



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

JÚLIO DE MESQUITA FILHO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS ARARAQUARA

**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA**

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**BIORREFINARIA DE RESÍDUO CÍTRICO VISANDO A OBTENÇÃO DE
COLORANTES NATURAIS MICROBIANOS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Araraquara

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA

CAIO DE AZEVEDO LIMA

BIORREFINARIA DE RESÍDUO CÍTRICO VISANDO A OBTENÇÃO DE
COLORANTES NATURAIS MICROBIANOS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Araraquara

2021

L732b Lima, Caio de Azevedo.
Biorrefinaria de resíduo cítrico visando à obtenção de colorantes naturais microbianos para aplicação industrial / Caio de Azevedo Lima. – Araraquara: [S.n.], 2021.
77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Ciências.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

1. Biorrefinaria. 2. Subproduto cítrico. 3. Colorantes naturais. 4. Enzimas. 5. *Talaromyces amestolkiae*. I. Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPE5: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Biorefinaria de resíduo cítrico visando a obtenção de colorantes naturais microbianos para aplicação industrial

AUTOR: CAIO DE AZEVEDO LIMA

ORIENTADORA: VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP - Araraquara

Profa. Dra. FERNANDA PERPETUA CASCIATORI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP - Araraquara

Araraquara, 29 de setembro de 2021

DEDICATÓRIA

*A Deus força maior,
Aos espíritos benfeitores,
A minha Família: minha mãe Selma,
meu pai Celso,
Dedico.*

EPÍGRAFE

*“É muito melhor lançar-se em busca de
conquistas grandiosas, mesmo expondo-se
ao fracasso, do que alinhar-se com os
pobres de espírito, que nem gozam muito
nem sofrem muito porque vivem numa
penumbra cinzenta, onde não conhecem
nem vitória, nem derrota.”*

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, causa primeira de todas as coisas, que me permitiu vivenciar essa experiência. Aos meus mentores espirituais e espíritos benfeitores pelas boas energias e influências positivas na minha vida.

Aos meus pais Selma e Celso por tudo que me proporcionaram. Vocês são os alicerces responsáveis por essa conquista e eu sempre serei eternamente grato. Agradeço principalmente pelo amor incondicional e pelos esforços imensuráveis para que eu pudesse realizar meus objetivos. Amo vocês eternamente.

Aos meus familiares, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À orientadora Profa. Dra. Valéria Ebinuma, pela confiança, apoio, incentivo e disponibilidade sempre apresentada ao longo de todo este trabalho. Obrigado por ter me fornecido uma oportunidade valiosa de trilhar meu caminho no desenvolvimento de ciência de qualidade.

A minha querida professora e amiga Dra Glauciane Coelho, pelo imenso carinho, amor e paciência.

Aos docentes, técnicos e demais funcionários do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelo apoio, paciência e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos “Anormais”, em especial meu querido Davi, Kamila, Tácia, Marco, Rainy e Dayse. Obrigado por todo o amor, por toda paciência, companhia e risadas.

Aos meus amigos de Tuparetama, em especial Henrique e Érika, meus irmãos de coração, obrigado pelos momentos de desabafo, conselhos, carinho e sinceridade.

Aos meus amigos de Araraquara, Dona Terezinha e Marcos, por terem me acolhido desde o início e me ajudarem em diversos momentos.

Aos meus amigos, em especial a minha irmã e companheira Laura que dividiu esta aventura acadêmica comigo e me auxiliou em diversos momentos. Aos amigos de laboratório, Fernanda, Gabi, Ariane, Vitória, Flávio, Milca, Graci, Heitor, Rodney, Rafael e Victor por todos os momentos, por toda a aprendizagem, amizade, sinceridade e companhia.

Aos companheiros do grupo de pesquisa BioPPul, obrigado pela paciência, auxílio e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Agradecimento especial a Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF e a Universidade Estadual Paulista UNESP por ter oportunizado essa conquista.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES),

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela importante contribuição financeira para a realização deste projeto.

Durante esta aventura acadêmica, diversas pessoas contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho a quais eu serei eternamente grato a cada uma delas.

Sumário

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Biorrefinaria	13
2.2 Biomassa e Subprodutos Agroindustriais	15
2.2.1 Agroindústria brasileira e Indústria cítrica	17
2.2.2 Biorrefinaria de subprodutos cítricos	19
2.2 Colorantes	25
2.2.1 Colorantes naturais microbianos	27
2. OBJETIVO GERAL	31
2.1 Objetivos Específicos:	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material	32
3.2 Caracterização química do subproduto cítrico	32
3.2.1 Extração do Limoneno	32
3.2.2 Quantificação do Limoneno por CG/GC	32
3.2.3 Extração de pectina	33
3.2.4 Composição química	34
3.2.5 Hidrólise ácida	34
3.2.6 Determinação do teor de cinzas	35
3.3 Produção do colorante vermelho	35
3.3.1 Microrganismo	35
3.3.2. Preparo do inóculo	35
3.3.3 Preparo do meio de cultivo	36

3.4 Métodos Analíticos	39
3.4.1 <i>Concentração de biomassa</i>	39
3.4.2 <i>Análise de Açúcares por CLAE/HPLC</i>	39
3.4.3 <i>Quantificação de Colorantes Naturais</i>	39
3.4.4 <i>Determinação de Atividades Enzimáticas</i>	40
3.5. Estatística.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Análise química do subproduto cítrico	42
4.2 Produção do colorante vermelho	44
4.3 Produção de enzimas celulolíticas por <i>Talaromyces amestolkiae</i>	50
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
6. CONCLUSÃO	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8. APÊNDICE.....	74

RESUMO

Considerando que o Brasil é um país com alta geração de resíduos agroindustriais, estudos acerca do aproveitamento de tais resíduos, principalmente, para obtenção de produtos de valor agregado, são de grande interesse. Assim, a produção de colorantes naturais fúngicos utilizando subproduto de baixo custo, como compostos provenientes do processamento da indústria cítrica, ganha importância com vista para o desenvolvimento de biorrefinaria para produção desse bioproduto em escala industrial. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a aplicação de um subproduto da indústria cítrica como fonte de carbono para a produção de colorantes por *Talaromyces amestolkiae* em cultivo submerso em agitador orbital. Inicialmente, o subproduto cítrico foi caracterizado quanto a composição química, contendo compostos como a lignina (21,6 %m.m⁻¹), hemicelulose (13,5 %m.m⁻¹) celulose (11,9 %m.m⁻¹). A produção dos colorantes naturais vermelhos foi realizada inicialmente aplicando diferentes fontes de carbono (glicose, xilose e pectina) e fonte de nitrogênio (glutamato monossódico-GMS) comerciais. Posteriormente, a produção dos colorantes foi avaliada utilizando o subproduto cítrico não-tratado e pré-tratado (remoção de pectina), e suplementado com as fontes de carbono e nitrogênio comerciais supracitadas. A melhor condição de produção de colorantes vermelhos observada foi empregando glicose e xilose comercial, 10,0 e 5,0 g.L⁻¹, respectivamente, com 25 g.L⁻¹ de GMS em cultivo submerso à 150rpm/30°C/168h, atingindo em torno de 16,1 UA_{500nm}. Na presença do resíduo cítrico, a máxima produção observada foi com 56,0 gramas de subproduto cítrico tratado por litro de meio de cultivo, chegando a 4,27 UA_{500nm}. Avaliou-se também a produção de enzimas celulolíticas durante o cultivo e obteve-se um máximo de, aproximadamente, 0,20 UI.mL⁻¹ para endo-glucanase; 0,87 UI.mL⁻¹ para xilanase e 2,90 UI.mL⁻¹ para β-glucosidase ao se empregar subproduto cítrico pré-tratado. Esses resultados revelam o potencial de resíduos agroindustriais da indústria cítrica para a geração de colorantes naturais através do conceito de biorrefinaria, contribuindo para o desenvolvimento sustentável e fortalecimento dos bioprocessos.

Palavras-chave: Biorrefinaria, subproduto cítrico, colorantes naturais, enzimas, *Talaromyces amestolkiae*.

ABSTRACT

Considering agrobusiness is the largest economic sector in Brazil and it generates a high amount of residues, studies about the use of agro-industrial residues, mainly to obtain high added value products, are of great interest. So, the production of natural fungal colorants using a low-cost by-product, such as wastes from the citrus industry, plays an important role to the development of biorefineries for the production of this bioproduct on an industrial scale. Thus, this work aims to study the application of a citrus industry by-product as carbon source for the production of colorants by *Talaromyces amestolkiae* in submerged culture in orbital shaker. Initially, the citrus by-product was characterized in terms of chemical composition, containing as major compounds lignin (21.6 %m.m⁻¹), hemicellulose (13.5 %m.m⁻¹) cellulose (11.9 %m.m⁻¹). The production of natural red colorants was firstly carried out by applying different commercial carbon (glucose, xylose and pectin) and nitrogen (monosodium glutamate, GMS) sources. Subsequently, the production of colorants was evaluated using the untreated, pretreated (pectin removal) citrus by-product and supplemented with the aforementioned sources of carbon and nitrogen. The best condition for the production of red colorants using commercial glucose and xylose, 10.0 and 5.0 g. L⁻¹, respectively, and GMS (25 g. L⁻¹) in submerged culture at 150rpm/30°C/168h, was around 16.1 UA_{500nm}. In the presence of citrus waste, the maximum production observed was with 56.0 grams of treated citrus by-product per liter of culture medium, achieving 4.27 UA_{500nm}. The production of cellulolytic enzymes during cultivation was also evaluated and a maximum of, approximately, 0.20 UI.mL⁻¹ for endo-glucanases; 0.87 IU.ml⁻¹ for xylanase and 2.90 UI.mL⁻¹ for β-glucosidase was obtained using pretreated citrus by-product. These results reveal the potential for application of agro-industrial residues that, through the biorefinery concept, acquire a noble destination as the generation of high commercial value biomolecules, namely natural colorants contributing to sustainable development and strengthening of bioprocesses.

Keywords: Biorefinery, citrus by-product, natural colorants, enzymes, *Talaromyces amestolkiae*.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de plantas industriais projetadas para extrair moléculas valiosas de subprodutos agroindustriais emergiu a partir da necessidade de aproveitamento desta biomassa (BRAGA *et al.*, 2017) e se tornou mais evidente, principalmente, entre as décadas de 1980 e 1990 com o surgimento do termo Biorrefinaria, o qual, posteriormente, emergiu como um campo promissor para a área de bioprocessos (LEXICO-OXFORD, 2021; MERRIAM-WEBSTER, 2021; KAMM *et al.*, 2016). Uma Biorrefinaria pode ser descrita de diferentes formas, porém, uma definição ampla que contempla o sentido geral é que, “*Biorrefinaria é uma instalação que integra processos e equipamentos para realizar a conversão de matéria orgânica em combustíveis, energia, produtos químicos e/ou produtos de alto valor agregado*” (NREL, 2017; BERNTSSON *et al.*, 2013). Atrelado a isso, o uso de recursos renováveis como matéria-prima pode favorecer sistemas que aplicam a economia circular por manter o carbono da biomassa no processo por mais tempo (TEIGISEROVA *et al.*, 2019; BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019).

Considerando os subprodutos agroindustriais que apresentam grande potencial de valorização no mercado, pode se destacar os resíduos do processamento de cítricos, predominantemente detritos de sumo de laranja. A indústria cítrica desempenha papel importante na economia global e gera grande quantidade de subprodutos (CIRIMINNA *et al.*, 2015). Entre esses subprodutos, a sobra do processamento do suco de laranja é um material que pode conter compostos de interesse industrial e/ou comercial, como açúcares fermentescíveis, polissacarídeos, flavonóides, polifenóis e óleos essenciais (ZEMA *et al.*, 2018a). Devido a riqueza de moléculas presentes neste resíduo, a destinação para processos de bioconversão por microrganismo se lança como uma alternativa nobre com o intuito de se obter bioprodutos de valor e interesse comercial. Assim, a produção e/ou extração de moléculas com base no conceito de biorrefinaria é relevante, especialmente no contexto de biorrefinarias cítricas em larga escala nos países produtores de citros (CIRIMINNA *et al.*, 2018).

A matéria orgânica do subproduto cítrico pode ser empregada para a produção de biomoléculas como, por exemplo, os colorantes naturais (KANTIFEDAKI *et al.*, 2018). Os colorantes naturais, também conhecidos como biocolorantes, tem atraído crescente atenção, principalmente, das indústrias farmacêutica e de alimentos, por

serem biodegradáveis, além da possibilidade de apresentarem propriedades farmacológicas como, atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena e redutora de colesterol (CAROCHO *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2011; DOWNHAM; COLLINS, 2000). Essas vantagens somadas à crescente preocupação da população com a saúde e o meio ambiente faz com que estes compostos ganhem destaque no mercado (MARTINS *et al.*, 2016; BALAKRISHNAN *et al.*, 2016; ZHANG, 2016; OPLATOWSKA-STACHOWIAK *et al.*, 2015; AMCHOVA *et al.*, 2015;). Em relação ao mercado de total de colorantes, uma pesquisa realizada pela *Grand View Research, Inc.* estima para 2025 um valor acerca de US\$ 37,49 bilhões. Deste total, os colorantes naturais são estimados em, aproximadamente, US\$ 2,0 bilhões com uma taxa composta de crescimento anual (CAGR, do inglês “*Compound Annual Growth rate*”) de 4,9% até 2025.

Entre as fontes produtoras de colorantes, os microrganismos destacam-se devido a facilidade de produção, algumas espécies não produzem compostos tóxicos e os colorantes produzidos são mais estáveis que outras congêneres naturais (FRISVAD *et al.*, 2013). Assim, diversas linhagens têm sido estudadas, tais como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (DUFOSSÉ, 2014; SANTOS-EBINUMA *et al.*, 2013). Dentre o gênero *Talaromyces*, a espécie *T. amestolkiae* não produz substâncias tóxicas e biossintetiza colorantes azafilonas provenientes da via dos policetídeos com cores amarela, laranja e vermelha, sendo um candidato promissor para produção e aplicação em diferentes matrizes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020b; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; ZACCARIM *et al.*, 2019).

Diante do exposto, o presente trabalho pretende avaliar o potencial do subproduto cítrico, por meio do conceito de biorrefinaria, como fonte de carbono na obtenção de produtos de valor agregado, nomeadamente, colorantes naturais e enzimas celulolíticas, por meio do cultivo submerso de *Talaromyces amestolkiae*. Os resultados deste trabalho contribuem para o desenvolvimento sustentável através do uso de subprodutos agroindustriais e fortalecimento do desenvolvimento de bioprocessos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biorrefinaria

A matéria conhecida como biomassa pode ser definida como material orgânico não fossilizado e biodegradável proveniente de plantas, animais e microrganismos, composta, principalmente, de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio (WARD *et al.*, 2014). É a forma natural que os seres vivos encontraram de incorporar estes elementos como componentes estruturais ou como forma de armazenar energia no próprio organismo. Esta matéria contida nos organismos pode ser transformada e utilizada para gerar novos produtos ou energia (LEXICO-OXFORD, 2021; MERRIAM-WEBSTER, 2021).

Para extrair produtos valiosos de biomassa sendo ela vegetal ou animal, se fez necessário, portanto, o desenvolvimento de um conjunto de técnicas sustentáveis projetadas, principalmente, para aproveitar ao máximo o potencial pouco conhecido de tais compostos (KUMAR; YAASHIKAA; 2020; FERNANDO *et al.*, 2006). Esta necessidade se tornou cada vez mais evidente considerando a aplicação crescente da bioeconomia circular, do avanço nos estudos de sustentabilidade, da preservação dos recursos naturais e pela necessidade da redução da poluição ambiental causada pelo uso extensivo dos combustíveis fósseis (UBANDO *et al.*, 2020). Tais conjuntos de técnicas de aproveitamento sustentável da biomassa, conhecidos como biorrefinaria, emergiram no século XX e se tornaram um campo promissor para os bioprocessos (BRAGA *et al.*, 2017; SAUER *et al.*, 2008). Posteriormente, novas definições foram concebidas afim de englobar a amplitude do termo.

Assim, uma biorrefinaria pode ser definida como uma instalação que integra processos e equipamentos para a conversão de biomassa em combustíveis, energia, e produtos químicos (NREL, 2017; BERNTSSON *et al.*, 2013). O termo foi utilizado pela primeira vez na década de 1980, porém, se popularizou no final dos anos 1990 e início dos anos 2000, quando vários processos industriais favoreciam o uso da biomassa (LEXICO-OXFORD, 2021; MERRIAM-WEBSTER, 2021; KAMM *et al.*, 2016).

Alguns autores afirmam que, em conceito, as biorrefinarias podem ser descritas como plataformas equivalentes às refinarias tradicionais, pois apresentam semelhança estrutural e realizam o fracionamento dos compostos de acordo com suas propriedades. Porém, as refinarias realizam a extração de produtos

provenientes de combustíveis fósseis (MONCADA *et al.*, 2016) enquanto as biorrefinarias beneficiam-se das muitas frações das biomassas e seus intermediários, expandindo assim o valor decorrente da matéria-prima (SHARMA; SAINI, 2020). Desta maneira, pela característica e definição, podem ser reconhecidas uma grande diversidade de vias para biorrefinaria, desde a variedade para a escolha da matéria-prima até a infinidade de produtos que podem ser formados (ALVIM *et al.*, 2014).

De acordo com o **Quadro 1**, pode-se identificar as principais fontes de matéria-prima utilizadas e principais produtos gerados no mundo no período de 1997 a 2017.

Quadro 1. Proporção das principais fontes de matéria-prima e produtos formados a partir de biorrefinaria relatados na literatura. Relativos ao período de 1997-2017.

Insumos para Biorrefinaria		Produtos da Biorrefinaria	
Substâncias		Produtos	
Materiais Lignocelulósicos (59%)	Culturas Lignocelulósicas: Pinheiro, Eucalipto, Salgueiro; Milho, Trigo, Cana-De-Açúcar	Compostos Químicos (46%)	Compostos Específicos: Ácidos, Furfural, Polihidroxialcanoato, Dióis, Antioxidantes, Xilitol e Enzimas
	Resíduos Lignocelulósicos: Bagaço, palha e sabugo		Biomateriais: Biopolímeros, Papel E Celulose, Biocompósitos e Fibras;
Biomassa vegetal (24%)	Açúcar e Amido: Milho-Verde Cana-de-açúcar fresca	Compostos líquidos e gasosos (43%)	Combustíveis: Biodiesel e Etanol
	Oleaginosas: Azeite de dendê		Gases: Hidrogênio, Gás de Síntese e Metano
	Biomassa fresca: Gramas mistas e Alfafa		
Biomassa aquática (10%)	Algas: Microalgas e Macroalgas	Energia (8%)	Termoelétrica: Potência e Calor
Resíduos Industriais e Domésticos (7%)	Resíduos mistos: Papel, Resíduos orgânicos e Resíduos de varrição	Outros (3%)	Produtos mistos: Biofertilizantes, Alimentos e Aditivos Alimentares

Fonte: Adaptado de Wenger; Stern, 2019.

Vale salientar que em cada grupo de matéria-prima ou produto existe uma abundância de compostos que podem ser aplicados pelas biorrefinarias e que a transformação desses compostos depende das características únicas de cada material, entre outros fatores (WENGER; STERN, 2019). Por exemplo, a cana-de-

açúcar pode gerar um bagaço com alto teor de celulose e hemicelulose, os quais podem ser transformados pela biorrefinaria para produção de etanol 2G, biogás, nanocelulose, xilo-oligossacarídeos, entre outros (SHAHID *et al.*, 2021)

Portanto, as biorrefinarias destacam-se não só por se apresentarem como uma possível alternativa para produção de energia, mas também por poderem auxiliar na resolução dos problemas de gestão de resíduos e diminuição da emissão de gases de efeito estufa (SHARMA; SAINI, 2020). O desenvolvimento e implementação do conceito de biorrefinaria de subprodutos oferece uma série de benefícios econômicos, ambientais, sociais e políticos, tais como: o fornecimento de tecnologias sustentáveis e lucrativas para gestão de resíduos urbanos e industriais; a implementação da economia circular; a diminuição da utilização de recursos não renováveis e a diversificação das fontes de abastecimento (ALIBARDI *et al.*, 2020).

2.2 Biomassa e Subprodutos Agroindustriais

Dentre os recursos renováveis aplicáveis nas biorrefinarias, os subprodutos agroindustriais tem ganhado destaque devido ao grande potencial de geração de combustíveis, energia e produtos de alto valor agregado por meio da conversão da matéria orgânica vegetal (BRAGA *et al.*, 2017; NREL, 2017; BERNTSSON *et al.*, 2013). A **Figura 1** demonstra a aplicação da biomassa vegetal no conceito de biorrefinaria para a obtenção de produtos de interesse industrial e comercial.

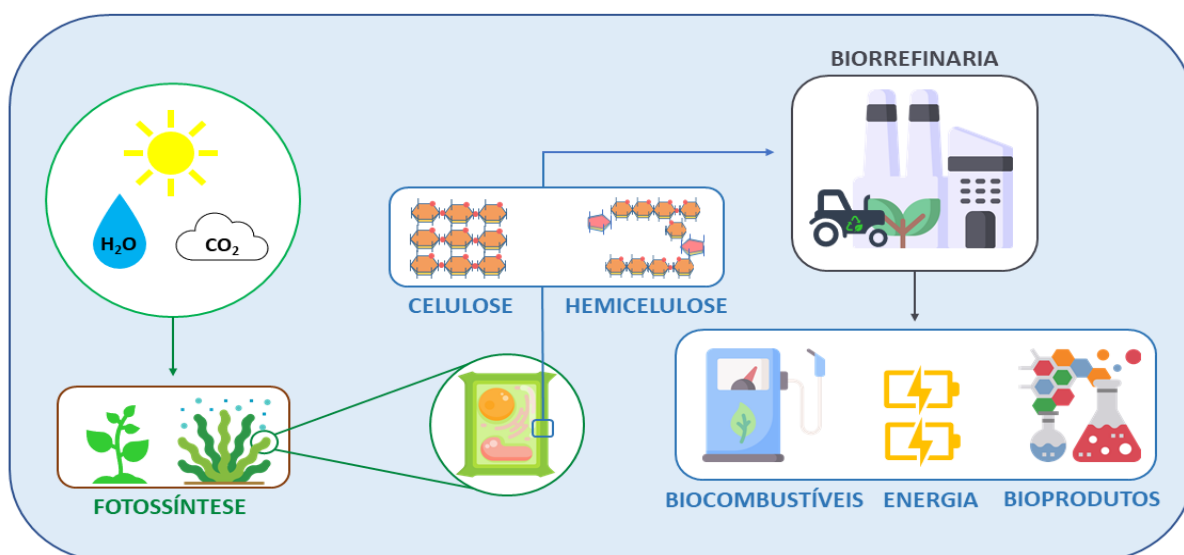


Figura 1 - Representação da aplicação da biomassa vegetal em biorrefinarias para obtenção de biocombustíveis, energia e bioprodutos. Fonte: Dados do autor.

A utilização da biomassa aplicada a biorrefinaria não se restringe exclusivamente pela diminuição do uso de recursos fósseis, mas também pela

abundância a qual se encontra (CHANDEL *et al.*, 2020). A produção de biomassa mundial em 2017 foi estimada em, aproximadamente, 170 bilhões de toneladas, das quais boa parte são compostas, principalmente, por carboidratos e destes apenas 4% podem ser utilizados diretamente para fins alimentícios (CHANDEL *et al.*, 2018).

Neste cenário, o Brasil é conhecido por estar entre os maiores produtores agrícolas e agroindustriais do mundo. Desde 1980, o Brasil se tornou um dos maiores exportadores e se sobressai por ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, café e suco de laranja (PICOLI *et al.*, 2018). Em decorrência desta produção agrícola, o Brasil tem uma intensa geração de subprodutos de biomassa, como, por exemplo, o bagaço e palha da cana-de-açúcar, palha e sabugo do milho, que podem ser utilizados como fontes de energia abundantes e renováveis (PAULA *et al.*, 2011). Segundo o Ministério de Minas e Energia, 2020, a produção de biomassa vegetal tem apresentado um crescimento acentuado, tendo previsões para 1,6 bilhões de toneladas por ano em 2050. Simultaneamente à produção agrícola, a utilização da biomassa para produção de energia tem crescido no país, representando cerca de 14% na produção de energia total (IEA, 2018).

Algumas ferramentas que intensificam e incentivam o reaproveitamento dos resíduos no Brasil são a Política Nacional de Resíduos Sólidos e de Saneamento Básico, a qual determina que o tratamento dos resíduos deve ser apropriado e, tendo viabilidade técnica, econômica e ambiental, isto deve ser efetivado (BRASIL, 2010). Ademais, o aproveitamento dos subprodutos se sobressai, pois o principal componente de tais resíduos é matéria orgânica que pode ser biotransformada (BRASIL, 2020).

É importante ressaltar que o uso de subprodutos agroindustriais em biorrefinarias se demonstra favorável pois pode fornecer matéria-prima viável para sistemas econômicos que aplicam a economia circular e manter o carbono da biomassa no processo produtivo por mais tempo (TEIGISEROVA *et al.*, 2019; BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019). Esta estratégia de reutilização de carbono se apresenta como alternativa aos tratamentos de resíduos que emitem gases na atmosfera (TEIGISEROVA *et al.*, 2019). Neste sentido, os conceitos de biorrefinaria podem também ser otimizados e aplicados como tecnologias de pré e/ou pós-tratamento às usinas de bioenergia existentes para melhor aproveitamento dos subprodutos, resultando em produção em cadeia e redução de custos (TEIGISEROVA *et al.*, 2019). Além disso, o aproveitamento de resíduos

agroindustriais pode ajudar no processo de descarte de tais resíduos e evitar a contaminação ambiental, doenças para a saúde, danos ecológicos e outros problemas associados à poluição (BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019).

Tendo em vista a crescente geração de subprodutos agroindustriais, a implementação de processos em cada etapa das biorrefinarias para um melhor aproveitamento de tais resíduos é indispensável (TEIGISEROVA *et al.*, 2019). Dentre os subprodutos mais gerados no Brasil, alguns já são aplicados em tecnologias conhecidas para produção de novos produtos, como, por exemplo, a cana-de-açúcar com a tecnologia de produção de etanol de segunda geração (FAO, 2019). Entretanto, alguns subprodutos não possuem biorrefinarias com tecnologias avançadas e estabelecidas para uma melhor aplicação. Um destes subprodutos agroindustriais é a sobra de processamento de cítricos, predominantemente detritos de sumo de laranja (SATARI; KARIMI, 2018). É importante salientar que a indústria cítrica desempenha um papel importante na economia global e produz grande quantidade de resíduos, tais como cascas, sementes e compostos de membrana (CIRIMINNA *et al.*, 2018). Devido ao potencial e abundância do resíduo cítrico é imprescindível uma nova rota promissora para o máximo aproveitamento desta matéria.

2.2.1 Agroindústria brasileira e Indústria cítrica

A indústria agrícola no Brasil é bem estabelecida e tem uma parcela fundamental na economia do país, representando, aproximadamente, 24% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (CEPEA, 2021). As estruturas industriais de processamento agrícola são parte essencial do desenvolvimento de produtos agroindustriais e estão distribuídas por todas as regiões do país (BRASIL, 2020). Entre as cultivares mais processadas destaca-se a cana-de-açúcar, que é a biomassa brasileira mais utilizada em biorrefinaria para obtenção de produtos e energia (FAO, 2019). Além da cana-de-açúcar, algumas cultivares também são processadas em larga escala, destacando-se o milho e a soja, que estão entre os principais produtos agrícolas e são uma das cultivares mais produzidas no Brasil e no mundo (RAMBO *et al.*, 2015). Outro destaque do agronegócio é a indústria cítrica que desempenha papel importante na economia mundial. Em 2019, a produção global de frutas cítricas contabilizou, aproximadamente, 158 milhões de toneladas com uma tendência crescente em relação aos anos anteriores (FAO, 2019). As culturas cítricas de origem asiática, chegaram ao Brasil no início da colonização portuguesa e se adaptaram as

condições climáticas que se demonstraram ideais para seu desenvolvimento (AGRIANUAL, 2016). A partir da década de 60, a produção comercial de citrus cresceu em função da exportação de suco de laranja e ao longo dos anos o país se consolidou como um dos maiores produtores mundiais de laranja (FAO, 2020; BOTEON E NEVES, 2005). Desde então, a laranja é a fruta mais cultivada dentro do grupo dos citrus, representando cerca de 90% do total produzido, assim como é a fruta mais cultivada no país (IBGE, 2019).

Atualmente, o Brasil representa, aproximadamente, 75% da produção mundial e segundo maior produtor de frutas cítricas, atrás somente da China (FAO, 2019). O estado de São Paulo concentra a maior parte das agroindústrias cítricas do país e é o maior produtor de laranjas do Brasil, sendo que em 2019 foi responsável por, aproximadamente, 78% da produção nacional (IBGE, 2019; FUNDECITRUS, 2017). Apesar da área de plantio de frutas cítricas no estado de São Paulo ter diminuído no século XXI, a modernização e aplicação de técnicas de cultivo avançadas aumentou a produtividade na produção de laranjas (ERPEN *et al.*, 2018). Vale destacar que a cidade de Araraquara-SP conta com a presença de uma das maiores empresas mundiais produtoras de frutas cítricas, sucos, óleos naturais e polpa, a *Sucocitrico Cutrale Ltda* (FORBES, 2020; SUCOCÍTRICO, 2021).

Em relação ao destino final das frutas cítricas (laranja, limão, lima, toranja, entre outras), sabe-se que, aproximadamente, 70% de todas as frutas cítricas produzidas são processadas pela indústria, e deste, cerca de 50% a 60% da massa processada transforma-se em subproduto composto por cascas, sementes e compostos de membrana, resultando em milhões de toneladas de detritos por ano (ZEMA *et al.*, 2018a; FAO, 2016; PAGGIOLA, *et al.*, 2016). Em geral, o subproduto cítrico tem como composição ácidos graxos, açúcares livres (glicose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos, polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina), enzimas (pectinaesterase, fosfatase e peroxidase), flavonóides, óleos essenciais (principalmente limoneno) e pigmentos (ZEMA *et al.*, 2018a; BOUKROUFA *et al.*, 2015).

É importante salientar que a destinação final de resíduos cítricos pode gerar problemas de poluição, principalmente em países em desenvolvimento, e o manejo resulta em um grande custo em termos econômicos e ambientais (ZEMA *et al.*, 2018b; MAHATO *et al.*, 2018). Ademais, os subprodutos cítricos são volumosos, heterogêneos, quimicamente complexos e altamente biodegradáveis, com demanda

química de oxigênio significativa devido ao alto teor de matéria orgânica, o que tornam tais subprodutos extremamente fermentáveis, podendo resultar em altos níveis de poluição (SILES *et al.*, 2016; NEGRO *et al.*, 2016; TRIPODO *et al.*, 2004). Além disso, as perdas e o descarte atreladas a má gestão desse tipo de subproduto também podem incluir indiretamente o desperdício de recursos importantes como terra, água, fertilizantes, produtos químicos, energia e mão de obra (SAGAR *et al.*, 2018).

Comumente, os subprodutos cítricos têm sido utilizados principalmente para produção de ração animal e produção de composto e adubo orgânico. Entretanto, alternativas mais eco-sustentáveis capazes de aproveitar o elevado potencial deste subproduto cítrico têm sido propostas (JEONG *et al.*, 2021; ISIBIKA *et al.*, 2021; ANTICONA *et al.*, 2020). Devido a este subproduto ser rico em carboidratos, as cascas de laranja provenientes da indústria de sucos podem ser usadas como substrato de baixo custo para a obtenção de biomoléculas (CIRIMINNA *et al.*, 2015). Vale salientar que a extração de moléculas baseado no conceito de biorrefinaria é relevante, especialmente no contexto da biorrefinaria de citros, emergente em larga escala em países produtores de frutas cítricas (CIRIMINNA *et al.*, 2018; BALU *et al.*, 2012).

Alguns compostos presentes nos subprodutos cítricos são utilizados nas mais diversas áreas, com tecnologias de extração já estabelecidas (RAVICHANDRAN *et al.*, 2018). Dentre tais compostos, o principal é o d-limoneno, que é um dos metabólitos secundários mais utilizados na indústria de alimentos, bebidas e fragrâncias por apresentar odor similar ao de laranja e limão e pode chegar a custar cerca de 8,55€ por 1,0kg e possuir um preço comercial de cerca de 4€ por 1,0mL (BATTISTA *et al.*, 2020). Outro composto contido nos resíduos cítricos é a pectina, que é um heteropolissacarídeo presente nas frutas, principalmente, nas cítricas e que também é extraído e comercializado pela indústria alimentícia (LOTITO *et al.*, 2018; HILALI, *et al.*, 2019). A exploração do potencial total deste resíduo tem sido estudada e os resultados reportados na literatura. Entretanto, apesar da existência de algumas técnicas de aproveitamento, ainda é necessário um estudo mais avançado quanto a extração e biotransformação das demais moléculas presentes neste subproduto.

2.2.2 Biorrefinaria de subprodutos cítricos

Após a extração de componentes comerciais como os óleos essenciais, a matéria residual do subproduto cítrico ainda contém uma riqueza pouco utilizada de biomoléculas que podem ser aplicadas para produção de diversos produtos de valor

agregado. Segundo a literatura, a composição química dos subprodutos cítricos pode variar consoante a espécie cítrica processada, o lote da produção em determinada temporada e os tratamentos aplicados no processamento (CIRIMINNA *et al.*, 2018). Ainda de acordo com a literatura, a casca da laranja possui um teor majoritário de celulose, seguido de hemicelulose (xilana) e menores teores de lignina e pectina (GROHMANN *et al.*, 1995; SILES LOPEZ *et al.*, 2010; BOUKROUFA *et al.*, 2015). Entretanto, é importante salientar que os resíduos cítricos não consistem apenas de casca da laranja, podendo possuir além das cascas, sementes e resíduos de membrana (PAGGIOLA *et al.*, 2016; FAOSTAT, 2018). Assim, apesar de haver algumas variações nos teores dos compostos de acordo com cada subproduto cítrico, as principais moléculas encontradas são a hemicelulose, celulose, lignina e pectina **Figura 2** (ROSA; PINHEIRO, 2021; ZEMA *et al.*, 2018; POURBAFRANI *et al.*, 2010).

A pectina é um polissacarídeo de parede celular complexo que contém resíduos α -D-galactosilurônicos ligados (ALI *et al.*, 2015), heterogêneo e abundante em resíduos cítricos e outros resíduos do processamento de frutas e vegetais (YANG *et al.*, 2020). Geralmente é extraída em condições ácidas em altas temperaturas e possui diversas aplicações, principalmente, na indústria alimentícia e farmacêutica (HU *et al.*, 2021). Dentre os aproveitamentos por meio da biorrefinaria pode-se citar a produção de géis emulsificantes, formação de biocompósitos, geração de oligogalacturonídeos, composição de membranas biodegradáveis, indução da produção de enzimas, auxiliar na digestão de alguns alimentos, entre outros (PICOT-ALLAIN *et al.*, 2020). De acordo com a literatura, o preço da pectina pode variar entre US\$ 5-100,0 por quilograma, dependendo do grau de pureza e quantidade a ser adquirida. Além disso, o mercado de pectina possui uma estimativa de crescimento anual de 6,5% a partir de 2019, para atingir um valor de US\$ 1,5 bilhão em 2025. Este crescimento na indústria pode ser justificado, principalmente pela multifuncionalidade desse polissacarídeo (MARKET AND MARKET, 2021).

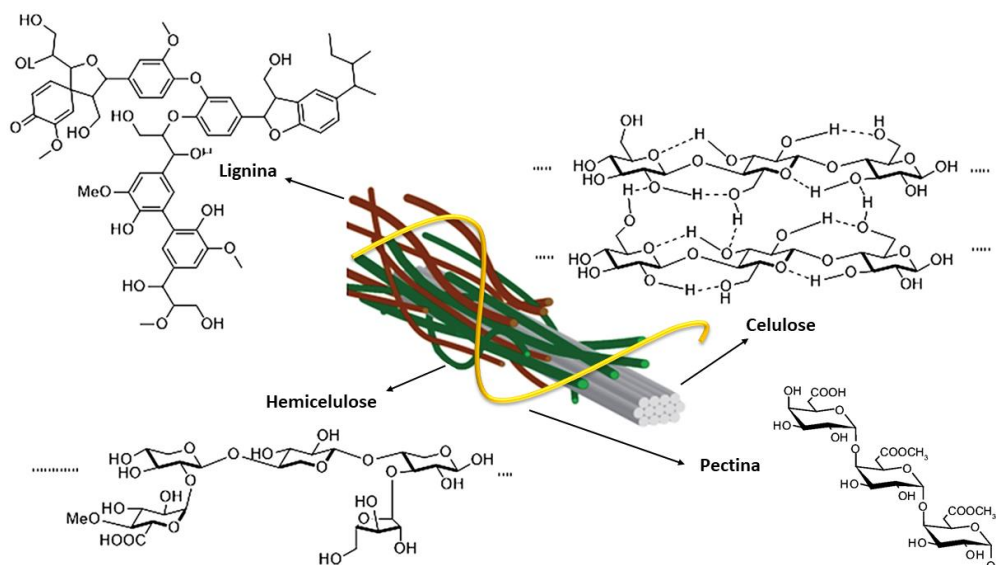


Figura 2 - Representação estrutural da composição de subprodutos cítricos. Fonte: Adaptado de LI, TAKKELLAPATI, 2018; ALI *et al.*, 2015.

2.2.2.1 Material Lignocelulósico

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal. É um homopolímero linear constituído de 7.000–15.000 unidades de D-glicose β -1-4 ligada. Consiste em uma estrutura altamente regular que permite a formação de regiões cristalinas por meio de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (LI, TAKKELLAPATI, 2018). É a principal fração da biomassa utilizada pela biorrefinaria para produção de diversos produtos, sobretudo o etanol de Segunda geração (2G) (FAO, 2019) e o biometano (RIVAS-CANTU *et al.*, 2013). Entre os resíduos cítricos, a celulose é um dos compostos de maior teor, podendo chegar a 20% m.m⁻¹ em massa seca, (ZEMA *et al.*, 2018).

Além da celulose, outro polissacarídeo que também constitui os subprodutos cítricos é a hemicelulose. Este polissacarídeo é formado por diferentes hexoses e pentoses, incluindo D-Glucose, D-Galactose, D-Manose, D-Xilose e L-Arabinose. Possui estrutura irregular e solubilidade em água (LI, TAKKELLAPATI, 2018). Nos subprodutos cítricos, pode chegar a representar entre 15-20% da composição química (ZEMA *et al.*, 2015). Em adição, possui algumas aplicações como, a indução da produção de enzimas, produção de xilo-oligossacarídeos, composição de nanocompósitos para formação de biomateriais, entre outras (FARHAT *et al.*, 2017).

A lignina é formada por um conjunto de moléculas que contribuem para a resistência da parede celular dos vegetais ao fixar a celulose e hemicelulose. É um

composto de três monômeros fenilpropanóides, incluindo álcool coniferílico, álcool cumarílico e álcool sinapílico. Cada monômero tem vários locais de ligação, permitindo muitas ligações diferentes entre as moléculas (LI, TAKKELLAPATI, 2018). Em relação ao teor, o conteúdo de lignina pode variar de acordo com a espécie vegetal, nos resíduos cítricos pode chegar a representar, aproximadamente, 24% m.m⁻¹ em base seca (ZEMA *et al.*, 2018). Em meio as aplicações, as pesquisas tem se concentrado no desenvolvimento de produtos equivalentes aos produzidos pelos produtos químicos do petróleo. Entre outras formas de utilização da lignina por meio da biorrefinaria, pode-se citar o emprego como aditivo em poliuretanos, como substituto para adesivos de fenol-formaldeído, como matéria-prima alternativa para a fibra de carbono e para fornecimento de produtos químicos aromáticos renováveis (LI, TAKKELLAPATI, 2018).

2.2.2.2 Enzimas

Diversos microrganismos têm sido utilizados para a produção de uma grande variedade de enzimas por meio da aplicação de diferentes subprodutos agroindustriais. Em vista da biorrefinaria de subprodutos cítricos, a produção de algumas enzimas a partir deste tipo de resíduo já vem sendo estudada, se destacando entre elas as pectinases, celulasas e xilanases (SIVASHANMUGAM, 2017; AHMED *et al.*, 2016; ARUN; MAMMA *et al.*, 2008).

As celulasas são as principais enzimas usadas para a biocatálise da biomassa celulósica em açúcares fermentescíveis. Estas são classificadas em diferentes enzimas que consistem em endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases, cuja ação sinérgica é essencial para uma hidrólise eficaz da celulose (KUHAD *et al.*, 2016). Estas enzimas são consideradas o terceiro maior grupo de enzima industrial devido à ampla gama de aplicações em vários campos, como biocombustíveis, alimentos, ração animal, indústria têxtil, papel e celulose, gestão de resíduos, indústria médica/farmacêutica, engenharia genética, tratamento da poluição e indústrias químicas (SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Além disso, compartilha cerca de 20% do valor de mercado mundial como enzimas industrialmente importantes, tais como pectinases, lipases e xilanases (SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Com base em estudos realizados na literatura, a necessidade global de enzimas industriais é estimada para crescer anualmente em 6,3% para o período de 2021–2026 e seu mercado deve ganhar valor estimado de, aproximadamente, US\$ 8,7 bilhões no final de 2026

(FREEDONIA *et al.*, 2021). De acordo com outro recente relatório de pesquisa de mercado global especificamente sobre celulasas, a receita foi calculada em US\$ 1,67 bilhões em 2020 e a receita estimada para 2026 será de US\$ 2,45 bilhões (CAS 9012-54-8, 2020).

Além das celulasas, outro grupo importante de enzimas utilizadas na catalização da biomassa lignocelulósica são as xilanases, constituídas pelas endoxilanases, β -xilosidases, α -glucoronidases e α -arabinofuranosidases (TYAGI; SHARMA, 2021). Estas enzimas são responsáveis pela hidrólise do xilano, um dos principais compostos da hemicelulose, e essa clivagem do xilano resulta na geração de monômeros como as pentoses e hexoses, além de outros grupos como os xilo-oligossacarídeos que possuem diversas aplicações industriais (TYAGI; SHARMA, 2021). Essas enzimas se tornaram mais populares durante as últimas décadas devido às suas principais aplicações, principalmente na indústria de papel e celulose, processamento de ração animal, clarificação de bebidas e produção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais (PRAJAPATI *et al.*, 2018).

As pectinases são enzimas que têm a capacidade de catalisar a quebra da pectina, que é um polissacarídeo presente, principalmente, nas células vegetais. São uma das enzimas mais produzidas comercialmente no setor biotecnológico e detém uma posição de liderança com 25% de participação no mercado global de enzimas para alimentos e bebidas (SHET *et al.*, 2018). A pectinase atua como um catalisador biológico de interesse para as indústrias, realizando várias aplicações, como por exemplo, a extração e clarificação de sucos de frutas em indústrias alimentícia, atuando como sistemas de liberação de drogas em indústrias farmacêuticas, processo de degomagem/maceração de fibras em indústrias têxteis, tratamento de águas residuais nas indústrias de processamento de citrinos e também durante a despolimerização da pectina nas indústrias de papel e celulose (JOHN *et al.*, 2020).

Neste sentido, a produção de biomoléculas por meio de processos de bioconversão empregando microrganismos é um viés de aplicação dos subprodutos cítricos que vem sendo estudado nos últimos anos (MAHATO *et al.*, 2021). Na **Tabela 1** estão descritas as diversas moléculas e produtos obtidos a partir de subproduto cítrico aplicando o conceito de biorrefinaria.

Tabela 1 - Principais moléculas produzidas a partir da biorrefinaria de subproduto cítrico (SC) relatadas na literatura.

Moléculas		Referência
Conjunto	SC	SC Hidrolisado
Enzimas	Pectinases (<i>Poligalacturonase</i>)	MAMMA <i>et al.</i> , 2008
	Celulases (<i>Endo-glucanase</i>)	
	Xilanases (β - <i>xilosidase</i>)	
	Lipases	AHMED <i>et al.</i> , 2016; ARUN; SIVASHANMUGAM, 2017
Biocombustíveis	Proteases	
		Biometano
		Bioetanol
Outros Bioprodutos		Ácidos Orgânicos
	Nanocelulose	CYPRIANO <i>et al.</i> , 2018
	Hesperidina (Flavonoide)	
	Colorantes Naturais Fúngicos	KANTIFEDAKI <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Dados da literatura

É importante salientar que para a obtenção dos produtos oriundos da fermentação do subproduto cítrico, alguns estudos têm empregado o processo de hidrólise deste subproduto com o intuito de se conseguir a clivagem das macromoléculas e liberação dos açúcares, os quais poderão ser empregados pelos microrganismos para a biossíntese de novas biomoléculas (PATSA LOU *et al.*, 2019). Na maioria destes processos é realizada hidrólise enzimática por meio do emprego de um conjunto específico de enzimas lignocelulolíticas e pectinolíticas que liberam monossacarídeos, os quais como citado anteriormente, são convertidos em outros bioprodutos de interesse industrial e/ou comercial (CYPRIANO *et al.*, 2018). Vale ressaltar que a utilização da hidrólise enzimática nestes casos é preferível a hidrólise química (ácida ou básica) devido à alta porcentagem de conversão e não geração de inibidores (CYPRIANO *et al.*, 2018). Entretanto, algumas metodologias relatadas na literatura aplicam hidrólise ácida antes da hidrólise enzimática com o objetivo de conseguir obter maiores índices de conversão (PATSA LOU *et al.*, 2019).

Dentre os produtos obtidos a partir da biorrefinaria de subprodutos cítricos, os colorantes naturais fúngicos se lançam como uma possibilidade nobre em vista do

refinamento e biotransformação deste subproduto em produtos de valor agregado (KANTIFEDAKI *et al.*, 2018).

2.2 Colorantes

A cor torna a vida humana mais fascinante, pois é uma das características básicas da natureza. Colorantes de plantas, animais e minerais têm sido utilizados como fontes primárias para a coloração de substâncias desde a antiguidade (SHINDY, 2016). Os consumidores têm fascínio pelas cores e julgam inicialmente a qualidade de um produto pela sua cor. Isso porque a cor ajuda a treinar o cérebro a reconhecer alimentos aceitáveis e seguros (MAGOULAS, 2009). Outrossim, com o passar dos anos, o setor industrial, especialmente o alimentício, tem utilizado substâncias para realçar ou restaurar a aparência dos produtos e garantir qualidade (GOLVEIA *et al.*, 2007).

Os colorantes podem ser definidos como compostos coloridos que mostram uma afinidade em relação ao substrato ao qual estão sendo aplicados e tem a finalidade de conferir cor a uma determinada substância ou produto (GÜRSES *et al.*, 2016). Essas moléculas podem ser classificadas com base na estrutura, fonte, espectro e métodos de aplicação (RATHER *et al.*, 2018). Em relação à sua solubilidade, os colorantes podem ser classificados como pigmentos ou corantes. Neste sentido, os colorantes que apresentam solubilidade no meio aplicado são denominados corantes, ao passo que os colorantes insolúveis no meio são designados como pigmentos (SARON; FELISBERTI, 2006). Portanto, um colorante pode ser um corante ou um pigmento dependendo da matriz a qual é aplicado, ou seja, carotenoides, que são moléculas lipofílicas, são corantes em óleo e pigmentos em água (DELGADO-VARGAS; PAREDES-LÓPEZ, 2003). Considerando a fonte dos colorantes, eles podem ser divididos entre sintéticos, naturais e idênticos aos naturais. Os colorantes sintéticos são provenientes de fontes não naturais que são sintetizadas quimicamente (TORRES *et al.*, 2016). Os colorantes naturais são, por definição, moléculas produzidas e armazenadas e/ou excretadas por células vivas (DABAS *et al.*, 2011) enquanto que os colorantes idênticos aos naturais são sintetizados quimicamente, porém, também podem ser encontrados na natureza, como, por exemplo, o carotenoide β -caroteno.

Os colorantes sintéticos foram usados durante muitos anos com pouca preocupação ou avaliações quanto à sua segurança. Posteriormente, agências

reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América, mostraram o efeito tóxico de alguns destes compostos para a saúde humana (OPLATOWSKA-STACHOWIAK *et al.*, 2015) tais como reações alérgicas e intolerância (MARTINS *et al.*, 2016) e efeito carcinogênico (BALAKRISHNAN *et al.*, 2016), sendo algumas dessas moléculas não mais autorizadas para aplicação em alimentos e fármacos. Além disso, estes compostos podem causar poluição ambiental significativa (SILVA *et al.*, 2018). Assim, os colorantes naturais emergiram como substituintes seguro e sustentáveis.

Os colorantes naturais compõem um grupo de moléculas quimicamente heterogêneas e por vezes biossinteticamente relacionadas que são unidas por uma característica comum: a estrutura contém um cromóforo que é responsável pelas cores características desses compostos (PEREIRA *et al.*, 2014). Estas biomoléculas podem advir de diversas fontes biológicas, dentre elas pode-se citar: insetos (ADEEL *et al.*, 2018), vegetais (AKOGOU *et al.*, 2017) e microrganismos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020b; MAPARI *et al.*, 2010). O uso dos colorantes naturais é regulamentado de acordo com o país ou região, sendo as principais agências de regulação no mundo a EFSA do inglês *European Food Safety Authority*, FDA nos Estados Unidos da América e no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alguns exemplos de colorantes naturais aplicados em alimentos e bebidas permitidos pelas principais agências regulatórias são carotenoides, cúrcuma, riboflavina, páprica, antocianina, entre outros (FDA, 2021; EFSA, 2011; ANVISA, 1988). A autorização para uso é dependente da fonte do colorante natural e cada biomolécula deve ser avaliada individualmente.

O mercado de colorantes industriais é composto majoritariamente de substâncias sintéticas/não renováveis. Apesar da predominância de colorantes sintéticos nas mais diversas áreas, a crescente preferência, aplicação e utilização dos colorantes naturais tem aumentado o valor comercial de tais moléculas. Em relação ao mercado total de colorantes, uma pesquisa realizada pela *Grand View Research, Inc.* estima para 2025 um valor acerca de US\$ 37,49 bilhões. Deste total, os colorantes naturais são estimados em, aproximadamente, US\$ 2,0 bilhões com uma taxa composta de crescimento anual (CAGR, do inglês “*Compound Annual Growth rate*”) de 4,9% até 2025. Especificamente para o mercado de alimentos e bebidas que é o segmento que mais aplica colorantes, um artigo publicado pelo mesmo instituto, prevê que haverá um acréscimo na utilização dos colorantes naturais aplicados à indústria

de alimentos e devido à tal acréscimo o mercado de colorantes naturais na indústria alimentícia é o que mais crescerá (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2020; MARKET INSIGHTS, 2020). Uma característica importante do colorante natural para sua aplicação é a sua estabilidade e o custo de produção. Assim, os colorantes microbianos ganham destaque pois são mais estáveis do que os oriundos de plantas e animais e o seu custo pode ser reduzido a partir do desenvolvimento e melhoria do bioprocessamento.

2.2.1 Colorantes naturais microbianos

Os microrganismos compõem uma das matrizes biotecnológicas mais promissoras para a geração de diversas moléculas, entre elas os colorantes (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020a). Vale salientar que em contraste com as plantas e animais, os microrganismos são mais promissores para produção biotecnológica, pois: podem ser cultivados usando técnicas de cultivo submerso ou semi-sólido; O desenvolvimento de espécies vegetais é mais lento que o de microrganismos e algas; não apresentam problema de sazonalidade, tem crescimento relativamente rápido (JACOBSON; WASILESKI, 1994); e a manipulação de seus genes é mais simples (WISSGOTT; BORTLIK, 1996; VELMURUGAN *et al.*, 2010). Considerando que há um mercado em expansão para aplicação de colorantes naturais, a produção desses biocompostos por via biotecnológica empregando microrganismos pode ser viável devido a facilidade de produção, produção independente de sazonalidade e as biomoléculas podem apresentar propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena, redutora de colesterol. (MOHARRAM *et al.*, 2012; MONTEIRO, 2016; AKOGOU *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020a).

Dentre os microrganismos capazes de produzir colorantes naturais, os fungos produzem uma enorme quantidade de metabólitos secundários que são importantes na indústria, inclusive colorantes. O fungo *Monascus purpureus* tem sido utilizado há anos na produção de colorantes vermelhos (GHORAI *et al.*, 2009). Muitos colorantes com características não carotenoides são produzidos por fungos, assim como quinonas, antraquinonas, naftoquinonas, di-hidroxinaftaleno, melanina (um agregado complexo de policetídeos) e componentes flavina, como riboflavina.

O fungo do gênero *Monascus* destaca-se por apresentar bons níveis de produção de colorantes, porém, a maior parte das cepas produz associada ao

colorantes toxinas, como citrinina e a monacolina K e não são autorizados para uso na Europa e nos Estados Unidos. Porém, a aplicação de um colorante denominado ANKASCIN® 568-R produzido pela linhagem *Monascus purpureus* NTU 568 foi recentemente autorizada pela agência regulatória dos Estados Unidos *Food and Drug Administration* (FDA) (CHEN; PAN, 2019). Esta aprovação se deu, principalmente, pela ausência de micotoxinas, a monacolina K, e presença de duas moléculas bioativas, ankaflavina e a monascina (WANG *et al.*, 2017). No entanto, outras linhagens tem sido alvo de estudos na produção de colorantes, tais como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Talaromyces*. A espécie *Talaromyces amestolkiae* tem despertado interesse pelo potencial de produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos (BOONYAPRANAI *et al.*, 2008; SANTOS-EBINUMA *et al.*, 2013; DUFOSSE *et al.*, 2014; YILMAZ *et al.*, 2014; ZACCARIM *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020b).

2.2.1.1 *Talaromyces amestolkiae*

O gênero *Talaromyces* foi relatado a primeira vez em 1955, introduzido como uma metamorfose sexual do gênero *Penicillium*, anteriormente definida como um dos quatro subgêneros do *Penicillium*, previamente identificada como *Penicillium* subg. *Biverticillium*. Entretanto, foi constatado que este subgênero é diferente filogeneticamente dos demais subgêneros de *Penicillium* e que, portanto, a nomenclatura deveria ser transferida e combinada em *Talaromyces* (PITT, 1979; BENJAMIN, 1955). Logo, a composição das espécies e a taxonomia deste grupo foram modificados, tendo como característica principal a produção de ascomas amarelos suaves que consistem em hifas entrelaçadas (BENJAMIN, 1955). Assim, as espécies dos estágios sexuais anamórficas de *Penicillium* foram classificadas em *Eupenicillium* e *Talaromyces* (PITT, 2014). Isso significa que *Talaromyces sensu stricto* contém espécies que podem se reproduzir sexualmente (ascomata) e/ou assexualmente (conidióforos).

De acordo com a literatura, as espécies de *Talaromyces* geralmente produzem colorantes amarelo, laranja e vermelho no micélio ou como colorantes extracelulares. Algumas espécies do gênero *Talaromyces* expelem elevadas quantidades de colorantes vermelhos, incluindo as espécies *T. amestolkiae* **Figura 3**, *T. atroroseus*, *T. purpurogenus* e *T. albobiverticillius* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020a; TOLBORG *et al.*, 2020; VENKATACHALAM *et al.*, 2019; PANDIT *et al.*, 2018; SANTOS-EBINUMA *et*

al., 2013; SAMSON *et al.*, 2011). Além disso, de acordo com a literatura, os colorantes produzidos por *T. amestolkiae* apresentam atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e baixa citotoxicidade contra células de fibroblastos (ZACCARIM *et al.*, 2019), indicando o potencial uso na indústria farmacêutica e/ou na indústria alimentícia.

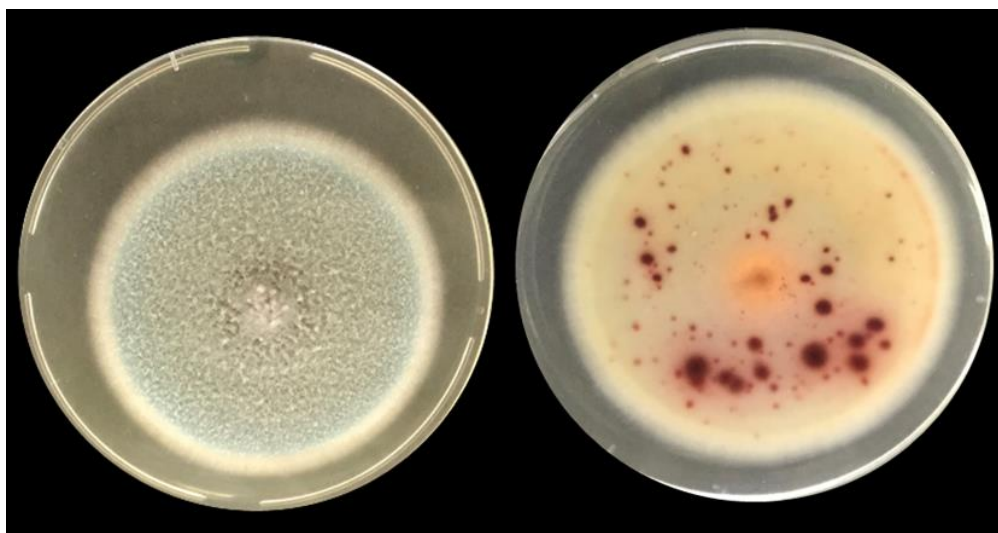


Figura 3 - Aspecto morfológico de *Talaromyces amestolkiae*. Apresentação macroscópica de *T. amestolkiae* em placa de Petri contendo BDA-YE (frente e verso) e demonstrando excreção dos colorantes para o meio. Fonte: Dados do autor.

De forma específica, a espécie *T. amestolkiae* produz colorantes da classe das azafilonas derivados de policetídeos semelhantes aos colorantes de *Monascus* (SAMSON *et al.*, 2011; YILMAZ *et al.*, 2012). As azafilonas, que constituem um subconjunto da classe de policetídeos, podem ser definidas como uma classe estruturalmente diversa de metabólitos secundários fúngicos, ou seja, colorantes com estruturas de pirona-quinona contendo um núcleo bicíclico altamente oxigenado e um centro quaternário quiral (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; WEI; YAO, 2005). Os policetídeos representam uma classe que não exibem íons localizados negativamente carregados e geralmente têm função poli-insaturada, ou seja, um sistema de anéis, um ou mais grupos de carbono, ácido carbólico e grupos funcionais de éster ou amidas que absorvem no espectro UV visível em estrutura de tetracetídeos a octacetídeos, que possuem quatro ou oito unidades de C2 **Figura 4** (MAPARI; MEYER; THRANE, 2009). Esses compostos são tipicamente sintetizados por policetídeos sintases (PKS) que unem derivados de ácido carboxílico (acetil-coenzima A (CoA) e malonil-CoA) de forma semelhante à síntese de ácidos graxos. As classes representativas incluem além das azafilonas, colorantes como antraquinonas, hidroxiantraquinonas,

naftalenos, naftoquinonas, flavonoides, melaninas, flavinas, entre outros (GMOSE et al., 2017; LAGASHETTI et al., 2019; VENIL et al., 2014)

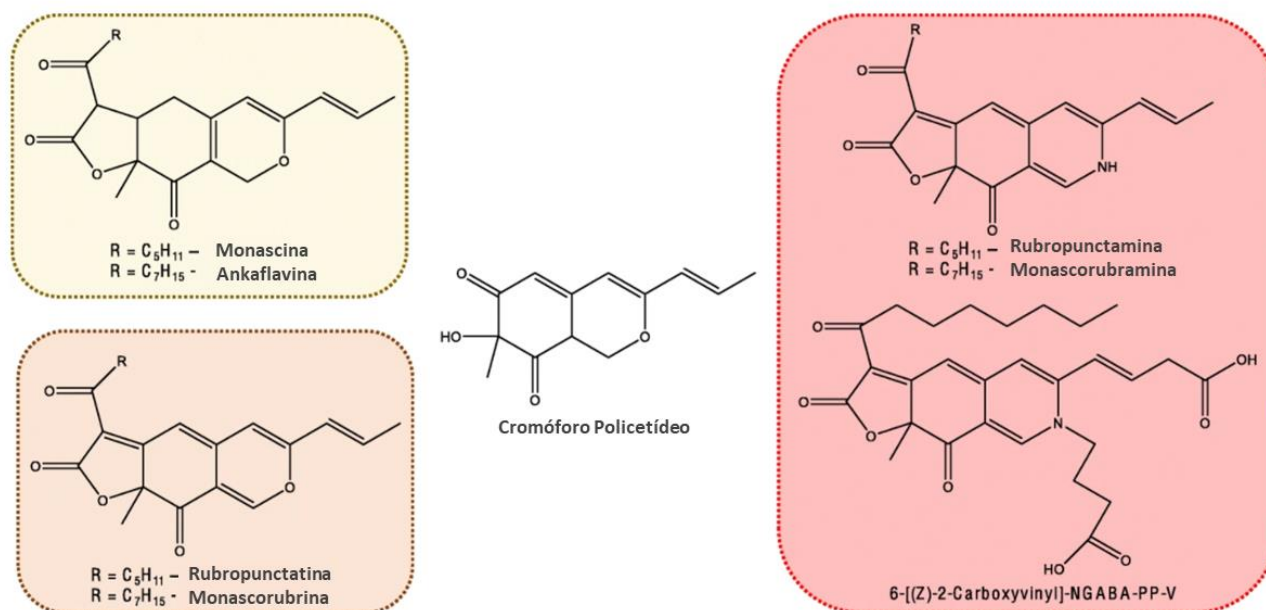


Figura 4 – Cromóforo policetídeo e estrutura química dos colorantes amarelo (Monascina e Ankaflavina), laranja (Rubropunctatina e Monascorubrina) e vermelhos (Rubropunctamina, Monascorubramina) produzidos por *Monascus* e 6 - [(Z) -2-carboxyvinyl] - NGABA-PP-V produzido por *Talaromyces*. Fonte: Adaptado de (DE OLIVEIRA et al., 2019).

Até o presente momento, as reações biossintéticas e os genes relacionados na produção das azafilonas são pouco conhecidas. Entretanto, existem evidências de que pelo menos uma, e possivelmente duas, policetídeo sintases estejam envolvidas na biossíntese, e ainda que, ácidos graxos são possíveis precursores dos colorantes formados (CHEN et al., 2017; YANG et al., 2015). A via hipotética de biossíntese envolve a geração de um cromóforo hexacetídeo, reação catalisada pela policetídeo sintase e, posterior, condensação com um β -cetoácido, proveniente de um ácido graxo de cadeia média, produzido pela via biossintética dos ácidos graxos. No caso dos colorantes de *Monascus*, o cetoácido é conectado à estrutura do cromóforo por uma reação de transesterificação para formar a monascorubrina, colorante laranja. A redução do colorante laranja dá origem ao amarelo ankaflavina a partir da monascorubrina. Por outro lado, com a aminação realizada por meio de uma base de *Schiff* da monascorubrina dá origem aos colorantes vermelhos, denominados monascorubramina e rubropunctamina (HAJJAJ et al., 1997).

De certo, a produção de colorantes naturais fúngicos é uma área propícia para o desenvolvimento de diversos produtos com aplicação nas mais variadas áreas da ciência. Somado a isso, a utilização dos conceitos de biorrefinaria para transformação biotecnológica de resíduos agroindustriais, em produtos de interesse como os colorantes naturais é promissora, visto que o Brasil é um país com a maior parte da economia baseada em agroindústria, que consequentemente gera resíduos. Apesar da biorrefinaria para produção de etanol como combustível automotivo estar implantada há muito tempo, existe, no entanto, a necessidade de avançar na utilização dos subprodutos lignocelulósicos, na produção não apenas de biocombustíveis, mas também de outros produtos de valor agregado, como os colorantes naturais. A indústria de cítricos gera uma grande quantidade de resíduos como subproduto para o qual é necessária uma rota de valorização. Assim, o desenvolvimento da biorefinaria de resíduos de citros para a geração de colorantes naturais é de interesse econômico, tecnológico e industrial.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a aplicação de um subproduto da indústria cítrica como fonte de carbono para a produção de colorantes por cultivo submerso de *Talaromyces amestolkiae* em agitador rotativo.

2.1 Objetivos Específicos:

- A) Avaliar a composição química do subproduto cítrico;
- B) Estudar a produção de colorantes naturais por cultivo submerso utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio comerciais;
- C) Estudar a interferência do acréscimo de pectina comercial cítrica e xilose comercial no meio de cultivo na produção dos colorantes naturais.
- D) Estudar a produção de colorantes naturais por cultivo submerso utilizando subproduto cítrico não tratado e tratado, bem como suplementado com fontes de carbono e nitrogênio comerciais;
- E) Avaliar a presença de enzimas celulolíticas no meio fermentado proveniente do cultivo com subproduto cítrico;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A glicose (G), glutamato monossódico (GMS) e pectina cítrica (PEC) foram obtidos da LS Chemicals, Dinâmica e Êxodo Científica (São Paulo, Brasil), respectivamente. A xilose, 4-nitrofenil β -d-glucopiranosídeo (4NPG), carboximetilcelulose e o (L)-limoneno foram obtidos da Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). O meio de manutenção e inóculo (Batata Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura) foram obtidos da Acumedia (São Paulo, Brasil). O preparo enzimático Cellic CTec 2 foi obtido da Novozymes (Araucária, Paraná). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Caracterização química do subproduto cítrico

O subproduto cítrico (SC) foi fornecido pela empresa Cutrale© (Araraquara-SP, Brasil) formado por casca, polpa e sementes prensadas provenientes do processamento de laranja para produção de suco. Este subproduto já havia passado por algumas etapas de extração, como extração de óleos essenciais e de pectina. Inicialmente, o subproduto foi seco em estufa a 50°C *overnight* para remoção do excesso de umidade e moído por um moinho de facas com uma tela de 0,22m para padronização da granulometria.

3.2.1 Extração do Limoneno

Para a extração do limoneno empregou-se os solventes Hexano e Acetato de etila. O subproduto cítrico e cada solvente foram misturados em tubos de centrífuga na proporção sólido/líquido de 1:10 fixando a massa de SC em 0,5 g. A mistura foi homogeneizada usando um homogeneizador rotativo durante 150 minutos a uma velocidade de 40 rpm à temperatura de 25°C e, subsequentemente, centrifugada a 2850 G à 25°C por 10 minutos, para separar o sobrenadante. Após alcançar a separação completa das fases, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo (Heidolph-Hei-VAP-Advantage).

3.2.2 Quantificação do Limoneno por CG/GC

O teor de D-limoneno presentes no óleo essencial extraído do subproduto cítrico foi determinado por cromatografia gasosa (CG). As análises de CG foram realizadas usando um cromatógrafo a gás SHIMADZU GC, equipado com a coluna capilar de sílica fundida SH-Stabilwax-DA (L x I.D = 30 m x 0,25 μ m, df 0,25 μ m)

utilizando injetor Split e detector de ionização por chama (DIC). A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C, sendo o modo de injeção Split e o gás de arraste utilizado, nitrogênio, na vazão de 0,55 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi programada à 60°C por 1 min, depois aquecida de 60°C à 210°C com subida de 5°C/min e mantida à 210°C por 7 min (LOPRESTO *et al.*, 2014). Em seguida, as áreas dos picos obtidos foram relacionadas com a curva de calibração obtida utilizando o (L)-Limoneno (Sigma-Aldrich) padrão CG e o teor de Limoneno foi calculado.

3.2.3 Extração de pectina

A pectina foi extraída após a moagem em meio ácido, com a utilização de ácido cítrico, conforme a **Figura 5**. As amostras de resíduo cítrico (4 g) foram dissolvidas em 3,0 L de água destilada. A extração foi realizada à temperatura constante (97°C) com ácido cítrico na proporção de 1g. de ácido cítrico por 20 gramas de subproduto cítrico por 1h. Após extração ácida, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 2 h, filtradas em vidro sinterizado de porosidade número 3, sendo reservado o sobrenadante. Ao filtrado contendo pectina, foi adicionado álcool etílico (95%v. v⁻¹) na proporção 1:2 (uma parte de solução de pectina e duas partes de álcool). Após 1 h, houve a separação da pectina na forma de precipitado, sendo separada por filtração. A pectina obtida foi seca em estufa de secagem a 50°C até peso constante. O rendimento de pectina foi obtido a partir da quantidade inicial da matéria-prima utilizada (MUNHOZ *et al.*, 2010).

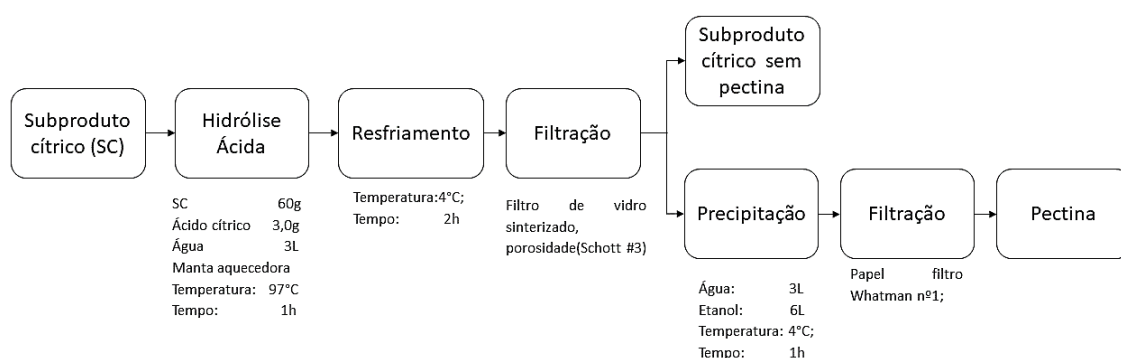


Figura 5 - Fluxograma das etapas de extração de pectina do subproduto cítrico. Fonte: Dados do autor.

O percentual de pectina foi obtido a partir da quantidade inicial de matéria-prima utilizada. (**Equação 1**).

$$\text{Pectina (\%)} = \frac{\text{PEC}}{m} \times 100 \quad (1)$$

Em que: PEC - massa de pectina obtida após extração e secagem (g); m - massa seca inicial de subproduto cítrico (g);

3.2.4 Composição química

Para determinação da composição química, SC não-tratado e pré-tratado (Subproduto cítrico sem pectina) foram submetidos à extração com hexano e etanol. Assim, 3g de SC foram inseridas em envelopes de papel filtro, colocados num sistema Soxhlet e foram realizados 3 ciclos com hexano. Posteriormente, o solvente foi evaporado utilizando rotaevaporador (Heidolph-Hei-VAP-Advantage) a 40°C, 150rpm e 250bar, a amostra foi seca em estufa à 50°C *overnight* e a massa foi aferida por gravimetria, sendo a massa extraída quantificada como lipídeos. De modo análogo, foi feita uma extração utilizando etanol (95% v.v⁻¹) como solvente, e após a extração, a amostra foi seca e a massa extraída foi quantificada como extrativos (adaptado de MASARIN *et al.*, 2011). Uma análise elementar foi realizada com analisador elementar 2400 Series II (PerkinElmer®) e o teor de proteína bruta foi calculado multiplicando o teor de nitrogênio obtido do analisador de elementos por um fator de 6,25 (CHAU; HUANG, 2003).

3.2.5 Hidrólise ácida

Após secar os envelopes contendo a matéria após a extração dos lipídeos e extrativos em estufa e, posteriormente em dessecador, cerca de 300mg das amostras foram tratadas com 3mL de ácido sulfúrico 72% m.m⁻¹ por 1h/30°C (MASARIN *et al.*, 2011). Em seguida, o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para frascos tipo Erlenmeyer de 250mL com auxílio de 79 mL de água destilada. A mistura foi autoclavada por 1h/121°C, resfriada e filtrada em filtros de vidro sinterizados de porosidade número 3 previamente pesados. O material retido nos frascos foi lavado com 10 mL de água destilada e seco em estufa por 12h (PAZ-CEDEÑO, 2021). Os vidros sinterizados foram novamente aferidos por gravimetria e a massa contida foi quantificada como lignina insolúvel. Os filtrados passaram por filtros de 0,45µm e, em seguida, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência conforme descrito no item 3.4.2.

O teor de lignina solúvel em ácido foi determinado por medida de absorbância em 205 nm. Para o cálculo da concentração de lignina solúvel foi utilizada uma absorvidade de 105 L/g.cm nesse comprimento de onda (MASARIN *et al.*, 2011; DENCE, 1992).

O percentual de lignina foi obtido a partir da quantidade inicial de matéria-prima utilizada. **(Equação 2).**

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{\text{Abs}}{b \times a} \times V \times 100 \quad (2)$$

Em que: Abs - Absorbância da amostra em 205 nm; b - Comprimento do caminho percorrido pela luz em cm; a - Absortividade de 105 L/g.cm em 205 nm; V - Volume de amostra filtrado em L.

3.2.6 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas do SC foi determinado de acordo com metodologia de Silva e Queiroz, 2002. Dois gramas do subproduto cítrico foram pesados em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados a 300°C por 2 h e a 1100°C pelo mesmo tempo. Após a calcinação do material nas mesmas condições, o cadinho foi resfriado em dessecador e aferido por gravimetria. O teor de cinzas foi calculado pela diferença entre as massas do cadinho com cinzas e vazio (**Equação 3**).

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{(M_2 - M_1)}{M_3} \times 100 \quad 3$$

Em que: M₁ - massa do cadinho calcinado; M₂ - massa do cadinho com cinzas; M₃ - massa do bagaço seco.

3.3 Produção do colorante vermelho

3.3.1 Microrganismo

T. amestolkiae é a espécie utilizada nesse trabalho, a qual foi cedida gentilmente pela Coleção de Culturas DPUA, do laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Cadastro de Acesso no CGEN nº A3FE0C3). As culturas estão preservadas em água destilada esterilizada, liofilizadas em glicerol (20% v.v⁻¹) em ultrafreezer. A cultura foi reativada em caldo glicosado, composto por (g.L⁻¹ água deionizada): glicose (20,0), peptona de carne (10,0), extrato de carne (3,0) e KH₂PO₄ (1,0), pH 7,0 (LACAZ *et al.*, 2002). O meio foi esterilizado a 121°C por 15 min. Os cultivos foram mantidos a 25 °C durante 168 h.

3.3.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi realizado em Placa de Petri (90 mm x 10 mm) contendo meio Ágar Batata Dextrose suplementado com extrato de levedura (BDA) pela transferência do microrganismo reativado para o centro da referida placa. O meio BDA contém a seguinte composição (g.L⁻¹ água deionizada): extrato de levedura (5,0) e ágar batata

dextrose (43,0). O período de crescimento do microrganismo nesta etapa foi de 168 h a 30°C em estufa incubadora.

3.3.3 Preparo do meio de cultivo

A produção de colorantes naturais foi estudada tendo como controle positivo o meio padrão de produção, que resulta na maior produção de colorantes vermelhos até o momento, realizado em trabalhos anteriores pelo grupo de pesquisa (DE OLIVEIRA, 2020a). A **Figura 6** apresenta o Fluxograma do processo padrão de obtenção dos colorantes naturais pelo nosso grupo de pesquisa Bioppul.

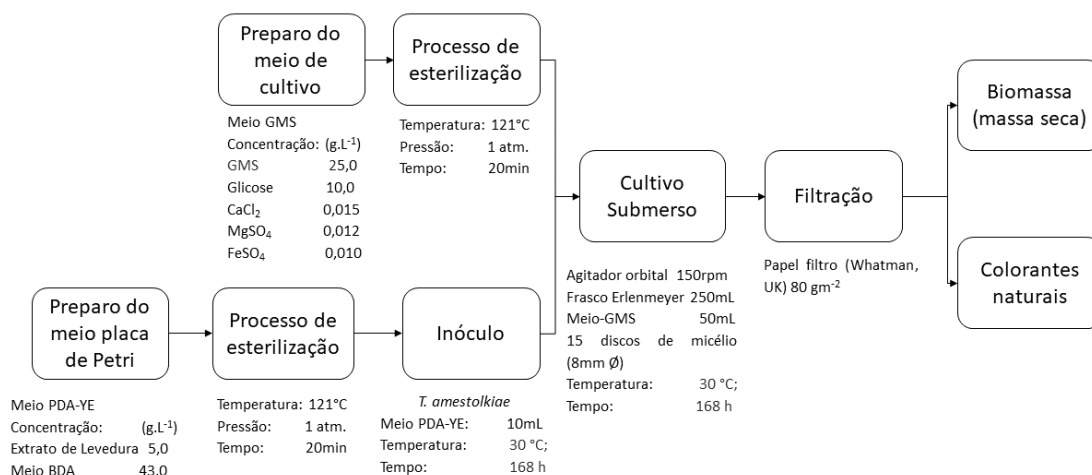


Figura 6 - Fluxograma das etapas de produção dos colorantes naturais por *T. amestolkiae* padrão.
 Fonte: Dados do autor.

Inicialmente, a produção dos colorantes foi estudada avaliando glicose e xilose como fontes de carbono, em diferentes proporções. Em seguida, foram realizados ensaios com pectina comercial (PEC) em diferentes concentrações em relação a glicose utilizada no meio de cultivo de acordo com a **Figura 7**.

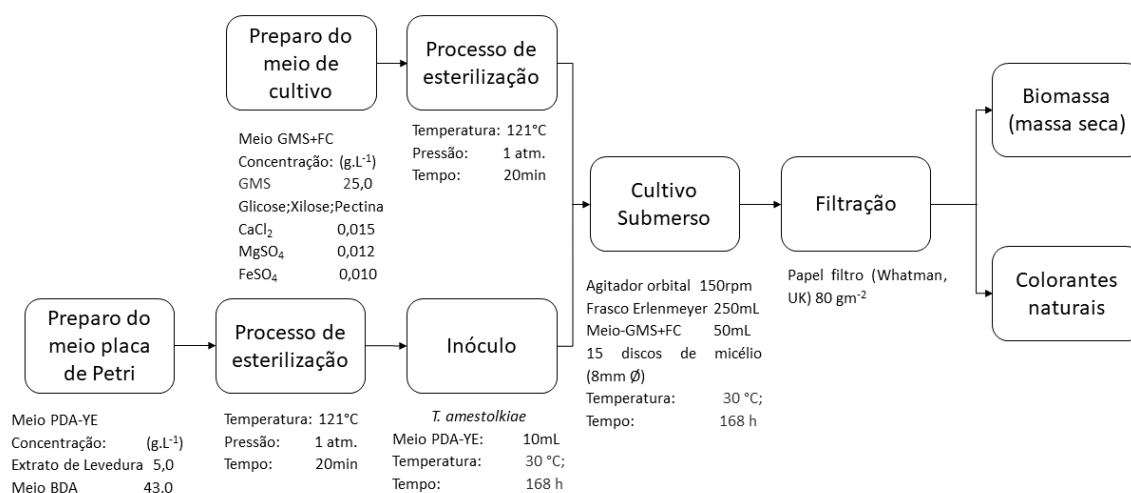


Figura 7 - Fluxograma das etapas de produção dos colorantes naturais por *T. amestolkiae* por meio do acréscimo de fontes de carbono comerciais (glicose-xilose e pectina cítrica). Fonte: Dados do autor.

Além disso, o subproduto cítrico (SC) foi usado também em proporções diferentes não-tratado e tratado (Subproduto cítrico sem pectina) aplicando o processo de extração de pectina descrito no item 3.2.3. Nos ensaios com subproduto cítrico, variou-se a quantidade de subproduto e o tempo de fermentação, bem como o efeito da inserção de GMS e glicose (G) no meio, como demonstrado na **Figura 8**.

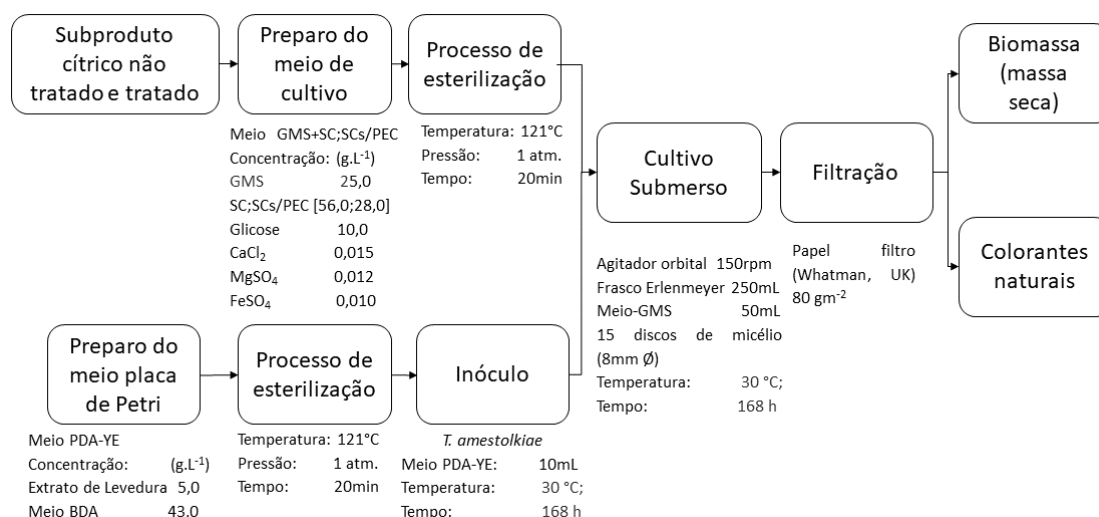


Figura 8 - Fluxograma das etapas de produção dos colorantes naturais por *T. amestolkiae* utilizando o subproduto cítrico como fonte de carbono. Fonte: Dados do autor.

Na **Figura 9** é possível observar a composição do meio de cultivo com os diferentes componentes avaliados para a produção do colorante natural vermelho.

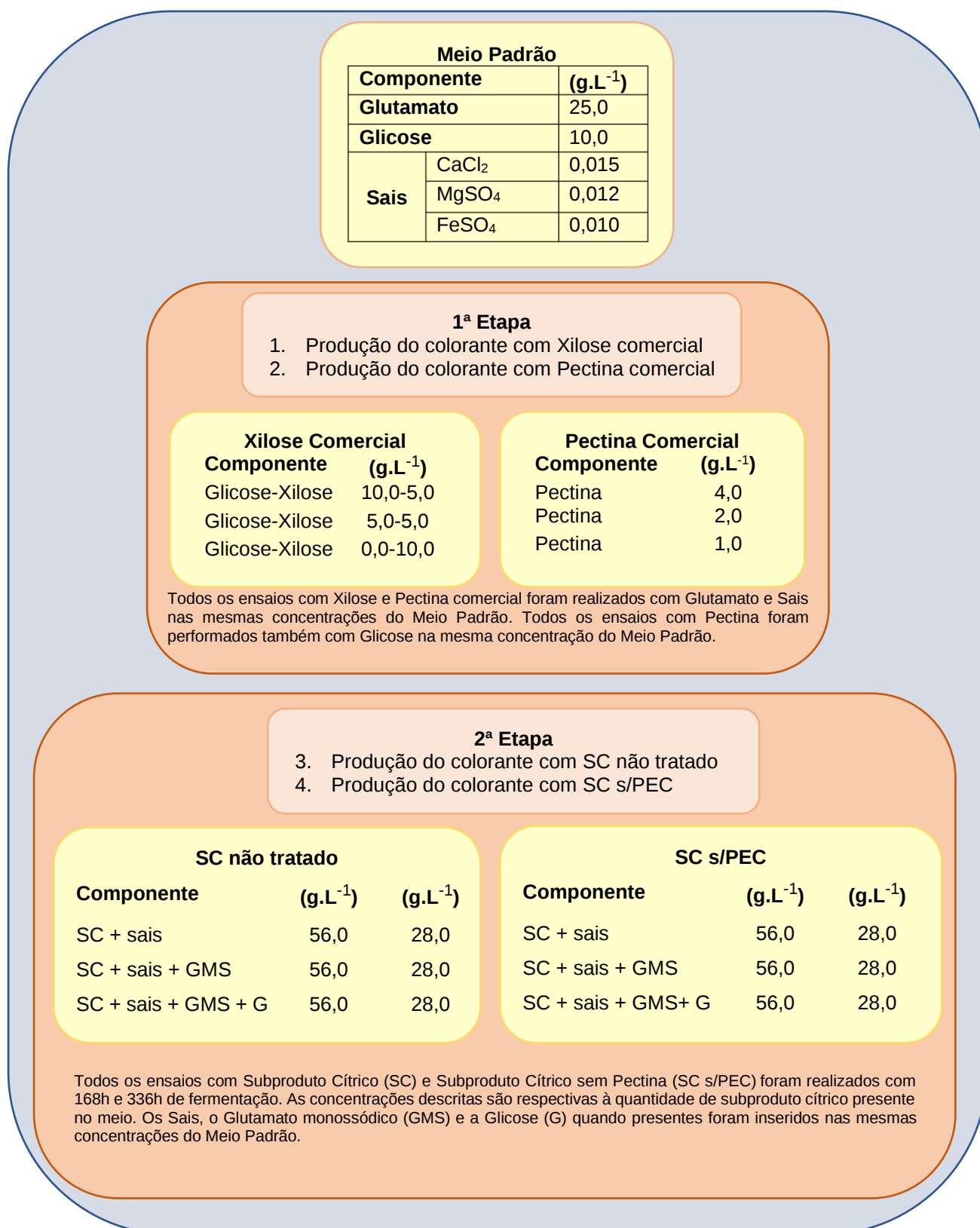


Figura 8 - Diagrama esquemático dos ensaios de avaliação da produção de colorantes naturais por *T. amestolkiae*.

Todos os experimentos de produção foram realizados em frascos tipo Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL do meio de cultivo os quais foram inoculados

com 15 discos de micélio (8 mm de diâmetro), retirados da margem da colônia com auxílio de tubos de ferro. Os ensaios foram divididos em duas etapas: na primeira foram realizados cultivos com componentes comerciais que fazem parte do SC e na segunda foram realizados cultivos com o SC e SCs/PEC. Todos os cultivos foram realizados em agitador orbital 30°C/150rpm pH 5,0, porém, os cultivos da primeira etapa foram realizados por 168h enquanto, os ensaios com SC e SCs/PEC foram realizados por um período de 336h. Todos os meios foram esterilizados à 121°C por 20 min. Ao fim do cultivo, o meio contendo os colorantes naturais foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e armazenado para a análise da produção de colorantes, consumo da fonte de carbono, biomassa e pH (DE OLIVEIRA, 2020a).

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi calculada com a massa seca do micélio por secagem do material obtido, após filtração à vácuo em papel de filtro previamente seco e aferido por gravimetria, em estufa a 100 °C por 24 horas (DE OLIVEIRA, 2020a).

3.4.2 Análise de Açúcares por CLAE/HPLC

As amostras obtidas do meio fermentado de *T. amestolkiae* foram filtradas em filtro 0,45 µm (Millipore) para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A concentração dos compostos (Glicose, Xilose, Arabinose, Ácido Acético) foi identificada no cromatógrafo (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) (Shimadzu - LC 20AD) empregando a coluna de troca catiônica AMINEX HPX-87H (300x 7,8 mm, 9 µm) BIO-RAD®, modo isocrático, tendo como fase móvel uma solução 0,005 M H₂SO₄, por 16 min; fluxo de 0,6mL/min à 60°C; 37 kgf; com volume de injeção de 20 µL (DE OLIVEIRA, 2020a).

3.4.3 Quantificação de Colorantes Naturais

O teor de colorantes extracelulares foi estimado por análise espectrofotométrica a partir da varredura (200-600nm) do meio filtrado. A leitura da absorbância do filtrado a 410, 470 e 500 nm correspondem à máxima absorbância para os colorantes amarelos, laranjas e vermelhos, respectivamente. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro EnSpire Alpha Plate Reader

(PerkinElmer®). Os resultados foram expressos em termos de Unidades de Absorbância (UA). Conforme a **Figura S1** disposta no item **8. Apêndice** é possível observar a varredura (200-600nm) do colorante produzido na condição padrão (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020a; ZACCARIM *et al.*, 2019; LACAZ *et al.*, 2002).

3.4.4 Determinação de Atividades Enzimáticas

Com o intuito de analisar outros metabólitos fúngicos produzidos pelo cultivo submerso de *T. amestolkiae*, foram realizados ensaios de determinação de atividade enzimática de enzimas celulolíticas, nomeadamente β -glucosidases, Endo- β -1,4-glucanases e Xilanase. A determinação das atividades enzimáticas (UI.mL⁻¹) foi obtida a partir do cálculo a seguir. (**Equação 4**).

$$[Enzima] = Abs \times [p] \times f \times (t)^{-1} \quad (3)$$

Em que: Abs - Absorbância da amostra no respectivo comprimento de onda (nm); [p] - Concentração do produto gerado (μ mol. mL⁻¹); f - Fator de diluição; t - Tempo de reação (min);

3.4.4.1 β -glucosidase (Celobiases)

O método para determinação da β -glucosidase foi baseado na metodologia descrita por Tan utilizando 4-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo (4NPG) (Sigma-Aldrich) como substrato. Neste ensaio, 0,4 mL de solução de 4NPG a 0,1% (p / v) foi adicionado a 0,1 mL de caldo fermentado e a solução foi incubada em tubos de ensaio por 30 min. As reações foram interrompidas com adição de 1 mL de NaHCO₃ a 10% (m.v⁻¹), e a respectiva absorbância medida a 410 nm (TAN *et al.*, 1987).

3.4.4.2 Endo- β -1,4-glucanase (CMCase)

Para a determinação da Endo- β -1,4-glucanase (CMCase) foi adicionado 750 μ L de solução de carboximetilcelulose (2% m.v⁻¹), preparada usando tampão citrato (0,05 M, pH 4,8), a um tubo de ensaio e logo após foi adicionado 750 μ L de meio fermentado. A mistura foi mantida à temperatura de 50 °C por 30 min. Posteriormente, os tubos foram resfriados e retiradas alíquotas de 500 μ L da solução. Então, adicionaram-se 500 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e a solução resultante foi submetida ao aquecimento em banho maria (água em ebulição) por 5 min. Posteriormente, adicionou-se 5 mL de água destilada e realizou-se a análise por espectrofotometria em leitora de microplacas PerkinElmer® no comprimento de onda de 540 nm. Foram realizados dois brancos diferentes para cada experimento. O

primeiro branco foi feito utilizando apenas o tampão citrato (0,05 M, pH 4,8) com o meio fermentado. O segundo branco foi feito contendo apenas a solução de carboximetilcelulose (2% m.v⁻¹) e tampão citrato (0,05 M, pH 4,8) (GHOSE, 1987).

3.4.4.3 Xilanase

Para determinação da atividade enzimática das xilanases foi realizada a reação do meio fermentado com solução do substrato xilana. O sistema consistiu em 750 µL de uma solução de xilana 1% (m.v⁻¹) de “Larchwood” em tampão McIlvaine pH 4,0 e 750 µL de meio fermentado. A solução foi mantida em banho termostático à 60°C por 20 min. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de 500 µL da solução, que foi adicionada 500 µL de DNS, cuja mistura foi submetida ao aquecimento em banho maria (água em ebulição) por 5 min. Em seguida, a solução foi resfriada e adicionou-se 5 mL de água destilada. Então, realizou-se a análise por espectrofotometria em leitora de microplacas PerkinElmer® no comprimento de onda de 540 nm e os resultados comparados com uma curva padrão de xilose previamente construída. Foram realizados dois brancos diferentes para cada experimento. O primeiro branco foi feito utilizando apenas o tampão McIlvaine (pH 4,0) com o meio fermentado. O segundo branco foi feito contendo apenas a solução de xilana 1% (m.v⁻¹) e tampão McIlvaine pH 4,0 (BARBIERI, 2019).

3.5. Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram apresentados na forma de média aritmética, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto, em um intervalo de confiança de 95%. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de *Tukey* (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise química do subproduto cítrico

A caracterização do subproduto cítrico permitiu a identificação e quantificação dos diferentes compostos presentes neste material. Segundo a literatura, a casca da laranja possui um teor majoritário de celulose, seguido de hemicelulose (xilana) e menores teores de lignina e pectina (GROHMANN *et al.*, 1995; SILES LOPEZ *et al.*, 2010; BOUKROUFA *et al.*, 2015). Porém, os resíduos cítricos não consistem apenas em casca da laranja, podendo possuir além das cascas, sementes e resíduos de membrana, assim como o subproduto cítrico utilizado neste trabalho (PAGGIOLA *et al.*, 2016; FAOSTAT, 2018). Pourbafrani e seus colaboradores (2010) determinaram o teor de celulose, hemicelulose, pectina, lignina, cinzas e proteínas de um subproduto cítrico proveniente do processamento de laranja, sendo, aproximadamente, 22%, 11%, 25%, 2,2%, 3,7%, 6,7% (m.m⁻¹) em base seca, respectivamente. Em um trabalho realizado por Rosa e Pinheiro (2021) a análise química de um subproduto cítrico proveniente do processamento de laranja revelou um teor (m.m⁻¹) de 18,8% de celulose, 10,7% de hemicelulose, 3,14% de lignina, 15,3% de pectina e 1,53% de cinzas aproximadamente. Já Zema e seus colaboradores (2018) em sua revisão de literatura relataram que alguns resíduos cítricos possuem teor de lignina em torno de 23,5% e teores de pectina de 6,5% em base seca. Na literatura também é reportado que resíduos cítricos podem conter alto teor de limoneno (BATTISTA *et al.*, 2020). Porém, a *Cutrale*® já forneceu o subproduto após um processo de extração do limoneno e pectina. Após um ensaio de extração com hexano e acetato de etila foi possível confirmar o baixo teor de limoneno no material, visto que não houve quantificação do limoneno Cromatografia Gasosa **Figura S2, S3 e S4 apresentados no Apêndice**. Os dados reportados reforçam que a quantificação dos compostos de resíduos cítricos pode diferir de acordo com cada resíduo, que pode variar consoante o tipo de espécie cítrica processada, o lote da produção em determinada temporada, a maturação da fruta e os processos aplicados. Na **Tabela 1** é possível observar a composição do subproduto cítrico empregado nesse trabalho em porcentagem de massa inicial em base seca.

Tabela 1 - Composição do subproduto cítrico (SC) não-tratado e tratado com processo de extração de pectina (SCs/PEC).

Amostra	Não-tratado (%massa inicial em base seca)	Tratado (%massa inicial em base seca)
Lignina Total	21,58 ± 1,45 ^a	22,35 ± 0,56 ^a
Celulose	11,94 ± 0,16 ^b	23,59 ± 0,56 ^a
Xilana	6,50 ± 0,09 ^b	11,29 ± 0,39 ^a
Arabinosil	4,94 ± 0,13 ^b	8,43 ± 0,11 ^b
Acetil	2,10 ± 0,52 ^a	2,25 ± 0,14 ^a
Proteínas	6,56 ± 0,31	-
Pectina	4,99 ± 0,29	-
Cinzas	6,58 ± 0,11 ^b	8,87 ± 0,16 ^a
Lipídeos	2,08 ± 0,19 ^b	12,23 ± 0,83 ^a
Extrativos	25,04 ± 2,14 ^a	1,68 ± 1,03 ^b
Total	92,29 ± 5,39 ^a	90,69 ± 3,78 ^a

Fonte: Dados do autor

O teor dos compostos identificados no subproduto cítrico foi expresso em (% m.m⁻¹) em base seca. Os valores descritos são as médias das triplicatas e a barra de erro ± indica o desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de Tukey (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05. Médias identificadas com letras diferentes (a, b) na mesma linha são significativamente diferentes.

Após o processo de extração de pectina, observou-se que o teor de polissacarídeos contidos no subproduto aumentou em relação ao resíduo não-tratado. Este aumento pode ter ocorrido porque possivelmente a celulose se manteve intacta durante o processo empregado para realizar a caracterização. Porém, durante o processo de extração de pectina, liberações de outras moléculas podem ter acontecido, sendo dissolvidas a pectina. Dentre todos os compostos avaliados antes e após o processo de extração da pectina, os lipídeos e extrativos foram os que mais sofreram alterações. Nos lipídeos que foram obtidos com ciclos com hexano, houve um aumento do teor em relação ao SCs/PEC, indo de cerca de 2,08% m.m⁻¹ no SC para, aproximadamente 12,23% m.m⁻¹ no SCs/PEC. Nestes ciclos com hexano, as moléculas mais apolares e hidrofóbicas tendem a ser extraídas devido a semelhança de polaridade com o solvente orgânico. Após a realização de buscas na literatura, não foi possível encontrar resultados semelhantes aos aqui reportados. Em relação aos extrativos, performados com ciclos com etanol 95% v.v⁻¹, houve uma diminuição abrupta, indo em torno de 25,04% m.m⁻¹ no SC para, aproximadamente, 1,08% m.m⁻¹ no SCs/PEC. Este resultado pode ser explicado devido a capacidade de extração no processo de remoção da pectina realizado antes da caracterização.

Vale salientar que a conservação do teor de carboidratos é uma resposta positiva, pois significa que haverá uma grande quantidade de açúcar a ser empregado

como fonte de carbono no processo de conversão do resíduo em colorantes naturais pelo fungo *T. amestolkiae*.

4.2 Produção do colorante vermelho

O estudo da utilização de diversas fontes de carbono em processos de biossíntese tem elucidado as melhores escolhas de acordo com o microrganismo e as condições de cultivo. Na produção de colorantes fúngicos, diferentes fontes de carbono têm sido aplicadas com o objetivo de se entender o comportamento e metabolismo destes compostos que atuam não somente como fonte de carbono, mas também de energia nestes processos (MORALES-OYERVIDES, 2020). É importante destacar, que cada microrganismo apresenta condições diferentes de metabolismo e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Fazendo com que um estudo de *screening* inicial, seja essencial para entendimento do processo. Assim, após a etapa de quantificação dos componentes presentes no SC, seguiu-se a ideia de realizar ensaios com alguns componentes comerciais isolados com o intuito de entender a interferência desses compostos na produção do colorante vermelho e ter o conhecimento da habilidade do microrganismo *T. amestolkiae* em metabolizar tais compostos. A **Tabela 2** apresenta os dados de produção do colorante vermelho nos ensaios realizados empregando glicose, xilose e pectina comercial.

Tabela 2. Produção de colorante vermelho por *T. amestolkiae* empregando glicose, xilose e pectina comerciais no meio de cultivo conduzido à 30°C; 150 rpm em agitador orbital por 168h

Fonte de carbono	(g.L ⁻¹)**	Colorantes Vermelhos UA _{500nm}	pH Final	Consumo de Glicose (%)	Consumo de Xilose (%)	Biomassa (g.L ⁻¹)
Padrão*(Glicose)	(10)	13,34 ± 1,94 ^{a,b}	4,95 ± 0,02 ^a	77,52 ± 13,45 ^a	-	2,35 ± 0,22 ^a
Glicose-Xilose	(10:5,0)	14,51 ± 1,49 ^a	4,94 ± 0,01 ^a	36,09 ± 3,64 ^b	13,66 ± 1,74 ^b	3,60 ± 0,82 ^a
Glicose-Xilose	(5,0:5,0)	13,59 ± 3,10 ^a	4,97 ± 0,02 ^a	85,78 ± 6,87 ^a	41,51 ± 2,63 ^a	3,24 ± 1,25 ^a
Glicose-Xilose	(00:10)	10,78 ± 0,49 ^{a,b,c}	5,00 ± 0,01 ^a	-	47,39 ± 4,01 ^a	3,09 ± 0,14 ^a
Glicose-Pectina	10,0:4,0	5,24 ± 1,30 ^{c,d}	4,85 ± 0,02 ^b	35,59 ± 0,93 ^b	-	3,80 ± 0,61 ^a
Glicose-Pectina	10,0:2,0	5,05 ± 2,63 ^d	4,91 ± 0,11 ^a	51,60 ± 1,27 ^b	-	4,47 ± 1,50 ^a
Glicose-Pectina	10,0:1,0	7,93 ± 0,12 ^{b,c,d}	4,90 ± 0,01 ^a	56,13 ± 3,90 ^b	-	3,45 ± 0,66 ^a

Fonte: Dados do autor

*Padrão corresponde ao meio de cultivo suplementado com a seguinte composição (g.L⁻¹): GMS - Glutamato monossódico (25,0), G - glicose (10,0), CaCl (0,015), MgSO₄ (0,012), FeSO₄ (0,010). Todos os ensaios com Pectina foram realizados contendo GMS, G e sais nas mesmas concentrações do meio padrão. Os valores descritos são as médias das triplicatas e a barra de erro ± indica o desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de Tukey (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05. Médias identificadas com letras diferentes (a, b, c, d) na mesma coluna são significativamente diferentes. ** Concentração correspondente ao açúcar inserido no meio de cultivo;

Nos ensaios performados com glicose-xilose em diferentes proporções em relação a produção dos colorantes vermelhos, pôde-se observar uma produção

semelhante ao padrão. Além disso, de acordo com os dados de biomassa é evidente que o microrganismo conseguiu se multiplicar e produzir colorantes em todas as condições, mesmo na presença apenas da xilose. Não houve diferença estatística em relação a biomassa em todas as condições analisadas. Estes resultados, aliados aos dados de consumo da fonte de carbono (xilose) indicam que o microrganismo é capaz de metabolizar a xilose. Porém, em um meio de cultura composto somente por xilose, a produção se demonstrou inferior as condições com presença dos dois monossacarídeos, evidenciando a importância da glicose na produção dos colorantes naturais. Tais resultados corroboram com os dados obtidos na literatura, visto que xilose é um monossacarídeo que pode ser consumido e utilizado como fonte de energia para alguns microrganismos. Diversos trabalhos na literatura relatam que a xilose pode ser empregada como fonte de carbono e/ou indutora em processos fermentativos com diferentes microrganismos como na produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (HOANG NGUYEN TRAN *et al.*, 2020), na geração de hidrogênio por *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (ZHAO *et al.*, 2020) e na produção de lipídios por *Cryptococcus curvatus* (DIAMANTOPOULOU *et al.*, 2020). A xilose inclusive já é utilizada para produção de colorantes vermelhos de acordo com a literatura (MORALES-OYERVIDES, 2020). Nestes trabalhos os autores relatam que a presença de xilose no meio de cultivo aumenta a produtividade como no caso dos colorantes vermelhos produzidos por *Penicillium spp* (SOPANDI *et al.*, 2012; CHINTAPENTA *et al.*, 2014) e/ou é a fonte de carbono preferida ou mais consumida como na produção de colorantes vermelhos por *Penicillium purpurogenum* chegando a uma absorbância de 10,4 em 510nm (PATIL *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos juntamente com a análise da literatura demonstram que a correlação entre o consumo da fonte de carbono e a produção dos colorantes pode alternar dependendo da proporção e da fonte utilizada. Em todos os experimentos que continham glicose e xilose juntos, o fungo consumiu preferencialmente a glicose. Na condição (10,0-05,0 g.L⁻¹) glicose-xilose, o fungo consumiu aproximadamente 36,09% da glicose. Já na condição com (05,0-05,0 g.L⁻¹) de glicose-xilose o *T. amestolkiae* chegou a consumir cerca de 85,78% da glicose e 41,51% da xilose. Sendo assim, o consumo da glicose nos ensaios com glicose-xilose permaneceu em torno de 4,0 g.L⁻¹ aproximadamente. Nos ensaios performados apenas com xilose, o consumo dessa fonte de carbono foi de 47,39% e mesmo assim conseguiu-se uma produção de 10,78

UA_{500nm}. Contudo, é importante ressaltar que as produções de corante foram estatisticamente semelhantes entre todos os ensaios realizados com xilose, glicose-xilose e o padrão. Assim, estes resultados demonstram que a xilose não inibe o metabolismo do *T. amestolkiae*. Além disso, é possível notar que em nenhum dos ensaios com glicose-xilose houve alteração do pH de forma significativa, que pode ter contribuído para a produção do corante, tendo em vista que o pH ótimo para a produção de corantes vermelhos por *T. amestolkiae* é 5,0 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Em relação aos resultados obtidos na presença de pectina comercial, apesar da interferência gradativa na produção, o *T. amestolkiae* foi capaz de gerar corantes na presença de PEC, sendo a produção estatisticamente semelhante nos ensaios com as maiores concentrações de PEC em relação ao padrão. Entretanto, vale salientar que a presença de PEC, ainda que na menor condição (1 g.L⁻¹) diminuiu, aproximadamente, 40% da produção de corantes vermelhos e 20% do consumo de glicose em comparação com o padrão, mesmo com o pH mantido em 5,0 que é ótimo para produção. Isto pode indicar que, embora a pectina não bloqueie completamente a produção dos corantes, a sua presença no meio de cultivo pode afetar ou inibir parcialmente a produção dos mesmos. Após uma pesquisa aprofundada, não foi possível encontrar nenhum trabalho relatado na literatura que utilize a pectina como fonte de carbono para produção de corantes naturais fúngicos, entretanto o objetivo desse experimento foi descobrir se a pectina inibia a produção dos corantes naturais por *T. amestolkiae* já que este polissacarídeo está presente no subproduto cítrico.

A utilização de resíduos agroindustriais, como por exemplo, descartes de mandioca e dejetos de laranja, para produção de corantes naturais fúngicos tem sido relatada na literatura (MORALES-OYERVIDES, 2020; KANTIFEDAKI *et al.*, 2018; PADMAPRIYA; MURUGESAN, 2016). Por possuir uma grande quantidade de polissacarídeos, o subproduto cítrico (SC) se apresenta como uma opção de aplicação dos conceitos de biorrefinaria para produção de corantes naturais. Na **Tabela 3** pode-se identificar os dados de produção do corante utilizando o SC e SCs/PEC.

Tabela 3 - Produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* empregando subproduto cítrico (SC) não-tratado e tratado (SCs/PEC) no meio de cultivo conduzido à 30°C; 150 rpm em agitador orbital por 168h

Condição	Sub. Cítrico (g.L ⁻¹)*	Colorantes Vermelhos	pH Final	Consumo de Glicose (%)
		UA _{500nm}		
Padrão*(Glicose)	10,00	13,34 ± 1,94 ^a	4,95 ± 0,02 ^f	77,52 ± 13,45 ^b
SC + sais	56,12	1,54 ± 0,32 ^{f,g}	5,19 ± 0,07 ^f	-
SC + sais + GMS	56,12	1,19 ± 0,23 ^{d,e}	6,77 ± 0,20 ^{c,d}	-
SC + sais + GMS + G	56,12	0,69 ± 0,18 ^{e,f}	6,18 ± 0,06 ^e	100 ± 0,00 ^a
SC + sais	28,0	0,31 ± 0,09 ^{g,h}	5,10 ± 0,19 ^f	-
SC + sais + GMS	28,0	1,28 ± 0,16 ^{d,e}	7,78 ± 0,05 ^a	-
SC + sais + GMS + G	28,0	1,83 ± 0,27 ^{c,d}	7,57 ± 0,08 ^{a,b}	100 ± 0,00 ^a
SCs/PEC + sais	56,12	0,24 ± 0,08 ^h	4,24 ± 0,03 ^g	-
SCs/PEC + sais + GMS	56,12	1,97 ± 0,14 ^{b,c,d}	6,49 ± 0,21 ^{d,e}	-
SCs/PEC + sais + GMS + G	56,12	4,27 ± 0,21 ^b	6,71 ± 0,26 ^{c,d}	100 ± 0,00 ^a
SCs/PEC + sais	28,0	0,64 ± 0,03 ^{e,f,g}	5,04 ± 0,11 ^f	-
SCs/PEC + sais + GMS	28,0	1,60 ± 0,16 ^{c,d}	7,38 ± 0,01 ^b	-
SCs/PEC + sais + GMS + G	28,0	3,34 ± 1,10 ^{b,c}	7,15 ± 0,17 ^{b,c}	100 ± 0,00 ^a

Fonte: Dados do autor

Os meios de cultivo apresentaram composição variada, como descrito a seguir (g.L⁻¹): GMS: Glutamato monossódico (25,0); G: glicose (10), Sais: CaCl (0,015), MgSO₄ (0,012), FeSO₄ (0,010). Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,0. Os valores descritos são as médias das triplicatas e a barra de erro ± indica o desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de Tukey (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05. Médias identificadas com letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g, h) na mesma coluna são significativamente diferentes.

*: Teor correspondente ao SC inserido no meio de cultivo;

Nos experimentos com SC tanto não-tratado quanto SCs/PEC, o fungo conseguiu produzir pouco corante quando comparado a condição padrão ou os ensaios com glicose e xilose comercial. A produção variou de acordo com o teor do subproduto e a presença de GMS e/ou glicose no meio. Nos experimentos com SC não-tratado, a máxima produção ocorreu no teor de 28,0 g.L⁻¹ de SC, na presença de GMS e glicose, chegando a produzir 1,83 UA_{500nm}. Já nos ensaios com SCs/PEC, a produção chegou a atingir 4,27 UA_{500nm}, na condição de 56,0 g.L⁻¹ com glutamato e glicose. Estes dados corroboram com os dados de produção obtidos nas condições com pectina comercial, uma vez que nos experimentos com pectina foi observado uma redução significativa da produção de colorantes vermelhos em relação ao padrão. Ainda assim, foi possível observar que em todos os ensaios com acréscimo de glicose, o fungo consumiu 100% do açúcar disponível. Tais resultados evidenciam que o microrganismo foi capaz de sobreviver na presença do resíduo e metabolizar a glicose quando disposta no meio de cultivo, indicando uma probabilidade de desvio metabólico da produção dos colorantes para outros metabólitos. Além disso, em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa na produção de colorantes em

cultivo submerso de *T. amestolkiae*, foi relatado que altas concentrações de GMS (25 g.L⁻¹) contribuem para rendimentos elevados de produção de colorantes, redirecionando o metabolismo central do carbono do crescimento para a via biossintética do colorante (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Atrelado a isso, a literatura relata que quando o GMS está presente no meio, ele promove uma melhor produção e excreção de colorantes extracelulares e também leva a maioria dos colorantes a formar um complexo entre o colorante e o ácido glutâmico, que torna a molécula mais solúvel em água (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; HAJJAJ *et al.*, 1997; LIN: DEMAIN, 1994; BLANC *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 1992).

Sabe-se que resíduos agroindustriais possuem complexidade e variabilidade nas moléculas contidas em sua composição, assim deve-se considerar a possibilidade de desvio metabólico do fungo da produção dos colorantes na presença do SC. Esta probabilidade pode ocorrer pois os colorantes naturais produzidos por *T. amestolkiae* são metabólitos secundários, desta forma são produzidos em maior quantidade, principalmente, após a fase de adaptação [lag] do microrganismo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020a). Além disso, o microrganismo pode ter metabolizado o subproduto produzindo outras biomoléculas, tais como enzimas, o que desfavoreceu a produção dos colorantes. Tendo em vista a diferença na presença de diversas moléculas no meio de cultivo contendo SC e o meio padrão, a adaptação do fungo ao meio pode sofrer alterações. Devido a tais possibilidades, realizaram-se experimentos dobrando o tempo de cultivo para 336h (15 dias), afim de analisar a produção dos colorantes nestas condições. Ademais, a atividade do meio fermentado também foi realizada. Na literatura, os tempos de cultivo para produção de colorantes utilizando resíduos agroindustriais pode variar entre 10, 12, 14, 16 e até 21 dias (SOPANDI *et al.*, 2012; CHINTAPENTA *et al.*, 2014; KANTIFEDAKI *et al.*, 2018; PANDIT *et al.*, 2019). Na **Tabela 4** pode-se observar os dados de produção do colorante utilizando o SC e SCs/PEC com 336h de cultivo.

Tabela 4 - Produção de corante vermelho por *T. amestolkiae* empregando subproduto cítrico (SC) não-tratado e tratado (SCs/PEC) no meio de cultivo conduzido à 30°C; 150 rpm em agitador orbital por 336h.

Condição	(g.L ⁻¹)*	Colorantes Vermelhos UA _{500nm}	pH Final	Consumo de Glicose (%)
Padrão*(Glicose)	10,00	13,34 ± 1,94 ^a	4,95 ± 0,02 ⁱ	77,52 ± 13,45 ^b
SC + sais	56,12	0,52 ± 0,05 ^f	6,58 ± 0,03 ^g	-
SC + sais + GMS	56,12	2,15 ± 0,23 ^c	7,32 ± 0,04 ^a	-
SC + sais + GMS+ G	56,12	2,01 ± 0,47 ^c	7,17 ± 0,07 ^b	100 ± 0,00 ^a
SC + sais	28,0	0,54 ± 0,06 ^f	6,54 ± 0,14 ^g	-
SC + sais + GMS	28,0	1,14 ± 0,08 ^{d,e}	7,17 ± 0,02 ^b	-
SC + sais + GMS + G	28,0	1,86 ± 0,15 ^{c,d}	7,14 ± 0,01 ^c	100 ± 0,00 ^a
SCs/PEC + sais	56,12	0,21 ± 0,08 ^g	5,14 ± 0,25 ^{h,i}	-
SCs/PEC + sais + GMS	56,12	0,82 ± 0,03 ^{e,f}	7,07 ± 0,03 ^e	-
SCs/PEC + sais + GMS + G	56,12	0,87 ± 0,11 ^{e,f}	6,74 ± 0,49 ^{e,f,g}	100 ± 0,00 ^a
SCs/PEC + sais	28,0	0,87 ± 0,22 ^{e,f}	5,34 ± 0,11 ^h	-
SCs/PEC + sais + GMS	28,0	2,01 ± 0,49 ^c	7,08 ± 0,05 ^{d,e}	-
SCs/PEC + sais + GMS + G	28,0	4,13 ± 0,21 ^b	7,13 ± 0,03 ^{c,d}	100 ± 0,00 ^a

Fonte: Dados do autor

Os meios de cultivo apresentaram composição variada, como descrito a seguir (g.L⁻¹): GMS: Glutamato monossódico (25,0); G: glicose (10), Sais: CaCl (0,015), MgSO₄ (0,012), FeSO₄ (0,010). Os valores descritos são as médias das triplicatas e a barra de erro ± indica o desvio padrão. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,0. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de Tukey (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05. Médias identificadas com letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g, h, i) na mesma coluna são significativamente diferentes.

*: Teor correspondente ao SC inserido no meio de cultivo;

Nos ensaios contendo SC e SCs/PEC com 336h de cultivo, o microrganismo produziu baixa quantidade de colorantes e esta produção variou de forma semelhante aos ensaios realizados por 168h de cultivo. Nestes ensaios, após 336h foi observada uma produção máxima nos experimentos com SC com teor de 56,0 g.L⁻¹ de SC, na presença de GMS, chegando a produzir 2,15 UA_{500nm}. Já nos ensaios com SCs/PEC, a produção chegou a atingir 4,13 UA_{500nm}, na condição de 28,0 g.L⁻¹ com GMS e glicose. De acordo com estes dados, com o aumento do tempo não houve uma maior produção de colorantes naturais, o que indica que o microrganismo priorizou a produção de outros compostos e não do corante, mesmo após 336h.

Foi observado que o pH do meio fermentado ao fim do cultivo tendeu para valores mais neutros/básicos do que o pH inicial (5,0), considerado pH ótimo para produção por *T. amestolkiae* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Esta alteração foi notada em todos os ensaios com SC e SCs/PEC contendo GMS, chegando até 7,78 em alguns experimentos. Isso indica que o comportamento do microrganismo na presença de nutrientes complexos e glutamato variou e desviou a rota de produção dos colorantes indo possivelmente para produção de metabólitos primários como

enzimas. Em trabalhos relatados na literatura realizados pelo nosso grupo de pesquisa, esta cepa de *T. amestolkiae* já foi estudada quanto a produção de enzimas e este microrganismo tem potencial para produção de enzimas celulolíticas na presença de subprodutos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de arroz) (BARBIERI *et al.*, 2019)

Ainda assim é importante ressaltar que a máxima produção de colorantes vermelhos utilizando subproduto cítrico neste trabalho foi semelhante ou superior a trabalhos que empregam outros resíduos agroindustriais. Em uma pesquisa relatada na literatura utilizando a casca do grão-de-bico, a maior produção de colorantes vermelhos por *T. purpureogenus* observada foi 0,565 UA em 494nm (PANDIT *et al.*, 2019). Outro trabalho utilizando casca de laranja como substrato para produção de colorantes vermelhos por *M. purpureus* conseguiu produzir cerca de 2,4 UA em 510nm (KANTIFEDAKI *et al.*, 2018).

Apesar da produção dos colorantes ter sido consideravelmente menor que o padrão, ao final do processo fermentativo em todas as condições contendo SC e SCs/PEC o açúcar adicionado ao meio (glicose) foi 100% consumido. Este dado indica que o *T. amestolkiae* não foi completamente inibido pelo SC, pois foi capaz de consumir toda a glicose disponível, contudo reforça a hipótese de que o metabolismo foi desviado da rota de produção dos colorantes. Dessa maneira, foi avaliado a presença de enzimas no meio de cultivo.

4.3 Produção de enzimas celulolíticas por *Talaromyces amestolkiae*

Diversos microrganismos têm sido utilizados para a produção de uma grande variedade de enzimas. Como citado anteriormente, o fungo *T. amestolkiae* foi relatado previamente na literatura na produção de xilanases empregando subprodutos agroindustriais (farelo de trigo, farelo de arroz) como fonte de carbono (BARBIERI *et al.*, 2019). Portanto, a fim de entender o possível desvio metabólico da produção dos colorantes na presença de SC e SCs/PEC, ensaios para determinação da atividade enzimática de enzimas celulósicas foram realizados utilizando os meios fermentados oriundos das etapas anteriores. Na **Figura 9**, pode-se analisar a detecção da atividade enzimática presente no meio fermentado com SCs/PEC na condição com 28,0 e 56,0 g.L⁻¹ após 168h de cultivo submerso.

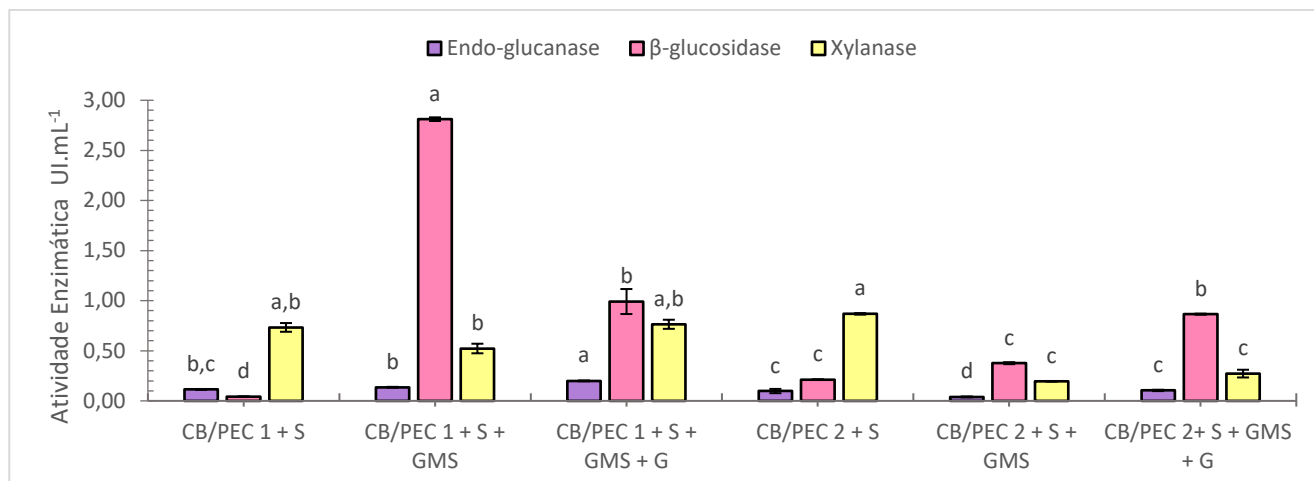


Figura 9 - Determinação da atividade enzimática de enzimas celulolíticas no meio fermentado de *T. amestolkiae* contendo SCs/PEC1-56,0 g.L⁻¹ e SCs/PEC2-28,0 g.L⁻¹ conduzido à 30°C; 150 rpm em agitador orbital por 168h. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de Tukey (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05. Médias identificadas com letras diferentes (a, b, c, d) são significativamente diferentes.

*GMS: Glutamato monossódico; G: glicose

Nos experimentos de determinação de atividade enzimática foi possível observar atividades de todas as enzimas analisadas em todos os ensaios realizados. Dentre as enzimas observadas nos ensaios com meio fermentado contendo SCs/PEC com 56,0 g.L⁻¹ por 168h de cultivo, as β-glicosidases são as que mais se destacam, chegando a gerar uma atividade em torno de 2,8 UI.mL⁻¹, sendo a maior atividade enzimática entre todas as enzimas presentes em todos os meios avaliados. Além disso, foi possível observar que nos ensaios contendo glutamato no meio de cultivo a produção das β-glicosidases foi maior. Estes dados corroboram com os dados obtidos na caracterização do SCs/PEC, sendo que a celulose foi o composto majoritário determinado. Em um trabalho relatado na literatura avaliando a produção de β-glicosidase por *T. amestolkiae*, os autores observaram uma produção entre 1,4 e 1,8 UI.mL⁻¹ utilizando glicose como fonte de carbono (DE EUGENIO *et al.*, 2017; MÉNDEZ-LÍTER *et al.*, 2018). Depois das β-glicosidases, as xilanases foram as enzimas mais produzidas nestas condições, atingindo um ponto máximo de, aproximadamente, 0,8 UI.mL⁻¹. Como mencionado anteriormente, a produção de xilanases por *T. amestolkiae* já foi estudada pelo grupo de pesquisa utilizando diversos subprodutos agroindustriais como fonte de carbono, tais como o farelo de trigo, farelo de arroz e casca e pele do amendoim. Destes substratos a maior produção de xilanases foi observada utilizando o farelo de trigo (20g.L⁻¹), alcançando 13,02 UI.mL⁻¹ em cultivo submerso por 168h (BARBIERI *et al.*, 2019). Entretanto, é importante ressaltar que o GMS utilizado neste trabalho favorece o acúmulo e

produção dos colorantes naturais, além disso o teor de celulose e hemicelulose pode variar de acordo com o resíduo agroindustrial empregado, o que interfere na produção de enzimas. Também é relevante salientar que nos referidos trabalhos, o foco principal foi a produção ou otimização da produção das respectivas enzimas.

Com o intuito de compreender melhor o metabolismo do fungo em diferentes tempos de fermentação, a determinação das atividades enzimáticas também foi realizada com os meios fermentados oriundos dos ensaios com 336h de cultivo. Na **Figura 10**, é possível observar a determinação da atividade enzimática presente no meio fermentado com SCs/PEC na condição com 56,0 g.L⁻¹ e 28,0 g.L⁻¹ por 336h.

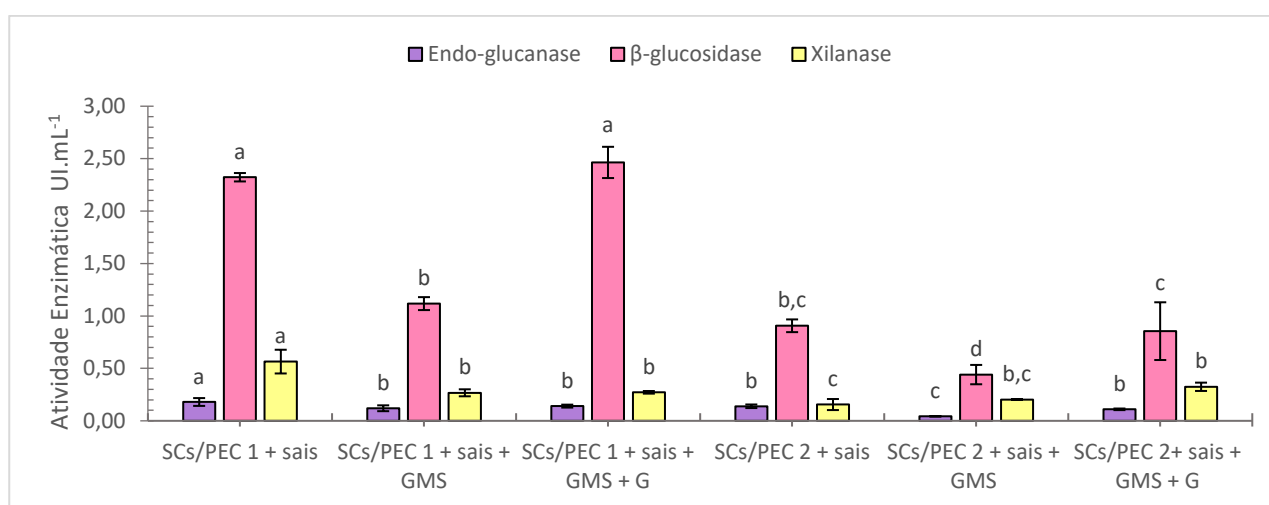


Figura 10 - Determinação da atividade enzimática de enzimas celulolíticas no meio fermentado de *T. amestolkiae* contendo SC na condição SCs/PEC1-56,0 g.L⁻¹ e SCs/PEC2-28,0 g.L⁻¹ conduzido à 30°C; 150 rpm em agitador orbital por 336h. As diferenças estatísticas entre os conteúdos foram avaliadas por meio do teste de Tukey (software Minitab 19.1) com nível de significância de 0,05. Médias identificadas com letras diferentes (a, b, c, d) são significativamente diferentes.

*GMS: Glutamato monossódico; G: glicose;

De acordo com os experimentos de determinação de atividade enzimática após 336h de cultivo, as enzimas que foram produzidas com maior proeminência constituíram novamente as β-glicosidases, chegando a atingir 2,46 UI.mL⁻¹, aproximadamente, e em seguida as xilanases, alcançando um máximo de 0,56 UI.mL⁻¹. Em todos ensaios, o ponto máximo determinado pelas endo-glucanases foi de 0,2 UI.mL⁻¹, ainda sim foi a enzima com menor atividade enzimática entre as enzimas avaliadas. Em um trabalho relatado na literatura avaliando a utilização de subprodutos agroindustriais como farelo de aveia, palha de trigo e farelo de trigo na produção de endo-glucanases por *T. amestolkiae*, foi possível observar uma produção entre 0,1 e 3,5 UI.mL⁻¹, variando de acordo com o substrato empregado (DE EUGENIO *et al.*, 2018).

Os resultados de produção de enzimas aqui reportado pelo *T. amestolkiae* na presença de SCs/PEC indicam um possível desvio de rota metabólica da produção de colorantes para produção destas enzimas, responsáveis pela quebra dos polissacarídeos contidos no SC em monômeros que, posteriormente, podem ser consumidos pelo fungo. Apesar do microrganismo ter conseguido produzir colorantes em todas as condições com SC, se faz necessária a aplicação de alguns tratamentos no subproduto cítrico, como por exemplo a hidrólise, para facilitar a metabolização e aumentar a produção dos colorantes vermelhos.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista a produção dos colorantes por meio de *T. amestolkiae* em cultivo submerso empregando o SCs/PEC, o cálculo da taxa de produção se faz necessário para o entendimento do processo **Figura 11**. Nesta condição, que foi a melhor condição utilizando o subproduto cítrico na produção de colorantes, atingiu-se uma absorbância de 4,27UA_{500nm} e uma taxa de 0,025UA/h. Com este conjunto de dados, uma análise econômica poderá ser realizada com o intuito de fornecer o entendimento do processo e da viabilidade econômica.

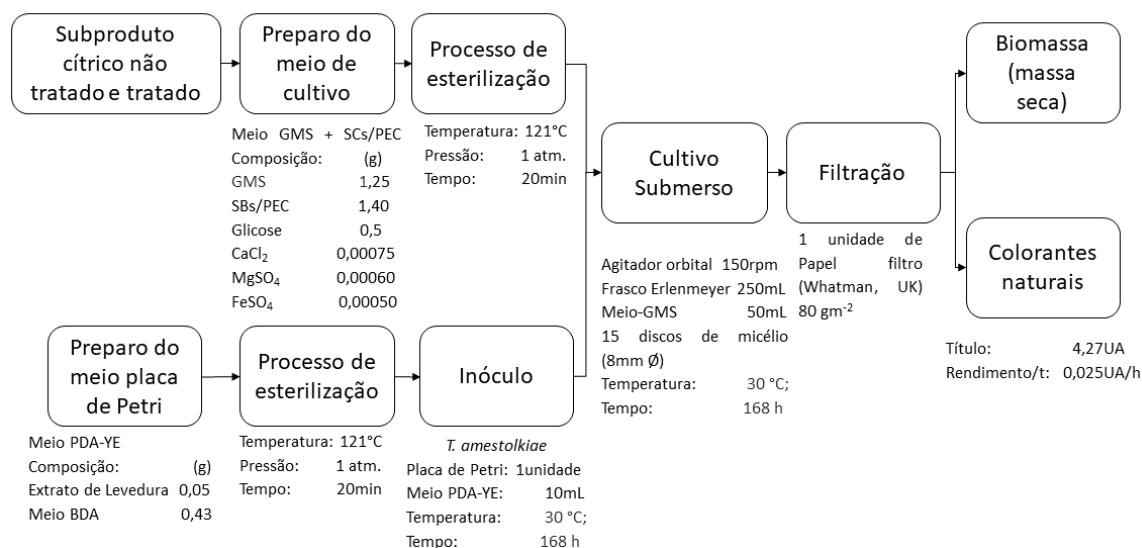


Figura 11 - Fluxograma das etapas de produção dos colorantes naturais por *T. amestolkiae* empregando SCs/PEC 28g.L⁻¹. Fonte: Dados do autor.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o subproduto cítrico detém polissacarídeos que podem ser utilizados como fonte de carbono para produção de diversas biomoléculas, especificamente, enzimas celulolíticas e colorantes naturais por bioconversão empregando o microrganismo *T. amestolkiae*. O microrganismo produziu colorantes em todas as condições estudadas, tanto com subproduto não-tratado quanto no subproduto tratado (sem pectina). Portanto, este trabalho evidenciou a versatilidade deste microrganismo e a capacidade de aplicação do *T. amestolkiae* na biorrefinaria e bioprocessos, valorizando o subproduto cítrico por meio da biotransformação e produção de diversas biomoléculas de interesse comercial e industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEEL, S.; HUSSAAN, M.; REHMAN, F.; HABIB, N.; SALMAN, M.; NAZ, S.; AKHTAR, N. Microwave-assisted sustainable dyeing of wool fabric using cochineal-based carminic acid as natural colorant. **Journal of Natural Fibers**, p. 1–9, 2018.
- AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Electronic Journal of Environmental Agriculture. Food Chemistry**. v. 9, p.148–154, 2016.
- AKOGO, F. U.; KAYODÉ, A. P.; DEN BESTEN, H. M.; LINNEMANN, A. R. Extraction methods and food uses of a natural red colorant from dye sorghum. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 361–368, 2017.
- ALI A. S.; EL-REGAL N. S.; SAEED S. M. The anti-schistosomal activity of two active constituents isolated from the leaves of Egyptian medicinal plants. **Infectious Diseases: Research and Treatment** (Auckl). v. 8, p. 5–16, 2015.
- ALIBARDI, L.; ASTRUP, T.S.; ASUNIS, F.; CLARKE, W.P.; DE GIOANNIS, G.; DESSI, P.; LENS, P.N.L.; LAVAGNOLO, M.C.; LOMBARDI, L.; MUNTONI, A.; PIVATO, A.; POLETTINI, A.; POMI, R.; ROSSI, A.; SPAGNI, A.; SPIGA, D. Organic waste biorefineries: looking towards implementation. **Waste Management**, v. 114, p. 274–286, 2020.
- ALVIM, J.C.; ALVIM, F.A.L.S.; SALES, V.H.G.; SALES, P.V.G.; OLIVEIRA, E.M.; COSTA, A.C.R. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. **Journal of Bioenergy and Food Science**. Macapá, v.1, n. 3, p. 61-77, out./dez. 2014.
- AMCHOVA, P., KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914-922, 2015.
- ANTICONA, M.; BLESÁ, J.; FRIGOLA, A.; ESTEVE, M.J. High biological value compounds extraction from citrus waste with non-conventional methods. **Foods**, v. 9, p. 811. 2020.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA - AGRIANUAL. **Agrianual 2015**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2016. 362 p.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Corantes naturais aditivos em alimentos e bebidas**. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Anexo III. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 25 abr 2021.

ARUN, C.; SIVASHANMUGAM, P. Study on optimization of process parameters for enhancing the multi-hydrolytic enzyme activity in garbage enzyme produced from preconsumer organic waste. **Bioresource Technology**, v. 9, p. 205-210, 2017.

BALAKRISHNAN, V.K.; SHIRIN, S.; AMAN, A.M.; DE SOLLA, S.R.; MATHIEU-DENONCOURT, J.; LANGLOIS, V.S. Genotoxic and carcinogenic products arising from reductive transformations of the azo dye, Disperse Yellow 7. **Chemosphere**, v. 146, p. 206-215, 2016.

BALU, A.M.; BUDARIN, V.; SHUTTLEWORTH, P.S.; PFALTZGRAFF, L.A.; WALDRON, K.; LUQUE, R.; CLARK, J.H. Valorization of orange peel residues: waste to biochemicals and nanoporous materials. **Chemistry Sustainability Energy and Materials**, v. 5, p. 1694–1697, 2012.

BARBIERI, G. S.; MASARIN, F.; OLIVEIRA, F.; DIAS, L. M.; SANTOS-EBINUMA, V. C. Characterization of agroindustrial by-products and their use in the production of xylanase using filamentous fungi. In: XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, **Anais**. Uberlândia, MG: Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

BATTISTA, F.; REMELLI, G.; ZANZONI, S.; BOLZONELLA, D. Valorization of residual orange peels: limonene recovery, volatile fatty acids, and biogas production. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 17, p. 6834-6843, 2020.

BELTRÁN-RAMÍREZ, F.; ORONA-TAMAYO, D.; CORNEJO-CORONA, I.; GONZÁLEZ-CERVANTES, J.L.N.; ESPARZA-CLAUDIO, J.J.; QUINTANA-RODRÍGUEZ, E. Agro-industrial waste revalorization: the growing biorefinery, biomass for bioenergy - recent trends and future challenges. In: ABOMOHR, Abd El Fatah (<https://orcid.org/0000-0003-2784-3297>). **Biomass for bioenergy: Recent Trends and Future Challenges**. London, UK: IntechOpen, 2019. Chapter 5. <https://www.intechopen.com/books/7608>.

BERNTSSON, T.; SANDÉN, B.; OLSSON, L.; ÅSBLAD, A. IN: SANDÉN, B.; PETTERSSON, K.; **Systems perspectives on biorefineries**. Gothenburg: Chalmers University of Technology., 2013.

BLANC, P.J.; LORET, M.O.; SANTERRE, A.L.; PAREILLEUX, A.; PROME, D.; PROME, J.C.; LAUSSAC, J.P.; GOMA, G. Pigments of *Monascus*. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 862-865, 1994.

BOONYAPRANAI, K.; TUNGPRADIT, R.; LHIEOCHAIPHANT, S.; PHUTRAKUL, S. Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 35, p. 457-466, 2008.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas, SP, Brasil: Instituto Agrônômico, Fundag, 2005. p. 20–36.

BOUKROUFA, M.; BOUTEKEDJIRET, C.; PETIGNY, L.; RAKOTOMANOMANA, N.; CHEMAT, F. Bio-refinery of orange peels waste: a new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 24, p. 72–79, 2015.

BRAGA, A.; LOPES, M.; FERREIRA, P.; SALGADO, J.M.; BELO, I. Bioprocesses development based on low-cost feedstocks by fermentation technology for added-value compounds production. **Book of Abstracts of CEB Annual Meeting**. Braga, 2017.

BRASIL. Lei 12.305, de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em: 22 mar. de 2021.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Plano Nacional de Energia 2050. Brasília: MME/EPE, 2020.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014.

CEPEA. PIB do agronegócio - Relatório de 2020. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_CNA_relatorio_2020.pdf>. Acesso em: 22 mar. de 2021.

CHANDEL, A.K.; GARLAPATI, V.K.; SINGH, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; DA SILVA, S.S. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. **Bioresource Technology**. v. 264:370–381, 2018.

CHANDEL, A.K.; GARLAPATI, VK.; KUMAR, S. P.J.; HANS, M.; SINGH, A.K.; KUMAR, S. The role of renewable chemicals and biofuels in building a bioeconomy. **Biofuels Bioproduction Biorefinery**, v. 14, n. 4, p 830-844, 2020.

CHAU, C.F.; HUANG, Y.L. Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. **Liucheng Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2615-2618, 2003.

CHEN, C.L.; PAN, T.M. Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products on cholesterol in vivo and clinical trial: A review. **Integrative Clinical Medicine Journal**. v. 3. p. 1-3. 2019.

CHEN, W.; CHEN, R.; LIU, Q.; HE, Y.; HE, K.; DING, X.; CHEN, F. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. **Chemical Science**, v. 8, n. 7, p. 4917–4925, 2017.

CHINTAPENTA, L.K.; RATH, C.C.; MARINGINTI, B.; OZBAY, G. Culture conditions for growth and pigment production of a Mangrove *Penicillium* species. **Journal of Multidisciplinary Sciences**. v. 2, p. 1–5, 2014.

CHO, Y.J.; HWANG, H.J.; KIM, S.W.; SONG, C.H.; YUN, J.W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.95, n.1, p.13-23, 2002.

CIRIMINNA, R.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, A.; PAGLIARO, M. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. **Biofuels, Bioproducts Biorefining**, v. 9, p. 368–377, 2015.

CIRIMINNA, R.; SCURRIA, A.; DANZÌ, C.; TIMPANARO, G.; DI STEFANO, V.; AVELLONE, G.; PAGLIARO, M. Fragrant bioethanol: A valued bioproduct from orange juice and essential oil extraction. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 9, p. 42–45, 2018.

CLARK, J.H. Green chemistry for the second generation biorefinery-sustainable chemical manufacturing based on biomass. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 82, p. 603-609, 2007.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, p. 203-220, 2002.

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

DABAS D.; ELIAS, R. J.; LAMBERT, J. D.; ZIEGLER, G. R. A colored avocado seed extract as a potential natural colorant. **Journal of Food Sciences** v. 76, p.1335–1341, 2011.

DE EUGENIO, L. I.; MÉNDEZ-LÍTER, J. A.; DE LOS RÍOS, V.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. β -1,4-endoglucanases from *Talaromyces amestolkiae*: Production of gluco-oligosaccharides from different β -glucans. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36:1, p. 68-77, 2018.

DE EUGENIO, L.I.; MÉNDEZ-LÍTER, J.A.; NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; ALONSO, L.; GIL-MUÑOZ, J.; BARRIUSO, J.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Differential β -glucosidase expression as a function of carbon source availability in *Talaromyces amestolkiae*: a genomic and proteomic approach. **Biotechnology Biofuels** v. 10, p. 161. 2017.

DE JONG, E.; HIGSON, A.; WALSH, P.; WELLISH, M. **Bio-based chemicals**: value-added products from biorefineries. Netherlands: IEA Energy Technology Network, 2012. (Report IEA Bioenergy, Task v. 42 Biorefinery).

DE OLIVEIRA F.; LIMA, C.A.; LOPES, A.M.; MARQUES, D.D.A.V.; DRUZIAN, J.I.; JÚNIOR, A.P.; SANTOS-EBINUMA V.C. Microbial colorants production in stirred-tank bioreactor and their incorporation in an alternative food packaging biomaterial **Journal of Fungi Basel** (Basel), v. 6, 2020a.

DE OLIVEIRA, F.; FERREIRA, L.C.; NETO, Á.B.; SIMAS TEIXEIRA, M.F.; SANTOS EBINUMA, V.C. Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: Mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 161, p. 107694, 2020b.

DE OLIVEIRA, F.; PEDROLI, D.B.; TEIXEIRA, M.F.S.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 103, p. 6529–6541. 2019.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural colorants for food and nutraceutical uses. **Trends Food Science Technology**. v. 14. 2003.

DENCE C. W. The Determination of Lignin. In: LIN, S.Y.; DENCE, C.W. (eds) **Methods in Lignin Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Series in Wood Science. Springer, 1992.

DIAMANTOPOULOU, P.; STOFOROS, N.G.; XENOPOULOS, E.; SARRIS, D.; PSARIANOS, D.; PHILIPPOUSSIS, A.; PAPANIKOLAOU, S. Lipid production by *Cryptococcus curvatus* growing on commercial xylose and subsequent valorization of fermentation waste-waters for the production of edible and medicinal mushrooms. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 162, p. 107706, 2020.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5–22, 2000.

DUFOSSE, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S.A.S.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion Microbiology**, v. 26, p. 56-61, 2014.

DWIVEDI, P.; SINGH, M.; SEHRA, N.; PANDEY, N.; SANGWAN, R.S.; MISHRA, B.B. Processing of wet *Kinnow mandarin* (*Citrus reticulata*) fruit waste into novel Brønsted acidic ionic liquids and their application in hydrolysis of sucrose. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 621-624, 2018.

EFSA. European Food Safety Authority. List of food additives. Commission regulation (EU) No 1129/2011. EFSA Journal L 295: 8. 2011. Disponível em: < <https://www.efsa.europa.eu/en> > Acesso em: 25 abr 2021.

ERPEN, L.; MUNIZ, F. R.; SOUZA MORAES, T.; ROCHA T, E. C. Análise do cultivo da laranja no Estado de São Paulo de 2001 a 2015. **Revista IPecege**, v. 4, n. 1, p. 33-43, 2018.

FAO. Citrus Fruit Fresh and Processed Statistical. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2019.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Biofuels and food security: A report by The High-Level Panels of Experts on Food Security and Nutrition (HLPE report 5). 2013. Disponível em: < http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/hlpe/hlpe_documents/HLPE_Reports/HLPE-Report-5_Biofuels_and_food_security.pdf>. Acesso em: 22 mar. de 2021.

FAOSTAT, 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.

FARHAT, W.; VENDITTI, R. A.; HUBBE, M.; TAHA, M.; BECQUART, F.; AYOUB, A. A review of water-resistant hemicellulose-based materials: processing and applications. **ChemSusChem**. v. 10, p. 305–323. 2017.

FDA. Food and Drug Administration. Federal Registry. Listing of color additives exempt from certification. 2021. **Disponível em:** < <https://www.fda.gov/> > Acesso em 25 abr 2021.

FERNANDO, S.; ADHIKARI S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: current status challenges and future, **Direction Energy Fuel.**, p.1727-1737, 2006.

FORBES. 100 melhores empresas de agronegócio do Brasil. Disponível em: < <https://forbes.com.br/forbesagro/2021/03/as-100-maiores-empresas-do-agronegocio-brasileiro-em-2020//>>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FRISVAD, J. C. et al. Talaromyces atroroseus, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2013.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. **Inventário de árvores do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro:** retrato dos pomares em março de 2017. Araraquara, SP, Brasil: FUNDECITRUS, 2017.

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v.42, n.5/6, p.577-587, 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GLOBAL MARKETS FOR ENZYMES IN INDUSTRIAL APPLICATIONS. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/global-markets-for-enzymes-in-industrial-applications.html>. Acesso em: jun de 2021.

GMOSER, R.; FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, 2017.

GOLVEIA, L.; NOBRE, B.P.; MARCELO, F.M.; MREJEN, S.; CARDOSO, M.T.; PALAVRA, A. F.; MENDES, R.L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 717- 723, 2007.

GROHMANN, K., CAMERON, R.G., BUSLIG, B.S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**. v. 54, p. 129–141. 1995.

GUO Q.; LIU K.; DENG W.; ZHONG B.; YANG W.; CHUN J. Chemical composition and antimicrobial activity of Gannan navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck cv. *Newhall*) peel essential oils. **Food Science Nutrition**, v. 6, p. 1431–1437, 2018.

GÜRSES A.; AÇIKYILDIZ M.; GÜNEŞ K.; GÜRSES M.S. Classification of Dye and Pigments. In: GÜRSES, Ahmet et al. editor. **Dyes and Pigments**. Switzerland: Springer, Cham, 2016. (Springer Briefs in Molecular Science).

HAJJAJ, H. *et al.* Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N-glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2671–2678, 1997.

HILALI, S.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; RUIZ, K. HEJJAJ, A.; NOUH, F. A.; IDLIMAM, A.; BILY, A. MANDI, L.; CHEMAT F. Green extraction of essential oils, polyphenols, and pectins from orange peel employing solar energy: Toward a zero-waste biorefinery **ACS Sustainable Chemistry Engineering**., v. 7, p. 11815-11822, 2019.

HOANG NGUYEN TRAN, P.; KO, J.K.; GONG, G.; UM, Y.; LEE, SUN-MI. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. **Biotechnology Biofuels** v. 13, p 12. 2020.

HU, W.; CHEN, S.; WU, D.; ZHU, K.; YE, X. Manosonication assisted extraction and characterization of pectin from different citrus peel wastes, **Food Hydrocolloids**, v. 121, 106952, 2021.

Huang, Z.-R., Zhou, W.-B., Yang, X.-L., Tong, A.-J., Hong, J.-L., Guo, W.-L., Liu, B. The regulation mechanisms of soluble starch and glycerol for production of azaphilone pigments in *Monascus purpureus* FAFU618 as revealed by comparative proteomic and transcriptional analyses **Food Research International**, v. 106, p. 626–635, 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal – 2019. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

IEA Bioenergy Country's Report. Bioenergy policies and status of implementation. Review. Finland, 2018. (IEA Bioenergy: ExCo: 2018:04).

ISIBIKA, A.; VINNERÅS, B.; KIBAZOHI, O.; ZURBRÜGG, C.; LALANDER, C. Co-composting of banana peel and orange peel waste with fish waste to improve conversion by black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.), *Diptera: Stratiomyidae*) larvae, **Journal of Cleaner Production**, v. 318, p. 128570, 2021.

JACOBSON G., WASILESKI J. Production of food colorants by fermentation. In: GABELMAN, A. editor. **Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients**. New York: John Wiley and Sons, 1994. p. 205–237.

JEONG, D.; PARK, H.; JANG, B.-K.; JU, Y.; SHIN, M.H.; OH, E.J.; LEE, E.J.; KIM, S.R. Recent advances in the biological valorization of citrus peel waste into fuels and chemicals. **Bioresource Technology**. v. 323, p. 124603. 2021.

JOHN, J.; KAIMAL, S.; SMITH, M.L.; RAHMAN, P.K.S.M. CHELLAM, P.V. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review, **International Journal of Biological Macromolecules**, v 162, p. 1086-1099, 2020.

KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. Biorefineries-industrial processes and products, U. Weinheim: Ilmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, 2016. p. 1-38.

KANTIFEDAKI, A.; KACHRIMANIDOU, V.; MALLOUCHOS, A., PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A.A. Orange processing waste valorisation for the production of bio-based

pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. **Journal of Cleaner Production**, v. 185, p. 882–890, 2018.

KISS, A. A.; LANGE, J.P.; SCHUUR, B.; BRILMAN, D.W.F.; VAN DER HAM, A.G.J.; KERSTEN, S.R.A. Separation technology – making a difference in biorefineries **Biomass Bioenergy**, v. 95, p. 296-309, 2016.

KOBYLEWSKI S.; JACOBSON M, F. Toxicology of food dyes. **International Journal of Occupational and Environmental Health**. v. 18, n. 3, p. 220-246, 2012.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 93-99, 2011.

KUMAR, P.S.; YAASHIKAA, P.R. Sources and operations of waste biorefineries, Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts: Technology, Advances, Life Cycle Assessment and Economics. Massachusetts: Academic Press. 2020. p.111–133.

LAGASHETTI, A.C.; DUFOSSE, L.; SINGH, S.K.; SINGH, P.N. Fungal Pigments and Their Prospects in Different Industries. **Microorganisms**, v.7, p.604. 2019.

LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v.36, p.949-953, 1991.

LEXICO-OXFORD: Oxford University Press. 2021. Disponível em: <<https://www.lexico.com/definition/biorefinery>> Acesso em 2021 mar 15.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARINS, J.E.C.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELLO, N.K. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 1104.

LI, T.; TAKKELLAPATI, S. The current and emerging sources of technical lignins and their applications. **Biofuels Bioproducts Biorefining**, v.12, p. 756–787. 2018.

LIN, T.F. DEMAINE, A.L. Leucine interference in the production of water-soluble red *Monascus* pigments. **Archives of Microbiology**. v.162, p. 114-119, 1994.

LIN, T.F.; YAKUSHIJIN, K.; BÜCHI, G.H.; DEMAINE, A.L. Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 9, p. 173-179, 1992.

LIU, Y.; LYU, Y.; TIAN, J.; ZHAO, J.; YE, N.; ZHANG, Y.; CHEN, L. Review of waste biorefinery development towards a circular economy: from the perspective of a life cycle assessment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 139. 2021.

LOPRESTO C.; PETRILLO G, F.; CASAZZA A A.; ALIAKBARIAN B.; PEREGO P.; CALABRÒ V. A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional *Soxhlet* extraction, **Separation and Purification Technology**. v. 137, 2014.

LOTITO, A. M.; SANCTIS, M. D.; PASTORE, C.; IACONI, C. D. Biomethanization of citrus waste: Effect of waste characteristics and of storage on treatability and evaluation of limonene degradation. **Journal of Environmental Management**. v. 215, p. 366–376, 2018.

MAGOULAS, C. **How color affects food choices**. Las Vegas: University Of Nevada, 2009. v.1, p. 5.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; CHO, M.H. Citrus waste derived nutra/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal Functional. Foods**, v. 40, p. 307–316. 2018.

MAHATO, N.; SHARMA, K.; SINHA, M.; DHYANI, A.; PATHAK, B.; JANG, H.; PARK, S.; PASHIKANTI, S.; CHO, S. Biotransformation of Citrus Waste-I: Production of Biofuel and Valuable Compounds by Fermentation. **Processes**. v. 9, p. 220, 2021.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2373-2383, 2008.

MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6253–6261, 2009.

MAPARI, S.A.S.; THRANE, U.; MEYER, A.S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n.6, p.300-307, 2010.

MARKET AND MARKET. Pectin Market by Type, Raw Material, Function, Application, and Region - Global Forecast to 2025. Disponível em:

<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pectin-market-139129149.html>. Acesso em: set de 2021.

MARKET INSIGHTS. Global Natural Colorant (Natural Pigment) Market Insights, Forecast to 2025 (2020). 2020. Disponível em: <<https://www.360marketupdates.com/enquiry/request-sample/13720643> > Acesso em: 15 abr 2021.

MARTÍN, M. A.; SILES, J. A.; CHICA, A. F.; MARTÍN, A. Biomethanization of orange peel waste. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8993-8999, 2012.

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p. 1–15, 2016.

MÉNDEZ-LÍTER, J.A.; DE EUGENIO, L.I.; PRIETO, A. The β -glucosidase secreted by *Talaromyces amestolkiae* under carbon starvation: a versatile catalyst for biofuel production from plant and algal biomass. **Biotechnology for Biofuels**. v. 11, p. 123, 2018.

MERRIAM-WEBSTER.COM DICTIONARY. Merriam-Webster. 2021. Disponível em: <<https://www.merriam-webster.com/dictionary/biorefinery>> Acesso em: 2021 mar. 15.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHARRAM A.M.; MOSTAFA E.M.; ISMAIL MA. Chemical Profile of *Monascus ruber* Strains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 490-499, 2012.

MONCADA, B.J.; ARISTIZÁBAL, V.M.; CARDONA, C.A.A. Design strategies for sustainable biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**. v. 116, p. 122–134, 2016.

MONTEIRO, A.B.P. **Produção de pigmento vermelho pelo fungo *Monascus ruber* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na elaboração de pães**. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

MORALES-OYERVIDES, L.; RUIZ-SÁNCHEZ, J. P.; OLIVEIRA, J. C.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; GIUFFRIDA, D.; DUFOSSÉ, L.;

MONTAÑEZ, J. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: A review, **Biotechnology Advances**, v. 43, 2020.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; SOARES JÚNIOR, M. S. Extração de pectina de goiaba desidratada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 119-125, 2010.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 578-597, 2010.

NEGRO, V.; MANCINI, G.; RUGGERI, B.; FINO, D. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: Review on limonene case study and energy valorization. **Bioresource Technology**. v. 214, p. 806–815, 2016.

NREL Biomass Research. Disponível em: <<https://search4.nrel.gov/texis/search/?pr=metanrel&query=biorefinery>>. Acesso em: 2018 nov. 15.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M.; ELLIOTT, C.T. Food colors: Existing and emerging food safety concerns. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 524–548, 2015.

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

PADMAPRIYA, C.; MURUGESAN, R. Optimization of SSF parameters for natural red pigment production from *Penicillium purpurogenum* using cassava waste by central composite design. **Journal of Applied Nature Science**. v. 8, p. 1663–1669. 2016.

PAGGIOLA, G.; STEMPVOORT, S.V.; BUSTAMANTE, J.; BARBERO, J.M.V.; HUNT, A.J.; CLARK, J.H. Can bio-based chemicals meet demand? Global and regional case-study around citrus waste-derived limonene as a solvent for cleaning applications. **Biofuels Bioproduction. Biorefinery**, v. 10, p. 686–698, 2016.

PANDIT, S.G.; MEKALA RAMESH, K.P.; PUTTANANJIAH, M.H.; DHALE, M.A. *Cicer arietinum* (Bengal gram) husk as alternative for *Talaromyces purpureogenus* CFRM02 pigment production: Bioactivities and identification. **LWT - Food Science Technology**. v. 116, p. 108499. 2019.

PATIL, S.; SIVANANDHAN, G.; THAKARE, D. Effect of physical and chemical parameters on the production of red exopigment from *Penicillium purpurogenum* isolated from spoilt onion and study of its antimicrobial activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 4, p. 599–609, 2015.

PATSALOU, M.; CHRYSARGYRIS, A.; TZORTZAKIS, N.; KOUTINAS, M. A biorefinery for conversion of citrus peel waste into essential oils, pectin, fertilizer and succinic acid via different fermentation strategies. **Waste Management**. v. 113, p. 469–477, 2020.

PATSALOU, M.; SAMANIDES, C. G.; PROTOPAPA, E.; STAVRINO, S.; VYRIDES, I.; KOUTINAS, M. A citrus peel waste biorefinery for ethanol and methane production. **Molecules**, v. 24, p. 2451, 2019.

PAULA, L.E.R.; TRUGILHO, P.F.; NAPOLI, A.; BIANCHI, M.L. Characterization of residues from plant biomass for use in energy generation. **Cerne**, v. 17. p. 237–246, 2011.

PAZ-CEDEÑO, F. R. **Hidrólise enzimática da fração polissacarídica do resíduo oriundo do processamento de carragena de *Kappaphycus alvarezii***. Tese (Doutorado), UNESP, Araraquara. 2017.

PAZ-CEDENO, F. R.; HENARES, L. R.; SOLORZANO-CHAVEZ, E. G.; SCONTRI, M.; PICHELI, F. P.; ROLDÁN, I. U. M.; MONTI, R.; OLIVEIRA, S. C.; MASARIN, F. Evaluation of the effects of different chemical pretreatments in sugarcane bagasse on the response of enzymatic hydrolysis in batch systems subject to high mass loads, **Renewable Energy**, v. 165, n. 1, p 1–13, 2021.

PEREIRA, D. N.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Marine natural pigments: chemistry, distribution and analysis. **Dyes Pigments**. v. 111:124–134. 2014.

PICOLI, M.C.A.; CAMARA, G.; SANCHES, I.; SIMÕES, R.; CARVALHO, A.; MACIEL, A.; COUTINHO, A.; ESQUERDO, J.; ANTUNES, J.; BEGOTTI, R.A. Big earth observation time series analysis for monitoring Brazilian agriculture. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**. v. 145, p. 328–339, 2018.

PICOT-ALLAIN, M. C. N.; RAMASAWMY, B.; EMMAMBUX, M. N. Extraction, characterization, and application of pectin from tropical and sub-tropical fruits: A Review. **Food Reviews International**, p. 1–31, 2020.

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4246–4250. 2010.

PRAJAPATI, A.S.; PANCHAL, K.J.; PAWAR, V.A.; NORONHA, M.J.; PATEL, D.H.; SUBRAMANIAN R.B. Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. **Industrial Biotechnology**. v. 14, p. 38-44. 2018.

RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v. 144, p. 696-703. 2015.

RATHER, L. J.; JAMEEL, S.; GANIE, S. A.; BHAT, K. A. Lichen derived natural colorants: history, extraction, and applications. **Handbook of Renewable Materials for Coloration and Finishing**, p. 103–114. 2018.

RAVICHANDRAN, C.; BADGUJAR, P. C.; GUNDEV, P.; UPADHYAY, A. Review of toxicological assessment of D-limonene, a food and cosmetics additive. **Food and Chemical Toxicology**. v. 120, p. 668-680, 2018.

RIVAS-CANTU, R. C.; JONES, K. D.; MILLS P. L. A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges. **Waste Management and Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy**. v. 31, n. 4, p. 413-420, 2013.

ROSA, J.M.A.; PINHEIRO, I.R. Planejamento experimental dccc aplicando a hidrólise enzimática do bagaço de laranja empregando as enzimas celulasas e pectinases. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.3191-3208, 2021.

SAGAR, N.A.; PAREEK, S.; SHARMA, S.; YAHIA, E.M.; LOBO, M.G. Fruit and vegetable waste: Bioactive compounds, their extraction, and possible utilization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 17, p. 512–531, 2018.

SANTOS-EBINUMA, V.C.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; PESSOA-JR, A. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 778-785, 2013.

SARON, C.; FELISBERTI, M.I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124–128, 2006.

SATARI, B.; KARIMI, K. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 129, p. 153–167, 2018.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 100–108, 2008.

SHAHID, M.K.; BATOOL, A.; KASHIF, A.; NAWAZ, M.H.; ASLAM, M.; IQBAL, N.; CHOI, Y. Biofuels and biorefineries: Development, application and future perspectives emphasizing the environmental and economic aspects, **Journal of Environmental Management**, v. 297, 2021.

SHARMA D.; SAINI A. Lignocellulosic waste valorization and biorefineries concept. In: SHARMA, D.; SAINI, A. **lignocellulosic ethanol production from a biorefinery perspective**. Singapore: Springer, 2020.

SHARMA, V.; MCKONE, H. T.; MARKOW, P. G. A global perspective on the history, use, and identification of synthetic food dyes. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 1, p. 24-28, 2011.

SHET, A. R.; DESAI, S. V.; ACHAPPA S. Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. **Research Journal of Life Sciences Bioinformatics Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 4, p. 337-348, 2018.

SHINDY H. A. Basics in Colors, Dyes and Pigments Chemistry: A Review. **Chemistry International**, v. 2, n. 1, p. 29-36. 2016.

SICAIRE, A.G.; FILLY, A.; VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A.-S., CHEMAT, F. Cosmo-rs-assisted solvent screening for green extraction of natural products. **Handbook of Green Chemistry**, p. 117–138. 2018.

SILES LOPEZ, J.A.; LI, Q.; THOMPSON, I.P. Biorefinery of waste orange peel. **Biotechnology**, v. 30, n.1, p. 63-69, 2010.

SILES, J.A.; VARGAS, F.; GUTIÉRREZ, M.C.; CHICA, A.F.; MARTÍN, M.A. Integral valorization of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting technologies. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 173–182. 2016.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235 p.

SILVA, J. S.; HECK, M. C.; BUZO, M. G.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of textile laundry effluents and their cytotoxic effects on *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25, p. 27890. 2018.

SOPANDI, T.; WARDAH, A.; SURTININGSIH, T.; SUWANDI, A.; SMITH, J.J. Utilization and optimization of a waste stream cellulose culture medium for pigment production by *Penicillium spp.* **Applied Microbiology**. v. 114, p. 733–745, 2012.

SUCOCITRICO CUTRALE LTDA. Cutrale. Disponível em: <<http://www.cutrale.com.br/institucional.xhtml>>. Acesso em: 31 mar. 2021.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* **Canadian Journal of Microbiology**. p. 689-691, 1987.

TEIGISEROVA, D.A., HAMELIN, L., THOMSEN, M. Review of high-value food waste and food residues biorefineries with focus on unavoidable wastes from processing. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 149, p. 413-426, 2019.

TOLBORG, G.; ØDUM, A. S. R.; ISBRANDT, T.; LARSEN, T. O.; WORKMAN, M. Unique processes yielding pure azaphilones in *Talaromyces atrovirens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 603–613. 2020.

TORRES, F. A. E. **Extração e identificação química de corantes naturais produzidos por *Talaromyces amestolkiae***. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2018.

TORRES, F. A. E.; ZACCARIM, B. R.; DE LENCASTRE NOVAES, L. C.; JOZALA, A. F.; DOS SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA, V. C. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 100, p. 2511–2521, 2016.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH *Corantes Market – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2017-2025*. Acessado em 29 de Fevereiro de 2020. Disponível em: < <https://www.transparencymarketresearch.com/colorants-market.html>>

TRIPODO, M.M.; LANUZZA, F.; MICALI, G.; COPPOLINO, R.; NUCITA, F. Citrus waste recovery: A new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 111–115. 2004.

TYAGI, D.; SHARMA, D. Production and industrial applications of xylanase: A review. **International Journal of Scientific Research & Engineering Trends** v 7, p. 3, 2021.

UBANDO, A.T.; FELIX, C.B.; CHEN, W.H. Biorefineries in circular bioeconomy: a comprehensive review. **Bioresource Technology**. p. 299, 2020.

VELMURUGAN, P.; LEE, Y.H.; VENIL, C.K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.C.; OH, B.T. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, n.4, p.346-50, 2010.

VENIL, C. K. *et al.* Current perspective on bacterial pigments: Emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39523–39529, 2014.

VENTURA, S. P. M.; SILVA, F. A.; QUENTAL, M. V.; MONDAL, D.; FREIRE, M. G., COUTINHO, J. A. P. Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6984–7052, 2017.

WANG, Y.R.; LIU, S.F.; SHEN, Y.C.; CHEN, C.L.; HUANG, C.N.; PAN, T.M.; WANG, C.K. A randomized, double-blind clinical study to determine the effect on ANKASCIN 568 plus on blood glucose regulation. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 5, p. 409-416, 2017.

WARD, J.; RASUL, M.G.; BHUIYA, M.M.K. Energy recovery from biomass by fast pyrolysis, **Procedia Engineering**, v. 90, p. 669-674, 2014.

WEI, W. G.; YAO, Z. J. Synthesis studies toward chloroazaphilone and vinylogous γ -pyridones: Two common natural product core structures. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 4585–4590, 2005.

WENGER, J.; STERN, T. Reflection on the research on and implementation of biorefinery systems – a systematic literature review with a focus on feedstock. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**. v. 13: p, 1347-1364. 2019.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K.I. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.9, p.298-302, 1996.

YANG, G.; TAN, H.; LI, S.; ZHANG, M.; CHE, J.; LI, K.; CHEN, WEI.; YIN, H. Application of engineered yeast strain fermentation for oligogalacturonides production from pectin-rich waste biomass. **Bioresource Technology**, v. 300, 2020.

YANG, Y. *et al.* Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8331, 2015.

YILMAZ, N.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v.78, p. 175–341, 2014.

ZACCARIM, B.R.; DE OLIVEIRA, F.; PASSARINI, M.R.Z.; DUARTE, A.W.F.; SETTE, L.D.; JOZALA, A.F.; TEIXEIRA, M.F.S.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from amazon: A producer of natural colorants. **Biotechnology Progress**, v. 35, p. 1-12, 2019.

ZEMA, D. A.; CALABRÒ, P. S.; FOLINO, A.; TAMBURINO, V.; ZAPPIA, G.; ZIMBONE, S. M. Valorization of citrus processing waste: A review. **Waste Management**, v. 80, p. 252–273. 2018a.

ZEMA, D.A.; FÒLINO, A.; ZAPPIA, G.; CALABRÒ, P.S.; TAMBURINO, V.; ZIMBONE, S.M. Anaerobic digestion of orange peel in a semi-continuous pilot plant: An environmentally sound way of citrus waste management in agro-ecosystems. **Science of The Total Environment**. v. 630, p. 401–408. 2018b.

ZHANG, Y. **Master's Thesis** (Master of Fine Arts). College of Arts and Letters, University of Notre Dame. 2016.

ZHAO, LEI.; CHEN, CHUAN.; REN, HONG-YU.; WANG, ZI-HAN.; WU, KAI-KAI.; MENG, JIA.; LEI, ZHAO.; HO, SHIH-HSIN. Unraveling hydrogen production potential by glucose and xylose co-fermentation of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16 and its metabolisms through transcriptomic sequencing. **International Journal of Energy Research**. v. 44, n. 12, p. 9617-9628, 2020.

8. APÊNDICE

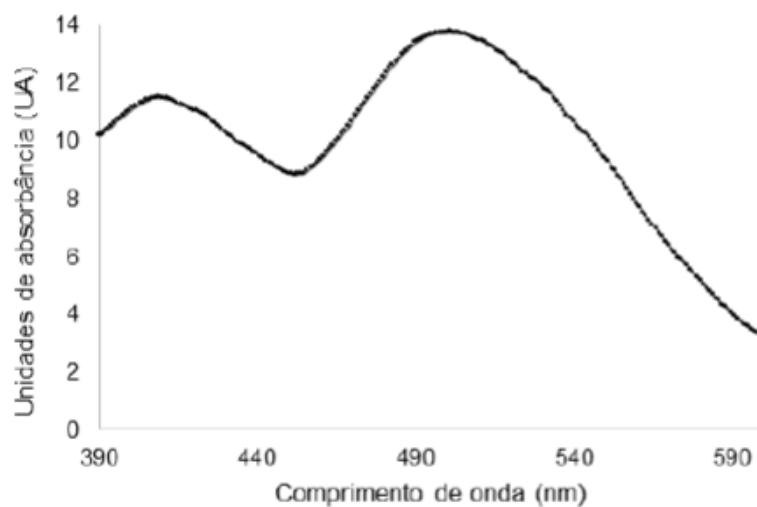


Figura S1 - Espectro de absorvância dos colorantes produzidos por *T. amestolkiae* em agitador rotativo utilizando o meio Padrão correspondente ao meio de cultivo suplementado com a seguinte composição (g.L⁻¹): GMS - Glutamato monossódico (25,0), G - glicose (10,0), CaCl (0,015), MgSO₄ (0,012), FeSO₄ (0,010) com 168h/150rpm/30°C.

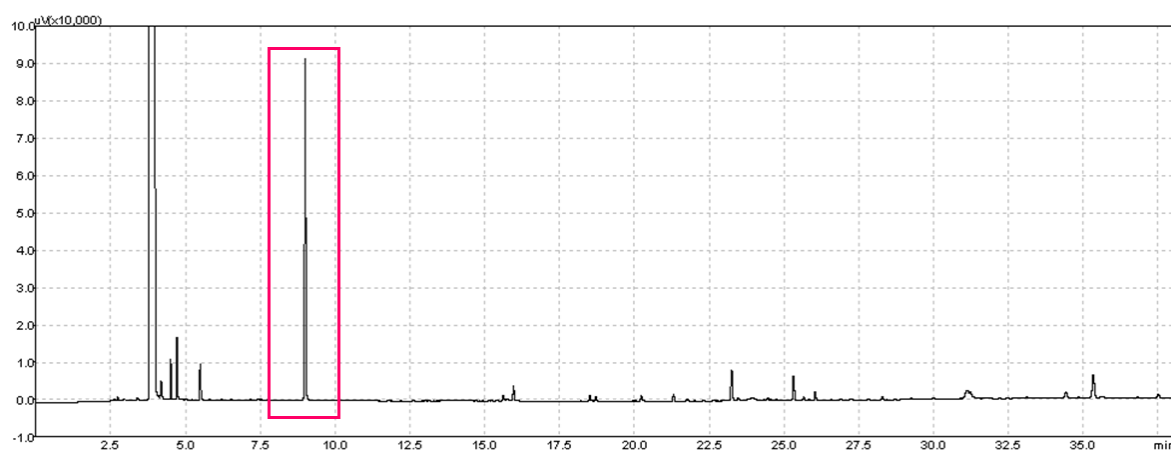


Figura S2 - Cromatograma obtido por meio de Cromatografia Gasosa (CG) do Limoneno padrão (Sigma-Aldrich) com o pico cromatográfico do padrão em destaque.

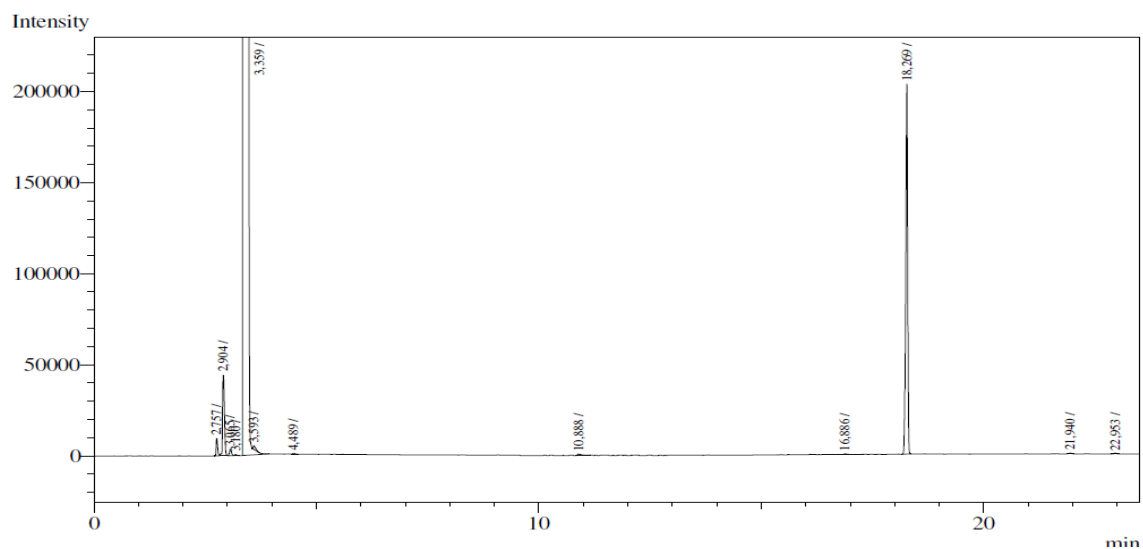


Figura S3 – Cromatograma obtido por meio de Cromatografia Gasosa (CG) da amostra após extração do limoneno do subproduto cítrico com Acetato de Etila.

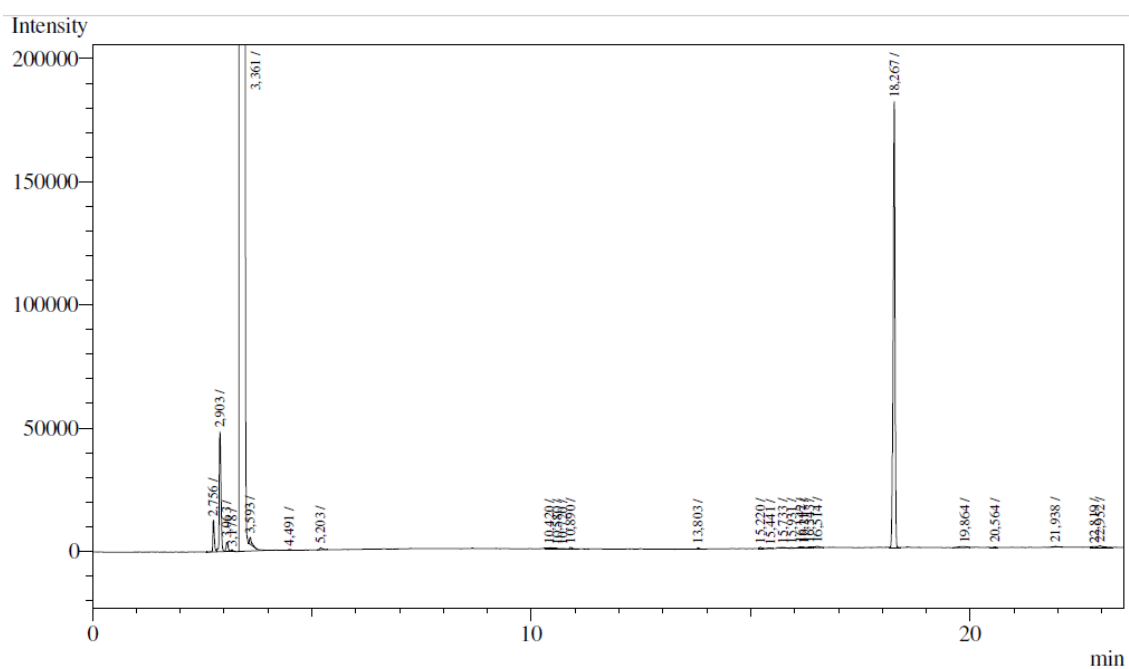


Figura S4 - Cromatograma obtido por meio de Cromatografia Gasosa (CG) da amostra após extração do limoneno do subproduto cítrico com Hexano.