



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HÉLIA ALVES

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ACEROLA VERDE (*Malpighia emarginata*  
DC.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES UTILIZANDO TRATAMENTO ÁCIDO E  
ENZIMÁTICO

FLORIANÓPOLIS – SC

2021

HÉLIA ALVES

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ACEROLA PARA A OBTENÇÃO DE  
AÇÚCARES UTILIZANDO TRATAMENTO ÁCIDO E ENZIMÁTICO

Dissertação submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal de Santa Catarina para  
a obtenção do título de mestre em Engenharia  
de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Poletto  
Coorientador: Prof. Dr. Marco Di Luccio

FLORIANÓPOLIS – SC

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alves, Hélia

APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ACEROLA VERDE (Malpighia emarginata DC.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES UTILIZANDO TRATAMENTO ÁCIDO E ENZIMÁTICO FLORIANÓPOLIS / Hélia Alves ; orientadora, Patrícia Poletto, coorientador, Marco Di Luccio, 2021.

67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Resíduo de acerola. 3. Açúcares. 4. Caracterização lignocelulósica. 5. Hidrolise ácida e enzimática. I. Poletto, Patrícia . II. Di Luccio, Marco. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Hélia Alves

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE ACEROLA VERDE (*Malpighia emarginata*  
DC.) PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES UTILIZANDO TRATAMENTO ÁCIDO  
E ENZIMÁTICO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Dr(a). Patrícia Poletto - Presidente UFSC

Prof(a). Dr(a). Marli Camassola - Membro externo UCS

Prof(a). Dr(a). Jaciane Lutz Ienczak - Membro interno UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Patrícia Poletto

Orientadora

Florianópolis, 2021.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pai e irmão que sempre fizeram de tudo por mim e foram essenciais para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

À todos os amigos que estiveram presentes nas conquistas da vida e em especial aos amigos que o mestrado me trouxe, obrigada pelos momentos, aprendizados e todo o apoio durante esses anos.

À minha orientadora Dra. Patrícia Poletto pela escolha do tema, pela paciência e por todos os ensinamentos ao longo da minha graduação e mestrado, obrigada pela parceria, apoio e tempo dedicado a minha formação. Ao meu coorientador Dr. Marco Di Luccio por toda a contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À estrutura e aos colegas do LIEB, em especial a Mônica, Gabriela e Karina que estiveram presentes no dia-a-dia e por todo o auxílio e companheirismo na realização dos experimentos e análises.

Ao professor Dr. Boris Stambuk e seu orientando Eduardo, pelo auxílio na realização das análises de HPLC.

À banca composta por Dra. Marli Camassola e Dra. Jaciane Lutz Ienczak, pela disponibilidade e contribuições.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao PPGEAL por fazerem parte da minha formação e pelo ensino de qualidade.

## RESUMO

Os resíduos produzidos a partir do processamento da acerola verde correspondem a 40% do volume processado e a identificação dos açúcares que os compõem é de grande importância quando se pensa no máximo aproveitamento dos resíduos. O bagaço é obtido a partir da prensagem da fruta e é constituído de cascas e sementes, enquanto a borra vem da etapa de clarificação do suco sendo composto de restos de polpa. Os teores dos açúcares presentes foram identificados usando protocolo de caracterização de biomassas lignocelulósicas e posteriormente, o fracionamento foi realizado utilizando pré-tratamento ácido ( $H_2SO_4$ ) seguido de enzimático (celulase). Foi identificado que 5,5% do bagaço era constituído de arabinose, 10,9% de xilose e 31% de glicose, sendo a arabinose provavelmente pertencente a estrutura da pectina contida na casca. O resíduo da borra era composto de 1,2% de arabinose, 9% de xilose e 29% de glicose. Entre as diferentes concentrações de  $H_2SO_4$  utilizadas no fracionamento (0 a 4,5%), 1,5% a 121 °C por 30 min pareceu ser a concentração na qual se atingiu a máxima capacidade de extração de xilose e arabinose para ambos os resíduos. As concentrações obtidas nos hidrolisados de bagaço e borra a 0,5% de ácido foram 2,9 e 2,6 g/L de xilose e 4,1 e 0,6 g/L de arabinose, respectivamente. Nos hidrolisados a 1,5% de ácido foram obtidos 4,6 e 4,7 g/L de xilose e 4,0 e 0,7 g/L de arabinose, respectivamente. Esses valores convertidos em rendimento mostraram que aproximadamente 5 e 8,5 g de xilose foram obtidas por 100 g de cada resíduo independentemente da concentração de ácido. A arabinose apresentou rendimento de aproximadamente 7 g/100 g de bagaço, acima do valor detectado na caracterização, indicando que a pectina presente no resíduo pode ter interferido no protocolo de caracterização. Os resíduos tratados com 0,5% e 1,5% de ácido passaram por uma hidrólise catalisada por celulases realizada com 5% de sólidos. As maiores concentrações foram obtidas com os sólidos pré-tratados com 0,5% de ácido, obtendo-se 8,5 g/L e 6,7 g/L de glicose para bagaço e borra, respectivamente. Os sólidos pré-tratados com 1,5% de ácido resultaram em 3,8 e 2,0 g/L de glicose. Os rendimentos de cerca de 33 e 14% de glicose foram obtidos para ambos os resíduos tratados com 0,5 e 1,5% de ácido. Os subprodutos de acerola apresentaram potencial para a obtenção de xilose, arabinose e glicose sendo ainda necessária a otimização das condições de tratamento e/ou a adição de mais etapas para se atingir maiores rendimentos de extração.

**Palavras-chave:** Resíduo. Açúcares. Lignocelulose. Arabinose. Xilose.

## ABSTRACT

The residues produced from the processing of the green acerola correspond to 40% of the processed volume and the identification of the sugars that compose them is very important when you consider the maximum utilization of waste. The pomace is obtained from the pressing of the fruit and consists of peels and seeds, while the non-pomace comes from the clarification stage of the juice being composed of pulp. The sugar contents present were identified using lignocellulosic biomass characterization protocol and later fractionation was performed using acid pretreatment ( $H_2SO_4$ ) followed by enzymatic (cellulase). It was identified that 5.5% of the pomace consisted of arabinose, 10.9% xylose and 31.2% glucose, and arabinose probably comes from the structure of pectin contained in the peel. The residue of the non-pomace was composed of 1.2% arabinose, 9% xylose and 29% glucose. Among the different concentrations of  $H_2SO_4$  used in fractionation (0 to 4.5%), 1.5% at 121°C for 30 min seemed to be the concentration where the maximum extraction capacity of xylose and arabinose was reached for both residues. The concentrations obtained in the hydrolysates of pomace and non-pomace with 0.5% of acid were 2.9 and 2.6 g/L of xylose and 4.1 and 0.6 g/L of arabinose, respectively. In the hydrolyzed extract at 1.5% of acid, 4.6 and 4.7 g/L of xylose and 4.0 and 0.7 g/L of arabinose were obtained, respectively. These values converted into yield showed that approximately 5 and 8.5 g of xylose were obtained per 100 g of each residue regardless of acid concentration. Arabinose presented yield of approximately 7 g/100 g of pomace, above the value detected in the characterization, indicating that the pectin present in the residue may have interfered in the characterization protocol. The residues treated with 0.5% and 1.5% of acid underwent a hydrolysis catalyzed by cellulases performed with 5% solids. The highest concentrations were obtained with the pretreated solids with 0.5% acid, obtaining 8.5 g/L and 6.7 g/L of glucose for pomace and non-pomace, respectively. The solids pretreated with 1.5% acid resulted in 3.8 and 2.0 g/L of glucose. Yields of about 33 and 14% glucose were obtained for both residues treated with 0.5 and 1.5% acid. Acerola by-products showed potential to obtain xylose, arabinose and glucose, and it is still necessary to optimize the treatment conditions and/or add more steps to achieve higher extraction yields.

**Keywords:** Waste. Sugars. Lignocellulose. Arabinose. Xylose.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de produção de suco concentrado de acerola verde.....	17
Figura 2 – Estrutura das paredes primária e secundária das células vegetais.....	22
Figura 3 - Estrutura das fibras de celulose com destaque para as regiões cristalina e amorfa.	23
Figura 4 - Açúcares encontrados em cadeias de hemicelulose.....	24
Figura 5 - Principais estruturas de pectinas e os açúcares constituintes.....	25
Figura 6 - Lignina, celulose e hemicelulose na estrutura das biomassas lignocelulósicas.....	26
Figura 7 - Esquema de fluxo de processo de tratamento ácido e alcalino.....	28
Figura 8 – Esquema da ação das enzimas celulolíticas. ....	31
Figura 9 - Etapas desenvolvidas neste trabalho.....	33
Figura 10 - Fluxograma das etapas realizadas durante o pré-tratamento ácido.....	38
Figura 11 – Porcentagem de açúcares (xilose + arabinose) quantificados após a hidrólise ácida em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para o bagaço (A) e borra de acerola (B). Barras escuras: açúcares obtidos na fração líquida. Barras claras: açúcares obtidos na fração sólida.	52
Figura 12 – Perfil da hidrólise enzimática para os resíduos do bagaço (A) e da borra (B) de acerola pré-tratados com ácido. As amostras foram pré-tratadas com solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 0,5 e 1,5% por 30 min a 121° C. ....	55
Figura 13 – Balanço de massa calculado para o fracionamento do bagaço de acerola. ....	58
Figura 14 – Balanço de massa calculado para o fracionamento da borra de acerola. ....	59



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Aplicações propostas na literatura para o resíduo de acerola. ....	20
Quadro 2 – Enzimas que atuam na hidrólise de celulose. ....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização proximal e compostos fenólicos totais das farinhas de resíduos de acerola. Os resultados são apresentados em base seca. ....	18
Tabela 2 - Composição físico-química do resíduo de acerola.....	19
Tabela 3 - Composição lignocelulósica (%) do bagaço de acerola com e sem a remoção de extrativos (base seca).....	45
Tabela 4 - Composição lignocelulósica (%) da borra de acerola com e sem a remoção de extrativos (base seca).....	45
Tabela 5 - Concentração de açúcares, ácido acético e galacturônico (g/L) nos hidrolisados resultantes da hidrólise ácida do bagaço de acerola em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . .	48
Tabela 6 - Concentração de açúcares, ácido acético e galacturônico (g/L) nos hidrolisados resultantes da hidrólise ácida da borra de acerola em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	48
Tabela 7 – Composição lignocelulósica (%) da fração sólida resultante da hidrólise ácida do bagaço de acerola em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	50
Tabela 8 – Composição lignocelulósica (%) da fração sólida resultante da hidrólise ácida da borra de acerola em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	50
Tabela 9 – Concentração de glicose e xilose (g/L) e rendimentos de conversão de glicose e xilose em 30 h de hidrólise.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HG - homogalacturonana

RG I - ramnogalactoronana I

RG II - ramnogalactoronana II

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

GH - glicosil hidrolases

EGs - endoglucanases

CBHs - celobiohidrolases

BGs - β-glucosidases

EC - enzyme commission

HMF – hidroximetilfurfural

DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico

HPLC - high performance liquid chromatography

CFT - compostos fenólicos totais

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 OBJETIVOS .....	15
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1 O RESÍDUO DE ACEROLA .....	16
2.1.1 Composição química dos resíduos de acerola .....	17
2.1.2 Propostas de reutilização dos resíduos de acerola.....	19
2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	21
2.1.3 Celulose .....	23
2.1.4 Hemicelulose .....	24
2.1.5 Pectina .....	24
2.1.6 Lignina.....	26
2.3 PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS .....	27
2.3.1 Pré-tratamentos químicos.....	27
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO DE ACEROLA E PREPARO .....	34
3.2 CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS RESÍDUOS .....	34
3.2.1 Determinação de extrativos .....	34
3.2.2 Determinações de celulose e hemicelulose .....	35
3.2.3 Determinação de lignina solúvel em ácido.....	36
3.2.4 Determinação de lignina insolúvel em ácido.....	37
3.2.5 Determinação de cinzas .....	37
3.3 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DOS RESÍDUOS DE ACEROLA .....	38
3.3.1 Pré-tratamento ácido .....	38
3.3.2 Hidrólise enzimática.....	39
3.4 BALANÇO DE MASSA .....	39
3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	40
3.5.1 Determinação de açúcares redutores por DNS.....	40
3.5.2 Atividade enzimática da celulase .....	40
3.5.3 Determinação de ácidos urônicos.....	41
3.5.4 Determinações de açúcares, ácido acético, fórmico, furfural e hidroximetilfurfural por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	42

3.5.5 Determinação de composto fenólicos totais.....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1 COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS RESÍDUOS .....	44
4.2 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DOS RESÍDUOS DE ACEROLA .....	47
4.2.1 Efeito do pré-tratamento ácido – análise dos hidrolisados.....	47
4.2.2 Efeito do pré-tratamento ácido – análise dos sólidos recuperados.....	50
4.2.2.1 Análise comparativa da recuperação dos açúcares .....	51
4.2.2.2 Hidrólise enzimática.....	53
4.2.2.1.1 Avaliação da cinética de hidrólise.....	54
4.2.2.1.2 Avaliação do rendimento da hidrólise.....	56
4.3 BALANÇO DE MASSA.....	57
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>66</b>
ANEXO I – CURVAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NAS QUANTIFICAÇÕES .....	66
ANEXO II – CROMATOGRAMA OBTIDO NA ANÁLISE DE HPLC DE UMA DAS AMOSTRAS.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

A acerola (*Malpighia emarginata* DC.) é uma fruta originária da América central. O Brasil lidera a sua produção no mundo que alcança cerca de 70.000 toneladas produzidas por ano (IBGE, 2017). Cerca de 40% do volume processado vira resíduo, sendo 30% composto de cascas e sementes, enquanto 10% são obtidos com a clarificação do suco sendo formado de restos de polpa (POLETTO et al., 2021). Muitos estudos avaliam a presença de compostos bioativos dos resíduos da acerola, e sabe-se que possui um alto teor de fibras, porém pouco se sabe sobre a composição destas fibras (BORGES et al., 2021; MARQUES et al., 2013). A desconstrução dos resíduos quanto ao seu teor de lignocelulose é de grande interesse quando se pensa no seu máximo reaproveitamento. Devido as diferentes características dos dois resíduos uma análise individual possibilita melhores alternativas de reutilização.

O aproveitamento de biomassas lignocelulósicas tem muito destaque no contexto de biorrefinarias, que abrange uma ampla gama de tecnologias aplicadas como forma de obter-se a partir de matéria-prima renovável produtos com alto valor agregado. A lignocelulose compõe a parede celular de células vegetais e é formada de três principais polímeros: celulose, que é composta de glicose; hemicelulose, que é um heteropolissacarídeo que pode ser formado de diversas pentoses e hexoses; e a lignina, um polímero polifenólico. Na parede celular primária, ao invés de lignina, a pectina está presente, sendo formada de uma cadeia principal de ácido galacturônico, e diversos açúcares ligados. Frutas, especialmente, contêm altos teores de pectina (CUI et al., 2021).

Os açúcares da celulose, hemicelulose e pectina podem ter aplicação na indústria alimentícia bem como na produção de biocombustíveis, medicamentos, cosméticos entre outros (ARUN et al., 2020; CUI et al., 2021; HEGDE; LODGE; TRABOLD, 2018). A obtenção destes açúcares pode levar a produtos como os xilooligossacarídeos obtidos a partir da xilana encontrada na hemicelulose e xilitol por meio de processos fermentativos (BANERJEE et al., 2019; RAO et al., 2016). A pectina de resíduos de frutas, dependendo de sua composição, pode possuir funções prebióticas ou ser utilizada como geleificante e estabilizante para aplicação em alimentos (GULLÓN et al., 2013; GÜZEL; AKPINAR, 2019).

O pré-tratamento é uma etapa necessária para a desconstrução do material lignocelulósico, pois reduz a cristalinidade da celulose e pode solubilizar a glicose e frações de hemicelulose e lignina (LIAO et al., 2020). Pré-tratamentos com ácido diluído normalmente levam a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa e consequente

exposição da celulose (SUN et al., 2016). É um tratamento amplamente utilizado na literatura para fracionar biomassas, pois é de fácil aplicação, baixo custo e alcança altos rendimentos de açúcares, além de auxiliar na análise de quão drástica precisam ser as condições para recuperar-se os açúcares. O sólido obtido na hidrólise ácida possui altos teores de celulose, e por isso a utilização de enzimas celulolíticas é uma alternativa para obter-se a glicose presente no resíduo.

Neste contexto, este trabalho tem o interesse de valorizar a fração lignocelulósica dos subprodutos do processamento da acerola verde, especialmente as frações de celulose, hemicelulose e pectina, caracterizando-as e obtendo os açúcares que as compõem através de tratamento ácido seguido de enzimático com utilização de celulasas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de despolimerização das frações de polissacarídeos que compõem a estrutura lignocelulósica de resíduos do processamento da acerola para a obtenção de açúcares.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os resíduos *in natura* proveniente das etapas de prensagem da fruta e clarificação do suco de acerola quanto à composição lignocelulósica;
- Avaliar concentrações de ácido sulfúrico como pré-tratamento para extração dos açúcares da hemicelulose;
- Avaliar a cinética de hidrólise enzimática da celulose presente no resíduo resultante do pré-tratamento ácido;
- Realizar o balanço de massa em condições de tratamento selecionadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

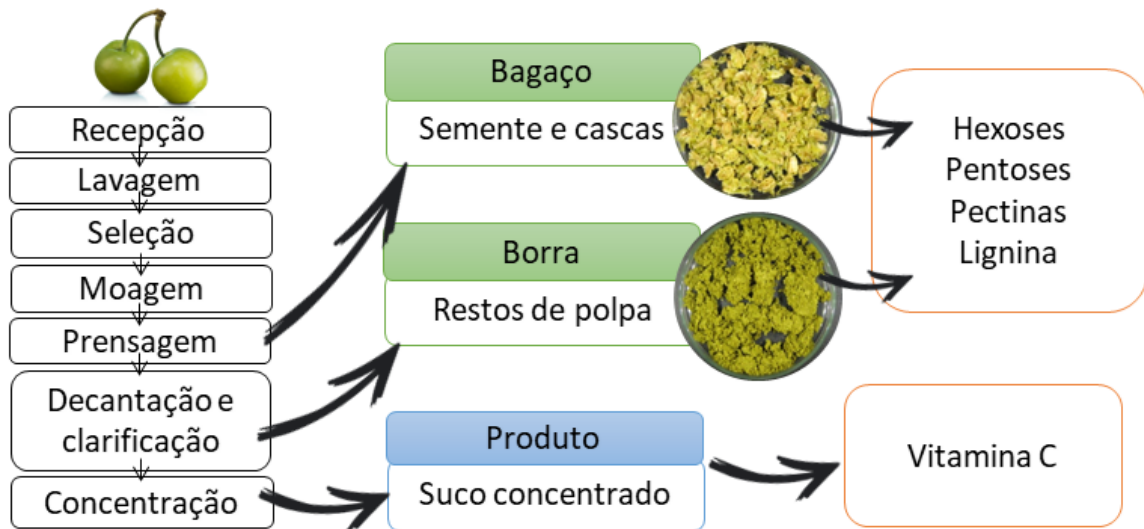
### 2.1 O RESÍDUO DE ACEROLA

A acerola (*Malpighia emarginata* DC) é uma fruta originária da América Central que vem se destacando por ser rica em compostos bioativos, especialmente ácido ascórbico e polifenóis, que se mostram benéficos à saúde devido às suas propriedades antioxidantes (BELWAL et al., 2018). O Brasil é o maior produtor mundial de acerola, alcançando cerca de 70.000 toneladas por ano (IBGE, 2017) Além do consumo *in natura*, a acerola também é processada na forma de suco, polpas e geleia (BORTOLOTTI et al., 2013), atingindo também a indústria farmacêutica, com suplementos e concentrados de vitamina C (ALMEIDA et al., 2014)

Os resíduos do processamento de acerola podem chegar a até 40% do volume total processado e são compostos de restos de polpa, casca e sementes da fruta (ABUDA; NARAIN, 2018). Os resíduos utilizados neste trabalho advêm das etapas de prensagem e decantação indicadas na Figura 1, a qual representa um fluxograma genérico de produção de suco concentrado. Da etapa de prensagem é separado o bagaço, que corresponde a cerca de 30% do volume processado. Esse resíduo é constituído de sementes e de cascas da fruta. Posteriormente, o suco extraído passa por uma etapa de clarificação, na qual o uso de enzimas leva à agregação de alguns polissacarídeos e arraste de outros compostos ainda ligados, formando um precipitado denominado de borra. O resíduo é constituído de fragmentos da polpa, gomas, proteínas e polifenóis (POLETTO et al., 2021). Essa grande quantidade de resíduos geralmente é descartada, causando perdas de matéria-prima e energia, causando impacto ambiental (GARCIA-GARCIA et al., 2017).



Figura 1 - Fluxograma de produção de suco concentrado de acerola verde.



Fonte: Próprio autor.

### 2.1.1 Composição química dos resíduos de acerola

Estudos mostram que esses resíduos são ricos em compostos fenólicos, antocianinas, carotenoides, fibras e minerais. Marques et al. (2013) produziram e caracterizaram farinhas de casca e restos de polpa e de sementes de acerola. Alguns resultados são apresentados na Tabela 1. A farinha de semente apresentou alto teor de fibras insolúveis e a farinha de casca e restos de polpa teve destaque para o teor de carboidratos e fibras. Dentre os compostos antioxidantes, Sousa (2010) ressaltou que dentre os resíduos de uma indústria de polpa de frutas tropicais avaliados, o resíduo da polpa da acerola apresentava as maiores quantidades de carotenoides (881,56  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), flavonoides (8,84  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e fenólicos totais (247,62 mg ácido gálico/100 g resíduo de polpa de fruta). Assim como observado por Marques et al. (2013), Poletto et al. (2021) também destacaram que os resíduos contendo sementes apresentam menores quantidades de compostos fenólicos e vitamina C que os resíduos contendo restos de polpa.

Tabela 1 - Caracterização proximal e compostos fenólicos totais das farinhas de resíduos de acerola. Os resultados são apresentados em base seca.

<b>Componente (g/100g)</b>	<b>Farinha de semente</b>	<b>Farinha de casca e sobras de polpa</b>
<b>Proteína</b>	8,51 ± 0,11	11,55 ± 0,09
<b>Cinzas</b>	1,65 ± 0,05	3,46 ± 0,05
<b>Fibras solúveis</b>	4,76 ± 0,98	8,74 ± 0,53
<b>Fibras insolúveis</b>	75,66 ± 1,58	28,58 ± 1,24
<b>Carboidratos</b>	4,15 ± 1,48	42,06 ± 2,49
<b>Compostos fenólicos</b>	4,73 ± 0,07	10,82 ± 0,09

Fonte: (MARQUES et al., 2013)

Apesar dos inúmeros estudos relacionados à caracterização de compostos bioativos presente nos resíduos de acerola, poucos estudos até o momento focaram na caracterização das fibras que ali se encontram (celulose, hemicelulose e lignina). Lousada Júnior et al (2006), Silva (2014) e Mélo (2016) foram os únicos trabalhos encontrados que realizaram a caracterização das frações de celulose, hemicelulose e lignina de resíduos de acerola composto de sementes, cascas e restos de polpa. Os dados são mostrados na Tabela 2. Há uma discrepância entre os valores que pode ser devido aos métodos usados na caracterização e também às características da fruta.

Tabela 2 - Composição físico-química do resíduo de acerola.

Composto (%)	SILVA (2014)	MÉLO (2016)	LOUSADA JR. (2006)
<b>Açúcares redutores</b>	n.d.	0,87 ± 0,01	n.d.
<b>Pectina</b>	n.d.	7,15 ± 0,11	n.d.
<b>Umidade (b.u.)</b>	7,83 ± 0,08	7,98 ± 0,21	n.d.
<b>Cinzas</b>	2,36 ± 0,01	2,36 ± 0,05	n.d.
<b>Extrativos</b>	14,5 ± 0,55	14,89 ± 0,95	n.d.
<b>Lignina</b>	28,37 ± 0,05	28,03 ± 0,68	20,11
<b>Holocelulose*</b>	43,97 ± 0,25	44,30 ± 0,65	n.d.
<b>αcelulose</b>	24,7 ± 1,86	43,82 ± 3,31	35,07
<b>Hemicelulose</b>	19,27 ± 1,86	0,48	17,17
<b>Proteína bruta</b>	n.d.	n.d.	10,54

\*Holocelulose=αcelulose + hemicelulose

n.d. – não determinado

Além da identificação do teor de cada fibra, a identificação dos monossacarídeos que as compõe também se torna importante para avaliar o potencial de reaproveitamento do resíduo. No estudo de Sabino et al. (2020), os autores removeram a fração de polissacarídeos solúveis em água mantendo o resíduo da acerola constituído de sementes, casca e polpa aquecido a 90 °C por 10 h em agitação magnética. Análises de caracterização identificaram 6,58% de arabinose, 4,23% de galactose e 2,82% de glicose. Utilizando a técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear foi possível identificar resíduos de ácido D-galacturônico como o principal componente da fração de polissacarídeos extraídos. Também observou-se arabinogalactanas, encontradas principalmente na parede celular primária, representando cadeias laterais da estrutura da pectina (MOORE; FARRANT; DRIOUICH, 2008).

### 2.1.2 Propostas de reutilização dos resíduos de acerola

O uso de tecnologia adequada pode levar os resíduos de acerola a diversos destinos, como produtos comerciais ou matéria-prima para outros tipos de processos. No Quadro 1 são apresentadas algumas propostas de reutilização.

Quadro 1 – Aplicações propostas na literatura para o resíduo de acerola.

<b>Tipo de processo</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Referência</b>
Secagem	Efeito da secagem em secador de leito fixo em compostos bioativos	DUZZIONI et al. (2013)
	Secagem em secador roto-aerado com aquecimento infravermelho	SILVA et al. (2019)
	Secagem com secador de leito fixo assistida por radiação infravermelho	NOGUEIRA et al. (2019)
Extração de antioxidantes	Extração de antioxidantes com acetona, etanol metanol	CAETANO et al. (2009)
	Extração de compostos bioativos assistida por ultrassom	REZENDE; NOGUEIRA; NARAIN (2017)
	Extração de vitamina C e polifenóis usando extração por etanol expandido por gás	POLETTO et al. (2021)
	Extração de vitamina C e polifenóis usando água subcrítica	BORGES et al., (2021)
Fermentação	Produção de ácido cítrico em fermentação submersa	SILVA et al. (2012)
	Produção de celulasas em fermentação em estado sólido	MÉLO (2016)
Extração de polissacarídeos	Hidrólise enzimática do resíduo <i>in natura</i> e pré-tratado na conversão de celulose em glicose	SILVA (2014)
	Estrutura química de polissacarídeos solúveis em água	SABINO et al. (2020)
Processos termoquímicos	Carbonização hidrotérmica e aplicação como adsorvente	NOGUEIRA; DUARTE; BARROZO (2019)
	Utilização em processos termoquímicos	SILVA et al. (2020)

Como observado, a secagem do material e a extração de compostos bioativos são muito estudadas, uma vez que esses compostos são de grande interesse para a saúde humana, têm alto valor agregado e a temperatura de secagem do material pode levar a sua degradação. Além disso, por se tratar de um material muito perecível, a secagem é uma operação unitária essencial para tornar o material acessível a outras operações. Entretanto, a fração de polifenóis presentes neste resíduo é pequena. Ao extrair compostos bioativos de borra de acerola com a técnica de líquido expandido por gás, Poletto et al. (2021) obteve um rendimento de extração de 12%, sendo apenas 38% desse extrato composto de polifenóis, carotenoides e vitamina C, o que nos mostra que a extração destes compostos ainda gera uma grande quantidade de resíduos.

Uma vez que o resíduo da acerola é rico em fibras e carboidratos, a identificação destas frações é de grande importância quando se pensa no seu máximo reaproveitamento.

Neste sentido, a extração dos poli e oligossacarídeos que constituem a hemicelulose e pectina de resíduos de frutas vêm ganhando destaque em muitos trabalhos (LUO; XU, 2020; RADENKOV; JUHNEVICA-RADENKOVA; SEGLINA, 2018). No caso dos resíduos de acerola, mais estudos são necessários para identificar quais açúcares fazem parte das frações hemicelulósica e péctica desses resíduos.

## 2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

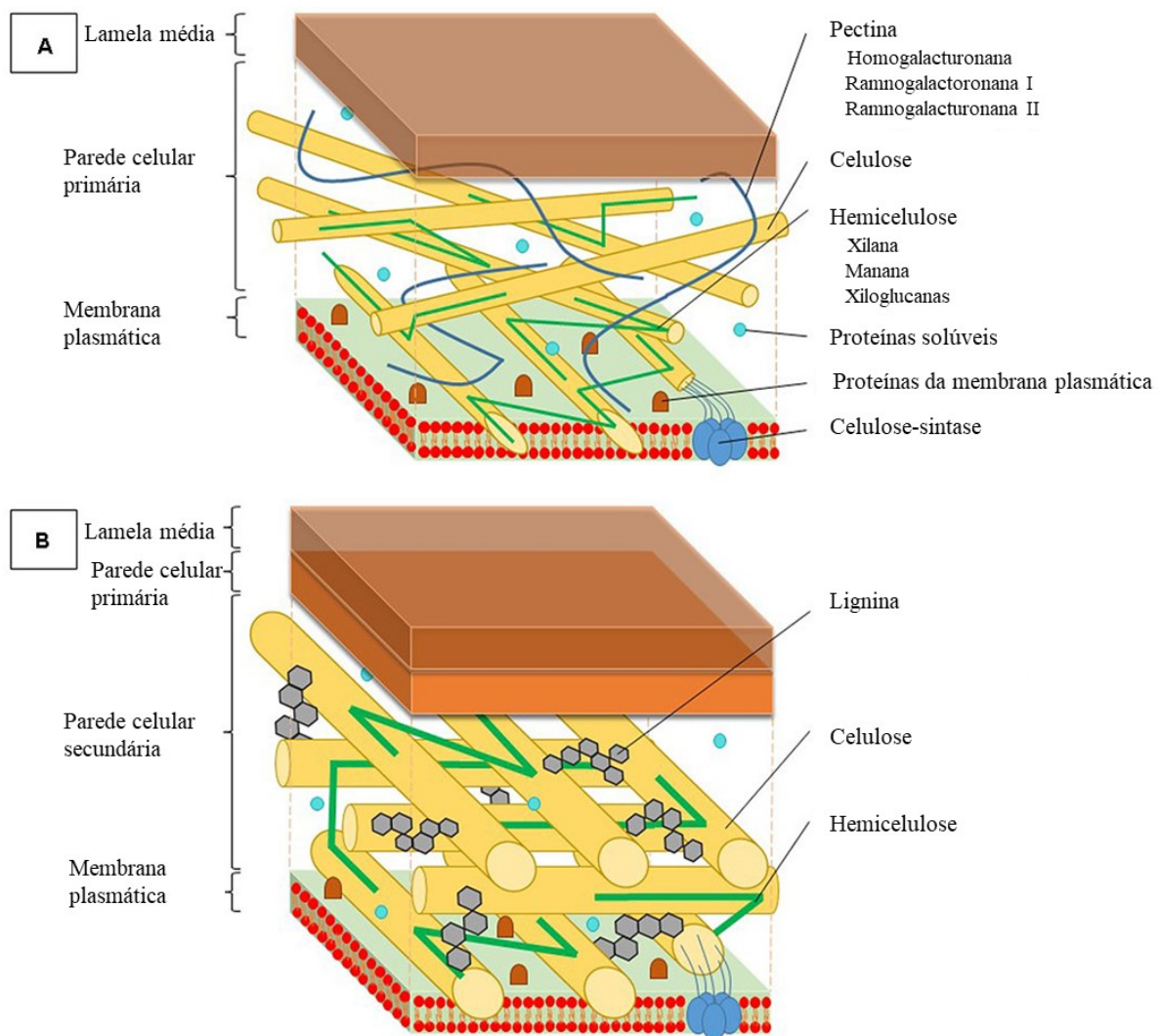
Materiais vegetais disponíveis na natureza contém uma grande quantidade de carbono, o que os torna matérias-primas de grande interesse industrial. Por serem renováveis, o uso de biomassas vegetais se coloca como uma alternativa à obtenção de carboidratos derivados dos polissacarídeos e fenólicos derivados da lignina para produção de produtos químicos e bioquímicos (BANERJEE et al., 2019). Entretanto, a grande diversidade na composição das biomassas disponíveis na natureza requer métodos específicos para a obtenção desses compostos.

Os três principais polímeros constituintes da parede celular são a celulose, hemicelulose e a lignina, organizados em uma matriz complexa e composta de várias camadas que fornecem suporte estrutural e recalitrância. A resistência natural da parede celular das plantas à desconstrução promovida por microrganismos e outras substâncias é chamada de recalitrância. Essa recalitrância dificulta o acesso aos carboidratos presentes na lignocelulose, e é a principal barreira à utilização destes materiais em larga escala para a produção de combustíveis celulósicos, além de produtos químicos e materiais biodegradáveis (WYMAN, 2013).

Além dos três principais polímeros da lignocelulose, existem outros componentes não estruturais na parede celular da planta. Esses componentes, como extrativos, proteínas, cinzas e pectina, variam muito com as espécies, tecidos, maturidade das plantas, épocas de colheita e armazenamento, e são amplamente influenciados por fatores ambientais (WYMAN, 2013).

A parede celular das plantas consiste em múltiplas camadas formadas durante o desenvolvimento da célula (WYMAN, 2013). A parede celular primária (Figura 2A) é composta principalmente de celulose, hemicelulose e pectina. Até 30% da parede celular primária é constituída de pectina, a qual é o principal constituinte da lamela média e um composto bioativo importante na maioria das frutas (CUI et al., 2021). A parede celular secundária é formada majoritariamente de três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2B). A lignina torna a parede celular menos permeável (LOIX et al., 2017).

Figura 2 – Estrutura das paredes primária e secundária das células vegetais. (A) A parede celular primária está localizada para fora da membrana plasmática e é constituída de microfibrilas de celulose, as quais são produzidas por complexos de celulose-sintase, hemicelulose, e proteínas solúveis. Hemicelulose se liga à superfície das microfibrilas de celulose e é constituída de xilanas, mananas e xiloglucanas. Pectinas formam um gel hidratado entre a rede celulose-hemicelulose e consiste em três principais estruturas: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG I) e ramnogalacturonana II (RG II). (B) A parede celular secundária é construída entre a parede celular primária e a membrana plasmática. A lignina é um polímero fenólico complexo que está entre as microfibrilas de celulose substituindo assim as moléculas de pectina.



Fonte: LOIX et al., 2017.

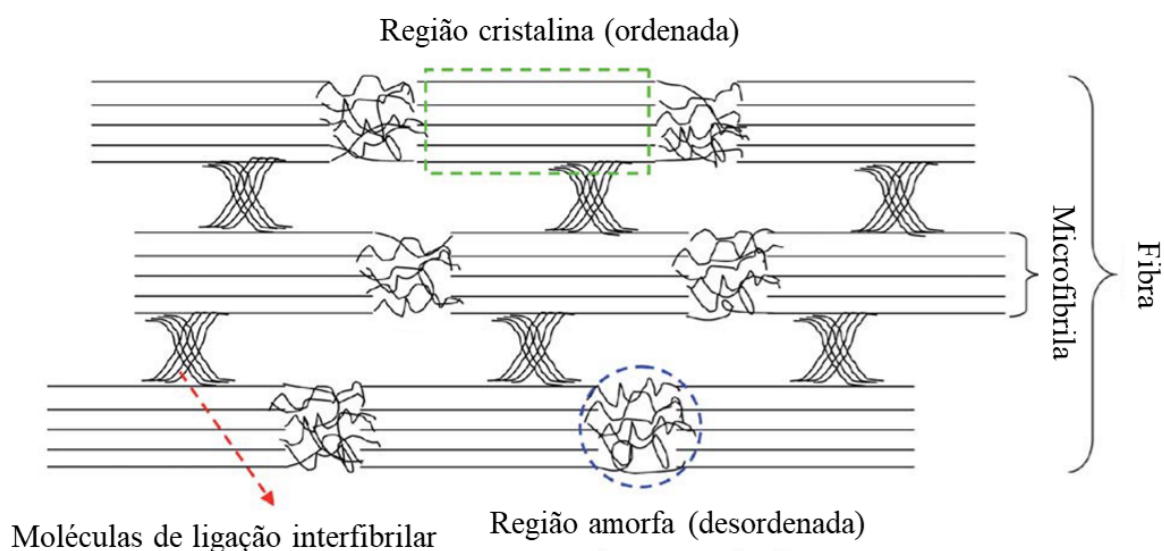
Segundo os estudos apresentados anteriormente (SABINO et al., 2020; SILVA, 2014), os resíduos de acerola são compostos de pectina, celulose, hemicelulose e lignina. Portanto, uma breve revisão sobre cada um desses componentes é apresentada a seguir. Além disso, os

tratamentos mais usados para obtenção dos carboidratos das frações de polissacarídeos também foram revisadas.

### 2.1.3 Celulose

A celulose é um polímero linear de alta massa molecular, composto por moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, formando subunidades de celobiose com grau de polimerização variado, contendo de 50 a 14000 unidades de glicose (HIMMEL, 2009). As fibras de celulose são compostas de longas microfibrilas (Figura 3) ligadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, que as mantêm ordenadas, paralelas e confere rigidez a estrutura (BONECHI, 2017; LIAO, 2020).

Figura 3 - Estrutura das fibras de celulose com destaque para as regiões cristalina e amorfa.



Fonte: Lin, N., Huang, J., Dufresne, A., 2012.

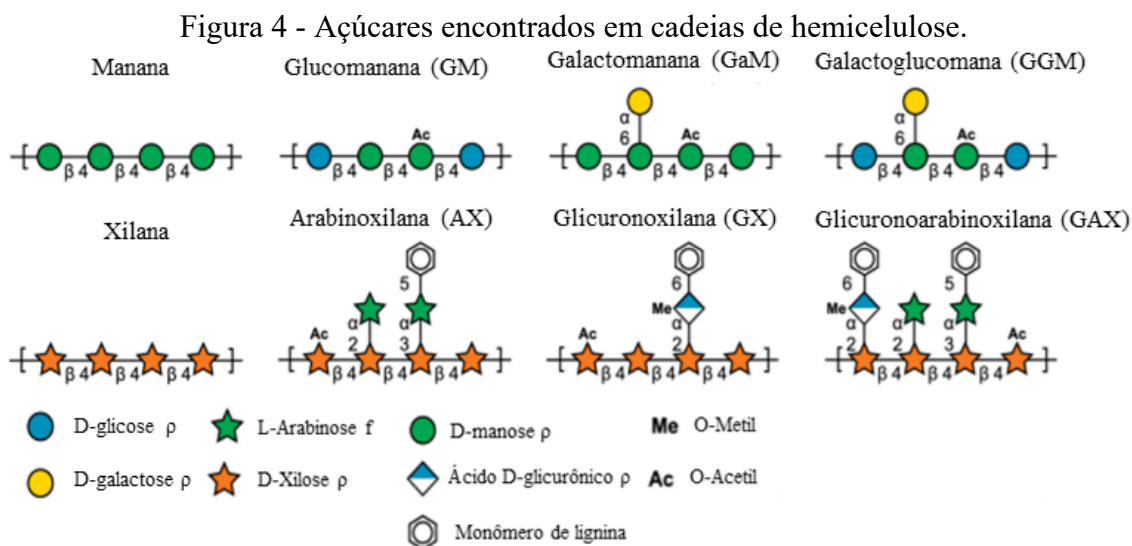
A celulose presente nas plantas pode ser altamente cristalina, o que contribui para a recalcitrância da biomassa, ainda assim, possui regiões amorfas alternadas ao longo das microfibrilas. A região amorfa é a parte mais vulnerável da molécula, onde a fibra possui mais flexibilidade e pode ser mais facilmente acessada por celulasas, enzimas hidrolíticas que provocam a quebra da celulose em moléculas de glicose. Já as regiões cristalinas são altamente ordenadas sendo mais resistentes à tração, ao alongamento e ao ataque das celulasas (WYMAN, 2013; SANTIAGO, 2017).

### 2.1.4 Hemicelulose

Hemiceluloses são polissacarídeos ramificados, com estrutura e composição que varia dependendo da espécie da planta e do tipo de tecido, e representa cerca de 20% a 30% da biomassa lignocelulósica. É um heteropolissacarídeo composto de açúcares com cinco carbonos (xilose e arabinose) e seis carbonos (glicose, galactose, manose e ramnose) e alguns grupos acetilados (BONECHI, 2017; LIAO, 2020).

Dentre os principais polímeros constituintes da lignocelulose, a hemicelulose é a mais sensível química e termicamente. A hemicelulose serve como uma conexão entre a lignina e as fibras de celulose e proporciona uma rede mais rígida (BONECHI et al., 2017). Na hemicelulose as ligações glicosídicas são possíveis nas posições 2, 3, 4 e 6 que o torna um polímero mais desordenado e amorfo. Assim, a hemicelulose é mais solúvel em água e mais suscetível ao processo de hidrólise que a celulose (WYMAN, 2013).

A hemicelulose está associada à celulose através de ligações de hidrogênio e à lignina através de ligações covalentes (LIAO et al., 2020). De acordo com os diferentes tipos de açúcares que possui pode ser classificada como xilana, arabinoxilana, manana e galactana, conforme apresentado na Figura 4.



Fonte: adaptado de TINGLEY, 2021.

### 2.1.5 Pectina

Pectinas estão presentes principalmente na parede celular primária e na lamela média das células vegetais. A cadeia principal é rica em ácido D-galacturônico podendo apresentar

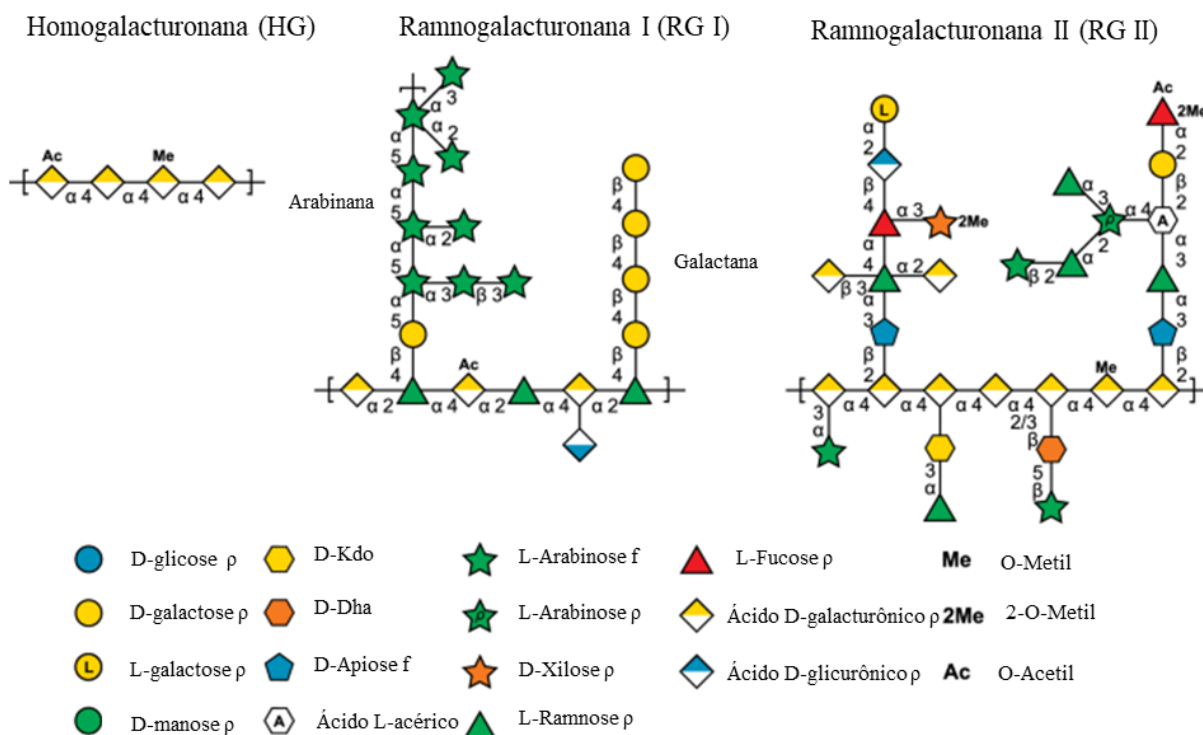


frações contendo L-ramnose de forma intercalada. Além disso, açúcares como galactose, arabinose e xilose aparecem ligadas formando cadeias laterais (FULOP 2020). As cadeias de pectina têm três conformações mais comuns, a homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana-I (RG-I) e ramnogalacturonana-II (RG-II) mostrados na Figura 5.

HG é formado por uma cadeia linear de ácido galacturônico que representa mais de 60% das pectinas. RG-I é altamente ramificada, sendo formada por uma cadeia principal de ácido galacturônico e ramnose intercalados, e cadeias laterais compostas de galactose e arabinose. RG-II tem a cadeia principal constituída por 7 a 9 unidades monoméricas de ácido galacturônico, e tem como substituintes diversos heteropolissacarídeos agrupados podendo ser arabinose, xilose, fucose entre outros.

A extração da pectina é feita comumente a partir de materiais residuais de frutas como cascas de cítricos e bagaço de maçã. Se utiliza condições ácidas (pH entre 1,5 a 3), altas temperaturas (70 a 90 °C) e posterior precipitação com álcool. É comum a utilização de ácidos minerais, porém a utilização de ácidos orgânicos é uma alternativa estudada por ser mais ambientalmente correto (GERSCHENSON, 2017). Pereira (2016) realizou extração de pectina de casca de romã utilizando ácido cítrico obtendo um rendimento otimizado em ácido galacturônico superior a 8 g/100 g do resíduo em um tempo de 120 minutos a 88 °C e pH 2,5.

Figura 5 - Principais estruturas de pectinas e os açúcares constituintes.



Kdo: ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico; Dha: ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico.

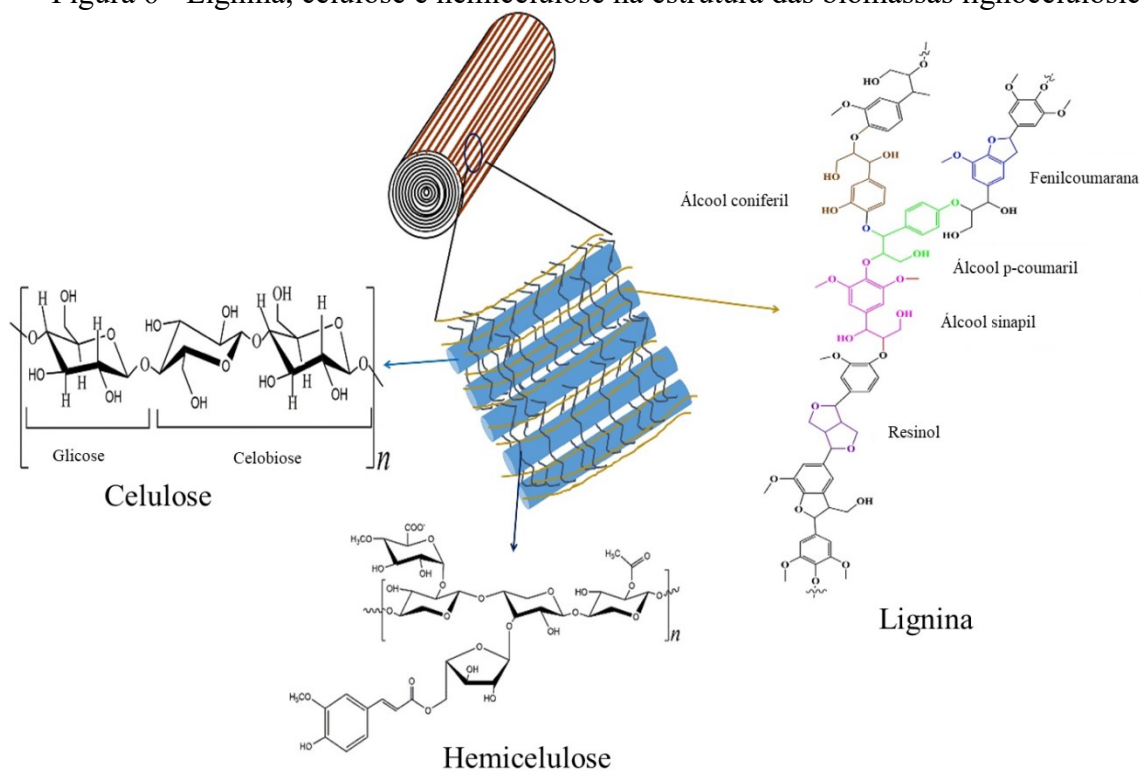
Fonte: Adaptado de TINGLEY, 2021.

### 2.1.6 Lignina

A lignina é um polímero polifenólico tridimensional que possui suas subunidades ligadas por ligações do tipo éter (C-O-C) e carbono-carbono (C-C) distribuídas aleatoriamente. A estrutura é constituída principalmente por três grupos fenol, a *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (LU et al., 2017). As proporções variam de acordo com a origem da biomassa. Está presente na parede celular secundária, preenchendo as lacunas e envolvendo parcialmente os polissacarídeos que unem as microfibrilas de celulose. Atua como um concreto, que mantém tudo no lugar e exclui a água do ambiente da hemicelulose (WYMAN, 2013).

A lignina é altamente hidrofóbica, por isso constitui uma barreira a penetração de água às estruturas onde está presente nas plantas. A lignina se liga à hemicelulose através de ligações covalentes e constrói uma rede estrutural estável como mostrado na Figura 6, com alta resistência mecânica e elasticidade se tornando uma contribuição chave para a recalcitrância da biomassa (BONECHI, 2017).

Figura 6 - Lignina, celulose e hemicelulose na estrutura das biomassas lignocelulósicas.



Fonte: KUMAR, 2020.

Sua complexa estrutura e os diferentes métodos de extração não permitem que a lignina seja isolada como na sua forma nativa, como no vegetal, já que há interferência entre o procedimento de isolamento químico e a estrutura das ligninas *in situ* (SOUTO; CALADO; PEREIRA JUNIOR, 2015). Porém, a remoção da lignina da biomassa aumenta os rendimentos de hidrólise enzimática, uma vez que a presença da lignina além de ser uma barreira física para a atuação de enzimas celulolíticas também é inibidor da atividade enzimática através de ligações não produtivas entre a lignina e a enzima (VERMAAS et al., 2016). A deslignificação também se mostra importante quando se pensa em obter fibras alimentares de biomassas lignocelulósicas, uma vez que a presença de lignina ligada a estes polissacarídeos diminui a sua digestibilidade e biodisponibilidade (RADENKOVS; JUHNEVICA-RADENKOVA; SEGLINA, 2018).

### 2.3 PRÉ-TRATAMENTO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS

O pré-tratamento é uma etapa importante para o fracionamento dos componentes da biomassa. Dependendo do tipo de pré-tratamento utilizado há a solubilização de açúcares da pectina (LUO; XU, 2020) e da hemicelulose (POLETTTO et al., 2020), assim como a deslignificação do material. Isso leva a um sólido rico em celulose, diminui a rigidez da biomassa e atenua as barreiras físicas para o acesso à celulose, expondo a estrutura cristalina à hidrólise por enzimas e levando à obtenção de glicose (HIMMEL et al., 2007).

Existem diversos tipos de tratamentos físicos, químicos e biológicos que tem por objetivo fracionar os polissacarídeos que compõem a parede vegetal e aumentar a pureza e a acessibilidade à celulose (LIAO et al., 2020). Pré-tratamentos químicos são muito utilizados em remoção de pectina e hemicelulose de resíduo de frutas. Banerjee et al. (2019) realizaram pré-tratamento básico com NaOH de cascas de abacaxi para obter hemicelulose e posteriormente produzir xilo-oligossacarídeos. Güzel e Akpınar (2019) obtiveram pectina de cascas de kiwi, melão, maçã, romã e laranja utilizando ácido cítrico.

#### 2.3.1 Pré-tratamentos químicos

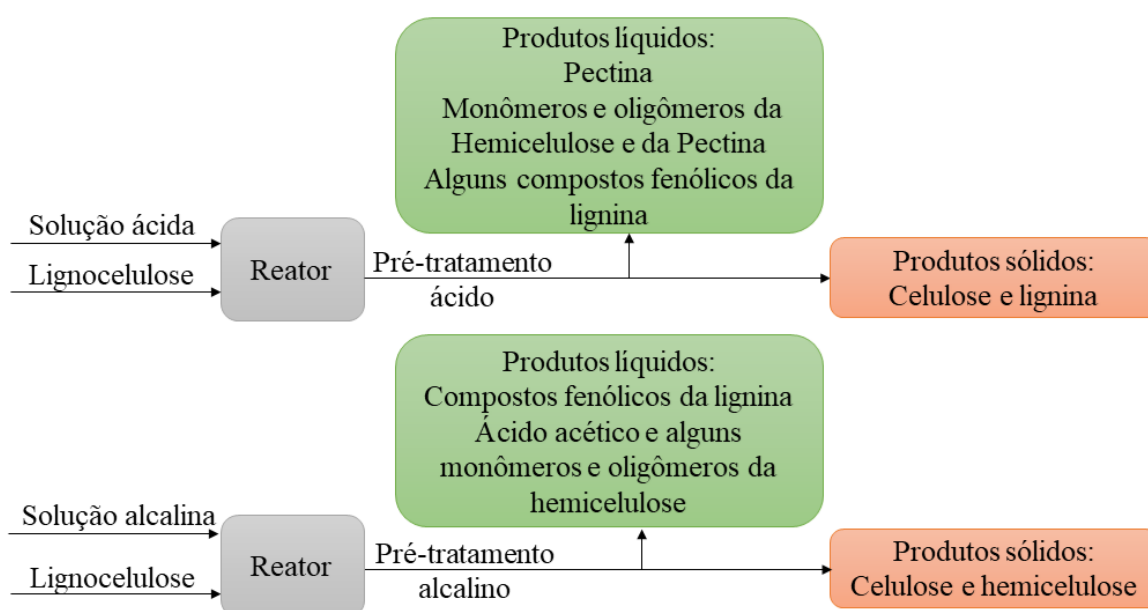
Entre os pré-tratamentos, os químicos (ácido e alcalino) são comumente usados no fracionamento de biomassas. São processos acessíveis, de fácil aplicação e podem levar a altos rendimentos, entretanto podem ser poluentes e altamente corrosivos aos equipamentos

em um processo industrial. É importante ressaltar que existem diferenças nos efeitos de cada tratamento, o que é destacado nos tópicos a seguir.

### 2.3.1.1 Hidrólise alcalina

Os pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para a solubilização da lignina, como destacado na Figura 7, exibindo menor solubilização da celulose e hemicelulose do que os processos ácidos ou hidrotérmicos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008). Em condições básicas, as ligações éster das hemiceluloses e ligninas são facilmente quebradas, e em temperaturas relativamente altas as ligações éter das hemiceluloses e ligninas podem ser destruídas. A clivagem dessas ligações promove a solubilização de hemiceluloses e ligninas, resultando na exposição da celulose às enzimas. Várias bases diferentes vêm sendo usadas com essa finalidade, como o NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , KOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e amônia, sendo os mais comuns o NaOH e KOH (SUN et al., 2016). No entanto, a possível perda de açúcares fermentáveis e a produção de compostos inibidores devem ser levadas em consideração para aperfeiçoar as condições de pré-tratamento (ALVIRA et al., 2010).

Figura 7 – Fluxograma de processo de tratamento ácido e alcalino.



Fonte: Adaptado de LIAO et al., 2020.

### 2.3.1.2 Hidrólise ácida

O principal objetivo de pré-tratamentos ácidos é a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa e consequente exposição da celulose (Figura 7), e dependendo da severidade do tratamento pode ser feita a liberação de açúcares monoméricos a partir da hemicelulose e celulose. Pré-tratamentos ácidos não são propícios para a remoção de lignina da biomassa, obtendo-se resíduos com alto teor de lignina, podendo ser necessário algum processo de deslignificação para aumentar a digestibilidade da celulose do material lignocelulósico (SUN et al., 2016).

A severidade do pré-tratamento pode ser expressa pelo fator de severidade ( $R_0$ ). É possível aplicar tempos de reação mais curtos e temperaturas mais baixas para obter o mesmo fator de um pré-tratamento aquoso, por exemplo, que tem valores mais baixos de pH do que o pré-tratamento ácido (ALVIRA et al., 2010; LIAO et al., 2020)

A hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos geralmente é feita com soluções ácidas diluídas e altas temperaturas ou com soluções ácidas concentradas e baixas temperaturas. Processos com ácidos concentrados, geralmente utilizam baixas temperaturas, o que é energeticamente favorável e minimiza a decomposição dos açúcares produzidos. Entretanto são altamente corrosivos, difíceis de reciclar e geram grandes quantidades de resíduos de neutralização (LIAO et al., 2020). Pré-tratamentos com ácidos diluídos, por sua vez, são conhecidos pela degradação dos açúcares devido às condições drásticas de temperatura e pressão (PEDERSEN; MEYER, 2010). O tipo de ácido utilizado no processo influencia fortemente nas frações liberadas da biomassa lignocelulósica (SUKRUANSUWAN 2018). Vários ácidos diluídos como  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $H_3PO_4$ , vem sendo estudados para pré-tratamento em diversos tipos de resíduos como casca e miolo de abacaxi, cascas de mandioca, entre outros (SUKRUANSUWAN; NAPATHORN, 2018; GUO et al., 2018; ADEOGUN et al., 2020).

A velocidade de hidrólise ácida é mais rápida do que a hidrólise enzimática, mas a glicose também se degrada rapidamente em condições ácidas. Condições menos severas no pré-tratamento previnem a degradação dos açúcares, porém são menos efetivas na hidrólise da hemicelulose e celulose. A decomposição dos monossacarídeos em compostos não desejáveis causa perda de rendimento na hidrólise, e pode ter efeito inibitório em um processo fermentativo ou enzimático subsequente. Entre esses compostos inclui-se o furfural, um produto da desidratação de pentoses, o hidroximetilfurfural (HMF), produto da desidratação

de hexoses e ácido acético que é formado durante a decomposição da hemicelulose como resultado da quebra de grupos acetil ligado ao açúcar (LENIHAN et al., 2010).

Tratamentos ácidos foram usados para extração de manose de semente de açaí usando  $H_2SO_4$ . As concentrações variaram de 1,5% a 4,5%, e o melhor resultado foi obtido na concentração de 3% com rendimento de 30% de manana. Posterior hidrólise enzimática de manose foi realizada e obteve-se 96,8% de rendimento (MONTEIRO et al., 2019).

Reddy, Veda e Wee (2020), realizaram um pré-tratamento alcalino (10 g de resíduo em 90 mL de NaOH 1%, 1 h, 70 °C) seguido de ácido (1%  $H_2SO_4$  autoclave por 10 min a 121 °C) em resíduo de banana que solubilizou 56% de lignina e 61% de hemiceluloses no extrato líquido resultando em uma perda de 50% de massa no resíduo. A biomassa pré-tratada e rica em celulose foi submetida à hidrólise enzimática com celulasas e  $\beta$ -glucosidases, liberando 0,52 g de glicose por g de resíduo.

Plaza et al. (2020) realizaram pré-tratamento em bagaço de malte com solução 1 mol/L de ácido sulfúrico e 15% de sólidos (pH 1, 120° C, 30 minutos) e obteve um extrato com 15,2 g/L de glicose (37,5% açúcares oligoméricos), 31,5 g/L de xilose (65,4% açúcares oligoméricos) e 15,1 de arabinose (26.5% açúcares oligoméricos). Dionísio et al. (2021) submeteram bagaço de cana de açúcar em pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído obtendo 89,5% da hemicelulose solubilizada sendo 82% na forma monomérica (xilose e arabinose).

Bagaço de maçã, por sua vez, foi pré-tratado com ácido acético e posteriormente submetido à hidrólise enzimática com celulasas. O rendimento de extração atingido de pectina foi de 19% e o rendimento da hidrólise enzimática foi de 98% em celulose (LUO; XU, 2020), o que demonstra que a celulose foi facilmente hidrolisada e a utilização de um ácido orgânico torna o processo ambientalmente mais atrativo.

## 2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

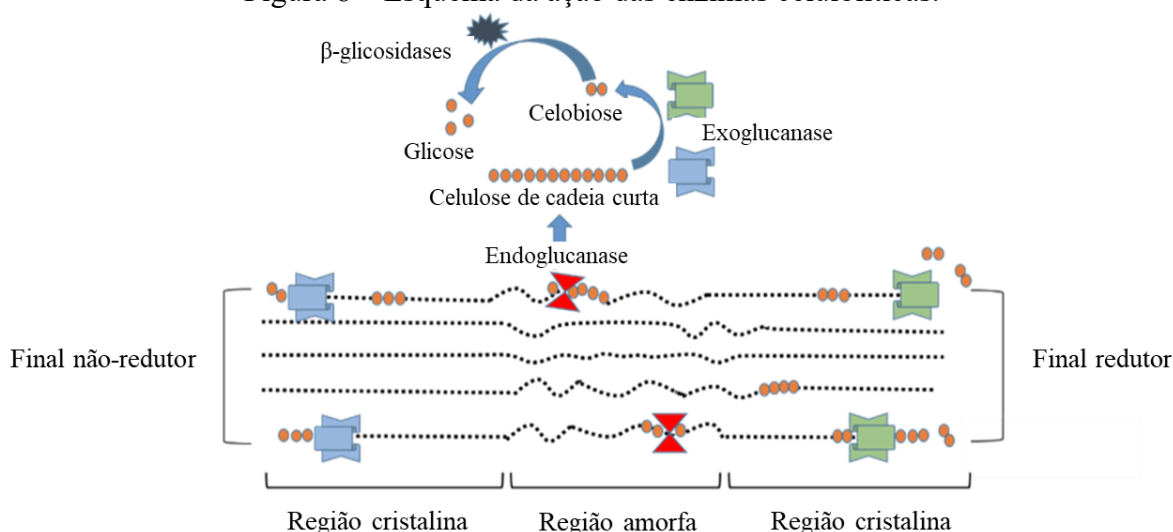
As celulasas pertencem à família das enzimas glicosil hidrolases (GH), as quais apresentam a capacidade de clivar ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 em cadeias de celulose. Para que a hidrólise da celulose aconteça são necessárias três atividades indispensáveis, as endoglucanases (EGs) que hidrolisam ligações internas da cadeia de celulose, as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHs) que hidrolisam regiões externas da fibra celulósica e as  $\beta$ -glucosidases (BGs) que agem para hidrolisar a celobiose. As enzimas são apresentadas no Quadro 2, e o seu esquema de ação nas cadeias de celulose são mostrados na Figura 8.

Quadro 2 – Enzimas que atuam na hidrólise de celulose.

Nome da enzima	Nº EC	Onde atua
Celobiohidrolases (CBHI e IIs)	EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176	Cliva unidades de celobiose do final (reductor ou não reductor) da cadeia de celulose
Endoglucanases (EGs)	EC 3.2.1.4	Cliva regiões aleatórias da cadeia de celulose e produz novos oligossacarídeos
$\beta$ -glicosidases (BGs)	EC 3.2.1.21	Hidrolisa ligações glicosídicas de celobiose e celodextrinas

Fonte: Próprio autor.

Figura 8 – Esquema da ação das enzimas celulolíticas.



Fonte: Adaptado de Thoresen et al. (2021)

Os coquetéis enzimáticos comerciais têm um importante papel no processamento de materiais lignocelulósicos. Ao longo dos anos eles vêm sendo otimizados, mas ainda assim os mecanismos de como EGs e CBHs funcionam juntas são o foco de estudos (THORESEN et al., 2021). Sabe-se que BGs aliviam a inibição que CBHs sofrem pelo acúmulo de celobiose durante a conversão de lignocelulose (STERNBERG, 1977). Coquetéis desenvolvidos nos últimos anos pela Novozymes como os da série Cellic CTec tiveram atividade de BG aumentada resultando em eficiência máxima de sacarificação e não necessitando de suplementação de BGs (ØSTBY et al., 2020). A série de coquetéis Cellic CTec também foi incorporada de mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), as quais são enzimas acessórias que levam a maiores rendimentos de sacarificação (MÜLLER et al., 2015).

Resíduos de frutas vêm sendo utilizados no estudo da hidrólise com coquetéis enzimáticos. Filippi et al. (2021) realizaram pré-tratamentos com água, ácido e base em talos e bagaço de uva e o sólido residual foi hidrolisado com coquetéis comerciais de celulases liberando 22,7 g de glicose por 100 g dos sólidos pré-tratados. Bagaço de maçã pré-tratado com peróxido de hidrogênio e pectinases foi hidrolisado com celulases e teve o rendimento otimizado de açúcares fermentescíveis de 67% (LIU et al., 2019).

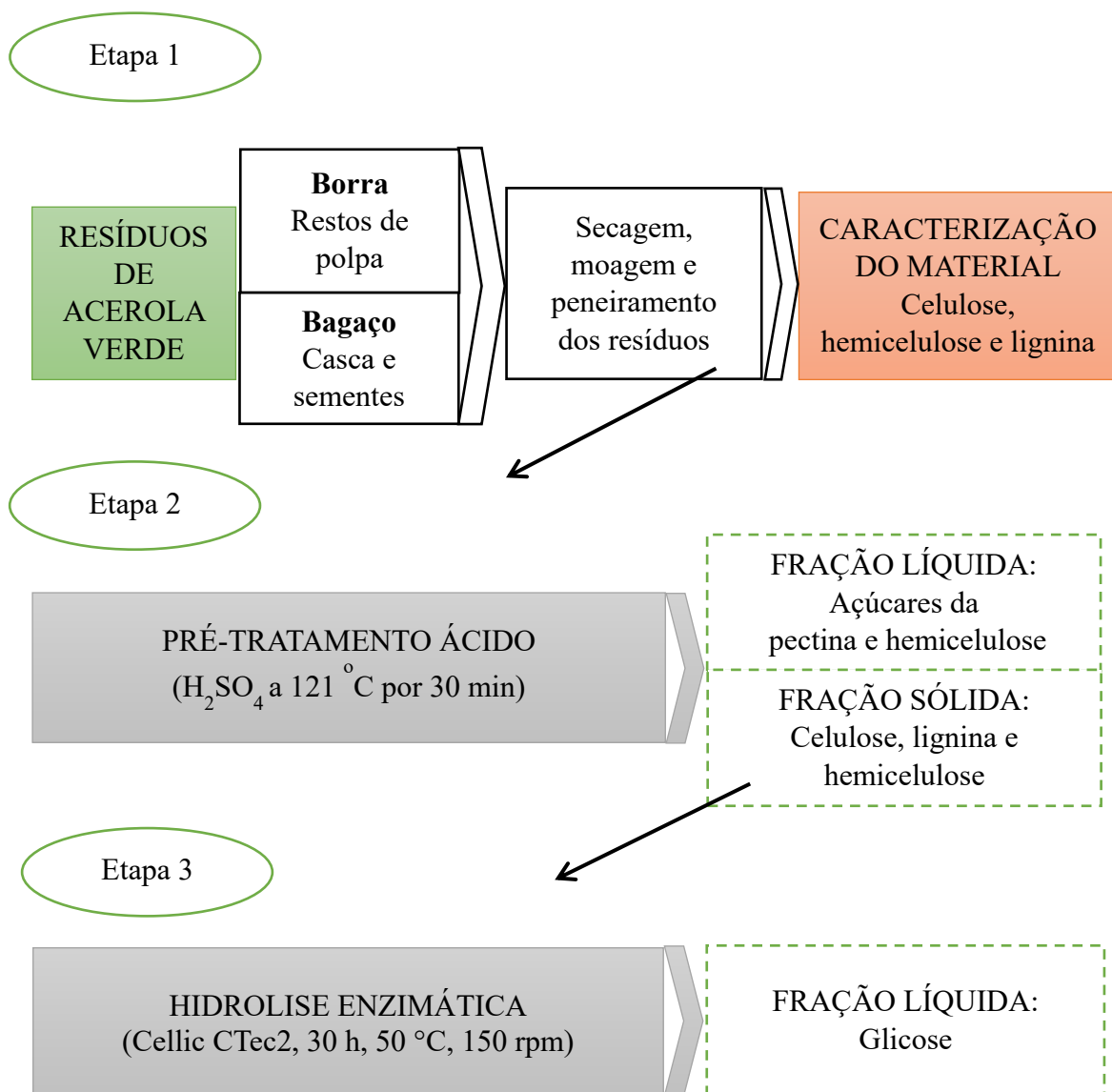
De acordo com as informações detalhadas na revisão da literatura, observa-se que os resíduos da acerola têm potencial para obtenção de açúcares, entretanto estudos precisam ser realizados para avaliar a capacidade de despolimerização do resíduo. A caracterização das frações de açúcares que compõem a biomassa é importante para que o potencial de reaproveitamento destes açúcares seja discutido. Da mesma forma, a composição dos sólidos tratados é essencial para que após os tratamentos ácido e enzimático aplicados seja também possível avaliar a recuperação dos açúcares.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os métodos utilizados para os processos de pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática e as determinações analíticas utilizadas. Na Figura 9 é apresentado um fluxograma que mostra as etapas para o desenvolvimento deste trabalho, resumidas em caracterização dos resíduos de acerola, pré-tratamento ácido para fracionamento da hemicelulose e hidrólise enzimática para despolimerização da celulose.

Figura 9 - Etapas desenvolvidas neste trabalho.



Fonte: próprio autor.

### 3.1 OBTENÇÃO DO RESÍDUO DE ACEROLA E PREPARO

Os resíduos de acerola verde *in natura* (*Malpighia emarginata* DC.) foram gentilmente fornecidos por uma indústria processadora de acerola, localizada no município de Ubajara-CE, sob as coordenadas S, 3°, 86'63,14"; - O, 41°10'56,40". A indústria fabrica produtos com elevado conteúdo de vitamina C.

O resíduo foi armazenado a temperatura de -18 °C até o uso. Foi realizada secagem do resíduo em estufa à vácuo a 40 °C por 48 h. O resíduo seco foi cominuído em um moinho de facas (De Leo, modelo EDB-5, Porto Alegre, Brasil) e em seguida foi peneirado em peneira de 600 µm. A umidade dos resíduos foi determinada no equipamento SMART Turbo™ (CEM Corporation).

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS RESÍDUOS

Os resíduos antes e após os pré-tratamentos foram caracterizados quanto aos percentuais de extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas seguindo os protocolos do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL-EUA), descritos por Sluiter et al. (2008) e Sluiter et al. (2012).

#### 3.2.1 Determinação de extrativos

Pesou-se 3 g de resíduo seco e moído em cartuchos feitos de papel filtro previamente tarados. O cartucho foi colocado em aparato Soxhlet utilizando balões de fundo chato de 500 mL e volume de solvente de 200 mL. A extração foi feita em duas etapas, primeiramente com água destilada como solvente e, em seguida, com etanol absoluto com aproximadamente 8 h de extração. A determinação de extrativos foi realizada para caracterização do material inicial. O percentual de extrativos foi calculado conforme a equação (1).

$$E(\%) = \left( \frac{M_{BSM} - M_{BE}}{M_{BSM}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

$M_{BSM}$ : massa de biomassa seca e moída (g)

$M_{BE}$ : massa de biomassa livre de extrativos (g)

E: teor de extrativos (%)

### 3.2.2 Determinações de celulose e hemicelulose

Pesou-se 0,3 g do resíduo livre de extrativos ou do resíduo pré-tratado, com umidade menor que 10%, em frascos de vidro de 250 mL. Adicionou-se 3 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (v/v) utilizando bastão de vidro para completa homogeneização do resíduo na solução. Os frascos foram colocados em agitador orbital a 30 °C por 60 min com agitação a 120 rpm. Adicionou-se 84 mL de água destilada e os frascos foram autoclavados a 121 °C por 60 min. Com um aparato de filtração por gravidade filtrou-se os hidrolisados, sendo a fração líquida submetida posteriormente à análise de glicose, xilose, arabinose, celobiose, ácido acético e fórmico (seção 3.5.4). Dessa fração faz-se também a determinação da lignina solúvel em ácido, conforme o procedimento descrito na seção 3.2.3. A fração sólida foi lavada com água destilada a 50 °C para neutralização do pH. Os papéis com os sólidos foram levados à estufa para as determinações de lignina insolúvel em ácido e cinzas descritas nas seções 3.2.4 e 3.2.5.

As determinações de celulose e hemicelulose foram realizadas por meio das equações (2) e (4) para a biomassa inicial e (3) e (5) para a biomassa pré-tratada, respectivamente.

$$C(\%) = \left[ \frac{((0,9 \times C_{GLI}) + (0,95 \times C_{CELO})) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[ \frac{1 - E}{100} \right] \times 100 \quad (2)$$

$$C(\%) = \left[ \frac{((0,9 \times C_{GLI}) + (0,95 \times C_{CELO})) \times V(L)}{M_B} \right] \times 100 \quad (3)$$

$$H(\%) = \left[ \frac{((0,88 \times C_{XIL}) + (0,88 \times C_{ARA}) + (0,72 \times C_{AC\ ACÉT})) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[ \frac{1 - E}{100} \right] \times 100 \quad (4)$$

$$H(\%) = \left[ \frac{((0,88 \times C_{XIL}) + (0,88 \times C_{ARA}) + (0,72 \times C_{AC\ ACÉT})) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \quad (5)$$

Sendo:

C: teor de celulose (%);

H: teor de hemicelulose (%);

$C_{GLI}$ : concentração de glicose (g/L);

$C_{CELO}$ : concentração de celobiose (g/L);

$V(L)$ : volume da filtração (0,087 L)

$E$ : teor de extrativos (%);

$B_{EM}$ : massa de biomassa livre de extrativos (g);

$M_B$ : massa de biomassa (g);

$C_{XIL}$ : concentração de xilose (g/L);

$C_{ARA}$ : concentração de arabinose (g/L);

$C_{AC\ ACET}$ : concentração de ácido acético (g/L);

0,9: corresponde ao fator de conversão de glicose em celulose;

0,95: corresponde ao fator de conversão de celobiose em celulose;

0,72: corresponde ao fator de conversão de ácido acético em hemicelulose;

0,8: corresponde ao fator de conversão de xilose ou arabinose em hemicelulose.

### 3.2.3 Determinação de lignina solúvel em ácido

Para determinação de lignina solúvel em ácido utilizou-se a fração líquida do hidrolisado obtido na etapa 3.2.2. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 240 nm (Hitachi U-2900) da amostra diluída de modo em que a absorbância ficasse na faixa de 0,7 a 1,0. O cálculo do teor de lignina solúvel em ácido foi calculado com a equação (6).

$$LS(\%) = \left[ \frac{Abs \times V(L) \times D}{\varepsilon \times M_B} \right] \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

$LS$ : teor de lignina solúvel em ácido (%);

$Abs$ : absorbância média de UV-Vis a 240nm;

$V(L)$ : volume filtrado (L);

$D$ : fator de diluição;

$\varepsilon$ : absorção da biomassa em comprimento de onda específico: 25

$M_B$ : massa de biomassa seca;

### 3.2.4 Determinação de lignina insolúvel em ácido

Os sólidos obtidos na etapa 3.2.2 foram filtrados em papel filtro previamente tarados. Depois de lavados foram levados à estufa a 105 °C por 24 h. O teor de lignina insolúvel em ácido foi calculada com a equação (7) para a biomassa inicial, (8) para a biomassa depois do pré-tratamento e o teor de lignina total com a equação (9).

$$LI(\%) = \left[ \frac{M_{CPR}}{M_{BE}} \right] \times \left[ \frac{1 - E}{100} \right] \times 100 \quad (6)$$

$$LI(\%) = \left[ \frac{M_{CPR}}{M_B} \right] \times 100 \quad (7)$$

$$LT(\%) = LS + LI \quad (8)$$

Sendo:

LI: teor de lignina insolúvel em ácido;

$M_{CPR}$ : massa de sólido seco após a hidrólise (g);

$M_{BE}$ : massa de biomassa sem extrativos (g);

$M_B$ : massa de biomassa (g);

LT: teor de lignina total (%).

### 3.2.5 Determinação de cinzas

Os sólidos secos descritos no item 3.2.4 foram colocados em cadinhos previamente tarados e levados à mufla a 575 °C por 24h. O teor de cinzas foi calculado conforme a equação (10).

$$Cinzas(\%) = \left[ \frac{M_f - M_i}{M_B} \right] \times 100 \quad (10)$$

Sendo:

Cinzas: teor de cinzas (%);

$M_f$ : massa final do cadinho com amostra (g);

$M_i$ : massa inicial do cadinho (g);

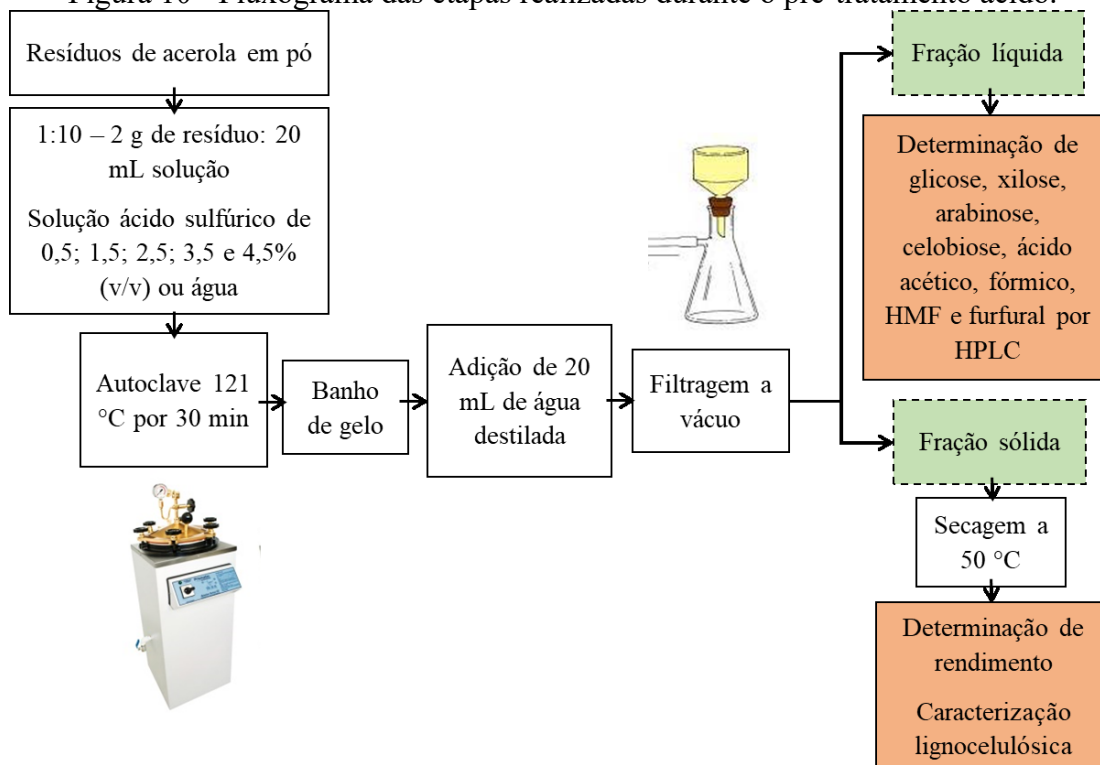
$M_B$ : massa de biomassa (g).

### 3.3 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DOS RESÍDUOS DE ACEROLA

#### 3.3.1 Pré-tratamento ácido

Os resíduos de acerola foram submetidos ao pré-tratamento com  $H_2SO_4$  para extração da fração hemicelulósica, com o procedimento baseado em Monteiro et al. (2019). O  $H_2SO_4$  (Lafan, 95-98%) foi utilizado nas concentrações de 0,17%; 0,34%; 0,5%; 1,5%; 2,5%; 3,5% e 4,5% (v/v). Além disso, uma extração apenas com água (0%) também foi realizada. Foram adicionados 20 mL da solução ácida em 2 g de resíduo em frascos de vidro de 250 mL resultando em uma razão sólido:líquido de 1:10. As extrações foram realizadas com quatro replicatas. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 30 min. Em seguida foram resfriados em banho de gelo, adicionou-se 20 mL de água destilada em cada frasco e filtrou-se o conteúdo sob vácuo em papel filtro previamente tarado. A fração sólida foi armazenada em estufa a 50 °C até completa secagem para determinação dos sólidos recuperados e posterior caracterização, enquanto a fração líquida foi submetida à caracterização química para determinação da concentração de açúcares como xilose, arabinose e glicose. As etapas realizadas durante o pré-tratamento são apresentadas na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma das etapas realizadas durante o pré-tratamento ácido.



Fonte: próprio autor.

### 3.3.2 Hidrólise enzimática

Escolhida a condição de pré-tratamento ácido, a biomassa seguiu para o tratamento enzimático, no qual se avaliou duas condições de pré-tratamento para cada resíduo. A enzima usada foi a Cellic® CTec2 produzida pela Novozymes usada na concentração de 6% em relação ao teor de celulose contido na biomassa. A reação aconteceu em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 4,8 usando frascos Schott® de 500 mL com tampa. O volume reacional foi de 200 mL e utilizou-se 5% de sólido pré-tratado. Ao longo da reação, amostras foram recolhidas nos tempos de 0; 1,5; 3; 6; 9; 12; 18; 24 e 30 h. As amostras foram centrifugadas (HT-MCD2000) por 5 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante usado para medir a concentração de açúcares redutores de acordo com o método colorimétrico usando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). As concentrações de glicose e xilose na amostra de 30 h foram quantificadas por HPLC. O cálculo dos rendimentos de glicose e xilose foi realizado com as equações (11) e (12).

$$Y_{glicose} = \frac{C_{gli} * 0,9}{ST \times T_{cel}} \quad (11)$$

$$Y_{xilose} = \frac{C_{xil} * 0,88}{ST \times T_{hemi}} \quad (12)$$

Sendo:

$C_{gli}$ : concentração de glicose medida na amostra (g/L);

$C_{xil}$ : concentração de xilose medida na amostra (g/L);

ST: concentração de sólidos totais em relação ao volume de tampão na reação de hidrólise enzimática, em g/L;

$T_{cel}$ : teor de celulose no sólido;

$T_{hemi}$ : teor de hemicelulose no sólido;

0,9: corresponde ao fator de conversão de glicose em celulose;

0,88: corresponde ao fator de conversão de xilose em hemicelulose.

### 3.4 BALANÇO DE MASSA

O balanço de massa para celulose e hemicelulose foi realizado baseado nos resultados obtidos nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. As frações de celulose,

hemicelulose e lignina obtidas da composição *in natura*, foram multiplicadas por 100 g, usada como base de cálculo. Na saída, a fração sólida recuperada foi quantificada e o rendimento foi multiplicado pelos teores de celulose, hemicelulose e lignina presentes nessa mesma fração. As massas dos compostos na corrente líquida foram obtidas pela equação (13).

$$M_{FL} = CHO * f_c \times \frac{V}{m} \times M_{bc} \quad (13)$$

Sendo:

$M_{FL}$ : massa dos compostos na fração líquida (g);

$f_c$ : fator de conversão do respectivo açúcar em celulose (0,9) ou hemicelulose (0,88);

$CHO$ : concentração do açúcar na fração líquida (g/L);

$V$ : volume de líquido usado na hidrólise (por exemplo: 20 mL de solução ácida utilizado na extração + 20 mL de água destilada adicionada depois, no caso da etapa ácida) (L);

$m$ : massa de resíduo (g);

$M_{bc}$ : massa da base de cálculo (g).

### 3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

#### 3.5.1 Determinação de açúcares redutores por DNS

O conteúdo de açúcares redutores foi quantificado nos hidrolisados obtidos durante a hidrólise enzimática pelo método colorimétrico, usando ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) com algumas modificações. A reação foi realizada em tubos de ensaio adicionando-se 0,5 mL de amostra (diluída ou não) e 1,0 mL de reativo de DNS. Para o branco adicionou-se 0,5 mL de água no lugar da amostra. A mistura foi levada para banho-maria a 100 °C por 5 min. Após, a amostra foi resfriada em banho de gelo e adicionado 13,5 mL de água destilada em cada tubo. Por fim, foi feita a leitura da absorbância em 540 nm e a análise dos dados usando a curva de calibração de glicose. Os resultados foram expressos em g/L de açúcares redutores.

#### 3.5.2 Atividade enzimática da celulase



A atividade enzimática do coquetel enzimático Cellic® CTec2 foi determinada baseada no procedimento descrito por Ghose (1987), utilizando-se papel filtro como substrato e dosando os açúcares redutores liberados por DNS segundo o método de Miller (1959).

Tiras de Papel filtro Whatman nº1 de aproximadamente 1,0 x 6,0 cm (50 mg) enroladas em espiral foram colocadas em tubos falcon de 15 mL em triplicata, e adicionou-se 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio (50 mmol e pH 4,8). O branco foi preparado com apenas 1,5 mL de solução tampão. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C por 10 min para equilíbrio da temperatura. Foi adicionado 0,5 mL da solução da enzima diluída em 50 vezes, e os tubos permaneceram em banho-maria por 60 min. Após esse tempo, os tubos foram colocados em banho de gelo para interrupção da reação. Em seguida a determinação dos açúcares redutores foi realizada.

De acordo com Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática (U) libera 1 µmol de açúcar redutor por minuto. O cálculo de atividade enzimática foi feito utilizando a equação (14).

$$\frac{U}{mL} = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_E \times t} \quad (14)$$

Sendo:

ART: açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

VT: volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do extrato enzimático) (mL);

0,18: massa molar de glicose (mg/µmol);

V<sub>E</sub>: volume do extrato enzimático utilizado na hidrólise (mL);

t: tempo de hidrólise (min).

### 3.5.3 Determinação de ácidos urônicos

A determinação de ácidos urônicos foi feita baseada no método de Blumenkrantz e Asboe-hansen (1973). A curva padrão foi construída com ácido D-galacturônico em concentrações de 10 a 80 µg/mL. Adicionou-se 0,4 mL do hidrolisado, diluído se necessário, a um tubo de ensaio com tampa. Em banho de gelo adicionou-se 2,4 mL de tetraborato de sódio 0,0125 mol/L em ácido sulfúrico concentrado, agitou-se em vórtex e os tubos foram levados para banho-maria a 100 °C por 5 min. Os tubos foram resfriados em banho de gelo e adicionaram-se 20 µL de solução 0,15% meta-hidroxifenil dissolvido em hidróxido de sódio

0,5%. Nos branco adicionou-se 20 µL de solução 0,5% de hidróxido de sódio e o valor de absorbância diminuído da absorbância das amostras. Os tubos foram agitados e após 10 min foi feita a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 520 nm.

### **3.5.4 Determinações de açúcares, ácido acético, fórmico, furfural e hidroximetilfurfural por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, celobiose, ácido acético e ácido fórmico foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando o equipamento Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu, Tokyo, Japan) e a coluna Bio-rad Aminex HPX-87H com detector de índice de refração (IR). As amostras foram filtradas (0,22 µm) e transferidas para vials. Foi utilizado solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mmol/L) como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min e 35 °C.

Furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) foram determinados no equipamento Shimadzu LCMS2020 usando a coluna Phenomenex Luna C18 e detector PDA a 274 nm. As amostras foram eluídas a uma vazão de 0,5 mL/min a 25 °C com acetonitrila: água (1:8 v/v) e 1% de ácido acético (v/v) como fase móvel. Em ambas as determinações foram usados padrões analíticos para construção das curvas de calibração e posterior cálculo das concentrações nas amostras.

### **3.5.5 Determinação de composto fenólicos totais**

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi quantificado nos hidrolisados obtidos da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados pelo método colorimétrico descrito por Singleton et al. (1999) com algumas modificações. A reação foi realizada em microtubo de 2 mL onde foi adicionado 1580 µL de água destilada, 20 µL de amostra ou 20 µL de água para o branco, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu e agitado em vórtex. A mistura foi deixada reagir por 7 min em temperatura ambiente. Após, foi adicionado 300 µL de solução de carbonato de sódio (0,25 g/mL) e incubada em banho-maria a 40 °C por 30 min. Por fim, foi feita a leitura da absorbância em 765 nm e análise dos dados usando a curva de calibração de ácido gálico. Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalente/mL.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no nível de probabilidade de 95% e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando o software Statistica 13 (Statsoft Inc, USA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA DOS RESÍDUOS

Após a secagem, moagem e peneiramento para padronização dos resíduos, estes passaram pela caracterização para determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina solúvel e insolúvel, cinzas e extrativos. No protocolo seguido, a biomassa passa primeiramente por um processo de extração em Soxhlet com água e depois com etanol como solventes para remover compostos que podem interferir em etapas analíticas posteriores. Desse procedimento se determina a fração de extrativos, que o autor descreve como compostos solúveis não estruturais da biomassa, como material inorgânico, açúcares não estruturais e nitrogênio, os quais são solúveis em água, e clorofila e ceras, solúveis em etanol (SLUITER *et al.*, 2012).

Nas Tabelas 3 e 4 são mostrados os resultados da composição lignocelulósica do bagaço e borra de acerola, respectivamente. Os resultados foram apresentados para a biomassa com e sem a aplicação do protocolo de remoção dos extrativos. Isso foi feito porque os resultados observados durante o fracionamento dos polissacarídeos, os quais são detalhados posteriormente no item 4.2.1, mostraram uma discrepância com os dados de caracterização. Foi observada uma quantidade maior de pentoses nos licores extraídos com ácido durante o fracionamento quando comparado com os resultados de composição aplicando o protocolo de remoção de extrativos. Por isso, se mostrou importante a determinação da composição do resíduo com a fração de extrativos presente, ou seja, sem a sua remoção.

O protocolo de caracterização foi desenvolvido no Laboratório Nacional de Energia Renovável dos EUA (do inglês, *National Renewable Energy Laboratory* - NREL) para se obter uma análise completa da composição de biomassas baseando-se em métodos clássicos de análises de fibras. O protocolo é composto de métodos individuais para cada fração analisada e os procedimentos foram otimizados para análise completa de madeiras e palha de milho. Geralmente funcionam bem para biomassas lenhosas e materiais herbáceos, enquanto que com outros tipos de biomassas adaptações podem ser necessárias (SLUITER *et al.*, 2010), como o resíduo de acerola que aparentemente apresenta pectina, e por esse motivo as divergências nos resultados devem ter acontecido.

Tabela 3 - Composição lignocelulósica (%) do bagaço de acerola com e sem a remoção de extrativos (base seca).

Componente	Com remoção de extrativos	Sem remoção de extrativos
Celulose como glicose	29,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	31,2 ± 2,0 <sup>a</sup>
Hemicelulose	12,6 ± 1,8 <sup>b</sup>	18,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Xilose</i>	8,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	10,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
<i>Arabinose</i>	1,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
<i>Acido acético</i>	2,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lignina insolúvel em ácido	15,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	23,7 ± 0,8 <sup>a</sup>
Lignina solúvel em ácido	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
Cinzas	0,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
Extrativos	30,8 ± 1,2	-
Total	92,2	80,4

Médias com a mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: próprio autor.

Tabela 4 - Composição lignocelulósica (%) da borra de acerola com e sem a remoção de extrativos (base seca).

Componente	Com remoção de extrativos	Sem remoção de extrativos
Celulose como glicose	25,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	29,4 ± 0,4 <sup>a</sup>
Hemicelulose	9,1 ± 1,6 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Xilose</i>	6,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	9,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Arabinose</i>	0,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Acido acético</i>	1,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lignina insolúvel em ácido	14,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	20,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
Lignina solúvel em ácido	7,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	8,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Cinzas	0,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
Extrativos	29,1 ± 0,8	-
Total	85,4	71,7

Médias com a mesma letra na mesma linha não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: próprio autor.

A principal diferença nos resultados obtidos para os polissacarídeos do bagaço está na hemicelulose (Tabela 2). O resíduo do bagaço sem a remoção dos extrativos apresentou 48% de hemicelulose a mais, enquanto que as pentoses avaliadas individualmente apresentaram aumento de 22 e 240% para xilose e arabinose, respectivamente. Essas diferenças nos teores de hemicelulose podem ser devido à fração de pectina contida na casca da acerola, que é característica das frutas. Provavelmente, a arabinose encontrada no resíduo pertence à pectina presente e não à hemicelulose. É possível que a extração em Soxhlet tenha extraído parte da fração pécica do resíduo, por isso, a fração de arabinose é baixa nos resultados dos sólidos com remoção de extrativos. Sabino et al. (2020) identificaram 6,6 % de arabinose e 4,2% de

galactose, e quantidades desprezíveis de xilose em polissacarídeos solúveis em água de resíduo de acerola (sementes, casca e restos de polpa) extraídos a 90 °C por 10 h. Isso indica que a arabinose encontrada neste trabalho esteja associada a pectina, concordando com o autor. Além disso, o autor identificou a presença de arabinogalactanas que é um polissacarídeo encontrado em frutas, como cadeias laterais da estrutura da pectina ou como constituinte do complexo ramnogalacturonana RG-I (SEYFRIED *et al.*, 2016). Neste trabalho, entretanto, não foi possível realizar a quantificação de galactose, pois a coluna usada (HPX-87H) elui a galactose junto com a xilose. A presença da galactose foi confirmada pela utilização de outra coluna (HPX-87P), na qual foi possível verificar apenas a presença ou não do açúcar, a quantificação não foi possível devido à acidez das amostras não compatível com os requisitos da coluna. Portanto, os resultados expressos aqui foram reportados apenas como xilose.

O principal constituinte da hemicelulose da borra foi a xilose que representou 6,9% do resíduo com remoção de extrativos e 9,0% sem remoção (Tabela 4). No resíduo da borra sem remoção de extrativos observou-se 27,5% de hemicelulose a mais do que no resíduo com remoção. O aumento de xilose foi 30%, enquanto a arabinose teve aumento de 100%, ambos apresentando diferenças significativas segundo o teste de Tukey.

Apesar do aumento significativo, o valor de arabinose encontrado na borra (1,2%) foi menor que aquele encontrado no bagaço (5,5%). Por ser obtido do processo de clarificação do suco de acerola, o resíduo provavelmente tem menor quantidade de pectina, pois se utilizam enzimas pectinolíticas, que liberam pectinas e os açúcares no suco. Portanto, a borra parece ser formada por demais fibras que compõem a parede celular e compostos ligados, como fenólicos que se agrupam e decantam. O resíduo da borra apresentou um baixo teor de arabinose, tanto com a remoção de extrativos quanto sem, outro indicativo de que a arabinose ou grande parte dela pode ter sido hidrolisada na etapa de clarificação.

Até o momento, há carência de informações na literatura sobre a obtenção e caracterização de polissacarídeos extraídos de subprodutos do processamento de acerola em comparação com outras matrizes vegetais. Têm-se apenas estudos que relatam os teores de hemicelulose, mas sem identificar os açúcares que a compõe. O fracionamento completo do resíduo se faz importante como forma de trazer novas alternativas para sua utilização.

## 4.2 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DOS RESÍDUOS DE ACEROLA

Após a caracterização do material, o fracionamento dos polissacarídeos foi realizado. O ácido sulfúrico foi escolhido para o pré-tratamento por ser um ácido muito utilizado no fracionamento de hemicelulose (DUSSÁN et al., 2014; GUO et al., 2018). Vale ressaltar que o objetivo foi avaliar a capacidade de extração dos açúcares que compõem o resíduo, já que até o momento não existem estudos similares para o resíduo de acerola. Após o tratamento ácido, o qual removeu grande parte da hemicelulose, um sólido rico em celulose foi gerado. A etapa enzimática complementou o fracionamento das biomassas, sendo que a digestibilidade da celulose foi avaliada em função de diferentes condições de pré-tratamento realizadas.

### 4.2.1 Efeito do pré-tratamento ácido – análise dos hidrolisados

Inicialmente, os resíduos passaram por pré-tratamento ácido em autoclave por 30 min em diferentes concentrações de  $H_2SO_4$ . Os dados das Tabelas 5 e 6 são referentes às concentrações de açúcares medidos nos hidrolisados ácidos do bagaço e da borra de acerola, respectivamente.

Tabela 5 - Concentração de açúcares, ácido acético e galacturônico (g/L) na fração líquida resultante da hidrólise ácida do bagaço de acerola em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	Fração líquida					
	Glicose	Celobiose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	Ácido galacturônico
0	0,49 ± 0,02 <sup>f</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,94 ± 0,02 <sup>f</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>d</sup>	-	3,51 ± 0,17 <sup>c</sup>
0,17	0,41 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,37 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,69 ± 0,28 <sup>abc</sup>
0,34	0,45 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>e</sup>	2,13 ± 0,02 <sup>d</sup>	3,25 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,71 ± 0,28 <sup>abc</sup>
0,5	1,17 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>d</sup>	2,91 ± 0,04 <sup>c</sup>	4,15 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,13 ± 0,02 <sup>ab</sup>
1,5	1,88 ± 0,19 <sup>d</sup>	1,01 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,64 ± 0,25 <sup>b</sup>	3,96 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,81 ± 0,03 <sup>c</sup>
2,5	2,29 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,06 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,03 ± 0,16 <sup>ab</sup>	3,95 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,43 ± 0,43 <sup>a</sup>
3,5	2,89 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,32 ± 0,13 <sup>a</sup>	4,22 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,04 ± 0,37 <sup>abc</sup>
4,5	3,47 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,99 ± 0,23 <sup>ab</sup>	3,41 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,07 <sup>c</sup>

Médias com a mesma letra na mesma coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: próprio autor.

Tabela 6 - Concentração de açúcares, ácido acético e galacturônico (g/L) na fração líquida resultante da hidrólise ácida da borra de acerola em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	Fração líquida					
	Glicose	Celobiose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	Ácido galacturônico
0	0,56 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>bc</sup>	1,22 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,02 <sup>bc</sup>	-	0,43 ± 0,06 <sup>c</sup>
0,17	1,28 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,40 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,43 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,92 ± 0,01 <sup>a</sup>
0,34	1,40 ± 0,03 <sup>cd</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>de</sup>	1,21 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>a</sup>
0,5	1,53 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>bcd</sup>	2,57 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,03 ± 0,15 <sup>a</sup>
1,5	1,97 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>ab</sup>	1,02 ± 0,06 <sup>a</sup>
2,5	1,54 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,41 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>ab</sup>
3,5	2,09 ± 0,25 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,77 ± 0,49 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,30 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,69 ± 0,06 <sup>b</sup>
4,5	2,26 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>cde</sup>	4,20 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>b</sup>

Médias com a mesma letra na mesma coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: próprio autor.

A glicose teve a sua maior concentração na condição mais drástica de ácido (4,5%) para o bagaço, enquanto para a borra as maiores concentrações foram alcançadas a partir de 3,5%. Já a celobiose tem as maiores concentrações a partir de 1,5% para os dois resíduos, o que mostra que parte da celulose hidrolisada está presente na forma do dissacarídeo e à medida que se aumenta a concentração de ácido a quantidade de celobiose diminui. Quase toda a celobiose é convertida a glicose, alcançando-se apenas 0,40 g/L e 0,08 g/L com 4,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para os resíduos do bagaço e da borra, respectivamente.

A xilose alcançou concentrações similares em ambos os resíduos, de aproximadamente 4,64 g/L, obtidas com 1,5% de ácido. Um pequeno aumento foi observado para concentrações de ácido maiores. Aparentemente toda a arabinose do bagaço foi extraída com 0,5% de ácido, visto que os valores não aumentam em concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



superiores. Para a borra isso aconteceu com 1,5% de ácido. Porém, o aumento de arabinose observado entre 0,5 e 1,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi de apenas 16%. O ácido acético é formado da hidrólise de grupos acetil presentes na hemicelulose (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). As concentrações encontradas para o ácido acético foram baixas se comparado com os outros componentes, tendo os seus valores máximos de 0,74 g/L com 3,5% de ácido para o resíduo do bagaço e de 0,31 g/L utilizando 1,5% de ácido para a borra. As concentrações de xilose, arabinose e ácido acético com 1,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no resíduo da borra são estatisticamente iguais as concentrações obtidas em tratamentos ácidos mais concentrados.

A combinação de altas temperaturas e pH ácido pode levar à formação de compostos derivados da desidratação de açúcares, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), os quais são inibidores de processos enzimáticos e fermentativos (JUNG; KIM, 2017). Além disso, ácido fórmico pode ser formado da degradação de furfural e hidroximetilfurfural (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013). A quantificação destes compostos é tão importante quanto a quantificação dos açúcares para verificar se está ocorrendo perda. A concentração média de HMF obtida foi  $90,7 \pm 2,7$  mg/L para os hidrolisados do bagaço e  $40,2 \pm 9,6$  mg/L para os hidrolisados da borra. Ácido fórmico e furfural não foram detectados em nenhuma amostra dentro do limite de detecção. Monteiro et al. (2019) encontraram 56 mg/L de HMF em hidrolisados de semente de açaí tratados com 4,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 60 min a 121 °C. O furfural não foi detectado, similarmente ao padrão encontrado neste trabalho.

A extração de ácido galacturônico também foi analisada, observando-se que com 0,17% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi possível alcançar um valor similar aos obtidos em maiores concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para os dois resíduos. Também houve uma boa extração apenas com água, entretanto é visível o efeito do aumento de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no aumento da solubilização tanto do ácido galacturônico como da xilose e arabinose. A quantidade de ácido galacturônico máxima obtida para o resíduo da borra foi de 1,03 g/L utilizando 0,5% de ácido, muito inferior à do resíduo do bagaço que alcançou 5,43 g/L, utilizando 2,5% de ácido sulfúrico, o que evidencia a menor quantidade de pectina no resíduo. Pereira *et al.* (2016) obteve 8% de casca de romã em ácido galacturônico utilizando ácido cítrico em condições otimizadas (120 min, pH 2.5, 88°C).

#### 4.2.2 Efeito do pré-tratamento ácido – análise dos sólidos recuperados

Os sólidos recuperados da hidrólise ácida foram também analisados quanto à sua composição lignocelulósica. Ao se obter a composição do sólido resultante é possível verificar quais frações foram extraídas com o tratamento ácido e quais as proporções de celulose, hemicelulose e lignina vão estar presentes no sólido tratado. As Tabelas 6 e 7 apresentam a composição lignocelulósica (%) da fração sólida resultante do pré-tratamento ácido do bagaço e da borra de acerola, respectivamente.

Tabela 7 – Composição lignocelulósica (%) da fração sólida resultante da hidrólise ácida do bagaço de acerola em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	Sólido recuperado (%)	Fração sólida (%)			
		Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros
		Glicose	Xilose		
0	76,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	33,9 ± 2,9 <sup>c</sup>	9,6 ± 0,8 <sup>ab</sup>	29,8 ± 2,1 <sup>d</sup>	26,7
0,17	71,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>	39,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	29,2 ± 0,9 <sup>d</sup>	21,1
0,34	67,5 ± 0,1 <sup>bc</sup>	44,7 ± 0,6 <sup>ab</sup>	9,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	29,8 ± 1,0 <sup>d</sup>	16,5
0,5	64,8 ± 0,3 <sup>cd</sup>	45,3 ± 1,4 <sup>ab</sup>	8,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	34,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	11,9
1,5	62,0 ± 0,5 <sup>d</sup>	48,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	39,5 ± 1,0 <sup>b</sup>	6,4
2,5	61,8 ± 0,9 <sup>d</sup>	48,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>cd</sup>	43,2 ± 1,5 <sup>b</sup>	4,4
3,5	64,7 ± 1,2 <sup>cd</sup>	49,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>d</sup>	47,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	0
4,5	61,7 ± 4,3 <sup>d</sup>	45,2 ± 0,6 <sup>ab</sup>	1,7 ± 0,5 <sup>e</sup>	42,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	11

Médias com a mesma letra na mesma coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).  
Fonte: próprio autor.

Tabela 8 – Composição lignocelulósica (%) da fração sólida resultante da hidrólise ácida da borra de acerola em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (v/v)	Sólido recuperado (%)	Fração sólida			
		Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros
		Glicose	Xilose		
0	82,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	30,3 ± 2,6 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,4 <sup>c</sup>	38,3 ± 0,9 <sup>abc</sup>	27,8
0,17	75,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	36,8 ± 1,6 <sup>ab</sup>	9,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	34,3 ± 1,5 <sup>c</sup>	19,5
0,34	68,5 ± 2,5 <sup>c</sup>	40,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	8,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	35,2 ± 1,8 <sup>bc</sup>	16,1
0,5	66,9 ± 0,5 <sup>cd</sup>	36,7 ± 2,9 <sup>ab</sup>	5,4 ± 0,4 <sup>b</sup>	39,4 ± 0,6 <sup>abc</sup>	18,5
1,5	63,8 ± 0,1 <sup>de</sup>	39,2 ± 1,6 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>c</sup>	38,2 ± 1,9 <sup>abc</sup>	20
2,5	63,8 ± 1,7 <sup>de</sup>	34,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	41,1 ± 1,7 <sup>ab</sup>	21,6
3,5	63,5 ± 1,1 <sup>de</sup>	39,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	43,3 ± 2,4 <sup>a</sup>	14,3
4,5	61,5 ± 0,8 <sup>e</sup>	40,5 ± 2,7 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>c</sup>	43,0 ± 2,2 <sup>a</sup>	13,8

Médias com a mesma letra na mesma coluna não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).  
Fonte: próprio autor.

Para ambos os resíduos as maiores porcentagens de sólidos recuperados foi alcançada utilizando apenas água. À medida que se adiciona ácido, os teores de sólido diminuem, o que é esperado, já que quanto maior a concentração de ácido mais compostos são solubilizados, especialmente a xilose, arabinose e ácido acético, como observado nas Tabelas 4 e 5, mostradas anteriormente. Os resultados demonstram maior efeito do ácido na extração de hemicelulose, no qual baixas concentrações levam à extração dos açúcares da hemicelulose, enquanto que a glicose não é tão fortemente afetada. Na verdade, observa-se o aumento do teor de celulose com o aumento da concentração de  $H_2SO_4$  para ambos os resíduos, assim como o aumento do teor de lignina, já que com a perda de hemicelulose o sólido fica concentrado em celulose e lignina. Para o bagaço a partir de 0,34% de ácido os teores de celulose não apresentaram diferenças significativas, o que aconteceu também com o resíduo da borra a partir de 0,17% de  $H_2SO_4$ .

Os teores de hemicelulose são maiores nas condições mais brandas de tratamento. A partir de 0,34% de ácido os teores decaíram, alcançando 1,7% de hemicelulose no bagaço quando 4,5% de  $H_2SO_4$  foi usado. Já para a borra, 2,7% de hemicelulose foi mantida no sólido com a mesma concentração de  $H_2SO_4$ . No entanto, os resultados das concentrações de 2,5 e 3,5% não apresentaram diferenças significativas quando comparado à concentração de 4,5%. Arabinose não foi detectada em nenhum dos sólidos tratados, o que indica que todas as condições foram efetivas na remoção deste açúcar.

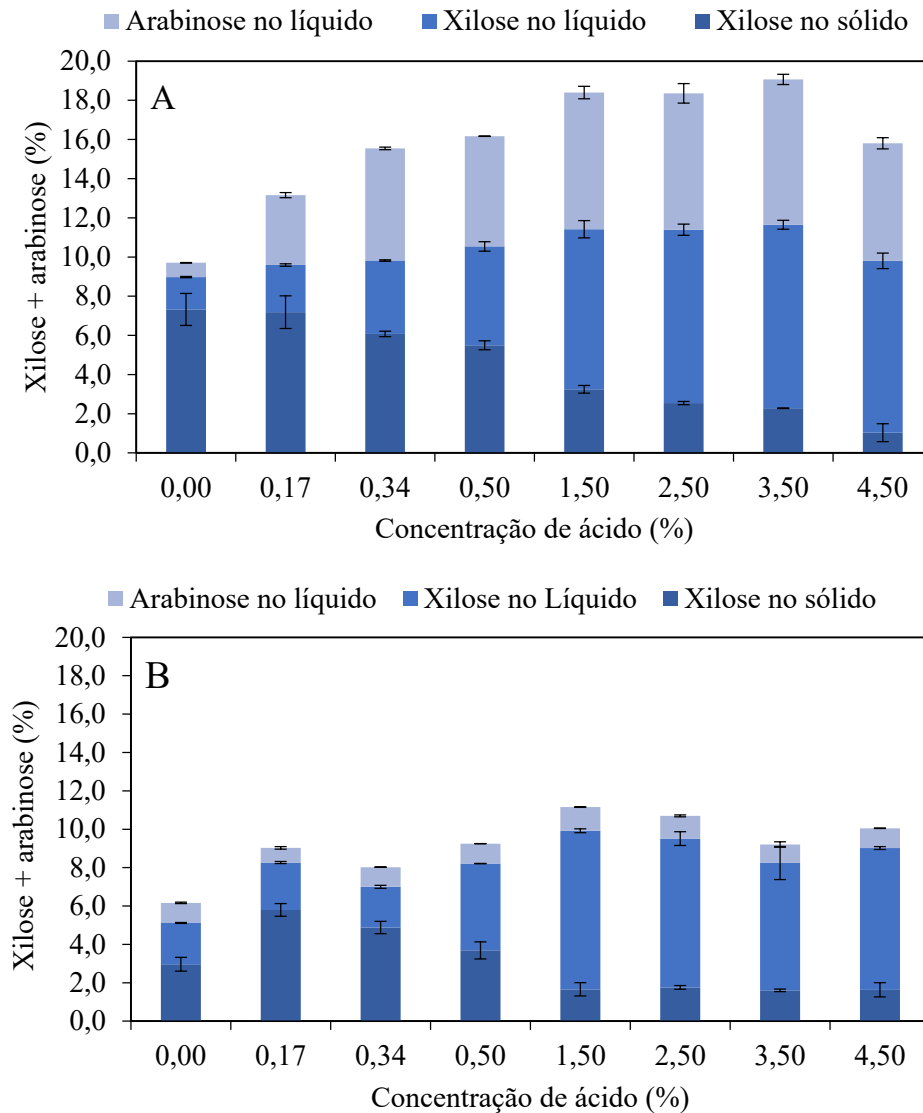
A lignina aparece com altos teores nos sólidos pré-tratados. O maior teor obtido foi com 3,5% de  $H_2SO_4$  obtendo-se 47,3% e 43,3% para os resíduos do bagaço e da borra respectivamente.

#### **4.4.2 Análise comparativa da recuperação dos açúcares**

A Figura 11 mostra o percentual de açúcares (xilose + arabinose) recuperados nas frações sólidas e líquidas após hidrólise ácida para os dois resíduos estudados. Na Figura 11-A tem-se um aumento linear no percentual de açúcares medidos na fração líquida até 0,5% de ácido, enquanto a fração sólida não apresenta grandes variações. Posteriormente observa-se o decaimento das porcentagens da fração sólida e pouca variação nos percentuais da fração líquida. Com 4,5% de ácido observa-se pequeno decaimento no somatório de açúcares que pode ter ocorrido devido à degradação dos açúcares dada a severidade do tratamento na condição mais drástica avaliada. Na Figura 11-B observa-se pouca variação no somatório das porcentagens de açúcar a partir de 0,17% de ácido para a borra. A fração líquida tem um

pequeno aumento com 0,5% de ácido enquanto a fração sólida decresce. Nas concentrações de ácido superiores, a fração sólida teve pouca variação. Portanto, para ambos os resíduos, 1,5% de  $H_2SO_4$  parece ser a concentração na qual se atinge a máxima capacidade de extração, já que a fração líquida teve pouca variação.

Figura 11 – Porcentagem de açúcares (xilose + arabinose) quantificados após a hidrólise ácida em diferentes concentrações de  $H_2SO_4$  para o bagaço (A) e borra de acerola (B).



Fonte: próprio autor.

Os valores similares encontrados nas concentrações entre 1,5 e 3,5% podem indicar de fato a concentração de pentoses que esse resíduo possui. Na Figura 11-A com 1,5% de ácido atingiu-se 18,3% de xilose + arabinose em ambas as frações analisadas (líquida + sólida). O somatório de xilose + arabinose no bagaço sem a aplicação do protocolo de remoção de extrativos, mostrado na Tabela 3, foi de 16,4%. Essa diferença pode ter sido decorrente da

dificuldade encontrada na caracterização do material com o protocolo adotado. Na Figura 11-B, para a mesma condição, observou-se 11,1% na soma da fração sólida + líquida, sendo que o valor obtido na caracterização da borra (Tabela 4) sem a remoção de extrativos foi de 10,2%.

A partir da análise acima, verificou-se que faltava parte dos açúcares no hidrolisado apenas com água (0% de  $H_2SO_4$ ) para a amostra de bagaço de acerola, já que o somatório das frações líquida e sólida resultou em 9,7%. Portanto, uma nova hidrólise nesse licor foi realizada com o intuito de identificar a presença de oligômeros. Assim, adicionou-se ácido de modo a alcançar 4% de  $H_2SO_4$  e levou-se à autoclave por 30 minutos a 121 °C para que os oligômeros pudessem ser hidrolisados e medidos na forma de monossacarídeos. Inicialmente, a concentração de arabinose medida no licor era de 0,4 g/L, após a segunda hidrólise, o valor alcançado foi de 2,8 g/L, cerca de 2,4 g/L a mais, o que confirmou a presença de arabinose na forma oligomérica no extrato aquoso. Com a concentração de oligômeros identificada, pode-se concluir que o valor de açúcares total no líquido foi de 7,3%, e que somado à fração sólida, atingiu-se 13,8%, ainda não atingindo os valores encontrados na caracterização. Isso pode ter ocorrido pela segunda hidrólise não ter sido suficiente para liberação dos monômeros ou por ter ocorrido a degradação dos mesmos. Não foi verificado aumento significativo da concentração de xilose nesse mesmo licor, e nenhuma alteração nas concentrações de açúcares na amostra da borra de acerola após a nova hidrólise, indicando que também não houve a presença de oligômeros de xilose. No entanto, no tratamento de bagaço de uvas, proveniente da produção de vinhos, dos 10% de hemicelulose presente, 74% foi obtida na forma de oligômeros utilizando 0,8% de ácido sulfúrico a 120 °C e 90 min (COSTA; TONON; GOTTSCHALK, 2018), um resultado que demonstra quanto a característica da biomassa pode interferir na extração dos açúcares.

#### **4.2.2 Hidrólise enzimática**

Após a hidrólise ácida, os sólidos resultantes ricos em celulose foram submetidos à hidrólise enzimática para avaliar a sua digestibilidade e conversão em glicose. Para isso, das condições estudadas, foram escolhidas duas condições de pré-tratamento para serem avaliadas: as concentrações de 0,5 e 1,5% de  $H_2SO_4$  para ambos os resíduos. Em 0,5% de ácido, praticamente toda a arabinose foi extraída, e cerca de 8,3% de xilose permaneceu nos sólidos após o pré-tratamento do bagaço. Usando 1,5% de ácido, 5,2% de xilose permaneceu nos sólidos, valor que está abaixo daquele encontrado a 0,5%. Além disso, a partir de 1,5% de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a fração celulósica começa a ser solubilizada. A composição lignocelulósica do sólido residual do bagaço pré-tratado pode ser observada na Tabela 7, mostrada anteriormente. O pré-tratamento com 0,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resultou em um sólido com 45,3% de celulose, 8,3% de hemicelulose e 34,5% de lignina, enquanto que aquele tratado com 1,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> possuía 48,9% de celulose, 5,24% de hemicelulose e 39,5% de lignina. As principais diferenças observadas estão nos teores de lignina e hemicelulose que são diferentes estatisticamente em nível de significância de 5%, enquanto os teores de glicose não apresentaram diferença significativa.

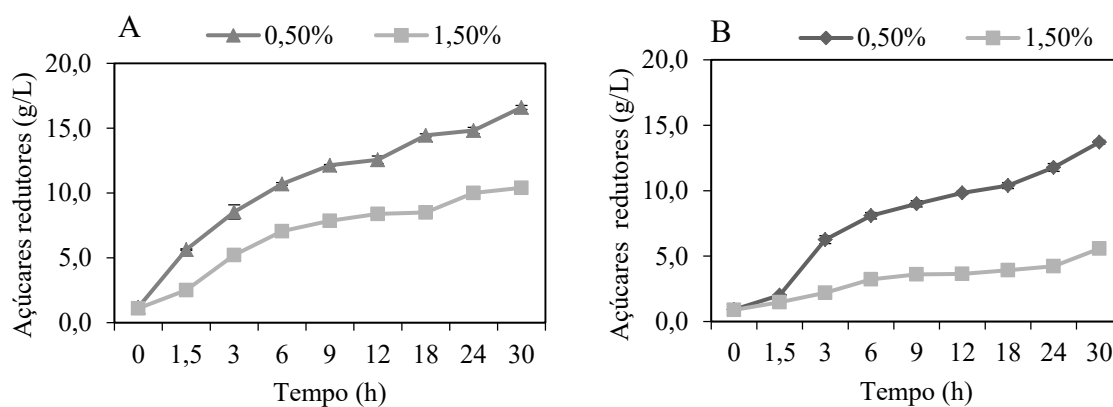
Já o sólido residual da borra pré-tratado a 0,5% de ácido possuía 36,7% de celulose, 5,4% de hemicelulose e 39,4% de lignina e o pré-tratado com 1,5% de ácido apresenta 39,2% de celulose, 2,6% de hemicelulose e 39% de lignina (Tabela 8). Apenas os teores de hemicelulose foram estatisticamente diferentes em nível de significância de 5%.

#### **4.2.2.1 Avaliação da cinética de hidrólise**

O coquetel enzimático utilizado para liberar glicose dos resíduos de acerola é indicado na hidrólise de materiais lignocelulósicos para a degradação de celulose a glicose. O complexo enzimático é formado por celulasas contendo alto teor de  $\beta$ -glucosidases e hemicelulasas, segundo o manual fornecido pelo fabricante (Novozymes). Antes da hidrólise, a atividade enzimática do coquetel Cellic CTec2 foi medida resultando em 102 U/mL de extrato enzimático.

A hidrólise dos resíduos de acerola foi realizada utilizando 6% (m/m) (g enzima/g celulose) de extrato enzimático com concentração de 5% de sólidos no meio. A Figura 12 mostra a concentração de açúcares redutores medidos pelo método de DNS ao longo da hidrólise enzimática dos resíduos pré-tratados com 0,5% e 1,5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Figura 12 – Perfil da hidrólise enzimática para os resíduos do bagaço (A) e da borra (B) de acerola pré-tratados com ácido. As amostras foram pré-tratadas com solução de  $H_2SO_4$  a 0,5 e 1,5% por 30 min a  $121^\circ C$ .



Fonte: próprio autor.

Para ambos os resíduos, o pré-tratamento com 0,5% de  $H_2SO_4$  apresentou maiores concentrações de açúcares redutores, alcançando 16,6 g/L de açúcares redutores para o bagaço e 13,7 g/L para a borra. Os resíduos pré-tratados com 1,5% de  $H_2SO_4$  alcançaram 10,4 g/L de açúcares redutores para o bagaço e 5,6 g/L para a borra no tempo de 30 h.

Já os teores de lignina nos resíduos pré-tratados encontram-se dentro de uma faixa estreita entre 35 a 39%. Apesar dos valores próximos, uma das justificativas para os resultados distintos obtidos na hidrólise enzimática são possíveis alterações na lignina dentro da estrutura lignocelulósica causadas pelo tratamento ácido, o que pode causar a adsorção das enzimas.

A inibição das enzimas pela lignina acontece principalmente por três mecanismos: 1) agindo como uma barreira física que restringe o acesso da enzima; 2) pela formação de uma ligação não produtiva entre a enzima e a lignina; 3) pela desativação das enzimas por compostos aromáticos solúveis derivados de lignina que causam precipitação enzimática ou atuam diretamente como um inibidor da enzima (AGRAWAL et al., 2021). A ligação não produtiva entre a enzima e a lignina acontece quando pré-tratamentos hidrotérmicos ou com ácido diluído promovem mudanças estruturais na lignina, permitindo que ela se redeposite na superfície do sólido em forma de esferas, onde há a adsorção das enzimas. Além disso, o aumento da severidade do tratamento aumenta o número de sítios para a adsorção improdutiva das celulasas (DOS SANTOS et al., 2019), o que parece descrever bem os resultados obtidos com os resíduos de acerola. Resultado semelhante foi observado na hidrólise de Avicel (celulose microcristalina purificada) na presença de lignina, na qual foi avaliada a adsorção de celobiohidrolase na lignina. Mudanças estruturais na lignina provocadas pela severidade do

pré-tratamento hidrotérmico foram associadas ao aumento de ligações e inativação de celulases na superfície da lignina. A aplicação de ácido durante o pré-tratamento, mesmo em temperaturas mais baixas, também resultou em aumento da inibição das enzimas (KELLOCK et al., 2019). Maneiras de reduzir as ligações enzima-lignina são estudadas, como a utilização de surfactantes e albumina de soro bovino que agem como um bloqueio na superfície da lignina quando adicionadas antes da hidrólise (AGRAWAL et al., 2016; BHAGIA; KUMAR; WYMAN, 2016).

#### 4.2.2.2 Avaliação do rendimento da hidrólise

Os cálculos de rendimento de conversão em glicose e xilose foram realizados analisando-se as amostras dos hidrolisados obtidos após 30 h em HPLC (Tabela 9), arabinose não foi detectada nas amostras.

Tabela 9 – Concentração de glicose e xilose (g/L) e rendimentos de conversão de glicose e xilose em 30 h de hidrólise.

Resíduo	% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Y <sub>glicose</sub> (g/g de cel)	Y <sub>Xilose</sub> (g/g de hemi)
Bagaço	0,5	8,51±0,03	0,64±0,01	0,34	0,12
	1,5	3,83±0,27	0,35±0,02	0,14	0,13
Borra	0,5	6,68±0,17	0,37±0,01	0,33	0,12
	1,5	2,00±0,28	0,20±0,01	0,09	0,14

Fonte: próprio autor.

A quantificação por HPLC dos açúcares presente nos hidrolisados enzimáticos confirmou a tendência dos resultados mostrados anteriormente, quantificados pelo método de DNS, no qual foi possível detectar maiores concentrações de glicose para os resíduos pré-tratados a 0,5% de ácido. As concentrações obtidas foram de 8,5 e 3,8 g/L de glicose para o bagaço pré-tratado com 0,5 e 1,5% de ácido, respectivamente. Já a hidrólise da borra resultou em 6,7 e 2,0 g/L de glicose com os pré-tratamento ácidos de 0,5 e 1,5% de ácido. As concentrações de xilose não apresentaram variações tão expressivas permanecendo entre 0,6 a 0,2 g/L.

Como pode ser observado, os valores encontrados por HPLC foram inferiores aos valores detectados por DNS. Além dos açúcares, outros compostos solubilizados durante a hidrólise podem ter causado interferência na análise por DNS, como compostos fenólicos, e a galactose, que não foi quantificada (DESHAVATH et al., 2020). Apesar do pré-tratamento



ácido, ainda foi detectado a presença de fenólicos nos hidrolisados enzimáticos. A análise de compostos fenólicos totais (CFT) resultou em  $132,0 \pm 5,2$  mg de ácido gálico/L e  $135,8 \pm 6,4$  mg de ácido gálico/L para os hidrolisados do bagaço com 0,5% e 1,5% de ácido, respectivamente e  $138,3 \pm 3,9$  mg de ácido gálico/L e  $78,0 \pm 6,4$  mg de ácido gálico /L para os hidrolisados da borra pré-tratada com 0,5% e 1,5%. Como os resultados de CFT são bastante próximos, poderíamos descartar efeitos de inibição desses compostos sobre a enzima, evidenciando a hipótese de que o desempenho da enzima foi reduzido pelo efeito do pré-tratamento ácido sobre a lignina.

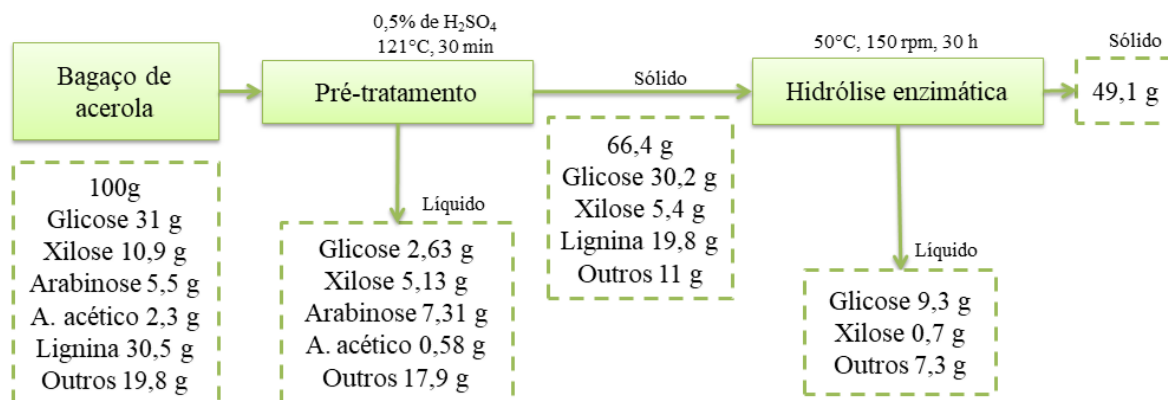
Com os dados de concentração mostrados na Tabela 9, os máximos rendimentos de glicose foram calculados e alcançaram 0,34 e 0,33 g/g de celulose, ou seja, 34% e 33% da celulose presente no bagaço e borra pré-tratados foi convertida em glicose, respectivamente. Os baixos rendimentos de conversão alcançados podem ter ocorrido devido às alterações causadas pelo pré-tratamento na lignina presente na biomassa, e talvez uma etapa de deslignificação fosse necessária para atingir rendimentos maiores. A hidrólise enzimática com Cellic CTec2 e Cellic HTec2 de bagaço de maçã, por exemplo, com a pectina e lignina removidas previamente alcançou cerca de 67% de rendimento de açúcares em 84 h (LIU et al., 2019). Os resultados obtidos na conversão da celulose presente nos resíduos de acerola e no bagaço de maçã citado acima mostram que apesar de serem resíduos de frutas, e com constituição aparentemente diferente de biomassas lignocelulósicos tradicionais, existe uma dificuldade em atingir altos rendimentos, e diferentes pré-tratamentos precisam ser testados para aumentar a digestibilidade caso haja interesse na glicose.

É importante destacar que os dois resíduos possuem diferentes características. O bagaço é formado por cascas e sementes enquanto a borra é formada apenas por restos de polpa. Os resíduos do bagaço tinham maior teor de celulose do que os resíduos da borra e os resíduos da borra tinham na sua composição maiores teores de lignina do que celulose. Apesar disso, a enzima apresentou rendimento semelhante para ambos os resíduos.

#### 4.3 BALANÇO DE MASSA

Os resultados obtidos do pré-tratamento e hidrólise enzimática foram utilizados para desenvolver um balanço de massa nas condições de hidrólise estudadas, extrapolando os resultados para 100 g de resíduos de acerola. Os resultados de caracterização obtidos sem a remoção de extrativos foram considerados nos cálculos. A Figura 13 apresenta o balanço de massa do fracionamento do bagaço de acerola.

Figura 13 – Balanço de massa calculado para o fracionamento do bagaço de acerola.



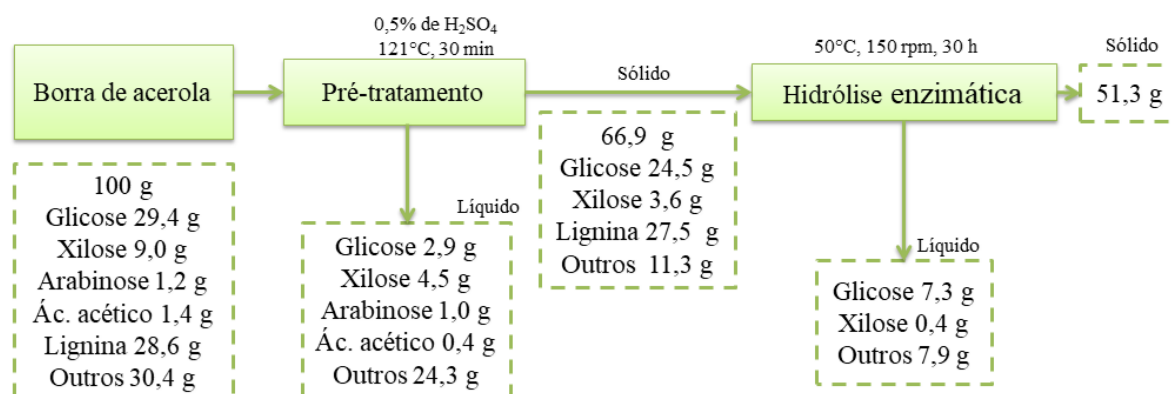
Fonte: próprio autor.

O balanço de massa para o bagaço mostra que 66,4 g dos sólidos originais foram recuperados do tratamento ácido, sendo 30,2 g de glicose, 5,4 g de xilose e 19,8 g de lignina. O somatório de glicose na fração líquida (2,6 g) e sólida (30,2 g) ultrapassa a quantidade encontrada para glicose no resíduo antes do pré-tratamento. Entretanto este valor não foi considerado significativo devido à dificuldade do método de caracterização, conforme discutido anteriormente. O mesmo pode ser observado para a quantidade de arabinose encontrada na fração líquida, que foi de 7,3 g contra 5,5 g encontrados no resíduo antes do pré-tratamento. A arabinose não foi detectada no sólido residual, o que evidencia que toda a arabinose foi extraída com a concentração de ácido utilizada. Dos 10,9 g de xilose encontrados no resíduo antes do pré-tratamento, 47% foi obtido na fração líquida, o restante permaneceu no sólido residual. Dos 30,5 g de lignina no sólido apenas 19,8 g permaneceram após o pré-tratamento, o que pode indicar que parte da lignina do resíduo solubilizou na fração líquida.

O sólido obtido ao final do pré-tratamento ácido foi submetido à hidrólise enzimática, de onde se obteve 9,3 g de celulose, cerca de 31% da quantidade de celulose no sólido e 0,7 g de xilose, que representa 13% da xilose no sólido. Da hidrólise enzimática obteve-se 49,1 g de sólido residual, que representa cerca de 74% da massa que foi submetida a hidrólise.

O balanço de massa mostrou que 25% da massa de bagaço tratada foi recuperada na forma de monômeros, onde toda a arabinose foi extraída, 53% da xilose e 38% da glicose presentes no bagaço foram obtidos com os tratamentos ácido e enzimático.

Figura 14 – Balanço de massa calculado para o fracionamento da borra de acerola.



Fonte: próprio autor.

O balanço de massa do fracionamento da borra mostra que 66,9 g dos sólidos originais foram recuperados do tratamento ácido, mostrando um valor semelhante ao encontrado para o bagaço. Dos 66,9 g de sólidos, 24,5 g são glicose, 3,6 g são xilose e 27,5 g lignina. Na fração líquida foi recuperado 2,9 g de glicose, 4,5 g de xilose e 1,0 g de arabinose. Assim como no bagaço não foi detectada arabinose no sólido residual, o que indica que toda a arabinose foi extraída com o pré-tratamento. Dos 9,0 g de xilose encontrados no resíduo antes do pré-tratamento 50% foi obtido na fração líquida, valor semelhante ao encontrado para o bagaço. A lignina na borra permaneceu praticamente sem alteração após o pré-tratamento ácido, diferentemente do bagaço que perdeu 35% de sua lignina com o tratamento.

Os 66,9 g de resíduo pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática, da onde foi liberado 7,3 g de glicose, cerca de 30% da quantidade de celulose no sólido e 0,4 g de xilose, que representa 11% da xilose no sólido. Da hidrólise enzimática obteve-se 51,3 g de sólido residual, que representa cerca de 76% da massa submetida a hidrólise.

O balanço de massa mostrou que 16% da massa de borra tratada foi recuperada na forma de monômeros, onde toda a arabinose, 54% da xilose e 34% da glicose presentes no bagaço foram obtidos com os tratamentos ácido e enzimático.

## 4 CONCLUSÕES

Os carboidratos de resíduos de acerola foram fracionados utilizando tratamento ácido e hidrólise enzimática. As diferentes concentrações de ácido sulfúrico utilizadas atingiram diferentes frações dos resíduos, sendo a pectina a mais facilmente atingida observado pela liberação de arabinose, seguida da hemicelulose. Além de arabinose e xilose, foram quantificadas maiores concentrações de ácido galacturônico nos hidrolisados do bagaço e menores concentrações no resíduo da borra, o que evidencia maiores teores de frações de pectina presente no bagaço de acerola. Através dos resultados obtidos do protocolo de caracterização somados aos resultados de hidrólise ácida, foi possível identificar que o teor de arabinose no bagaço pertence a uma fração péctica, pois foi extraída facilmente com baixas concentrações de ácido.

Entre as concentrações de ácido testadas, 1,5% de  $H_2SO_4$  foi efetiva na extração de xilose, arabinose e ácido galacturônico, já que os valores não variaram quando concentrações maiores foram usadas. A hidrólise enzimática de ambos os resíduos acabou apresentando uma baixa conversão em glicose, de apenas 33%. Uma etapa para deslignificação do resíduo poderia ter sido realizada como forma de aumentar o rendimento em glicose, já que tratamentos ácidos são mais efetivos na remoção da hemicelulose. Além disso, outros ácidos podem ser testados futuramente para avaliar o efeito sobre o fracionamento das pentoses e sobre o rendimento da hidrólise enzimática.

O balanço de massa mostrou que 53% da xilose e 38% da glicose presentes no bagaço foram obtidos com os tratamentos ácido e enzimático. Resultados bem semelhantes foram obtidos também para a borra, resultando em 54% da xilose e 34% de glicose obtidas no processo. Toda a arabinose foi obtida com o tratamento ácido com destaque para o bagaço. A presença de xilose e arabinose em altos teores se torna um diferencial nos resíduos, e pode-se ser avaliado o potencial de outros produtos, como a própria arabinose como adoçante.

A identificação das frações presentes nos resíduos de acerola possibilita novas estratégias para seu fracionamento e o máximo reaproveitamento dos resíduos provenientes do processamento da acerola verde pode ser avaliado.

## REFERÊNCIAS

- ABUDA, A. K. S.; NARAIN, N. Characterization and alternatives to use acerola residue. **Acta Horticulturae**, v. 1198, p. 145–154, 2018.
- ADEOGUN, A. I. et al. Kinetic, Thermodynamic and Optimization Studies of Dilute Acid Hydrolysis of Manihot esculenta Peels for Glucose Production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 3, p. 817–826, 2020.
- AGRAWAL, R. et al. Investigating the Enzyme-Lignin Binding With Surfactants for Improved Saccharification of Pilot Scale Pretreated Wheat Straw DBT-IOC Centre for Advanced Bioenergy Research , Research and Development Centre , Analytical Department , Research and Developmen. **Bioresource Technology**, 2016.
- AGRAWAL, R. et al. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, n. February, p. 125042, 2021.
- ALMEIDA, J. P. N. DE et al. Fungo micorrízico arbuscular e extrato de algas no crescimento inicial de porta-enxerto de aceroleira. **Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 1, p. 22–28, 2014.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ARUN, K. B. et al. Industrial Crops & Products Remodeling agro-industrial and food wastes into value-added bioactives and biopolymers. **Industrial Crops & Products**, v. 154, n. May, p. 112621, 2020.
- BANERJEE, S. et al. Hemicellulose based biorefinery from pineapple peel waste: Xylan extraction and its conversion into xylooligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, v. 117, p. 38–50, 2019.
- BELWAL, T. et al. Phytopharmacology of Acerola (Malpighia spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 74, n. January, p. 99–106, 2018.
- BHAGIA, S.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of Dilute Acid and Flowthrough Pretreatments and BSA Supplementation on Enzymatic Deconstruction of Poplar by Cellulase and Xylanase. **Carbohydrate Polymers**, 2016.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. Tailoring the message. **Analytical bioChemistry**, p. 484–489, 1973.
- BONECHI, C. et al. **Biomass: An overview**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017.
- BORGES, O. M. A. et al. Integrated green-based methods to recover bioactive compounds from by-product of acerola processing. **Ltw**, v. 151, n. July, 2021.
- BORTOLOTTI, C. T. et al. Hydrodynamic study of a mixture of West Indian Cherry Residue and Soybean Grains in a spouted bed. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 91, n. 11, p. 1871–1880, 2013.
- CAETANO, A. C. et al. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola.

**Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 02, p. 155–160, 2009.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

COSTA, J. R.; TONON, R. V; GOTTSCHALK, M. F. Enzymatic production of xylooligosaccharides from Brazilian Syrah grape pomace flour : a green alternative to conventional methods for adding value to agricultural by- products. n. August, 2018.

CUI, J. et al. Pectins from fruits: Relationships between extraction methods, structural characteristics, and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 110, n. February, p. 39–54, 2021.

DESHAVATH, N. N. et al. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 156, p. 180–185, 2020.

DIONÍSIO, S. R. et al. Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 304, n. February, p. 121290, 2021.

DOS SANTOS, A. C. et al. Lignin–Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 518–531, 2019.

DUSSÁN, K. J. et al. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 433–438, 2014.

DUZZIONI, A. G. et al. Effect of drying kinetics on main bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 1041–1047, 2013.

FILIPPI, K. et al. Industrial Crops & Products Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. **Industrial Crops & Products**, v. 168, n. April, p. 113578, 2021.

GARCIA-GARCIA, G. et al. A Methodology for Sustainable Management of Food Waste. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 6, p. 2209–2227, 2017.

GERSCHENSON, L. N. The production of galacturonic acid enriched fractions and their functionality. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 23–30, 2017.

GULLÓN, B. et al. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 153–161, 2013.

GUO, J. et al. Optimization of acid pretreatment and enzymatic hydrolysis on the production of ethanol fuel from waste banana peels. **Energy and Environment**, v. 29, n. 8, p. 1354–1364, 2018.

GÜZEL, M.; AKPINAR, Ö. Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. **Food and Bioproducts Processing**, v. 115, p. 126–133, 2019.

HEGDE, S.; LODGE, J. S.; TRABOLD, T. A. Characteristics of food processing wastes and their use in sustainable alcohol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 81, n. July 2017, p. 510–523, 2018.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels

- production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose : inhibitors and detoxification. p. 1–10, 2013.
- JUNG, Y. H.; KIM, K. H. Evaluation of the main inhibitors from lignocellulose pretreatment for enzymatic hydrolysis and yeast fermentation. **BioResources**, v. 12, n. 4, p. 9348–9356, 2017.
- KELLOCK, M. et al. Effect of hydrothermal pretreatment severity on lignin inhibition in enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, 2019.
- LENIHAN, P. et al. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 2, p. 395–403, 2010.
- LIAO, Y. et al. The role of pretreatment in the catalytic valorization of cellulose. **Molecular Catalysis**, v. 487, n. January, p. 110883, 2020.
- LIU, L. et al. Biomass and Bioenergy Promoting hydrolysis of apple pomace by pectinase and cellulase to produce microbial oils using engineered *Yarrowia lipolytica*. **Biomass and Bioenergy**, v. 126, n. May, p. 62–69, 2019.
- LOIX, C. et al. Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. October, p. 1–19, 2017.
- LOUSADA JÚNIOR, J. E. et al. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 70–76, 2006.
- LU, Y. et al. Review Article Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. v. 2017, 2017.
- LUO, J.; XU, Y. Comparison of Biological and Chemical Pretreatment on Coproduction of Pectin and Fermentable Sugars from Apple Pomace. n. 159, p. 129–137, 2020.
- MARQUES, T. R. et al. Chemical constituents and technological functional properties of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) waste flour. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 526–531, 2013.
- MÉLO, B. C. A. DE. PRODUÇÃO DE CELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM RESÍDUO DE ACEROLA (*Malpighia* sp.) UTILIZANDO *Trichoderma reesei*. 2016.
- MONTEIRO, A. F. et al. High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- MOORE, J. P.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, n. 2, p. 102–104, 2008.
- MORALES-CONTRERAS, B. E. et al. Apple pomace from variety “Blanca de Asturias” as sustainable source of pectin: Composition, rheological, and thermal properties. **Lwt**, v. 117, n. September 2019, p. 108641, 2020.
- MÜLLER, G. et al. Harnessing the potential of LPMO-containing cellulase cocktails poses new demands on processing conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.

- NOGUEIRA, G. D. R. et al. Analysis of a hybrid packed bed dryer assisted by infrared radiation for processing acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) residue. **Food and Bioproducts Processing**, v. 114, p. 235–244, 2019.
- NOGUEIRA, G. D. R.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S. Hydrothermal carbonization of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) wastes and its application as an adsorbent. **Waste Management**, v. 95, p. 466–475, 2019.
- ØSTBY, H. et al. **Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives**. [s.l.] Springer International Publishing, 2020. v. 47
- PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 739–750, 2010.
- PEREIRA, P. H. F. et al. Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 88, p. 373–379, 2016.
- PLAZA, P. E. et al. Efficient use of brewer's spent grain hydrolysates in ABE fermentation by *Clostridium beijerinckii*. Effect of high solid loads in the enzymatic hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 9, p. 2393–2402, 2020.
- POLETO, P. et al. Xylooligosaccharides: Transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics. **Process Biochemistry**, v. 91, n. December 2019, p. 352–363, 2020.
- POLETO, P. et al. Recovery of ascorbic acid, phenolic compounds and carotenoids from acerola by-products: An opportunity for their valorization. **Lwt**, v. 146, n. November 2020, 2021.
- RADENKOV, V.; JUHNEVICA-RADENKOVA, K.; SEGLINA, D. Trends in Food Science & Technology Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial. v. 77, n. May, p. 64–76, 2018.
- RAO, L. V. et al. Bioresource Technology Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol : An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299–310, 2016.
- REDDY, L. V.; VEDA, A. S.; WEE, Y. J. Utilization of banana crop residue as an agricultural bioresource for the production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium beijerinckii* YVU1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 36–41, 2020.
- REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 158–169, 2017.
- SABINO, L. B. DE S. et al. Polysaccharides from acerola, cashew apple, pineapple, mango and passion fruit co-products: Structure, cytotoxicity and gastroprotective effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 24, n. October 2019, 2020.
- SEYFRIED, M. . et al. Pectinas de plantas medicinais : características estruturais e atividades imunomoduladoras. p. 201–214, 2016.
- SILVA, J. D. O. DA et al. Characterization of acerola (*Malpighia emarginata*) industrial waste as raw material for thermochemical processes. **Waste Management**, v. 107, p. 143–149, 2020.
- SILVA, G. K. C. et al. Utilização de Resíduo Agroindustrial como Materia Prima Para a



- Produção de Ácido Cítrico por *Kluveromyces marxianus* URM 4404. v. 8, n. 5, p. 2–7, 2012.
- SILVA, P. B. et al. Drying of acerola residues in a roto-aerated dryer assisted by infrared heating. n. September, p. 11–14, 2019.
- SILVA, R. D. A. Efeito Do Pré-Tratamento Ácido Seguido De Básico Na Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Acerola. **Centro De Ciências E Tecnologia Unidade Acadêmica De Engenharia Química Programa De Pós-Graduação Em Engenharia Química**, 2014.
- SLUITER, A. et al. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. April 2008, p. 17, 2012.
- SLUITER, A. et al. NREL/TP-510-42619 Determination of Extractives in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, n. 2005, 2008.
- SLUITER, J. B. et al. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks . 1 . Review and Description of Methods. p. 9043–9053, 2010.
- SUKRUANSUWAN, V.; NAPATHORN, S. C. Use of agro-industrial residue from the canned pineapple industry for polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* strain A-04. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2018.
- SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49–58, 2016.
- THORESEN, M. et al. Revisiting the phenomenon of cellulase action: Not all endo-and exo-cellulase interactions are synergistic. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 1–13, 2021.
- VERMAAS, J. V et al. Mechanism of lignin inhibition of enzymatic biomass deconstruction. **Biotechnology for Biofuels**, n. 2015, p. 1–16, 2016.

## ANEXOS

## ANEXO I – CURVAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NAS QUANTIFICAÇÕES

Figura A1 – Curva padrão de ácido galacturônico

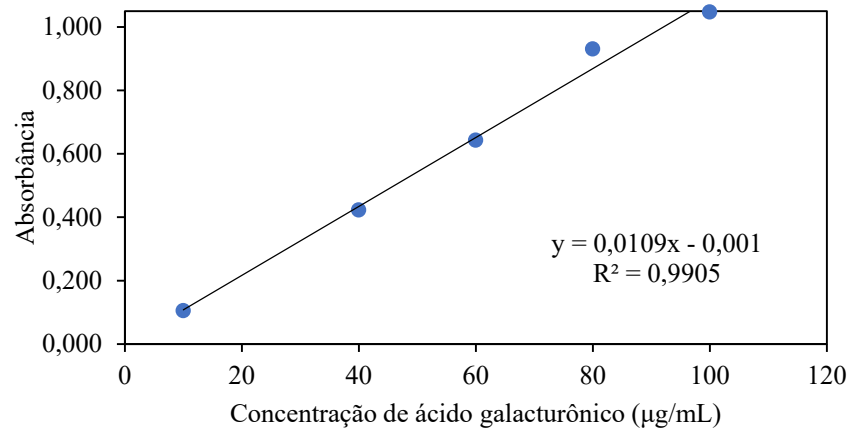


Figura A2 – Curva padrão de açúcares redutores

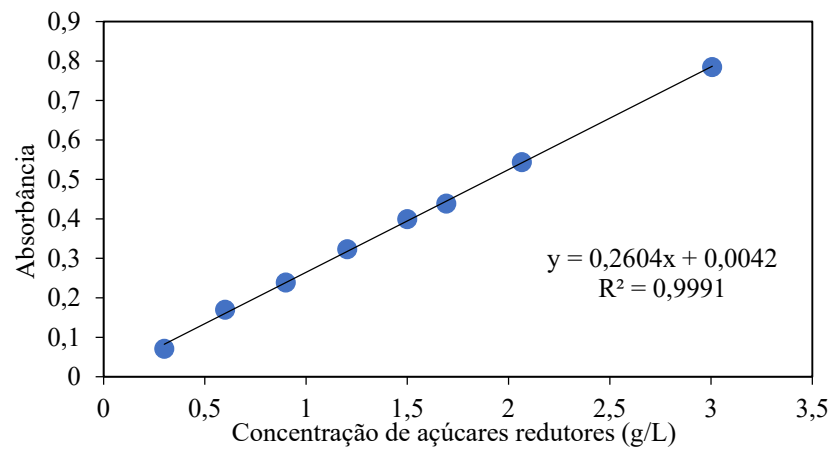
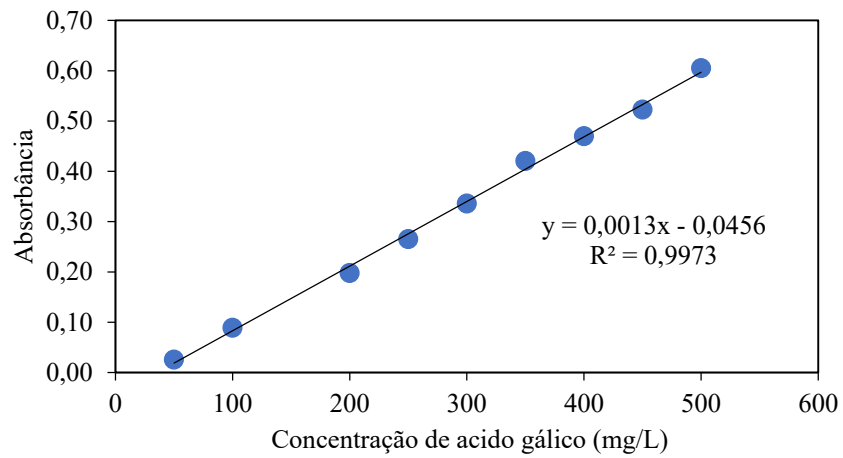


Figura A3 – Curva padrão de ácido gálico



## ANEXO II – CROMATOGRAMA OBTIDO NA ANÁLISE DE HPLC DE UMA DAS AMOSTRAS

Figura A4 – Cromatograma obtido na análise de HPLC da fração líquida do bagaço hidrolisado com 0,5% de ácido sulfúrico e os picos de cada composto analisado.

