

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL -
CAMPUS ERECHIM**

CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

LAURA HELENA DOS SANTOS

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

ERECHIM

2024

LAURA HELENA DOS SANTOS

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito para obtenção do título de Bacharel
em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof. Dra. Helen Treichel

ERECHIM

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Santos, Laura Helena dos
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO INTEGRADO UTILIZANDO
RESÍDUOS DE FRUTAS PARA PRODUÇÃO DE D-LIMONENO E ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO / Laura Helena dos Santos. -- 2024.
30 f.

Orientadora: Doutora Helen Treichel

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,
Erechim, RS, 2024.

1. Bioprocessos. 2. Enzimas. 3. Engenharia. I.
Treichel, Helen, orient. II. Universidade Federal da
Fronteira Sul. III. Título.

LAURA HELENA DOS SANTOS

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

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 foi defendido e aprovado pela banca em 04/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Helen Treichel – UFFS
Orientadora

Dra. Suzana Bazoti
Avaliadora

Dra. Jéssica Mulinari
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Para aqueles que exploram o mundo acadêmico, começo meus agradecimentos olhando para o espelho da minha própria jornada. A mim mesma, por ter sido resiliente e por nunca ter desistido desta árdua, porém gratificante, caminhada. Foram os momentos de desafio que moldaram minha determinação e me ensinaram a perseverar.

Àqueles que são o alicerce da minha existência, Vera e Mário, meus pais amados. Com amor incondicional e apoio incansável, vocês foram a luz que iluminou meu caminho, sustentando-me em cada passo desta jornada acadêmica.

Ao Gustavo, meu companheiro e confidente, expresso minha mais profunda gratidão. Seja nos momentos de calma ou nas tempestades emocionais, sua presença constante e seu apoio inabalável foram minha âncora, dando-me força para seguir adiante.

À minha orientadora, cuja sabedoria e orientação foram como faróis em meio à neblina da pesquisa acadêmica, expresso minha sincera admiração e agradecimento. Sua dedicação e apoio foram fundamentais para minha trajetória.

À minha querida avó, que agora habita em memória, dedico um lugar especial em meu coração. Seus valores e ensinamentos continuam a guiar-me, mesmo na ausência física.

Aos meus amigos, pessoas preciosas, que estiveram ao meu lado em cada tropeço do caminho. Sua presença e suporte foram uma bússola que me orientou nos momentos mais desafiadores.

Aos demais colegas nessa jornada, cuja colaboração, risos e trocas foram uma fonte constante de inspiração, agradeço de coração. Cada palavra de encorajamento e gesto de apoio fortaleceu minha jornada.

E, mais uma vez, a mim mesma, por nunca desistir, por encontrar força nos momentos de fraqueza e por persistir, mesmo diante das adversidades. Que esta jornada não seja apenas o fim de um capítulo, mas sim o início de novas conquistas e aprendizados. Obrigada a todos que tornaram este sonho uma realidade.

RESUMO

Cerca de 14% das frutas e hortaliças produzidas anualmente no mundo são descartadas, incluindo resíduos como cascas e sementes. Esses resíduos, ricos em celulose, pectina e açúcares solúveis, são considerados uma biomassa promissora para a produção integrada de etanol e D-limoneno. No entanto, suas estruturas lignocelulósicas exigem pré-tratamentos para simplificar a conversão dos açúcares em etanol, sendo necessário lidar com desafios específicos, como a presença de D-limoneno, um possível inibidor da fermentação alcoólica. Neste estudo, uma Mistura de Resíduos de Frutas (MRF) foi investigada quanto à composição química dos resíduos, destacando-se a presença de pectina. Foi utilizado um processo alternativo de hidrólise enzimática dos resíduos, com ênfase na produção de um coquetel enzimático pelo fungo *Aspergillus niger*. Além disso, foi realizada uma etapa de extração de D-limoneno, utilizando o extrator Soxhlet, e o caldo extraído da mistura de frutas resultante do processo de hidrólise enzimática e da extração foi utilizado como meio fermentativo para a produção de bioetanol utilizando a levedura *Wickerhamomyces sp.* UFFS-CE-3.1.2. A hidrólise enzimática feita empregando o coquetel produzido pelo microrganismo *Aspergillus niger* mostrou-se satisfatória quando comparada à hidrólise com celulase comercial, indicando a atuação das enzimas na MRF, já que após 120 horas obteve-se $23,30 \pm 0,09$ g/L de açúcares fermentáveis. A extração de D-limoneno se mostrou um processo eficiente obtendo-se 15 mg/L do óleo. Durante o processo de fermentação alcoólica, a presença de altos teores de ácido cítrico impactaram negativamente a produção de bioetanol. A remoção eficaz de D-limoneno e o pré-tratamento adequado para redução do ácido cítrico são essenciais para otimizar a produção de etanol a partir desses resíduos.

Palavras-chave: Pré-tratamento, Fermentação Alcoólica, Enzimas, Extração de açúcares.

ABSTRACT

Around 14% of the world's fruits and vegetables produced annually are discarded, including waste such as peels and seeds. These residues, rich in cellulose, pectin, and soluble sugars, are considered a promising biomass for the integrated production of ethanol and D-limonene. However, their lignocellulosic structures require pretreatments to simplify the conversion of sugars into ethanol, making it necessary to deal with specific challenges, such as D-limonene, a possible inhibitor of alcoholic fermentation. In this study, a mixture of fruit waste (MRF) was investigated concerning the chemical composition of the waste, highlighting the presence of pectin. An alternative process of enzymatic hydrolysis of waste was used, with emphasis on the production of an enzymatic cocktail by the fungus *Aspergillus niger*. Furthermore, a D-limonene removal step was carried out using the Soxhlet extractor, and the juice extracted from the fruit mixture resulting from the enzymatic hydrolysis and extraction process was used as a fermentative medium for the production of bioethanol using *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 fermentation. Enzymatic hydrolysis carried out using the enzyme cocktail produced by the microorganism *Aspergillus niger* proved to be satisfactory, indicating the action of enzymes in the MRF, since after 120 hours, 23.30 ± 0.09 g/L of fermentable sugars was obtained. The extraction of D-limonene proved to be an efficient process, resulting in 15 mg/L of oil. During the alcoholic fermentation process, the presence of high levels of citric acid impacted bioethanol production levels. Effective removal of D-limonene and adequate pretreatment to reduce citric acid is essential to improve ethanol production from these residues.

Keywords: Pretreatment, Alcoholic Fermentation, Enzymes, Sugar Extraction

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS GERAIS	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. METODOLOGIA	14
3.1 RESÍDUOS DE FRUTAS	14
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	14
3.3 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS	14
3.4 CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS VISANDO ETAPA DE HIDRÓLISE	15
3.4.1 MICRORGANISMO	15
3.4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E HIDRÓLISE	15
3.4.3 HIDRÓLISE COM CELULASE COMERCIAL	16
3.5 REMOÇÃO E RECUPERAÇÃO DE D-LIMONENO	16
3.6 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	17
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MISTURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS (MRF)	19
4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	19
4.3 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE D-LIMONENO	21
4.4 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	22
4.4.1 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO E DOS AÇÚCARES LIVRES	22
5. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

Na última década, com o surgimento e o fortalecimento do conceito de biorrefinaria e economia circular, ampliaram-se as discussões sobre gerenciamento de resíduos pela valorização em cadeia para minimização de impactos para saúde e meio ambiente (MORONE *et al.*, 2019). O iminente esgotamento dos recursos de combustíveis fósseis, aliado à sua extrema dependência e demanda em constante crescimento, constitui uma preocupação de escala global (MORAES, 2018)

Durante a conferência da Organização das Nações Unidas sediada em Dubai entre os dias 30 de novembro a 12 de dezembro de 2023 (COP 28) assuntos decorrentes das mudanças climáticas foram discutidos. Dentre os principais assuntos discutidos, se fez ênfase à crise energética global. Durante o evento, foram elencadas 4 metas, dentre elas uma meta reafirmando a necessidade de acelerar a transição da matriz energética para matrizes de fontes de energia limpa, assim como reduzir as emissões de gases do efeito estufa. Diante desse dilema, a substituição desses combustíveis por opções mais sustentáveis, como o bioetanol, emergiu como uma alternativa promissora para enfrentar a crise energética e aprimorar a qualidade ambiental (ADITIYA *et al.*, 2016; MIKULSKI, KLOSOWSKI, 2018; TAN *et al.*, 2019).

Resíduos industriais são extensivamente estudados como matérias-primas de processos integrados por serem gerados em grandes quantidades e por não dependerem de terras agrícolas para produção. Biomassas como bagaço de cana de açúcar, palha de arroz e resíduos de frutas foram avaliados como potenciais matérias-primas para a conversão em biomateriais, bioprodutos e bioenergia (BONATTO *et al.*, 2021; DAGNINO *et al.*, 2017). No Brasil mais de 98% da produção de etanol é feita com cana-de-açúcar como matéria-prima. Em 2019 o país produziu mais de 36 bilhões de litros de etanol, sendo destes 10,7 bilhões de etanol anidro e 25,3 bilhões de litros de etanol hidratado. O país possui uma política única para biocombustíveis, o programa RenovaBio, que visa promover a produção sustentável de bioenergia e buscar novas matrizes energéticas (CANABARRO *et al.*, 2023).

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). Um terço dos alimentos produzidos para

consumo humano são desperdiçados. Destes alimentos que são desperdiçados estima-se que cerca de 14% das frutas e hortaliças que são produzidas anualmente são descartadas e vão para aterros sanitários. Esses desperdícios de alimentos estão atrelados a fatores de consumo alimentar e a gestão de distribuição (FAO, 2023). Tais resíduos incluem frutas cítricas, como laranja, abacaxi e limão, que são utilizados em toda cadeia de distribuição, principalmente para a produção de sucos. Após o processamento são descartados e são considerados resíduos partes da fruta como cascas e sementes (SCAPINI *et al.*, 2019). A geração de resíduos alimentares deve ser evitada e reduzida. Diante disso, a utilização de resíduos de frutas para a produção de energia limpa representa uma promissora alternativa para enfrentar desafios na crise energética, e diminuir o desperdício dos resíduos de frutas, além de enfatizar e promover a economia circular (SCAPINI *et al.*, 2023).

Os resíduos de frutas possuem sua composição baseada em uma estrutura com alto teor de celulose, pectina, e açúcares solúveis, essas características sugerem ser uma biomassa promissora para produção de etanol (CHOI *et al.*, 2015). As características da biomassa devem ser observadas, pois a produção de bioprodutos a partir de resíduos de frutas pode ser desafiadora, visto que os carboidratos se encontram em diferentes formas, celulose, hemicelulose e pectina, e estes podem variar de acordo com a fonte de biomassa utilizada (SCAPINI *et al.*, 2023). Como esses tipos de biomassa possuem estruturas lignocelulósicas são necessários uso de pré-tratamentos e também de hidrólise para o rompimento da estrutura lignocelulósica, assim tornando a estrutura dos açúcares mais simples, para aumentar a eficiência do processo de conversão a etanol (CHOI *et al.*, 2015; SARKAR *et al.*, 2019).

Contudo, durante esse processo, também são gerados produtos inibidores, como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), resultantes da degradação da pentose e da hexose, respectivamente. Além disso, o ácido acético é formado a partir da hidrólise do radical acetila, presente na hemicelulose (SRITRAKUL; NITISINPRASERT; KEAWSOMPONG, 2018). Diante disso, para a produção de etanol de segunda geração, é necessário que a biomassa passe por pré-tratamentos, visando a disponibilização das estruturas celulósicas e hemicelulósicas.

O pré-tratamento da biomassa desempenha um papel crucial na melhoria da eficiência de processos como a produção de biocombustíveis, o biorrefinamento e a produção bioquímica. Este processo torna a biomassa mais acessível para conversão ao simplificar estruturas complexas em componentes mais simples, como açúcares. Esses açúcares são então utilizados na produção de biocombustíveis, produtos químicos e outros produtos valiosos em biotecnologia. Além disso, a biomassa pré-tratada contribui para a redução dos custos de energia, minimiza a formação de inibidores, melhora o rendimento global e mitigando os impactos ambientais associados aos processos biotecnológicos, tornando-se um recurso valioso em práticas sustentáveis de biotecnologia (TREICHEL, et al., 2020).

O pré-tratamento enzimático é uma abordagem que utiliza enzimas para degradar a biomassa em componentes mais simples antes de ser processada em aplicações biotecnológicas adicionais. Enzimas específicas, como celulasas, hemicelulasas e ligninases, são empregadas para quebrar estruturas complexas, como celulose e hemicelulose, em açúcares fermentáveis. Esse método facilita a conversão desses açúcares em biocombustíveis e outros produtos de alto valor (TREICHEL, et al., 2020).

Dependendo do processo pode ocorrer a inibição dos microrganismos envolvidos na fermentação. Resíduos de frutas cítricas, como laranja e limão, possuem altas quantidades de D-limoneno, este quando em alta quantidade é um inibidor de fermentação alcoólica (CHOI et al., 2015). O D-limoneno é um composto orgânico pertencente aos terpenos, possui fórmula molecular $C_{10}H_{16}$. O óleo D-limoneno possui propriedade antimicrobiana e é muito utilizado na indústria cosmética e farmacêutica, o que o torna um composto de interesse tanto econômico quanto ambiental.

Frutas como, abacaxi, limão e laranja são as mais convencionais na utilização para a remoção de D-limoneno, entretanto estudos indicam que o óleo está presente em outros resíduos, como cascas de banana e manga. O limão, o Brasil em 2018, totalizou uma produção de cerca de 20,1 toneladas, sendo cerca de 49% do fruto sua casca (DERAL, 2020), (Mendonça *et. al.*, 2006). O limão é o fruto mais utilizado como fonte de extração de D-limoneno (Oliveira, 2020).

A laranja também é uma fruta utilizada tradicionalmente na produção de óleos cítricos, sendo o D-limoneno o principal componente desse óleo. A laranja possui

como principais componentes a hemicelulose, pectina e o D-limoneno (Pires; Ribeiro; Machado , 2018). Muito utilizado para a produção de suco, o abacaxi também é uma das frutas tradicionalmente utilizadas para a produção de D-limoneno, a fruta é altamente comercializada em países tropicais, o que torna faz com que exista grandes quantidades de resíduos após a sua utilização (Hikal *et al.*, 2021).

Mangas e bananas vêm sendo estudadas quanto a sua composição química. No mundo existem cerca de 50 variedades de banana, e as pesquisas vêm avaliando o potencial dos resíduos desta fruta como fonte para a extração de D-limoneno (Facundo *et al.*, 2013). Já em resíduos de manga, alguns estudos como Pandit *et al.*, (2009) identificaram D-limoneno utilizando cromatografia gasosa em 13 espécies, sendo essas espécies cultivadas em diversas partes do mundo.

O processo de extração de D-limoneno envolve a seleção dos resíduos de frutas, posteriormente esse resíduos necessitam ser secados e triturados, esses processos garante que não exista umidade excessiva e os resíduos triturados aumentam a superfície de contato, o que facilita a extração do óleo essencial (Santos *et al.*, 2022). Para a remoção de água e outras impurezas, é necessário a existência de um processo de purificação, onde o produto final do óleo é o D-limoneno puro, podendo ser utilizado em indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Costa, 2022).

Considerando as limitações dos processos convencionais e a necessidade de explorar novos cenários para conversão de resíduos de frutas, este estudo propõe processos alternativos para produção de etanol a partir de misturas de resíduos de fruta utilizando processos integrados com etapa para remoção e recuperação de D-limoneno. Assim, os resíduos de frutas cítricas e não cítricas foram utilizados como matéria-prima, e foram submetidos a processo de hidrólise enzimática com enzimas produzidas por fungos filamentosos, visando a redução dos custos do processo de hidrólise e, também a enzima celulase comercial (Sigma-Aldrich). Posteriormente, foi realizado extração de D-limoneno para na sequência, ocorrer a fermentação alcoólica utilizando a levedura *Wickerhamomyces sp.*

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o processo de pré-tratamento enzimático, extração de D-limoneno e produção de etanol de segunda geração utilizando resíduos de frutas cítricas e não cítricas como matéria-prima.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o processo de hidrólise enzimática dos resíduos de frutas a partir da celulase comercial e do coquetel enzimático produzido por microrganismos.
- .Sugestão: Avaliar a possibilidade de extração de D-limoneno em Soxhlet utilizando hexano como solvente.
- Avaliar o desempenho da produção de etanol na presença de inibidores D-limoneno, ácido acético e ácido cítrico.

3. METODOLOGIA

3.1 RESÍDUOS DE FRUTAS

Os resíduos de frutas de banana, manga, abacaxi, laranja e limão foram coletados no restaurante universitário da Universidade Federal da Fronteira Sul, e após o uso residencial das frutas. Os resíduos foram secos em estufa (40 °C), moídos separadamente em moinho de facas na granulometria de 20 mesh (aproximadamente 0,84 mm de diâmetro), esterilizados em autoclave e armazenados no freezer a -20 °C, até a utilização.

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O teor de açúcares solúveis, ácido acético e ácido cítrico foram analisados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O teor de celulose, hemicelulose e lignina foram determinados de acordo com a metodologia descrita em Sluiter *et al.* (2008). O teor de pectina foi determinado segundo metodologias descritas em Sudhakar; Maini (2000).

3.3 EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS

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

3.4 CRESCIMENTO DE MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE ENZIMAS VISANDO ETAPA DE HIDRÓLISE

3.4.1 MICRORGANISMO

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

3.4.2 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E HIDRÓLISE

A produção de enzimas foi conduzida utilizando os resíduos de laranja, limão, abacaxi, banana e manga como substrato em fermentação submersa. Os resíduos foram misturados em proporções iguais.

Assim, o microrganismo *Aspergillus niger* foi cultivado em meio de cultura BDA durante 7 dias a 28°C. Posteriormente, cada inóculo contendo 10⁶ esporos mL⁻¹ foi transferido para Erlenmeyers com substrato (10% m v⁻¹) e meio tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8. As amostras foram mantidas em agitador orbital a 150 rpm e 28 °C, e alíquotas foram coletadas em 72 e 120 horas para quantificação da atividade enzimática. Além disso, foi mantido na fermentação um controle negativo contendo 10% m v⁻¹ de resíduo de frutas em tampão citrato de sódio pH 4,8 0,05 M. A fração sólida foi separada do sobrenadante por filtração e a fração líquida resultante foi considerada como o coquetel enzimático e avaliada quanto à produção de enzimas pectinase e celulase (endo e exoglucanase), conforme as respectivas metodologias mostradas na tabela 1.

Tabela 1- Metodologias e substratos das atividades enzimáticas

Enzima	Substrato	Referência metodológica
Endoglucanase	Carboximetilcelulase	Ghose (1987)
Exoglucanase	Papel filtro	Ghose (1987)
Pectinase	Pectinase cítrica	Sudhakar; Maini(2000)

Fonte: Autoria Própria (2024)

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

3.4.3 HIDRÓLISE COM CELULASE COMERCIAL

A MRF foi misturada com tampão citrato de sódio 0,05M pH 4,8 na proporção de 1% (m v⁻¹) e posteriormente esterilizada. Após, foi adicionado 50 FPU/g de enzima celulose comercial (Sigma-Aldrich) e o sistema foi incubado em agitador orbital a 45°C e 150 rpm. Amostras foram coletadas em 72 e 120 horas. Um controle negativo foi monitorado ao longo da hidrólise para confirmação da capacidade hidrolítica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5 REMOÇÃO E RECUPERAÇÃO DE D-LIMONENO

A recuperação do D-limoneno foi realizada em aparelho extrator Soxhlet, por 4 horas, utilizando 8 gramas de biomassa contendo MRF e 200 mL de hexano. Após a extração foi realizada a purificação do D-limoneno utilizando rota-evaporador utilizando 16 mL da amostra extraída anteriormente nas condições de 120 rpm a 100 °C. Após a separação completa do D-limoneno e do hexano, o teor do primeiro foi determinado por Cromatografia Gasosa-GC (GCMS 2010 Shimadzu). O processo teve início com a preparação da amostra, onde 50 µL da amostra foram diluídos em um balão de 1 mL. A amostra foi injetada em um volume de 1 µL e os componentes da amostra foram separados em uma coluna NST 05ms (30 m x 0,25mm x 0,25 µm), composta por 5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano. A temperatura de injeção foi mantida a 220 °C. A rampa de aquecimento iniciou-se a 40 °C por 3 min, seguida de um aumento de temperatura de 5 °C/min até 180 °C, e então de 10 °C/min até 210 °C. As temperaturas da fonte de ionização e da interface foram fixadas em 250

°C. Após a injeção, houve um período de corte de solvente de 3 min, iniciando a análise aos 3.0 min. A ionização foi realizada com 70 V e uma corrente de emissão de 60 µA. A pressão da coluna foi mantida em 63.9 kPa, com um fluxo de 1.2 mL/min de gás hélio como carregador. A faixa de varredura de massa (m/z) foi de 30 a 500, operando no modo de aquisição de varredura com um tempo de evento de 0.15 segundos.

Após a remoção do D-limoneno, o resíduo sólido foi seco em estufa a 40°C durante 72 horas e posteriormente foi hidrolisado com o coquetel produzido pelo microrganismo *Aspergillus niger* e pelo coquetel comercial conforme o item 3.4.3 e posteriormente foi realizada a fermentação.

3.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O meio de cultivo para o crescimento das leveduras foi preparado utilizando uma mistura de extrato de levedura-peptona-dextrose (YPD), composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar. A repicagem foi realizada em tubos de ensaio contendo 10 mL deste meio sólido, mantidos por 72 horas em uma estufa bacteriológica (B.O.D.) a 30°C. Após esse período, as cepas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de YPD líquido e incubadas em B.O.D. por 24 horas a 30°C. Onde posteriormente, o meio resultante do processo de hidrólise enzimática foi utilizado como meio fermentativo.

O processo fermentativo foi conduzido em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio fermentativo previamente esterilizado, onde foi incubada a levedura *Wickerhamomyces.sp* e foi ressuspendido e incubado em agitador orbital (New Brunswick Scientific, Innova® 42) a 120 rpm a 30 °C durante 48 horas (Bonatto *et al.*, 2021). As amostragens foram coletadas no tempo 0, 12 horas e posteriormente a cada 24 horas de fermentação.

Para a quantificação dos açúcares fermentáveis e etanol foi utilizado o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A quantificação de glicose, xilose, celobiose, arabinose, etanol, ácido acético e glicerol foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um cromatógrafo Shimadzu equipado com detector de índice de refração (RID-10A). O equipamento foi operado com coluna Aminex® Biorad HPX-87H, utilizando fase móvel de ácido sulfúrico

(H₂SO₄) 0,005 mol L⁻¹, no modo isocrático, com um volume de injeção de 20 µL, vazão de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de 45 °C. A fase móvel foi preparada utilizando H₂SO₄ (Sigma-Aldrich) na concentração adequada (0,005 mol L⁻¹), filtrada a vácuo em membrana de 0,45 µm, e degaseificada em banho ultrassônico (UNIQUE USC-1800A) por 40 min. O preparo das amostras foi realizado pela diluição adequada em fase móvel e filtração em membrana de acetato de celulose de 25 mm e 0,45 µm de tamanho médio de poros (Millipore®).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos de fermentação alcoólica foram apresentados como média seguida do desvio padrão. Para determinar se havia diferenças significativas na produção de bioetanol e consumo de açúcares entre as amostras, utilizamos o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Esses testes foram realizados utilizando o software Statistica 8 (Statsoft, Tulsa, EUA). O teste de Tukey foi escolhido para identificar quais grupos apresentavam diferenças significativas entre suas médias, garantindo que as comparações fossem feitas de forma adequada e confiável.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MISTURA DE RESÍDUOS DE FRUTAS (MRF)

Os resíduos de frutas foram avaliados quanto a sua composição química, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Composição química da MRF

Constituintes da Biomassa	Teor (%)
Celulose	20,05±0,40
Hemicelulose	17,70±0,60
Lignina	16,30±0,20
Pectina	21,10±0,80
Extrativos	38,20±0,90
Sólidos Totais	89,20±0,30
Cinzas	12,00±0,20

Fonte: Autoria Própria (2024)

A composição química da MRF mostra-se alinhada com a literatura, o estudo de Cavalcante *et al.*, 2021, avaliou a composição química de cascas de laranja quanto aos sólidos totais, pectina e cinzas e obteve respectivamente 93,02 ± 0,08%, 25,97±0,18% e 4,26± 0,36%. Como a maioria dos resíduos de frutas a MRF apresentou quantidade considerável de celulose, hemicelulose e lignina. Estes resíduos quando são hidrolisados são quebrados em estruturas menos complexas, como glicose (SCAPINI *et al.*, 2023).

4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As atividades enzimáticas das enzimas endoglucanase, exoglucanase e pectinase do coquetel produzido estão apresentadas na Tabela 3. Como pode-se observar, o coquetel enzimático produzido apresentou alta atividade das enzimas endoglucanase e exoglucanase.

O microrganismo *Aspergillus niger* mostrou-se eficiente na produção do coquetel enzimático, indicando seu potencial na atuação na hidrólise na fração de celulose presente na MRF. As Tabelas 4 e 5 apresentam a concentração de açúcares obtida após hidrólise enzimática.

Tabela 3 - Atividade Enzimática

Tempo (h)	Pectinase (U/g)	Endoglucanase (U/g)	Exoglucanase (U/g)
72	0,7 ± 0,1	4,5 ± 0,9	19,8 ± 0,7
120	0,7 ± 0,1	16,6 ± 0,8	52,0 ± 0,9

Fonte: Autoria Própria (2024)

Tabela 4 - Quantidade de açúcar hidrolisado na hidrólise com o Coquetel Enzimático e Celulase Comercial sem a extração de D-limoneno

Tempo (h)	Açúcares da hidrólise realizada com Celulase Comercial (g/L)	Açúcares da hidrólise realizada com Coquetel Enzimático (g/L)
72	1,4 ± 0,8	13,2 ± 0,2
120	5,7 ± 0,3	20,3 ± 0,1

Fonte: Autoria Própria (2024)

Tabela 5 - Quantidade de açúcar hidrolisado na hidrólise com o Coquetel Enzimático e Celulase Comercial após extração de D-limoneno

Tempo (h)	Açúcares da hidrólise realizada com Celulase Comercial (g/L)	Açúcares da hidrólise realizada com Coquetel Enzimático (g/L)
72	3,6 ± 0,8	1,6 ± 0,2
120	12,0 ± 0,1	8,3 ± 0,1

Fonte: Autoria Própria (2024)

As quantidades de açúcares resultantes da hidrólise com o coquetel enzimático produzido pelo microrganismo *Aspergillus niger* mostram-se satisfatórios e melhores que os resultados encontrados na hidrólise realizada com o coquetel enzimático. Os controles negativos do coquetel enzimático apresentaram 2,72 g/L ± 0,2 de açúcares redutores totais e com celulase comercial 1,26 g/L ± 0,1, indicando a atuação das enzimas na MRF. O pH durante a hidrólise se manteve controlado, 4,80 ± 0,1. O pH tem influência direta sobre a hidrólise, visto que em condições onde o

meio não se mantém tamponado na faixa de pH adequada, as enzimas podem ser inativadas.

O estudo de Schneider *et al.* 2018 realizou uma avaliação na atividade de diferentes enzimas envolvidas na degradação de material lignocelulósico utilizando o microrganismo *P. echinulatum*, e como substrato o bagaço de cana de açúcar e capim elefante. Nesse estudo as enzimas endoglucanase, exoglucanase e pectinase foram avaliadas durante 96 horas, e obtiveram respectivamente as atividades máximas de 1,93 U/mL, 0,46 U/mL e 0,20U/mL, entretanto o estudo relata que houve mudanças nas condições de pH que podem ter interferido na produção enzimática.

4.3 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE D-LIMONENO

O rendimento da extração de D-limoneno foi de 15±0,2 mg/L. Esse valor quando comparado a extrações utilizando resíduos de limão ou laranja e o mesmo solvente (hexano) mostra-se satisfatório conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação na produção de D-limoneno utilizando diversos métodos.

Biomassa	Extrator	Solvente	D-limoneno (mg/L)	Referência
MRF	Soxhlet	Hexano	15	Presente Estudo
Limão	Soxhlet	Hexano	1900	(LOPRESTO, <i>et al.</i> , 2014)
Laranja	Agitação mecânica	Hexano	32,9	(OZTURK, <i>et al.</i> , 2019)
Laranja	Agitação mecânica	Metanol	4,89	(JHA, <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: Autoria Própria (2024)

Jha *et al.* (2019) afirma que, o processo, os equipamentos e o solvente empregado são parâmetros que afetam o rendimento da extração. Tsouko *et al.* (2020) também afirma que além dos métodos de extração, condições como a origem dos frutos, e condições de como a biomassa foi processada também foram um fator decisivo para obter um bom rendimento na extração do óleo. O estudo de Giwa *et al.* (2018) utilizou diversas metodologias para extração de óleo essencial de casca de

laranja, como, destilação a vapor, água e extração com solvente. Dentre as três metodologias, a com maior rendimento foi a destilação a vapor (4,4%). A MRF obteve uma quantidade de D-limoneno satisfatória quando comparada com os estudos da Tabela 6. Entretanto, o estudo de Lopresto *et al.* (2014), o qual utilizou apenas cascas de limão como biomassa apresentou quantidade superior do óleo. De acordo com Lopresto *et al.* (2014) o rendimento de D-limoneno em resíduos de limão pode atingir até 95%, visto que o limão é uma das frutas mais utilizadas para a extração do óleo, pois é o composto encontrado em maior quantidade nos resíduos da fruta. (OLIVEIRA, 2020)

A utilização de resíduos para extração de D-limoneno já é utilizada em diversos estudos, como no de Colecio-Juárez *et al.* (2012), o qual investigou a extração dos resíduos em diversos estágios da fruta, verde, verde intenso, amarelo e amarelo intenso. Na coloração amarelo intenso, obteve-se 77,7% de concentração do óleo. O estudo de Siqueira *et al.* (2020) utilizou cascas de laranja e observou diferentes estágios da fruta: as cascas de laranja verde e as cascas de laranja madura, e identificou que a maior concentração do D-limoneno está presente na extração utilizando os resíduos maduros (87,10%). Esses estudos, salientam que existe também influência na condição da fruta, se está suficientemente madura ou não.

Como o D-limoneno é um composto encontrado majoritariamente em cascas de frutas cítricas como laranja e limão, essas frutas vão ter uma quantidade maior do óleo, a MRF possui outras frutas como: banana, manga e abacaxi, as mesmas não possuem quantidade significativa do óleo devido as suas composições químicas, entretanto a MRF mostra-se promissora para a extração de D-limoneno.

4.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

4.4.1 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO E DOS AÇÚCARES LIVRES

A fermentação dos açúcares livres na lavagem da biomassa da MRF está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da fermentação da água da lavagem da biomassa analisadas em HPLC

Tempo (h)	Açúcares (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido cítrico (g/L)	Etanol (g/L)
0	3,71 ± 0,16	7,28 ± 0,35	8,02 ± 0,35	0,00
12	1,71 ± 0,04	6,14 ± 0,08	7,20 ± 0,45	0,58 ± 0,04
24	1,21 ± 0,08	6,19 ± 0,10	7,40 ± 0,70	0,43 ± 0,10
48	1,13 ± 0,07	6,04 ± 0,06	7,05 ± 0,60	0,07 ± 0,06

Fonte: Autoria Própria (2024)

Devido à baixa quantidade de açúcares disponíveis foi realizada hidrólise da biomassa conforme o item 4.2 e posteriormente o hidrolisado foi fermentado. A fermentação alcoólica foi realizada com a biomassa hidrolisada com a celulase comercial, e com o coquetel enzimático produzido pelo microrganismo *Aspergillus niger*. Nesta etapa também foi realizada a fermentação com a biomassa com remoção de D-limoneno. A fermentação sem o óleo D-limoneno foi realizada com o hidrolisado de celulase comercial e com o coquetel enzimático produzido pelo microrganismo *Aspergillus niger*, conforme as Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Resultados da fermentação sem a remoção de D-limoneno analisadas em HPLC

Tempo (h)	Fermentado utilizando hidrolisado com o Coquetel produzido				Fermentado utilizando hidrolisado com celulase comercial			
	Açúcares (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido cítrico (g/L)	Etanol (g/L)	Açúcares (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido cítrico (g/L)	Etanol (g/L)
0	10,50±0,15	3,15±0,10	2,92±0,25	0,00	16,30±0,26	7,25±0,15	4,48±0,45	0,00
12	0,27±0,02	3,89±0,04	3,17±0,45	6,95±0,65	3,10±0,35	6,17±0,20	3,40±0,35	8,51±0,90
24	0,20±0,08	4,12±0,05	4,78±0,40	5,82±0,32	1,70±0,10	6,13±0,10	3,32±0,40	7,87±0,58
48	0,13±0,01	4,90±0,20	5,60 ±0,20	3,50±0,15	1,25±0,08	5,87±0,30	3,18±0,40	6,37±0,52

Fonte: Autoria Própria (2024)

Realizando a hidrólise tanto com o coquetel produzido, quanto com a celulase comercial, houve a quebra e estruturas complexas de celulose presentes na biomassa, estas foram quebradas em estrutura mais simples, como glicose e frutose. Esses açúcares são mais facilmente metabolizados pelas leveduras durante a fermentação. Bonatto *et al.* (2021) utilizou a mesma metodologia do presente estudo, no entanto usando como substrato resíduos de mamão papaia. A autora obteve concentração máxima de etanol após nove horas de fermentação utilizando a levedura *Wickerhamomyces sp.* UFFS-CE-3.1.2 (27,31 ± 1,40 g/L) e não relata em seu estudo a presença de inibidores.

Os resíduos de frutas cítricas utilizados na MRF possuem compostos que podem inibir a fermentação, a presença de ácido acético é um dos fatores que pode afetar negativamente o desempenho das leveduras (TADIOTO *et al.*, 2022). A elevada concentração de ácido acético presente na MRF pode estar relacionada ao procedimento de autoclavagem que foi realizada para esterilizar os resíduos, este procedimento hidrolisa os grupos acetil presentes na hemicelulose, e faz a liberação de ácido acético (RAMOS *et al.*, 2015). Outro inibidor do crescimento de leveduras é o óleo essencial do grupo dos terpenóides, encontrado em frutas cítricas. Em resíduos cítricos utilizados como substrato para fermentação, o d-limoneno deve ser extraído, visando melhorar

o rendimento de bioetanol. (Choi *et al.*, 2015). A MRF possui uma quantidade alta de ácido cítrico e ácido acético, e D-limoneno. Diante deste fator, foi realizada a fermentação da MRF após a remoção de D-limoneno, conforme a Tabela 9.

Tabela 9- Resultados da fermentação analisadas em HPLC após a fermentação e a remoção de D-limoneno

Tempo (h)	Fermentado utilizando hidrolisado com o Coquetel produzido				Fermentado utilizando hidrolisado com celulase comercial			
	Açúcares (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)	Etanol (g/L)	Açúcares(g/L)	Ácido Acético (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)	Etanol (g/L)
0	0,96±0,10	0,90±0,10	6,60±0,40	0,00	2,45±0,30	0,98±0,30	0,98±0,30	0,00
12	0,27±0,02	0,80±0,05	5,10±0,60	0,25±0,05	0,51±0,02	0,20±0,01	0,20±0,01	0,90±0,04
24	0,20±0,08	0,80±0,06	3,50±0,60	0,18±0,10	0,50±0,40	0,20±0,06	0,20±0,06	0,62±0,05
48	0,13±0,01	0,10±0,20	3,20±0,50	0,10±0,10	0,54±0,06	0,20±0,06	0,20±0,06	0,17±0,14

Fonte: Autoria Própria (2024)

Durante o processo de extração do óleo existe uma perda significativa na quantidade de carboidratos da biomassa, o que pode diminuir o rendimento da produção de etanol (Choi *et al.*, 2015). Após a extração e remoção de D-limoneno, a quantidade de açúcares livres da MRF teve uma queda, este acontecimento pode ter ocorrido pois durante o processo de extração, o hexano, o qual foi utilizado como solvente, pode ter removido não apenas o D-limoneno, mas também outros compostos solúveis, como os açúcares presentes na biomassa. Além disso, o processo de extração envolve uma alta temperatura, essa exposição da biomassa a altas temperaturas pode ocasionar degradação dos açúcares presentes na biomassa, o que resulta em diminuição dos açúcares livres.

No presente estudo as concentrações de etanol após a remoção do limoneno foram inferiores às observadas na literatura. Choi *et al.* (2015) avaliou a produção de etanol após a extração do óleo, o autor avaliou a produção de etanol em frutas cítricas. Os

resíduos de laranja foram avaliados de maneira individual e obtiveram 2,7g/L de etanol, enquanto a mistura de frutas cítricas contendo cascas de laranja, tangerina, toranja e limão obteve 15,9 g/L de etanol. O estudo de Widmer *et al.* (2010) utilizou resíduos cítricos livres de D-limoneno e pré-tratados sob diferentes tempos, pH e temperatura, este estudo obteve 27±2.1 g/L de etanol e baixa produção de ácido cítrico, o que indica que é necessário a aplicação de pré-tratamento na biomassa antes da fermentação.

A biomassa que não foi pré-tratada e foi hidrolisada com o coquetel comercial apresentou valores maiores de produção de etanol sendo seu pico em 12 horas de fermentação com cerca de 8,51± 0,90 g/L. Já a biomassa que passou pela extração de D-limoneno apresentou baixa concentração de etanol, e concentração elevada de ácido cítrico. Na Tabela 10, foi realizada uma comparação com estudos de outros autores que utilizaram resíduos para produção de etanol, a composição gravimétrica e os substratos utilizados nestas pesquisas não foram os mesmos utilizados no presente estudo, pois dados utilizando resíduos selecionados para o presente estudo não estão presentes na literatura.

Tabela 10- Comparação da produção de bioetanol utilizando diferentes substratos.

Biomassa	Microorganismo	Tempo de Fermentação (h)	Concentração de etanol (g/L)	Referência
MRF	<i>Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2</i>	12	8,51	Presente Estudo
Mistura de resíduos frutas	<i>Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2</i>	9	23,18	(ZANIVAN <i>et al.</i> , 2022)
Cascas de Banana	<i>Enterobacter sp. Et K3</i>	48	3,07	(SARKAR <i>et al.</i> , 2019)
Hidrolisado de palha	<i>Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2</i>	96	5,57	(VEDOVATTO <i>et al.</i> , 2021)
Hidrolisado de casca	<i>Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2</i>	96	6,11	(VEDOVATTO <i>et al.</i> , 2021)
Resíduos de melancia	<i>Wickerhamomyces sp. UFFS-CE-3.1.2</i>	9	35,06	(SCAPINI <i>et al.</i> , 2023)

Fonte: Autoria Própria (2024)

Com base nesses resultados encontrados na literatura dos quais diversos tipos de substratos são utilizados, a MRF mostra-se promissora para a produção de bioetanol. Após a aplicação do teste de Tukey para comparar as médias de concentração de etanol entre os grupos com e sem remoção de D-limoneno, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Os resultados indicaram que estatisticamente houve uma diferença significativa na concentração média de açúcares com e sem a remoção de D-limoneno ($p < 0,05$). Da mesma forma, a concentração de ácido cítrico apresentou diferença significativa, a remoção de d-limoneno contribuiu para um aumento na concentração média de ácido cítrico, o que pode ter colaborado para a diminuição na concentração de etanol.

Diante disso, utilizar pré-tratamento na biomassa é essencial para otimizar a conversão de açúcares livres em etanol, pois envolve a quebra de estruturas complexas de biomassa, aumentando a acessibilidade dos substratos para microrganismos ou enzimas fermentadoras. Além disso, reduz inibidores como ácido cítrico e ácido acético, que prejudicam a eficiência do processo fermentativo.

5. CONCLUSÃO

A maior produção de etanol foi obtida em 12 horas com a biomassa hidrolisada pela celulase comercial, está apresentou valor de $8,51 \pm 0,90$ g/L, este valor está de acordo com outros dados encontrados na literatura, mostrando que a MRF possui potencial para a geração de etanol de segunda geração.

A remoção de D-limoneno também obteve resultado promissor, 15mg/L. Este resultado também está de acordo com dados encontrados em outros estudos, mostrando que a metodologia utilizando extrator Soxhlet e hexano como solvente possui potencial para a remoção do respectivo composto.

A análise dos resultados revela a eficácia da hidrólise enzimática e da fermentação para produzir bioetanol a partir desses resíduos, com rendimentos promissores alcançados. Do ponto de vista econômico e ambiental esse é um resultado interessante, pois contribui significativamente com a cadeia energética e com a gestão adequada de resíduos. Além da MRF possuir potencial para a produção de bioetanol, foi possível extrair o óleo D-limoneno, que é um composto de alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ADSUL, M. et al. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109442, fev. 2020.
- ANDREWS, R. E.; PARKS, L. W.; SPENCE, K. D. Some Effects of Douglas Fir Terpenes on Certain Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 301–304, ago. 1980.
- BARRETO, R. A. Fossil fuels, alternative energy and economic growth. **Economic Modelling**, v. 75, p.196-220, 2018.
- BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582–587, nov. 2017.
- BOLUDA-AGUILAR, M.; LÓPEZ-GÓMEZ, A. Production of bioethanol by fermentation of lemon (Citrus limon L.) peel wastes pretreated with steam explosion. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 188–197, jan. 2013.
- BONATTO, C. et al. Utilization of seawater and wastewater from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124501, fev. 2021.
- CASABAR, J. T. et al. Enhancement of hydrolysis with *Trichoderma harzianum* for bioethanol production of sonicated pineapple fruit peel. **Fuel**, v. 279, p. 118437, nov. 2020.
- CAVALCANTE, B. D. M. et al. Orange peels and shrimp shell used in a fermentation process to produce an aqueous extract with bioherbicide potential to weed control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 32, p. 101947, mar. 2021.
- CANABARRO, N. I. et al. Sustainability assessment of ethanol and biodiesel production in Argentina, Brazil, Colombia, and Guatemala. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 171, p. 113019, jan. 2023.
- 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.
- COLECIO-JUÁREZ, M. C. et al. Characterization of Volatile Compounds in the Essential Oil of Sweet Lime (Citrus limetta Risso). *Chilean journal of agricultural research*, v. 72, n. 2, p. 276–280, jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000200017>. Acesso em: 14 abr 2024.

COSTA, L. D. **Revisão bibliográfica sobre comparação de metodologias convencionais de extração de óleos essenciais**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/server/api/core/bitstreams/067aaf2c-d1c6-408a-b75a-9616a563f750/content>. Acesso em: 26 jun. 2024.

DAGNINO, E. P. et al. Optimization of the soda-ethanol delignification stage for a rice husk biorefinery. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 156–165, mar. 2017.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 22 out. 1980.

FAO, FIDA, OMS, PMA y UNICEF. 2023. **Versión resumida de El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2023**. Urbanización, transformación de los sistemas agroalimentarios y dietas saludables a lo largo del continuo rural-urbano. Roma, FAO.

FACUNDO, H. V. DE V. et al. Isolation of Volatiles Compounds in Banana by HS-SPME: Optimization for the Whole Fruit and Pulp. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, p. 110–115, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.176>. Acesso em: 25 jun. 2024.

FUWA, H. A NEW METHOD FOR MICRODETERMINATION OF AMYLASE ACTIVITY BY THE USE OF AMYLOSE AS THE SUBSTRATE. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, set. 1954.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GOLMOHAMMADI, M. et al. Optimization of essential oil extraction from orange peels using steam explosion. **Heliyon**, v. 4, n. 11, p. e00893, nov. 2018.

HIDENO, A. et al. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 162–168, fev. 2011.

HIKAL, W. M. et al. Sustainable and Environmentally Friendly Essential Oils Extracted from Pineapple Waste. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 6833–6844, 20 nov. 2021. Disponível em: . Acesso em: 26 jun. 2024.

JHA, P. et al. Valorisation of orange peel: supplement in fermentation media for ethanol production and source of limonene. **Environmental Sustainability**, v. 2, n. 1, p. 33–41, 20 mar. 2019.

LOPRESTO, C. G. et al. A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 137, p. 13–20, nov. 2014.

MAHATO, N. et al. Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 307–316, jan. 2018.

MARQUES, N. P. et al. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66–75, out. 2018.

MATSUURA, M.; SASAKI, J.; MURAO, S. Studies on β -Glucosidases from Soybeans That Hydrolyze Daidzin and Genistin: Isolation and Characterization of an Isozyme. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, n. 9, p. 1623–1627, 12 jan. 1995.

MENDONÇA, L. M. V. L. et al. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 870–874, dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400025>. Acesso em: 25 mar 2024.

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, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

MORAES, Ana Paula Bagaiolo. **O etanol como instrumento de desenvolvimento na política energética brasileira**. 2018. 165 f. Tese (Direito Político e Econômico) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.

MORONE, P. et al. Food waste: Challenges and opportunities for enhancing the emerging bio-economy. **Journal of Cleaner Production**, v. 221, p. 10–16, jun. 2019.

OLIVEIRA, Luiz Fernando Lima Gomes de. Revisão literária da extração da pectina do Citrus lemon. 2020. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química)** - Fundação Educacional do Município de Assis - fema, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://cepein.femanet.com.br/BDigital/arqTccs/1311430249.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2024

Organização das Nações Unidas. (2023). **Una acción climática ambiciosa y acelerada: plan para un cambio de rumbo**. Disponível em: <https://www.un.org/es/cr/C3%B3nica-onu/una-acci%C3%B3n-clim%C3%A1tica-ambiciosa-y-acelerada-plan-para-un-cambio-de-rumbo>. Acesso em 11 maio 2024

OZTURK, B.; WINTERBURN, J.; GONZALEZ-MIQUEL, M. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107298, nov. 2019.

PANDIT, S. S. *et al.* Cultivar relationships in mango based on fruit volatile profiles. **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 363–372, maio 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.107>. Acesso em: 26 jun. 2024.

PRAJAPATI, B. P. *et al.* Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 152, p. 653–663, jun. 2020.

PIRES, T.; RIBEIRO, M. G.; MACHADO, A. **EXTRAÇÃO DO R-(+)-LIMONENO A PARTIR DAS CASCAS DE LARANJA: AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA VERDURA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO TRADICIONAIS**. Química Nova, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170139>. Acesso em: 26 jun. 2024.

RADETIC, M. *et al.* Efficiency of recycled wool-based nonwoven material for the removal of oils from water. **Chemosphere**, v. 70, n. 3, p. 525–530, jan. 2008.

RAMOS, L. P. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195–202, jan. 2015.

ROCHA, J. C. **Produção, avaliação da estabilidade e aplicação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* IOC 4003 utilizando resíduos de frutas tropicais como substrato**. 2018. Dissertação de Mestrado. Brasil.

SANTIAGO, B. *et al.* Identification of environmental aspects of citrus waste valorization into D-limonene from a biorefinery approach. **Biomass and Bioenergy**, v. 143, p. 105844, dez. 2020.

SANTOS, L. H. *et al.* Desenvolvimento de processo integrado utilizando resíduos de frutas para produção de D-limoneno. **Jornada de Iniciação Científica - JIC**, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, Rio Grande do Sul, 2022. Disponível em: <https://portaleventos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/18292/12564>. Acesso em: 26 jun. 2024.

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

SCAPINI, T. *et al.* Bioethanol from fruit. In: TREICHEL, H.; ALVES JR, S. L.; FONGARO, G.; 14 MULLER, C. (org.). Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives. 1. Ed. **Nova Science Publishers**, Nova Iorque, p. 139–176, 2019.

SCAPINI, T. *et al.* Bioethanol and biomethane production from watermelon waste: A circular economy strategy. **Biomass and Bioenergy**, v. 170, p. 106719, mar. 2023.

SCHNEIDER, W. D. H. *et al.* Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its

hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 162–170, mar. 2018.

SIQUEIRA, M. F. F. et al. Extração e composição do óleo essencial de cascas de citrus de diferentes estádios de maturação. **SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR**, 7., 2020. Inovação com sustentabilidade. [s.l.: sbCTA-RS, 2020.]

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), n. April, p. 1–18, 2008.

SLUITER, A.; SLUITER, J. **Determination of starch in solid biomass samples by HPLC: Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. National Renewable Energy Laboratory (NREL), n. January, p. 1–7, 2008.

SRITRAKUL, N.; NITISINPRASERT, S.; KEAWSOMPONG, S. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 6, p. 512–519, dez. 2017.

SUDHAKAR, D. V.; MAINI, S. B. ISOLATION and CHARACTERIZATION of MANGO PEEL PECTINS. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 24, n. 3, p. 209–227, ago. 2000.

TADIOTO, Viviani et al. **Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 2, p. 1-14, 2022.

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.

TREICHEL, H. et al. **Utilising Biomass in Biotechnology**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

TSOUKO, E. et al. Integrated biorefinery development for the extraction of value-added components and bacterial cellulose production from orange peel waste streams. **Renewable Energy**, v. 160, p. 944–954, nov. 2020.

VEDOVATTO, F. et al. Production of biofuels from soybean straw and hull hydrolysates obtained by subcritical water hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 328, p. 124837, maio 2021.

VENTURIN, B. et al. Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production purposes. **Bioresource Technology**, v. 266, p. 116–124, out. 2018.

WIDMER, W.; ZHOU, W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5242–5249, jul. 2010.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W. W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 1614–1619, dez. 2007.

YAN, W. et al. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107674, jan. 2021.

ZANIVAN, J. et al. Evaluation of Bioethanol Production from a Mixed Fruit Waste by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. **BioEnergy Research**, v. 15, n. 1, p. 175–182, 7 mar. 2022.

ZEMA, D. A. et al. Valorisation of citrus processing waste: A review. **Waste Management**, v. 80, p. 252–273, out. 2018.

ZHAO, C. et al. Bio-energy conversion performance, biodegradability, and kinetic analysis of different fruit residues during discontinuous anaerobic digestion. **Waste Management**, v. 52, p. 295–301, jun. 2016.