizada sob condições estabelecidas na metodologia DCCR 2<sup>2</sup>, com duas variáveis independentes e uma variável resposta. Na Tabela 2 é apresentada a matriz experimental com os valores reais e codificados e o resultado obtido em termos de concentração de açúcares redutores. Além disso, o volume de caldo recuperado em cada ensaio após a filtração foi considerado para a avaliação dos resultados obtidos, dado a importância deste parâmetro para a condução do processo fermentativo, e, portanto, acompanha os dados da matriz experimental.

A concentração de açúcares extraídos aumentou com o aumento da relação sólido/líquido (S:L) no processo. A menor concentração de açúcares foi obtida a partir de S:L de 0,69% ( $\text{m}_{\text{seca}} \text{v}^{-1}$ ) a 50 °C ( $2,18 \text{ g L}^{-1}$ ) e a maior concentração de açúcares foi alcançada quando empregada um S: L de 23,31% ( $\text{m}_{\text{seca}} \text{v}^{-1}$ ) a 50 °C ( $76,78 \text{ g L}^{-1}$ ) (Tabela 2). Esses dados mostram que S:L é um parâmetro essencial no processo de extração dos açúcares de resíduos de frutas, e corrobora com os resultados obtidos por Turhan et al.



(2010) em um estudo que avalia a extração de açúcares de vagens de alfarroba, através de processo similar.

**Tabela 2.** Planejamento experimental de extração de açúcares (valores reais e codificados) e respostas em termos de concentração de açúcares e volume de caldo

Ensaio	Variáveis independentes		Variável dependente	
	S:L (%)	Temperatura (°C)	Açúcares Redutores (g L <sup>-1</sup> )	Volume de caldo (mL)
1	4 (-1)	25 (-1)	12,53	78,0
2	20 (1)	25 (-1)	61,63	11,5
3	4 (-1)	75 (1)	16,52	76,0
4	20 (1)	75 (1)	65,27	18,0
5	0,69 (-1,41)	50 (0)	2,18	90,0
6	23,31 (1,41)	50 (0)	76,78	4,5
7	12 (0)	14,64 (-1,41)	28,98	49,0
8	12 (0)	85,36 (1,41)	25,34	41,0
9	12 (0)	50 (0)	39,32	40,0
10	12 (0)	50 (0)	35,11	41,0
11	12 (0)	50 (0)	42,17	35,0

Fonte: A AUTORA

O efeito das variáveis, determinado através da análise estatística, evidencia que apenas S:L é significativa ( $p < 0,05$ ) no processo de extração dos açúcares com 95% de confiança ( $R^2$  94,77%). Baseado nos resultados obtidos, a relação prevista foi expressa na forma da Equação 3, onde S:L é representada por  $x_1$  e a temperatura por  $x_2$ , sendo  $y$  a concentração de açúcares extraídos da MRF.

$$y = 36,89 + 25,42x_1 + 0,31x_2 \quad (\text{Equação 3})$$

O modelo matemático de primeira ordem foi validado pela Análise de Variância (ANOVA) e a curva de contorno representativa para o processo de extração evidenciou mais uma vez que a temperatura não influencia na extração dos açúcares, sendo razoável, portanto, a adoção de temperaturas que tendam a temperatura ambiente a fim de reduzir o consumo energético. Desta forma, o processo de extração dos açúcares da MRF nas demais etapas do trabalho foi conduzido a 25 °C.

A Tabela 2 mostra que apesar de maiores S:L favorecerem a extração dos açúcares, o volume de caldo recuperado é menor em função da capacidade de adsorção da água pelas partículas sólidas da mistura de resíduos. A adsorção de água em materiais carbonáceos tem sido amplamente estudada devido, entre outros aspectos, ao impacto em muitos processos industriais (LIU et al., 2017). Sendo assim, apesar de a adição de uma maior concentração de sólidos resultar em uma maior concentração de açúcares extraídos,

a adsorção da água pelas partículas leva a uma redução significativa do volume de líquido filtrado, sendo necessário realizar o processo repetidas vezes para se atingir volume de caldo suficiente para a condução do processo fermentativo. Apesar da concentração de açúcares ser importante para a produção de bioetanol (FAKRUDDIN et al., 2012), a utilização de uma quantidade apropriada de substrato implica na redução do desperdício de água, biomassa, tempo e energia. Desta forma, 12% ( $m_{seca} v^{-1}$ ) foi o S:L mais adequado do ponto de vista de concentração de açúcares liberados para o meio líquido e volume final do caldo filtrado.

Em relação ao tempo, nenhuma diferença na concentração de açúcares extraídos foi verificada nos três tempos de processo testados (5, 10 e 15 min), sendo justificável, pois a extração é um processo de equilíbrio de contato, assim, uma vez atingido o equilíbrio, a difusão dos sólidos solúveis na massa líquida é cessada (TURHAN et al., 2010).

A concentração de açúcares redutores extraídos na condição otimizada (12% S:L, 25 °C, 100 RPM, 5 min) foi de  $36,32 \pm 0,72 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 4.2 COMPOSIÇÃO DO CALDO DE MRF

A composição do caldo de MRF foi investigada sob as condições otimizadas de extração, revelando que em relação aos açúcares, a constituição majoritária é dada por frutose ( $23,20 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ ) e glicose ( $10,03 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ ). É provável que haja ainda a presença de sacarose neste extrato, já que, conforme reportado por Choi et al. (2015), os resíduos provenientes de frutas são ricos em açúcares solúveis fermentáveis como sacarose, frutose e glicose, no entanto a sacarose não foi monitorada neste estudo em virtude de algumas limitações. Além disso, possivelmente haja a presença de xilose, um açúcar redutor presente em cascas de frutas, conforme já reportado por outros autores (REHMAN et al., 2013; KHEDKAR et al., 2018)

#### 4.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA UTILIZANDO CALDO DE MRF

A levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 cultivada em caldo de MRF mostrou um bom desempenho na fermentação alcoólica, alcançando uma produção de

bioetanol de  $23,18 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$  a partir de  $11,55 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e  $25,75 \pm 0,43 \text{ g L}^{-1}$  de frutose após 9 horas de fermentação, mantendo-se constante até o final do processo ( $p > 0,05$ ).

Um aspecto interessante a ser destacado neste processo fermentativo é que a produção de bioetanol foi mais lenta durante as três primeiras horas de fermentação. Isso ocorre em função do período de latência da levedura característico de culturas recentemente inoculadas. Essa fase de latência deve-se à adaptação da cepa induzida pelo estresse ocasionado por mudanças de pressão osmótica e novo balanço de nutrientes (BAUER, PRETORIUS, 2000; TAN et al., 2019). Após a adaptação celular, acontece a fase de crescimento exponencial (TAN et al., 2019) evidenciado pelo consumo acelerado dos substratos entre 3 e 6 horas de fermentação, atingindo produtividade volumétrica de bioetanol de  $2,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

O Quadro 1 apresenta uma comparação entre pesquisas de outros autores que também investigaram a utilização de resíduos sem a aplicação de pré-tratamentos na produção de bioetanol, e os resultados obtidos neste estudo, demonstrando que o caldo de MRF possui potencial para a geração energética líquida.

**Quadro 1.** Comparação da produção de bioetanol utilizando diferentes substratos sem a aplicação de pré-tratamento e os resultados obtidos por este estudo.

Biomassa	Microrganismo	Máxima concentração de bioetanol ( $\text{g L}^{-1}$ )	Tempo de fermentação (h)	Produtividade ( $\text{g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	Referência
Mistura de resíduo de frutas	<i>Wickerhamomyces</i> sp. UFFS-CE-3.1.2	23,18	9	2,40	Presente estudo
Mistura de cascas de frutas cítricas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29,5	9	3,8	CHOI et al., 2015
Cascas de banana	<i>Enterobacter</i> sp. Et K3	3,07	48	0,06	SARKAR et al., 2019
Vagens de alfarroba	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34,24	12	2,85	TURHAN et al., 2010
Folha de bananeira	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45,75	15	3,05	TAN et al., 2019
Folha de dendê	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18,67	24	0,78	ABDULLAH et al., 2015.

Fonte: A AUTORA

#### 4.4 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DO CALDO DE MRF

A suplementação do caldo de MRF com extrato de levedura retornou uma produção de bioetanol máxima de  $24,72 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$  a partir de  $8,82 \pm 1,17 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e  $22,22 \pm 0,89 \text{ g L}^{-1}$  de frutose após decorridos 6 horas de fermentação, sem diferença significativa de produção em 9 h, 12 h, 24 h e 48 h ( $p > 0,05$ ). O meio suplementado com ureia possuía inicialmente  $8,85 \pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e  $19,75 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1}$  de frutose, retornando produção de bioetanol máxima de  $18,31 \pm 0,25 \text{ g L}^{-1}$  em 9 horas de fermentação, mantendo a concentração de bioetanol constante nas próximas horas de processo fermentativo ( $p > 0,05$ ).

A partir dos resultados alcançados, pode-se perceber que as duas fontes de nitrogênio adicionadas ao caldo de MRF afetam de maneiras distintas o processo fermentativo, conforme também já observado por Zhao, Procopio e Becker (2015). Embora não tenha sido alcançada maior produção de bioetanol na suplementação do meio com extrato de levedura, a redução do tempo de processo fermentativo em três horas é um resultado promissor. Tan et al. (2019) verificaram um aumento do crescimento da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* e na produção de bioetanol quando maiores concentrações de extrato de levedura eram aplicadas ao processo, sendo esse aumento na produção de bioetanol associado à presença de cofatores importantes presentes no extrato de levedura como a biotina e a riboflavina. Desta forma, neste estudo, a redução do tempo de fermentação pode estar associada ao estímulo do metabolismo energético das cepas proporcionado pela suplementação com um tipo de nitrogênio mais assimilável, vitaminas, além de outros fatores de crescimento que podem satisfazer melhor as necessidades metabólicas da cepa de *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2, fazendo a fermentação ocorrer mais rapidamente e resultando em uma melhor produtividade volumétrica de bioetanol ( $3,30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). O estudo realizado por Li, Wang e Shi (2017) também demonstrou que o extrato de levedura retornou maiores rendimentos de bioetanol, e maior eficiência de processo, ao suplementar o meio fermentativo de amido de milho de alta gravidade com diversas fontes de nitrogênio para a produção de bioetanol utilizando uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Já a fermentação conduzida com o meio suplementado por ureia retornou uma menor produção de bioetanol. Verificou-se que apesar dos açúcares terem sido totalmente assimilados pela levedura, não houve a conversão em bioetanol como nas outras duas

fermentações realizadas, evidenciando a ocorrência de um desvio metabólico para a formação de outros produtos, o que pode ser notado também pela redução da produtividade volumétrica de bioetanol ( $1,71 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Gutierrez (1991) atribuiu a maior produção de glicerol, um subproduto da fermentação alcoólica, ao desvio do ácido pirúvico para a formação de aminoácidos, gerando a alteração do balanço redox. O autor observou ainda, que a adição de extrato de levedura reduz a produção de glicerol em função da presença de aminoácidos, evitando o desvio dos açúcares para este fim e resultando em menor produção de glicerol. Além disso, a ureia e o etanol podem estar atuando como possíveis precursores na formação de carbamato de etila durante o processo de fermentação alcoólica, conforme também já observado por Kim et al. (2015).

#### 4.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BIORREATOR

O estudo da fermentação alcoólica em biorreator por *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 atingiu  $20,8 \text{ g L}^{-1}$  de bioetanol após 9 horas de processo fermentativo, assemelhando-se à concentração de bioetanol obtida na fermentação conduzida em frascos de 250 mL. Inúmeros fatores podem ter levado ao aumento de 3 horas de fermentação comparado ao estudo anterior, como as mudanças da configuração do reator (KARAGOZ, BILL, OZKAN, 2019) e quantidade do inóculo (TURHAN et al., 2010).

### 5 CONCLUSÃO

Os resultados alcançados com este estudo enfatizam o potencial do uso dos resíduos de frutas para a produção de bioetanol em função de sua alta disponibilidade, baixo custo e presença de açúcares, apresentando uma alternativa de conversão de resíduos em energia.

O estudo da extração de açúcares da mistura de resíduos de frutas revelou que apenas a relação sólido/líquido é significativa no processo. Este resultado é interessante do ponto de vista econômico, uma vez que a glicose e frutose presentes no resíduo são facilmente solubilizadas, reduzindo gastos com energia ao aplicar temperaturas brandas e tempos curtos no processo de extração.

A fermentação alcoólica conduzida com o caldo extraído da mistura de resíduos de frutas sem a adição de nutrientes utilizando a levedura *Wickerhamomyces* sp. UFFS-

CE-3.1.2 atingiu  $23,18 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$  de bioetanol em apenas 9 horas. A adição de extrato de levedura ao caldo proporcionou redução do tempo fermentativo em 3 horas, enquanto a suplementação com ureia ocasionou uma redução da produção de bioetanol se comparado com o resultado obtido na fermentação com adição de extrato de levedura e sem adição de fontes extras de nitrogênio. A fermentação alcoólica em biorreator mostrou-se promissora, uma vez que a produção de bioetanol alcançada foi similar àquela obtida em menor escala.

Esses resultados podem fornecer subsídios para estudos posteriores visando ampliação de escala com a implantação de uma escala piloto de produção de bioetanol a partir de resíduos de frutas.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, S. S. S.; SHIRAI, Y.; BAHRIN, E.K.; HASSAN, M. A. Fresh oil palm frond juice as a renewable, non-food, non-cellulosic and complete medium for direct bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 357-361, 2015.

ADITYA, H.B.; MAHLIA, T. M.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631-653, 2016.

ABHF-ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTI E FRUTI. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 96 p. 2018.

AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; RAO PRASADA, U. J. S. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p.1006-1011, jan. 2007

BARRETO, R. A. Fossil fuels, alternative energy and economic growth. **Economic Modelling**, v. 75, p.196-220, 2018.

BAUR, F.F.; PRETORIUS, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - A review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v.21, p. 27-51, 2000.

BAZOTI, S. F.; GOLUNSKI, S.; SIQUEIRA, D. P.; SCAPINI, T.; BARRILLI, E. T.; MAYER, D. A.; BARROS, K. O.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U.; ALVER JR, S. L.; 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.

CHOI, I. S.; LEE, Y G.; KHANAL, S. K.; PARK, B. J.; BAE, H., J. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 140, p.65-74, 2015.

FAKRUDDIN, M.; QUAYUM, M.A.; AHMED, M. M.; CHOUDHURY, N. Analysis of Key Factors Affecting Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. **Biothechnology**, v. 11, p. 248-252, 2012.

FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The stage of food and agriculture** – Moving forward on food loss and waste reduction, Rome, 2019.

GUTIERREZ, L.C. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais ESALQ**, v. 48, p.55-69, 1991.

HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 742-749, 2014.

HORTIFRUTI BRASIL. **Quais foram as frutas mais vendidas em 2017?**. 2018. Disponível em: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/hortifruti-cepea-quais-foram-as-frutas-mais-vendidas-em-2017.aspx>>. Acesso em: 09 set. 2020.

KARAGOZ, P.; BILL, R. M.; OZKAN, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**, v. 143, p. 741-752, 2019.

KHEDKAR., M.A.; NIMBALKAR, P. R.; KAMBLE, S.P.; GAIKWARD, S. G.; CHAVAN, P. V.; BANKAR, S. B. Process intensification strategies for enhanced holocellulose solubilization: Beneficiation of pineapple peel waste for cleaner butanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 199, p. 937-947, 2018.

KIM, Y. G.; LYU, J.; KIM, M.K.; LEE., K.G. Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl carbamate in soybean paste model system. **Food Chemistry**, v. 189, p. 74-79, 2015.

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4176-4182, 2009.

LI, Z.; WANG, D.; SHI, Y. Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 229-235, 2017.

LIMA, F. C. et al. An overview of applications in pineapple agroindustrial residues. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 111, p. 445-462, 2018.

LIU, L.; TAN, S. J.; HORIKAWA, T.; DO, D.D.; NICHOLSON, D.; LIU, J. Water adsorption on carbon - A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 250, p.64-78, 2017.

MIKULSKI, D.; KLOSOWSKI, G. Efficiency of dilute sulfuric acid pretreatment of distillery stillage in the production of cellulosic ethanol. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 424-433, 2018.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-428, 1959.

MOURA, A. G. C.; SOUZA, A. R. L. A.; OLIVEIRA, E. N. A. Elaboração e caracterização físico-química sensorial de casca de melão e albedo de maracujá **crystalizados**. **Tecnologia e ciência agropecuária**, João Pessoa, v.8., n.1. p. 77-81, 2017.

PATHAK, P. D.; MANDAVGANE, S. S.; KULKARNI, B. D. Fruit peel waste: characterization and its potential uses. **Current Science**, v.113, p. 444-454, 2017.



REHMAN, S.; NADEEM, M.; AHMAD, F.; MUSHTAQ, Z. Biotechnological Production of Xylitol from Banana Peel and Its Impact on Physicochemical Properties of Rusks. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 15, p. 747-756, 2013.

RODRIGUES, M. A.; IEMMA, A.F. **Experimental Designer and Process Optimization**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

SAGAR, N. A.; PAREEK, S.; SHARMA, S.; YAHIA, E. M.; LOBO, M. G. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, p. 512-531, 2018.

SARKAR, D.; PRAJAPATI, S.; PODDAR, K.; SARKAR, A. Production of ethanol by *Enterobacter* sp. EtK3 during fruit waste biotransformation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 145, p. 1-7, 2019.

SHALINI, R.; GUPTA, D. K. Utilization of pomace from apple processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 365-371, 2010.

TAN, J. S.; PHAPUGRANGKUL, P.; LEE, C. K.; LAI, Z. W.; BAKAR, A. M. H.; MURUGAN, P. Banana frond juice as novel fermentation substrate for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2019.

TURHAN, I.; BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A.; KARHAN, M. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology** v. 101, p.5290-5296, 2010.

ZABED, H.; FARUQ, G.; SAHU, J. N.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; BOYCE, A. N. Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

ZHAO, X.; PROCOPIO, S.; BECKER, T. Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7588–7598., 2015.