

Artigo

A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos

Cypriano, D. Z.; da Silva, L. L.; Mariño, M. A; Tasic, L.*

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (1), no prelo. Data de publicação na Web: 24 de novembro de 2016

<http://rvq.sbq.org.br>

Orange Biomass By-products

Abstract: Brazil is the major orange producer in the world that per year counts on about ten million tons of underutilized waste (orange biomass). This biomass has a great potential for ethanol production through the hydrolysis of its high amount of polysaccharides with low cost enzyme cocktails. For this purpose, an enzymatic cocktail of cellulases (FPU 8 mL⁻¹) and pectinases (58 U g⁻¹) from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* bacteria was used for the hydrolysis of orange bagasse, thus being able to substitute the use of commercial enzymes, which involve a high cost in an industrial scale. The second phase of the proposed bioprocess for second-generation ethanol from orange biomass is called fermentation with co-cultures, and it ensured the conversion of almost 100 % of the sugars. Hesperidin and nanocellulose were also obtained from bagasse. The hesperidin (1.2 % yield) was obtained in two steps, by liquid-solid extraction and purification, while nanocellulose (1.4 % yield) was obtained through a procedure of extraction, bleaching and nanonization.

Keywords: Industrial orange bagasse; 2G ethanol; glycosil hydrolases; hesperidin and nanocellulose.

Resumo

O Brasil é o maior produtor de laranja no mundo e gera, anualmente, cerca de dez milhões de toneladas de resíduos (bagaço) que são subutilizados. Essa biomassa apresenta grande quantidade de carboidratos que podem ser aproveitados através da sua hidrólise, utilizando coquetéis de enzimas de baixo custo. As enzimas isoladas da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* foram empregadas no processo hidrolítico do bagaço de laranja, pois compõem um coquetel enzimático com atividade de celulases (8 FPU mL⁻¹) e pectinases (58 U g⁻¹), evitando o uso de enzimas comerciais, as quais envolvem maiores custos operacionais. Outra etapa do processo biotecnológico, denominada fermentação em coculturas, garantiu a produção do etanol 2G de bagaço com cerca de 100% de conversão de açúcares livres. Além disso, foram isoladas a partir do bagaço, a hesperidina e a nanocelulose, outros produtos de valor agregado. A hesperidina (1,2 % de rendimento) foi obtida em duas etapas, por extração líquido-sólido e purificação, enquanto a nanocelulose (1,4 % de rendimento) foi obtida através de etapas de extração, branqueamento e nanonização.

Palavras-chave: Bagaço de laranja industrial; etanol 2G; glicosil hidrolases; hesperidina e nanocelulose.

* Universidade Estadual de Campinas, Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

✉ ljubica@iqm.unicamp.br

DOI:

A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos

Daniela Z. Cypriano,^a Lucimara L. da Silva,^b Mayra Alejandra M. Bohórquez,^a Ljubica Tasic^{a,*}

^a Universidade Estadual de Campinas, Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Caixa Postal 6154, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

^b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, CEP 85660-000, Dois Vizinhos-PR, Brasil.

* ljubica@iqm.unicamp.br

Recebido em 31 de outubro de 2016. Aceito para publicação em 24 de novembro de 2016

1. Introdução

2. Metodologia

2.1. Caracterização do bagaço de laranja

2.2. Processos biotecnológico

2.3. Extração da hesperidina

2.4. Extração da nanocelulose

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do bagaço de laranja industrial

3.2. Processos biotecnológicos

3.3. Extração da hesperidina

3.4. Extração da nanocelulose

4. Conclusão

1. Introdução

As frutas cítricas são as mais comuns e abundantes no mundo com uma produção de cerca de 48,8 milhões de toneladas, em 2015.¹ Comumente são produzidas em países que apresentam climas tropicais e subtropicais, como a China, o Brasil e os Estados Unidos. Dentro desse gênero, a laranja (*Citrus aurantium*) se destaca como a

espécie mais produzida e conhecida. Este fruto híbrido, da família Rutaceae, foi obtido a partir do cruzamento de dois frutos: pomelo e tangerina.² Já no Brasil, em 2015, a produção mundial de laranja foi em torno de 17 milhões de toneladas.¹ A laranja *in natura* é uma das frutas mais consumidas pelos brasileiros, mas também pode ser industrializada para a produção de sucos (Figura 1) e geleias.³

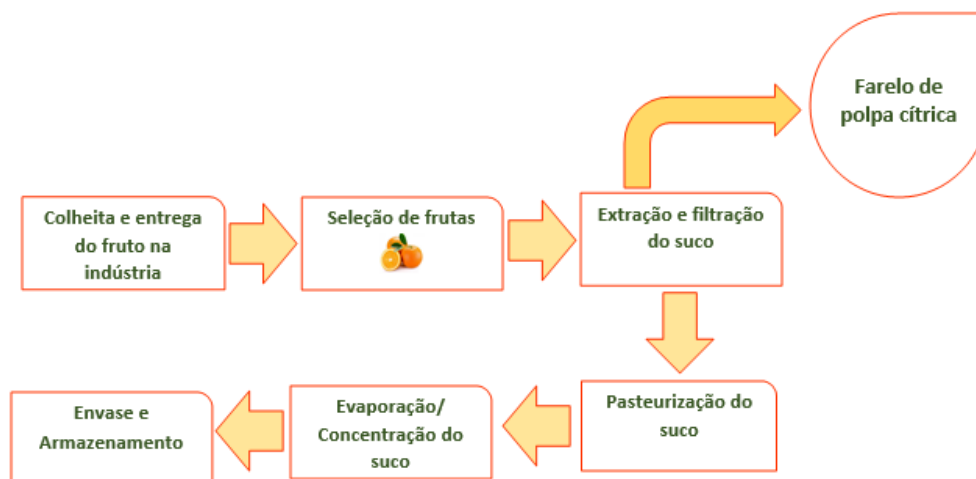


Figura 1. Etapas do processo de produção de suco de laranja *in natura*

Após a extração do suco de laranja, cerca de 50,0 % da fruta é descartada na forma de bagaço. O bagaço é composto de casca, semente e polpa e geralmente é prensado e peletizado, tendo como destino a suplementação de rebanhos bovinos e suínos,^{4,5} devido à grande quantidade de fibras. No entanto, este trabalho mostra que este bagaço pode ser utilizado na obtenção de produtos de maior valor agregado em comparação aos suplementos alimentares para animais. A laranja apresenta algumas propriedades nutricionais e funcionais que

merecem destaque, já que trazem grande benefício à saúde humana. Além de fibras, a fruta contribui com compostos antioxidantes incluindo a vitamina C, compostos fenólicos, e carotenoides,^{6,7} que auxiliam na prevenção de doenças cardíacas, neurológicas, doenças metabólicas e neoplásticas. A laranja possui entre 72,0 e 86,0 % de umidade e polissacarídeos como celulose e hemicelulose, além de açúcares solúveis como hexoses e arabinoses,⁸ como mostra a Figura 2:

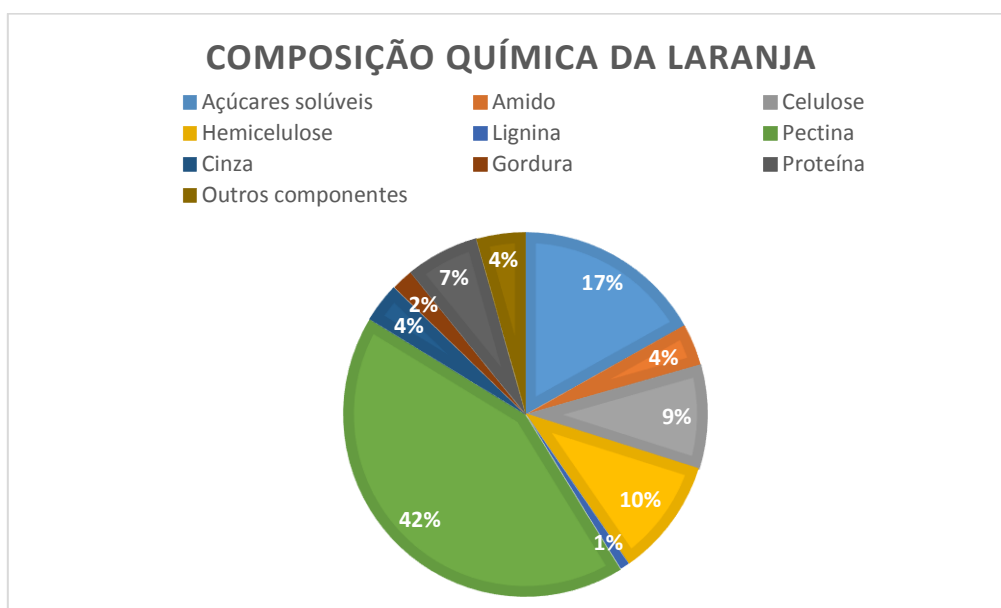


Figura 2. Composição química da laranja em porcentagem de matéria seca. Fonte: Rivas *et al.* 2008

O bagaço de laranja é um material lignocelulósico, pois apresenta lignina (cerca de 4,0 %) em sua parede celular além de uma grande quantidade de polissacarídeos (Figura 2). Quando hidrolisados, estes polissacarídeos produzem açúcares (monossacarídeos) que são facilmente fermentados por leveduras produzindo etanol. A hidrólise tem por objetivo a quebra de macromoléculas, como a celulose, para formar monômeros, como a d-glicose.^{9,10} Essa etapa é de extrema importância para a produção de fontes de energia renovável sendo determinante na obtenção de rendimento final significativo. Após a hidrólise, é feita a fermentação dos açúcares, utilizando-se comumente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Neste trabalho, além dessa levedura, foram avaliadas também as capacidades de fermentação de espécies de cepas do gênero *Candida*. No Brasil já há indústrias que produzem etanol 2G a partir do bagaço da cana de açúcar, como é o caso da Granbio e da Raízen. Acredita-se que a produção desse combustível seja em torno de 2 bilhões de litros por ano.^{11,12} O uso do bagaço de laranja para a obtenção de etanol 2G apresenta algumas vantagens em relação ao uso do bagaço de cana. O suco de laranja tem maior valor comercial que o caldo de cana e seus produtos derivados como o açúcar e o etanol combustível. Além disso, é possível obter outros produtos de alto valor agregado a partir do bagaço de laranja, como a hesperidina e a nanocelulose.

A hesperidina é um flavonoide muito comum utilizado em indústrias farmacêuticas devido ao efeito sobre a redução de risco de derrames e certos tipos de câncer, além da sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Na sua forma purificada, a hesperidina apresenta coloração amarela e possui sabor adstringente.¹³ A celulose é o biopolímero mais abundante do planeta e tem como função agregar resistência mecânica ao corpo vegetal das plantas. Por isso, é muito comum a extração desse polissacarídeo a partir de resíduos renováveis como madeira, algodão, fibras naturais e materiais lignocelulósicos.¹⁴

¹⁷ Quando a celulose é submetida à hidrólise ácida ocorre remoção das suas partes amorfas e se obtém a celulose semicristalina, que pode ser desfibrilada através de um tratamento mecânico obtendo-se assim as nanofibras de celulose (nanocelulose).^{15,18} Esse nanomaterial pode ser utilizado na obtenção de materiais de alto desempenho para diversas aplicações industriais e biomédicas, pois apresenta propriedades físico-químicas vantajosas como baixa densidade, baixa toxicidade e boa resistência mecânica.¹⁹ Dentre algumas aplicações potenciais destaca-se seu uso como nanopartículas em nanocompósitos poliméricos, revestimentos protetores, membranas utilizadas como barreiras ou para separação em sistemas de filtração, suportes para engenharia de tecidos, filmes transparentes e antimicrobianos, produtos farmacêuticos, células solares orgânicas, supercapacitores e baterias de íon lítio, dentre outros.¹⁹

Sendo assim, o objetivo desse trabalho é utilizar o bagaço de laranja como matéria-prima sustentável para a produção de etanol 2G, hesperidina e nanocelulose.

2. Metodologia

Para o desenvolvimento de toda a metodologia, o bagaço de laranja utilizado foi fornecido pela Citrosuco (Matão, SP), maior indústria de sucos do Brasil. Os procedimentos essenciais deste trabalho serão apresentados em forma de fluxograma.

2.1. Caracterização do bagaço de laranja

A caracterização do bagaço de laranja industrial é uma etapa importante, pois permite quantificar os polissacarídeos com potencial de serem hidrolisados a monossacarídeos fermentáveis, o que influenciará diretamente no rendimento global do processo. Além disso, é importante

analisar os resultados obtidos para esta biomassa e comparar os resultados obtidos com o bagaço de laranja *in natura*.

Para a caracterização foram feitos os seguintes testes: medição de pH,²⁰ pois a fermentação ocorre em pH em torno de 5,0; determinação do teor de sólidos totais; umidade;²¹ cinzas;²² fibras ácidas e neutras.

Além disso também foram determinadas as porcentagens de lignina;²³⁻²⁵ o teor de açúcar livre que determina se a amostra é susceptível a fermentação e os teores de pectina e de proteína.^{26,27} A caracterização do bagaço de laranja foi feita conforme fluxograma da Figura 3:



Figura 3. Caracterização do bagaço de laranja industrial

2.2. Processos biotecnológicos

2.2.1. Hidrólise enzimática

Para a hidrólise do bagaço de laranja foram utilizadas enzimas de baixo custo provenientes da bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, numa concentração de 5 mg de enzima/g de bagaço de laranja seco. Para verificar se a bactéria apresenta enzimas capazes de degradar os carboidratos do bagaço de laranja na etapa da hidrólise, foram determinadas as atividades de celulose,²⁸ pectinase e β -galactosidase.^{29,30} Após a remoção do seu óleo essencial, a biomassa industrial resultante foi diluída para 17 % v.v⁻¹ com água esterilizada. O antibiótico cloranfenicol foi adicionado para evitar a contaminação

durante a hidrólise. Os erlenmeyers foram mantidos a 35-40 rpm e 45 °C durante 48 h. Para analisar o conteúdo de açúcar, foram coletadas ao longo do tempo (0, 0,5, 1, 3, 6, 12, 20 h) alíquotas de 2 mL que foram filtradas e levadas para análise em CLAE.³¹ Para o isolamento das enzimas, as células da bactéria foram cultivadas no meio modificado de Luria Bertani a 32 °C durante 24 h numa incubadora - agitadora até o A600 (600 nm) de ~ 0,8. A cultura de células foi centrifugada a 4 °C e 15000 rpm durante 30 min e a massa celular foi suspensa em tampão de lise esterilizado (50 mmol.L⁻¹ de Tris - HCl, pH 8,0, 50 mmol.L⁻¹ de NaCl e 10 mmol.L⁻¹ de EDTA), numa proporção de 0,8 % v.v⁻¹. O lisado foi mantido num congelador a - 80 °C durante 1 h, descongelado a 4°C e sonificado (com 30 % de amplitude de pulso aplicada durante dois min, pulsando por 10 s

e repouso durante 40 s) em um banho de gelo. O lisado obtido foi centrifugado durante 15 min e o sobrenadante foi dialisado com água usando uma membrana de celulose (3,5 kDa, Fisher Sci.). Em seguida, foi mantido a -20 °C até à sua utilização.

2.2.2. Fermentação com leveduras

Para a fermentação foram utilizadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e duas cepas de *Candida*^{2,32}, como mostra a Figura 4. Para o crescimento das leveduras foram feitos 3 meios de cultura do tipo *yeast peptone dextrose* (YPD) utilizados para a incubação das mesmas, sob agitação, em *shaker*, por 48 h. Para a determinação do número de células dessas leveduras presentes no meio de cultura após o tempo de incubação, foi medida a absorbância a 600 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível. As fermentações foram feitas tanto por monocultura quanto por coculturas fermentativas, utilizando-se leveduras inoculadas a 10 % (v.v⁻¹).

2.3. Extração da hesperidina

Para a obtenção de hesperidina, as amostras de bagaço de laranja foram secas em estufa a 70 °C, para remoção da água, e trituradas. Aproximadamente 9 g da amostra foram colocados em um cartucho de extração de celulose que foi inserido no extrator de Soxhlet. Adicionou-se 250 mL de éter etílico a um balão de fundo redondo de 500 mL que foi acoplado ao extrator, que por sua vez estava acoplado a um condensador. A extração com éter foi conduzida por 4 h, sob refluxo intenso, para a remoção dos óleos essenciais. Então se retirou o cartucho do extrator e deixou-se evaporar todo o éter. Outro balão, contendo 250 mL de metanol, foi acoplado ao extrator e o cartucho foi

recolocado para uma nova extração que durou cerca de 3 h. Após o término da extração, o metanol foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo, até que a amostra estivesse viscosa. Para a precipitação da hesperidina adicionou-se 50 mL de ácido acético 6 %. O precipitado sólido de cor amarela foi centrifugado a 5000 xg por 15 min. O sobrenadante foi removido e a hesperidina foi lavada com água destilada. A recristalização da hesperidina foi realizada adicionando-se 20 mL de dimetilsulfóxido ao sólido, seguido de um aquecimento de 70 °C, sob agitação constante, até que a hesperidina fosse totalmente dissolvida. Então se adicionou 20 mL de água destilada, gota-a-gota, à mistura sob agitação. A solução resultante foi resfriada à temperatura ambiente e centrifugada novamente a 5000 rpm por 5 min. Os cristais foram então lavados com água aquecida e isopropanol. A hesperidina foi seca em dessecador até massa constante.³¹

2.4. Extração de nanocelulose

Para a obtenção da nanocelulose, 5 g do resíduo sólido proveniente da hidrólise enzimática sofreram branqueamento utilizando-se 4 % de hidróxido de sódio (NaOH). A solução foi autoclavada (120 °C) por 20 min e, em seguida, foi filtrada e lavada com água destilada. Na amostra sólida foi adicionada solução de 1,7 % (m.v⁻¹) de clorito de sódio (NaClO₂) em pH 4,5. Novamente a solução foi autoclava (120 °C) por 20 minutos e filtrada e o sólido lavado com água destilada. As fibras foram suspensas em água destilada e sonicadas usando 20 % de pulso de 750 W e de 20 kHz (Sonics Vibra Cell) durante 10 min, em banho de gelo. A amostra foi centrifugada a 15000 rpm por 15 min e liofilizada (Terroni). Foram obtidas nanofibras de coloração clara e de massa ultra-leve.³¹

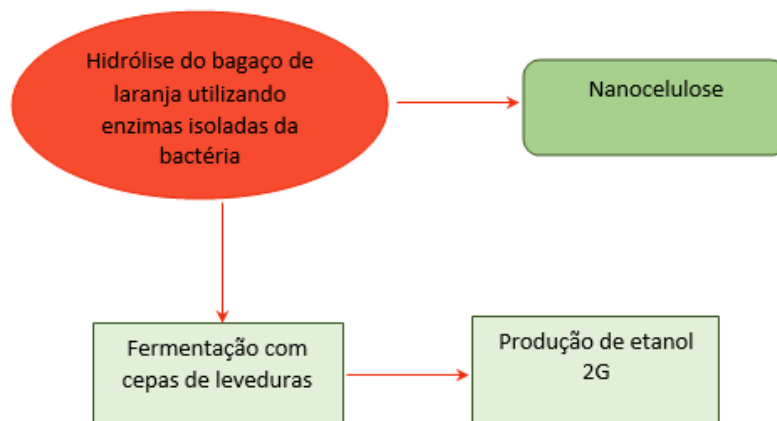


Figura 4. Esquema da parte experimental para obtenção da nanocelulose e de etanol 2G.²

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do bagaço de laranja industrial

Após a caracterização do bagaço de laranja verificou-se que a matéria-prima fornecida pela Citrosuco apresenta elevada porcentagem de polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina) e 78,23 % de umidade, estando de acordo com a literatura.³³ A Tabela 1 apresenta a comparação entre a composição do bagaço de laranja industrial avaliado neste trabalho e a composição de acordo com Rivas *et al.* 2008. As diferenças observadas são devido a

fatores como: variedades das plantas, constituição do solo, o clima (temperatura, umidade), a época de colheita e até mesmo o método de plantio, fazendo com que frutas da mesma espécie apresentem composições diferentes.

3.2. Processos biotecnológicos

3.2.1. Hidrólise enzimática

Após as amostras do bagaço de laranja industrial serem autoclavadas e hidrolisadas, as alíquotas foram filtradas e analisadas em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).

Tabela 1. Composição do bagaço de laranja da Citrosuco e do caracterizado por Rivas *et al.*, 2008

Composição	Porcentagem (%) obtida do bagaço de laranja neste estudo	Porcentagem (%) obtida do bagaço de laranja por Rivas <i>et al.</i> 2008
Água	78,23 ± 2,25	72,00-86,00
Proteína	5,51 ± 0,03	1,16
Celulose	4,30 ± 0,20	1,93
Hemicelulose	1,38 ± 0,03	2,21
Lignina	0,91 ± 0,15	0,18
Pectina	0,104 ± 0,090	8,93
Açúcar livre	1,0 ± 0,1	3,55
Cinzas	10,50 ± 0,25	0,74

Os resultados dos picos cromatográficos foram analisados para obtenção de curvas de calibração dos açúcares (monossacarídeos).

As curvas são obtidas usando as equações das retas de concentração de cada açúcar.

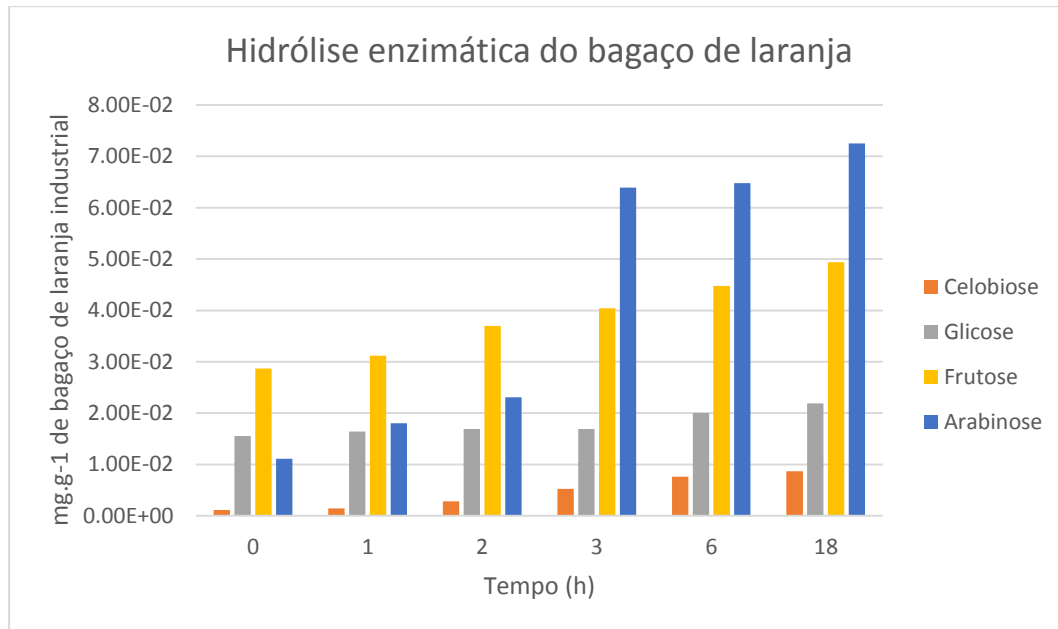


Gráfico 1: Quantidade de açúcares liberados em função do tempo de hidrólise hidrólise enzimática

O monitoramento da hidrólise foi feito por 18 h (Gráfico 1). Na hidrólise, percebe-se que com o passar do tempo, a quantidade de açúcares aumenta, já que neste processo ocorre a quebra dos polissacarídeos e consequente liberação dos monômeros. A celulose é constituída de glicose enquanto que outros monômeros como a frutose e arabinose são obtidos a partir da hidrólise da hemicelulose, que é constituída por diversos tipos de açúcares. Esses açúcares livres são fermentados na 2ª etapa do processo biotecnológico, utilizando-se leveduras para a formação do etanol 2G.

3.2.2. Fermentação com leveduras

Verificou-se que a conversão de açúcar (d-glicose e d-frutose) em etanol variou de 61,8 a 99,0 % na fermentação com a monocultura *Candida parapsilosis* NRRL Y-12969, e que a produção máxima de etanol ocorre na sexta

hora, onde são mínimas as quantidades de açúcares (Gráfico 2).

Também podemos afirmar que o rendimento do processo fermentativo foi maior utilizando-se essa cepa em comparação com a cepa *Candida parapsilosis* IFM 48375 (dados não apresentados).

As fermentações com coculturas foram feitas pela *Saccharomyces cerevisiae* e as cepas de *Candida* separadamente. Resultados semelhantes aos obtidos na fermentação em monocultura foram obtidos utilizando-se a cocultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida parapsilosis* IFM 48375, com conversão de açúcar em etanol (de 81,8 a 100,0 %). Neste caso também se observa que o consumo de açúcares decresce até a sexta hora e consequentemente, a produção de etanol é crescente até atingir seu valor máximo neste tempo (Gráfico 3).

Pode-se inferir a partir da análise dos resultados que foi obtido maior rendimento

com o uso da *Saccharomyces cerevisiae* com *Candida parapsilosis* IFM 48375 em comparação com a cocultura utilizando-se *S. cerevisiae* e *Candida parapsilosis* NRRL Y-12969 (dados não apresentados).

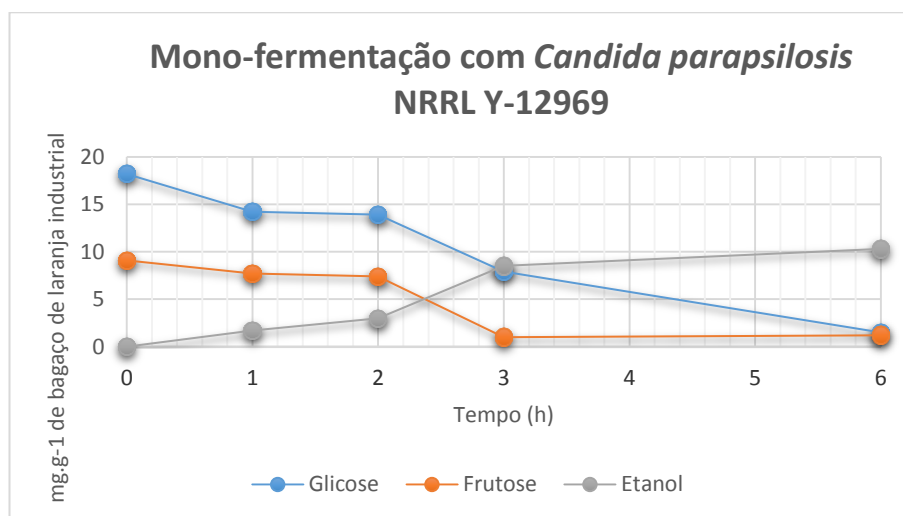


Gráfico 2. Quantidade de açúcares e etanol em função do tempo de fermentação em monocultura utilizando-se cepas de *Candida parapsilosis* NRRL Y-12969

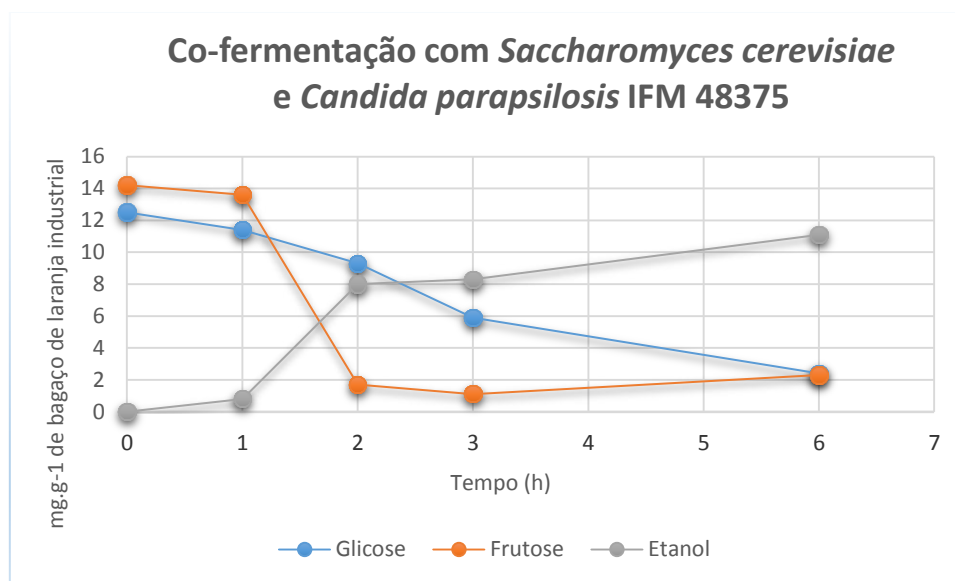


Gráfico 3. Quantidade de açúcares e etanol em função do tempo de fermentação em cocultura utilizando-se cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e cepas de *Candida parapsilosis* IFM 48375

A partir dos resultados obtidos nas fermentações verificou-se que a conversão de açúcares em etanol 2G é mais eficaz utilizando-se coculturas em relação a monoculturas, devido à sinergia entre as duas leveduras utilizadas.²⁰ A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tradicionalmente utilizada nos processos de panificação e

obtenção de etanol, precisa de certo tempo de adaptação enquanto que as espécies de *Candida* se adaptam mais rapidamente ao meio reacional. A conversão do bagaço de laranja não chega a 100 %, pois a *Saccharomyces cerevisiae* fermenta apenas d-glicose e d-frutose, enquanto que os demais

açúcares são fermentados por outros tipos leveduras.

3.3. Extração da hesperidina

A partir de 5,0 g do bagaço de laranja industrial foi obtido um sólido cristalino de coloração amarela com um rendimento de 1,2 %. A caracterização do sólido foi determinada através de espectroscopia de infravermelho (FTIR) e RMN de ^1H e de ^{13}C ,

como mostram os Gráficos 4, 5 e 6, respectivamente.

O espectro de infravermelho da amostra apresentou fortes bandas de estiramento de OH em 3544 e 3470 cm^{-1} , de CH (alifático) em 2976 , 2916 e 2848 cm^{-1} , de C=C (aromático) em 1606 , 1519 , 1467 e 1443 cm^{-1} , de C=O (aldoses e cetoses) em 1648 cm^{-1} , além de estiramentos de C-O em 1298 , 1276 , 1240 , 1203 , 1182 , 1154 , 1131 , 1094 , 1050 , 1033 e 1009 cm^{-1} . Estas bandas coincidem com as bandas encontradas num espectro teórico tido como referência.³⁴

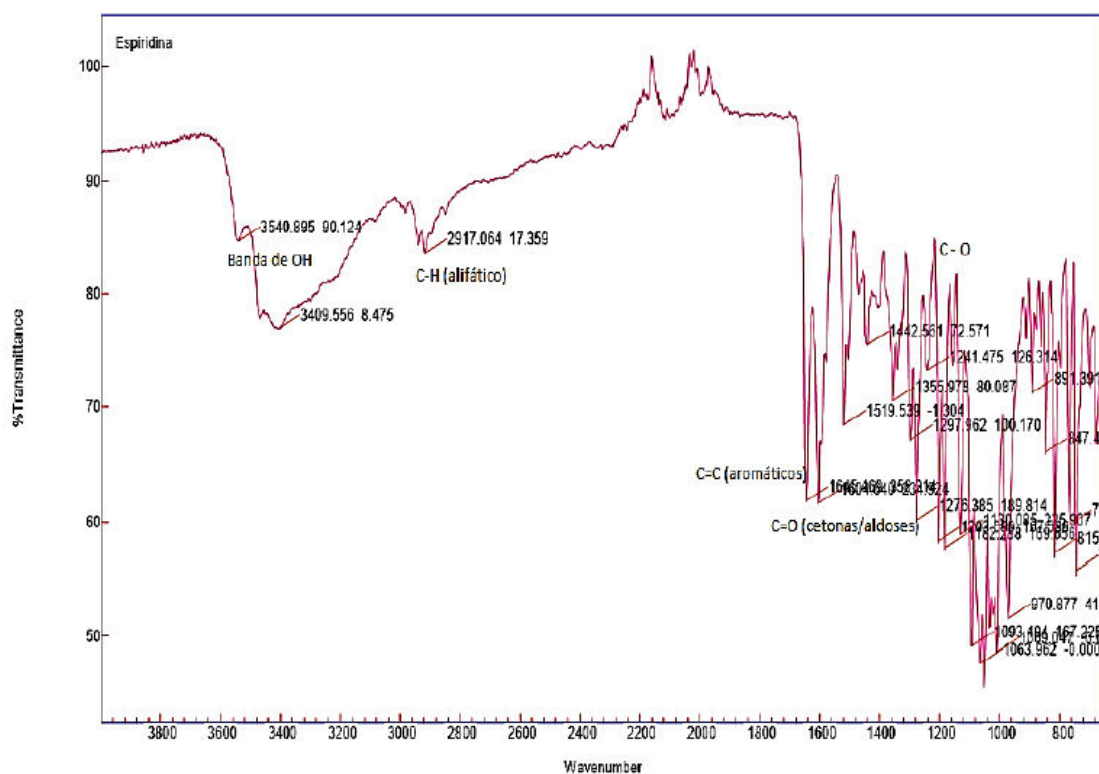


Gráfico 4. Espectro de infravermelho (FTIR) da hesperidina isolada do bagaço de laranja industrial

O espectro de RMN de ^1H da hesperidina (Gráfico 5) apresentou todos os picos de acordo com os deslocamentos químicos característicos encontrados na literatura para essa molécula.^{35,36}

A hesperidina apresentou sinais típicos relativos ao esqueleto flavonona δ 5,51 (1H, dd, $^3J = 12,1$), aos três prótons de 1, 3, 4

trissubstituído em anel em δ 6,91 (3H, m), aos dois prótons anoméricos de glicose e ramnose em δ 4,98 (1H, d, $^3J = 7,3\text{ Hz}$) e 4,53 (1H, m), um sinal de metóxido em δ 3,8 (3H, s), um sinal de metila em δ 1,09 (4H, d, $^3J = 6,2\text{ Hz}$), e dois sinais de fenóis em δ 12,02 (1H, s, 5-OH) e 9,09 (1H, s).

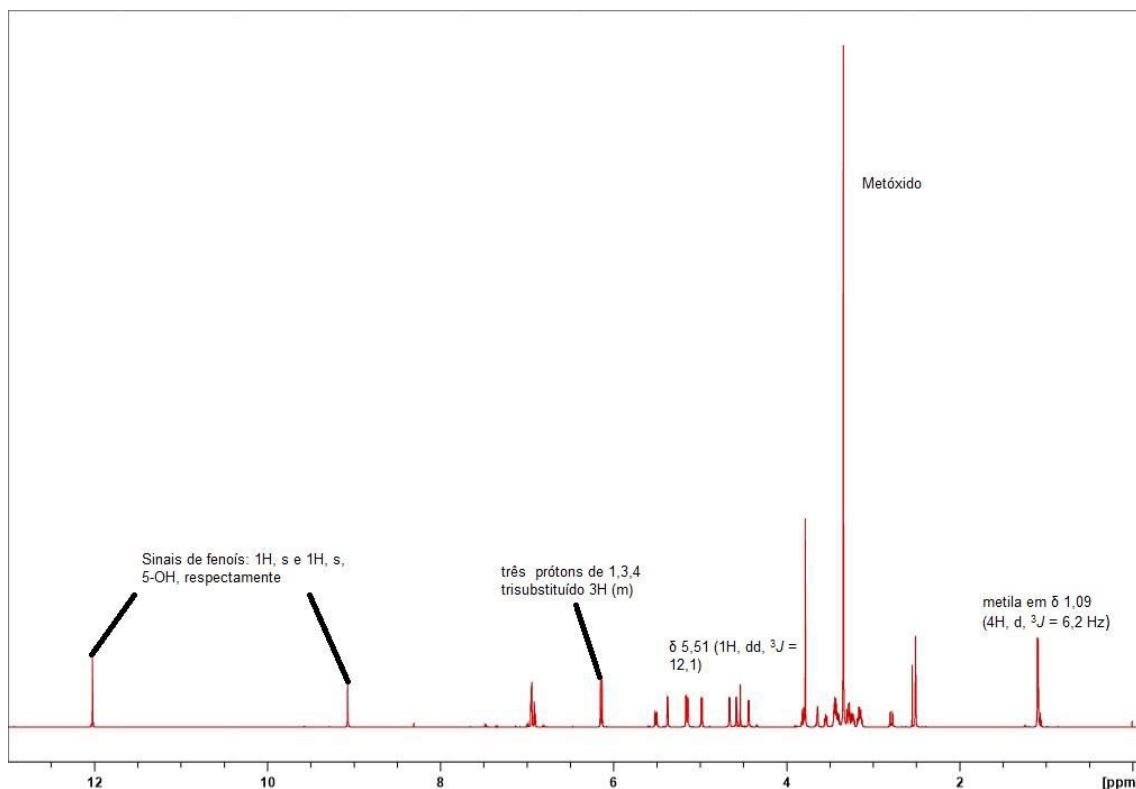


Gráfico 5. Espectro de RMN de ^1H da hesperidina isolada do bagaço de laranja industrial

A caracterização da hesperidina por RMN de ^{13}C (Gráfico 6) mostrou deslocamentos químicos característicos para hesperidina de acordo com os dados da literatura: (63 MHz, DMSO-d_6) δ : 197,3 (C-4), 165,4 (C-7), 163,4 (C-5), 162,8 (C-9), 148,2 (C-4'), 146,7 (C-3'), 131,4 (C-1'), 118,2 (C-6'), 114,5 (C-2'), 112,3 (C-5'), 103,6 (C-10), 100,9 (C-1'''), 99,65 (C-

1''), 96,62 (C-6), 95,79 (C-8), 78,12 (C-2), 75,74 (C-3''), 75,30 (C-5''), 72,98 (C-2''), 71,83 (C-4'''), 70,25 (C-4''), 69,95 (C-2''') 69,32 (C-3'''), 68,11 (C-5'''), 65,69 (C-6''), 55,91 (OCH_3), 42,02 (C-3), 18,11 (C-6''').^{34,35}

A partir dos espectros de RMN foi obtida a estrutura da hesperidina, apresentada na Figura 5:

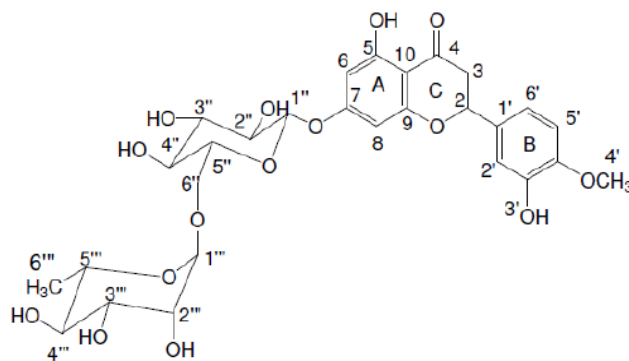


Figura 5. Representação da estrutura da hesperidina após a caracterização por RMN

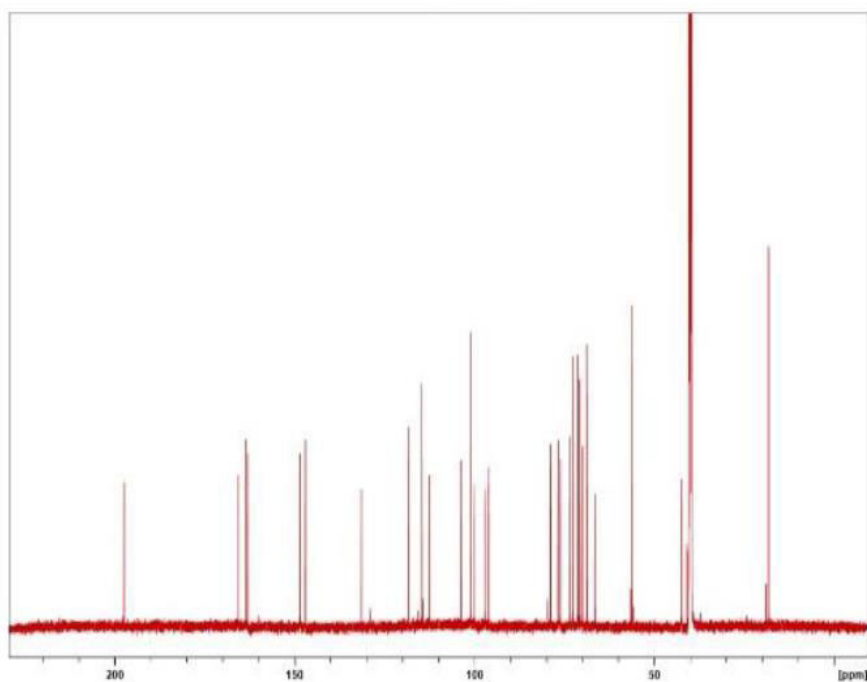


Gráfico 6. Espectro de RMN de ^{13}C da hesperidina isolada do bagaço de laranja industrial

3.4. Extração de nanocelulose

A partir de 5,0 g do bagaço de laranja industrial hidrolisado foi extraída a

nanocelulose na forma de um sólido de baixa densidade, branco e com um rendimento de 1,4 %. O sólido foi caracterizado pelos métodos de: infravermelho (Gráfico 7) e RMN de ^{13}C (Gráfico 8).

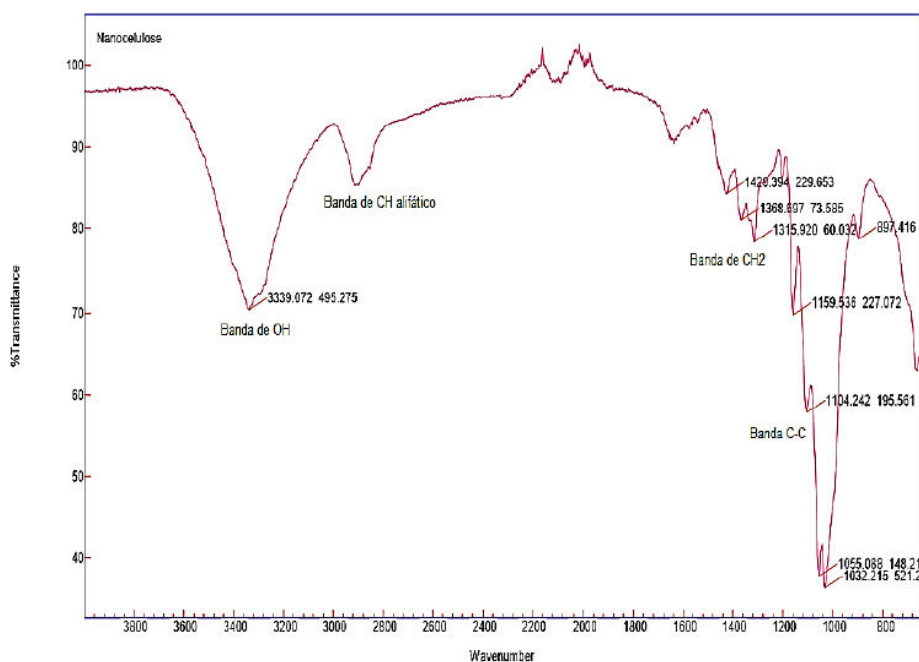


Gráfico 7. Espectro de infravermelho da nanocelulose isolada do bagaço de laranja industrial

O espectro de infravermelho apresentou uma forte banda de estiramento de OH em 3544 e 3470 cm^{-1} , de CH (alifático) em 2976, 2916 e 2,848 cm^{-1} , de CH_2 em 1315 cm^{-1} , de estiramento de C-O-C entre 1162 e 1125 cm^{-1} , estiramentos de C-C em 1104 cm^{-1} , estiramentos de C-H entre 1375 a 1320 cm^{-1} , e de C-O entre 1047 e 1004. Estes resultados estão de acordo com outros da literatura.³⁷⁻³⁹

O espectro de RMN de ^{13}C da nanocelulose (Gráfico 8) mostra um pico de carbono anomérico (C1) em 102 ppm, seguido de um C2, C3 e C5 entre 72 e 76 ppm e o C6 de metileno em 60 ppm. O pico atribuído ao C4 está na região entre 84 (superfície de fibrilas menos ordenadas) a 89 ppm (fibrilas com estrutura ordenada). A região de 87 a 93 ppm corresponde a fase cristalina da estrutura da celulose.^{39,40}

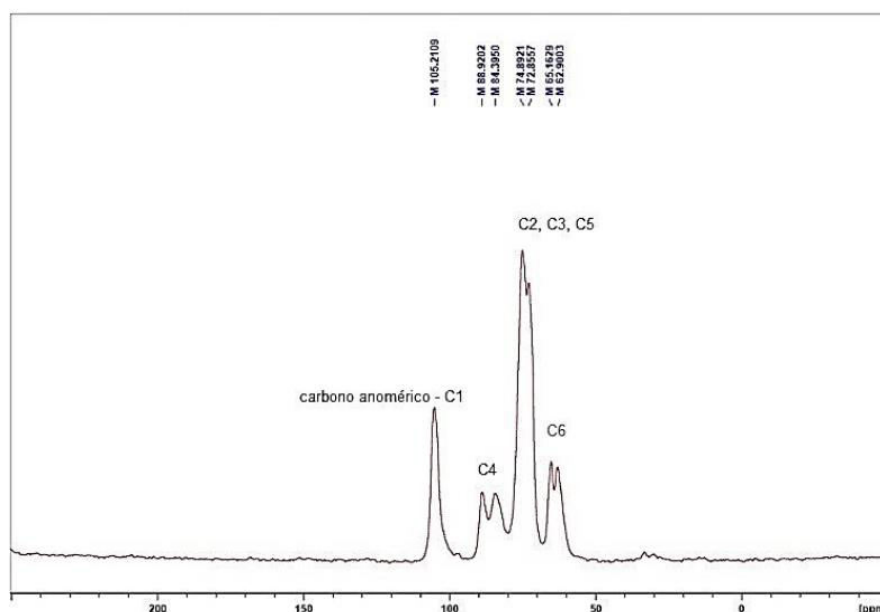


Gráfico 8. Espectro de RMN de ^{13}C da nanocelulose isolada do bagaço de laranja industrial

4. Conclusão

Pode-se concluir que a obtenção de etanol 2G foi realizada com êxito a partir da hidrólise enzimática do bagaço de laranja industrial utilizando-se enzimas provenientes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. O máximo de etanol 2G produzido na fermentação corresponde a até 51,11 % de açúcares fermentáveis. Baseando-se nesses dados, poderiam ser obtidas anualmente, entre 6,69 a 137,70 mil toneladas de etanol 2G, dependendo do tipo de fermentação aplicada.

Além da produção de etanol 2G, o bagaço pode ser utilizado para extração e obtenção

da hesperidina (1,2 % de rendimento) e da nanocelulose (1,4 % de rendimento). De acordo com a produção de laranja anual e pela quantidade de resíduos gerados, poderiam ser obtidas até 119,0 mil toneladas de nanocelulose, o que equivale a uma rentabilidade de U\$ 127 bilhões. Em relação à hesperidina, poderiam ser obtidas 102,0 mil toneladas do flavonoide anualmente, o que equivale a uma rentabilidade de U\$ 250 bilhões.

Desta maneira é possível utilizar este resíduo para a produção sustentável de produtos de alto valor agregado.

Referências Bibliográficas

- ¹ USDA - Citrus: World Markets and Trade, United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/>>. Acesso em: 16 de maio de 2016.
- ² Cypriano, D. Z.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Campinas, 2015.
- ³ Plano estratégico para o Citros. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/camaras_setoriais/Citricultura/35RO/35%20AA%20RO%20Citricultura_Embrapa%20parte%202.pdf>. Acesso em: 16 maio 2016.
- ⁴ Widmer, W.; Zhou, W.; Grohmann, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 5242. [PubMed]
- ⁵ Rezzadori, K.; Benedetti, S.; Amante, E.R. Proposals for residues recovery: orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing* **2012**, *90*, 606. [CrossRef]
- ⁶ Bampidis, V. A.; Robinson, P. H. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal feed Science and Technology* **2006**, *128*, 175. [CrossRef]
- ⁷ Ağçam, E.; Akyıldız, A. A Study on the Quality Criteria of Some Mandarin Varieties and Their Suitability for Juice Processing. *Journal of Food Processing* **2014**, *2014*. [CrossRef]
- ⁸ Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Converti, A.; Domínguez, J. M. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 2380. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Grohmann, K.; Cameron, R.; Buslig, B. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology* **1995**, *54*, 129. [CrossRef]
- ¹⁰ Gallant, D. J.; Bouchet, B.; Baldwin, P. M. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers* **1997**, *32*, 177. [CrossRef]
- ¹¹ Etanol 2G mobiliza iniciativas para uso sustentável de resíduos de cana. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sp/ribeirao-preto-franca/agrishow/2015/noticia/2015/04/etanol-2g-mobiliza-iniciativas-para-uso-sustentavel-de-residuos-da-cana.html>>. Acesso em: 21 Julho, 2016.
- ¹² Usina italiana produzirá etanol com palha de arroz e de trigo. Disponível em: <<http://www.correpar.com.br/usina-italiana-produzira-etanol-com-palha-de-arroz-e-de-trigo/#>>. Acesso em: 21 Julho, 2016.
- ¹³ Ghafoor, K.; Al-Juhaimi, F. Y. Bioactive compounds, antioxidant and physico-chemical properties of juice from lemon, mandarin and orange fruits cultivated in Saudi Arabia. *Pakintan Journal of Botany* **2013**, *45*, 1193. [Link]
- ¹⁴ Maddahy, N.K; Ramezanib, O.; Kermanian, H. Production of Nanocrystalline Cellulose from Sugarcane Bagasse. *ICNS4 2012*, *87*. [Link]
- ¹⁵ Costa, L. A. S.; Fonsêca, A. F.; Pereira, F. V.; Druzian, J. I. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corn stover. *Cellulose Chemistry and Technology* **2015**, *49*, 127. [Link]
- ¹⁶ Rambabu, N.; Panthapulakkal, S.; Sain, M.; Dalai, A. K. Production of nanocellulose fibers from pinecone biomass: Evaluation and optimization of chemical and mechanical treatment conditions on mechanical properties of nanocellulose films. *Industrial Crops and Products* **2016**, *83*, 746. [CrossRef]
- ¹⁷ Gómez, C. H.; Serpa, A.; Velásquez-Cock, J.; Gañán, P.; Castro, C.; Vélez, L.; Zuluaga, R. Vegetable nanocellulose in food science: A review. *Food Hydrocolloids* **2016**, *57*, 178. [CrossRef]
- ¹⁸ Teixeira, E. M.; Bondancia, T. J.; Teodoro, K. B. R.; Correa, A. C.; Marconcini, J. M.; Mattoso, L. H. C. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations.

Industrial Crops and Products **2011**, *33*, 63. [CrossRef]

¹⁹ Kumar, A.; Negi, Y.S.; Choudhary, V.; Bhardwaj, N.K. Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste. *Journal of Materials Physics and Chemistry* **2014**, *2*, 1. [CrossRef]

²⁰ Awan, A. T. A. J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, 2013.

²¹ NREL, Laboratory Analytical Procedure (LAP), para Determinação de sólidos totais da biomassa. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42621.pdf>>. Acesso em: 30 outubro 2012.

²² AOAC International. Disponível em: <www.aoac.org>. Acesso em: 5 setembro 2012.

²³ ANKOM Technology Methods` Procedure for "NDF" ("Neutral Detergent Fiber"). Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/Method_6_NDF_4013011_A200,A200I.pdf>. Acesso em: 24 fevereiro 2014.

²⁴ ANKOM Technology Methods` Procedure for "ADF" ("Acid Detergent Fiber"). Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/Method_5_ADF_4-13-11_A200,A200I.pdf>. Acesso em: 24 fevereiro 2014.

²⁵ ANKOM Technology Methods` Procedure for "ADL" ("Acid Detergent Lignins"). Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/Method_8_Lignin_in_beakers_3_13_13.pdf>. Acesso em: 24 fevereiro 2014.

²⁶ Sudhakar, D. V.; Maini, S. B. Isolation and Characterization of Mango Peel Pectins. *Journal of Food Processing and Preservation* **1999**, *24*, 209. [CrossRef]

²⁷ Braddock, R. J. & 1940-. Handbook of citrus by-products processing technology. (1999). Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?f=2013/US/US20130363000363.xml;US201300036364>>. Acesso em: 24 fevereiro 2014.

²⁸ Ghose, T. K., Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* **1987**, *59*, 257. [Link]

²⁹ Carrao-Panizzi, M. C., Bordignon, J. R., Comparação entre dois métodos para a extração de isoflavonas em cultivares de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2000**, *35*, 873. [Link]

³⁰ Phutela, U.; Dhuna, V.; Sandhu, S.; Chadha, B. S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus Fumigatus* from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology* **2005**, *36*, 63. [CrossRef]

³¹ Tasic, L.; Tsukamoto, J.; Awan, A. T.; Durán, N. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130325856, data de depósito: 18/12/2013, título: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOETANOL, ESPERIDINA E NANOCELULOSE A PARTIR DE BAGAÇO DE LARANJA", Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

³² Awan, A. T.; Tsukamoto, J.; Tasic, L. Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. *RSC Advances* **2013**, *3*. [CrossRef]

³³ Ali, J.; Abid, H.; Hussain, A. Study on some macronutrients composition in peels of different citrus fruits grown in NWFP. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* **2010**, *32*, 83. [Link]

³⁴ Aghel, N.; Ramezani, Z.; Beiranvand, S. Hesperidin from *Citrus sinensis* Cultivated in Dezful, Iran, *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2008**, *11*, 2451. [PubMed]

³⁵ Nizamutdinova, I. T.; Jeong, J. J.; Xu, G. H.; Lee, S.; Kang, S. S.; Kim, Y. S. Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *International Immunopharmacology* **2008**, *8*, 670. [CrossRef] [PubMed]

³⁶ Kokotkiewicz, A.; Luczkiewicz, M.; Kowalski, W.; Badura, A.; Piekus, N.; Bucinski, A.

Isoflavone production in *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) suspension cultures grown in shake flasks and stirred-tank bioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology*, **2013**; *97*, 8467. [CrossRef] [PubMed]

³⁷ Sheltami, R. M.; Abdullah, I.; Ahmad, I.; Dufresne, A.; Kargarzadeh. Disponível em: <http://www.ipst.gatech.edu/faculty/ragauskas_art/technical_reviews/FT-IR.pdf>. Acesso em: 30 setembro 2016.

³⁸ Ciolacu, D.; Ciolacu, F.; Popa, V. Amorphous cellulose – Structure and characterization.

Cellulose Chemistry and Technology **2011**, *45*, 13. [Link]

³⁹ Mariño, M.; Lopes, L.S.; Durán, N.; Tasic, L. Enhanced Materials from Nature: Nanocellulose from Citrus Waste. *Molecules* **2015**, *20*, 5908. [CrossRef] [PubMed]

⁴⁰ Nehls, I.; Wagenknecht, W.; Philipp, B.; Sts Cherniba, D. Characterization of cellulose and cellulose derivatives in solution by high resolution ¹³C-NMR spectroscopy. *Progress in Polymer Science* **1994**, *19*, 28. [CrossRef]