

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE  
ENGENHARIA DE LORENA

WAGNER LUIZ DA COSTA FREITAS

**Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos**

Lorena – SP

2016



WAGNER LUIZ DA COSTA FREITAS

**ESTUDO DA CASCA DE CAFÉ COMO MATÉRIA PRIMA EM PROCESSOS  
FERMENTATIVOS**

Tese apresentado à Escola de Engenharia  
de Lorena da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências do Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia Industrial, na área de  
Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr Silvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP  
Janeiro, 2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Freitas, Wagner Luiz da Costa

Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos / Wagner Luiz da Costa Freitas; orientador Silvio Silvério da Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2016.  
118 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016  
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Casca de café. 2. Etanol. 3. Xilitol. 4. Hidrólise ácida. 5. Hidrólise enzimática. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério , orient.

Dedico a conclusão deste trabalho aos meus pais, Wellington e Fatima, e ao meu irmão Baba (Fagner) pelo carinho, amor, compreensão e apoio incondicional.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar força, saúde e sabedoria, para trilhar os melhores caminhos na vida.

Ao meu orientador Silvio Silvério da Silva, sem dúvidas uma pessoa singular neste mundo. Muito obrigado por seus inúmeros ensinamentos, me aconselhando e chamando atenção, quando necessário, sempre visando meu bem profissional e pessoal, acima de tudo. Sem dúvidas fui feliz em te conhecer e sempre serei grato por sua paciência, dedicação, amizade e fé em minha pessoa.

Aos meus pais, Wellington e Fátima (Coroinha e Mainha), e meu irmão Baba (Fagner). Jamais teria chegado até aqui sem o apoio, amor e carinho incondicional de vocês. Entre todos os presentes que Deus me deu, chamar vocês de minha família sem dúvidas foi o melhor.

À Bruna Caroline e Messias Borges pela amizade, companheirismo, conselhos e das boas risadas gratuitas de quando nos encontramos.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia L. B. Rodrigues, uma pessoa em que tive o imenso prazer de conhecer durante meus estudos e pesquisa. Muito obrigado por todos os seus conselhos, pela paciência sem fim que senhora e momentos agradáveis.

Ao meu grande amigo Adílson Nicanor, que, além de ser um profissional de ponta e exemplar, é uma pessoa com um coração sem tamanho. Sem sua ajuda eu jamais teria concluído meus estudos.

Aos meus amigos Felipe Antunes e Anuj Kumar que sempre estiveram ao lado dispostos ajudar.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório, pelo convívio, parceria e troca de experiências durante esses 4 anos de doutorado.

Aos meus amigos e alunos de iniciação científica João Zanaga, Guilherme Guedes, Beatriz Botaro, Laís Azzoline e Samira Leite. Pessoas que foram muito além de companheiros de laboratório. Agradeço pelo período em que trabalhamos juntos.

Ao professor Luiz Carlos Rodrigues por ter cedido a casca de café.

A todos os professores do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena pelos ensinamentos cedidos durante meu doutorado.





## RESUMO

FREITAS, W. L. C. **Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos**. 2015. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

O Brasil é um país com forte produção agrícola, produzindo anualmente uma grande quantidade de biomassa vegetal, proveniente de resíduos agroflorestais, como o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de café, entre outros. As biomassas de origem vegetal são constituídas basicamente por frações de celulose, hemicelulose e lignina que encontram-se intimamente associadas dando origem a uma estrutura recalcitrante do vegetal. O presente estudo teve como objetivo contribuir para o emprego de uma nova matéria-prima, a casca de café, para obtenção de produtos com valor agregado. Foi analisado a composição química da casca de café para determinar os valores de compostos extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. Foi analisado também diferentes condições de pré-tratamento ácido e pré-tratamento alcalino, seguido de sacarificação, da casca de café. Os hidrolisados obtidos foram submetidos à fermentação pelas leveduras *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 e *Candida guilliermondii* FTI 20037 para produção de etanol e xilitol, respectivamente e *Saccharomyces cerevisiae* 174 para produção de etanol pelos métodos SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*) e SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*). A caracterização química da casca de café apresentou concentrações de 38,05% de compostos extrativos, 24% de celulose, 19% de hemicelulose, 13,68% de lignina e cerca de 0,36% em cinzas. As melhores condições de pré-tratamento ácido forneceram um hidrolisado com 31,35 g/L de xilose, 12,42 g/L de glicose, 1,25 g/L de ácido acético e pH de 0,8. A fermentação do hidrolisado ácido produziu 6,1 g/L de etanol, com um Yp/s de 0,27 g/g. A fermentação do hidrolisado hemicelulósico de casca de café para produção de xilitol apresentou valores de 2,82 g/L do produto, com um Yp/s de 0,16 g/g. A produção de etanol pelo método SHF a partir do hidrolisado enzimático da casca de café foi de 4,89 g/L nas primeiras 12 horas de fermentação, com Yp/s de 0,20 g/g. A fermentação pelo método SSF produziu 4,66 g/L de etanol, com um Yp/s de 0,17 g/g de etanol no período de 18 horas de fermentação. Frente a isto é possível concluir que a casca de café é uma biomassa com potencial para uso em processos biotecnológicos na produção de compostos com valor agregado como etanol e xilitol.

Palavras-chave: Casca de café, etanol, xilitol, hidrólise ácida, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

FREITAS, W. L. C. **Study of the coffee husk as feedstock for fermentative processes.** 2015. 118 p. Tese. (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

Brazil is a country with strong agriculture, producing a large amount of plant biomass from agroindustrial waste, such as sugarcane bagasse, coffee husk, among others. Biomasses from plants are basically constituted of cellulose, hemicellulose and lignin, which are deeply associated, resulting in a recalcitrant structure in the plant. The present study aimed at contributing for the application of a new feedstock, coffee husk, for obtaining value-added products. The chemical composition of the coffee husk was analyzed in order to determine values of extractive compounds, cellulose, hemicellulose, lignin and ashes. It was also analyzed different conditions of acid pretreatment and alkaline pretreatment, followed by saccharification, of coffee husks in order to improve the release of sugars. The hydrolysates were fermented by the yeasts *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 and *Candida guilliermondii* FTI 20037 for the production of ethanol and xylitol, respectively, and by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 174 for the production of ethanol through SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*) and SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) methods. Chemical characterization of the coffee husk presented 38.05% of extractive compounds, 24% of cellulose, 19% of hemicellulose, 13.68% of lignin and around 0.36% of ashes. The best conditions for acid pretreatment yielded 31.35 g/L in xylose, 12.42 g/L glucose and 1.25 g/L acetic acid in 0.8 pH. Acid hydrolysate fermentation of coffee husk produced 6.1 g/L of ethanol, with an  $Y_{P/S}$  of 0.16 g/g. Ethanol production through SHF methods from enzymatic hydrolysate of coffee husk yielded 4.89 g/L in the first 12 hours of the process, with an  $Y_{P/S}$  of 0.20 g/g. SSF process yielded 4.66 g/L of ethanol with  $Y_{P/S}$  of 0.17 g/g after 18 hours of fermentation. It is possible to conclude, thus, that coffee husk is a biomass with potential for biotechnological applications in the production of value-added compounds, such as ethanol and xylitol.

Key-words: Coffee husk, ethanol, xylitol, acid hydrolysis, enzyme hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução na produção brasileira de café no período compreendido entre os anos 2001 e 2015. ....	22
Figura 2 - Processos de produção do café.....	24
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do tecido vegetal e seus principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina).....	26
Figura 4 - Principais etapas envolvidas na produção de etanol de 2º geração.....	27
Figura 5 - Distribuição das cadeias de celulose em materiais lignocelulósicos. ....	28
Figura 6 - Representação do arranjo estrutural das ligações nas fibras de celulose. ....	29
Figura 7 - Principais açúcares constituintes da porção hemicelulósica da parede celular. ....	30
Figura 8 - Representação da estruturação dos compostos presentes na lignina.....	31
Figura 9 - Unidades básicas que formam a estrutura da lignina. ....	31
Figura 10 - Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.....	33
Figura 11 - Modo de ação das celulasas em um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose .....	39
Figura 12 - Rota metabólica na fermentação da glicose à etanol. ....	41
Figura 13 - Metabolismo de xilose por leveduras.....	44
Figura 14 - Molécula de xilitol. ....	45
Figura 15 - Bloco digestor, marca PHD, utilizado para reações de hidrólise ácida da casca de café. ....	50
Figura 16 - Frascos Erlenmeyers contendo casca de café, durante o preparo dos experimentos para deslignificação da biomassa. ....	52
Figura 17 - Hidrolisado hemicelulósico da casca de café tratado com 100 mg/g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> após filtração a vácuo. ....	65
Figura 18 - Gráfico de pareto referente a influencia da temperatura, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e tempo na concentração de açúcares do hidrolisado hemicelulósico, com as variáveis dependente concentração de açúcar e variáveis independentes temperatura, concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2 <sup>3</sup> completo, com três pontos centrais. ....	66
Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta para a variáveis dependente concentração de açúcar, de acordo com resultados das variáveis independentes temperatura e concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , referentes aos resultados do planejamento estatístico 2 <sup>3</sup> completo com três pontos centrais .....	67
Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura da casca de café <i>in natura</i> (A e B) e submetido a processo de hidrólise com ácido diluído (C e D), em diferentes concentrações, sendo C – 100 mg/g de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; e D – 200 mg/g de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , por meio de fotomicrografia obtida em MEV.....	69
Figura 21 - Hidrolisado hemicelulósico da casca do café submetido ao método de destoxificação <i>Liming</i> . (A) Diferença de cor entre o hidrolisado destoxificado (esquerda) e não tratado (direita); (B) formação de corpo de fundo após centrifugação de 50 mL de	

hidrolisado em destoxificação, (C) corpo de fundo gelatinoso formado durante o método destoxificação <i>Liming</i> . .....	71
Figura 22 – Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café destoxificado com NaOH com a levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2. ....	72
Figura 23 – Produção de etanol e valores de Y p/s e Qp da fermentação dos hidrolisados hemicelulósico da casca de café.....	79
Figura 24 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes concentração de etanol (A) e variável dependente açúcar consumido (B) de acordo com resultados da variável independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ completo com três pontos centrais, para estudo de condições de ganho de açúcar, visando a produção de etanol em 24 hr de fermentação a partir de hidrolisado hemicelulósico da casca de café.....	80
Figura 25 – Gráfico de superfície de resposta para a variável dependente Concentração de etanol (A) e variável dependente açúcar consumido (B), de acordo com resultados das variáveis independentes pH e concentração carvão ativado, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ com três pontos centrais, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico da casca de café. ....	81
Figura 26 - Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2.....	84
Figura 27 – Produção de Xilitol e valores de Y p/s e Qp da fermentação dos hidrolisados hemicelulósico da casca de café pela levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037. ....	89
Figura 28 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes concentração de xilitol (A) e Variável dependente Açúcar Consumido (B) de acordo com resultados da variável independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ completo com três pontos centrais.....	90
Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta para a variável dependente Concentração de xilitol (A) e variável dependente açúcar consumido (B), de acordo com resultados das variáveis independentes pH e concentração carvão ativado, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ com três pontos centrais, visando a produção de xilitol por a partir de hidrolisado hemicelulósico da casca de café. ....	91
Figura 30 - Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037. ....	94
Figura 31 - Concentração de glicose (g/L) durante 48 horas de hidrólise enzimática da casca de café submetida a pré-tratamento alcalino com NaOH.....	97
Figura 32 - Gráfico de pareto com a variável dependente glicose (A) e variável dependente biomassa recuperada (B) de acordo com resultados das variáveis independentes concentração de NaOH e tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^2$ completo com três pontos centrais, visando a produção de etanol celulósico a partir de hidrolisado enzimático da casca de café. ....	99
Figura 33 - Gráfico de superfície de resposta para a variável dependente biomassa recuperada de acordo com resultados das variáveis independentes concentração de NaOH e tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^2$ completo com três pontos centrais, visando a produção de etanol celulósico por a partir de hidrolisado enzimático da casca de café. ....	100
Figura 34 - Fermentação do hidrolisado enzimático da casca de café pelos métodos SHF (A) e SSF (B), visando a produção de etanol celulósico. ....	103

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol. ....	34
Tabela 2 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis avaliados no processo de hidrólise por meio de planejamento fatorial $2^3$ , com três pontos centrais, para variáveis independentes concentração de $H_2SO_4$ (mg/g), Tempo (min) e Temperatura ( $^{\circ}C$ ) no processo de hidrólise ácida da casca de café seca. ....	51
Tabela 3 - Variáveis independentes e seus respectivos níveis avaliados no processo de hidrólise por meio de planejamento fatorial $2^2$ com três pontos centrais, para variáveis independentes tempo (min) e concentração de NaOH no processo de pré-tratamento alcalino da casca de café. ....	52
Tabela 4 –Condições de incubação e suplementação de meio de cultura utilizados no preparo do inóculo das leveduras <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 e <i>S. cerevisiae</i> 174. ....	55
Tabela 5 – Suplementação do meio de cultura designado para fermentação e produção de etanol e xilitol ....	56
Tabela 6 - Condições propostas para processo fermentativo.....	57
Tabela 7 - Condições propostas para realização do planejamento fatorial $2^{4-1}$ , com três pontos centrais, para variáveis independentes carvão ativado (%), pH, temperatura ( $^{\circ}C$ ) e tempo (min) para determinar as melhores condições de fermentação do meio por <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 e <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.....	57
Tabela 8 – Componentes estruturais e não estruturais da casca de café <i>in natura</i> . ....	60
Tabela 9 – Concentração de açúcares redutores e valores de pH do hidrolisado hemicelulósico obtido no Planejamento experimental $2^3$ , com três pontos centrais, variando concentração de $H_2SO_4$ , tempo e temperatura de reação de hidrólise ácida da casca de café, tendo como variável resposta a concentração de açúcar redutores.....	63
Tabela 10 - Análise de variância para as variáveis dependentes concentração de açúcar, de acordo com resultados das variáveis independentes concentração de $H_2SO_4$ , tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^3$ completo com três pontos centrais ....	67
Tabela 11 – Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico da casca de café obtido a partir do tratamento 200 mg/g $H_2SO_4$ , 160 $^{\circ}C$ e 10 minutos. ....	68
Tabela 12 – Produção de etanol e consumo de açúcar pela levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 a partir do hidrolisado de casca de café destoxificado com NaOH.....	72
Tabela 13 – Planejamento experimental $2^{4-1}$ , com três pontos centrais, variando concentração de carvão ativo, pH, temperatura e tempo de reação de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de casca de café, submetido a processo de fermentação para produção de etanol de 2 <sup>o</sup> geração, tendo como variável resposta a concentração de etanol sintetizado e açúcares fermentescíveis consumidos em um período de 24 horas de fermentação.....	76
Tabela 14 – Consumo (%) de açúcares fermentescíveis pela levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2 nas diferentes condições de tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café. ....	77

Tabela 15 - Síntese de etanol e valores de Yp/s da fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café pela levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2 em diferentes condições de tratamento .....	78
Tabela 16 - Análise de variância e significância para a variável dependente etanol, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativado, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ completo com três pontos centrais.....	82
Tabela 17 - Análise de variância e significância para a variável dependente Consumo de Açúcar, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ completo com três pontos centrais.....	82
Tabela 18 – Resultado da fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2. ....	83
Tabela 19 – Planejamento experimental $2^{4-1}$ , com três pontos centrais, variando concentração de carvão ativo, pH, Temperatura e Tempo de reação de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de casca de café, submetido a processo de fermentação pela levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 para produção de xilitol .....	86
Tabela 20 – Consumo (%) de açúcares fermentescíveis pela levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 nas diferentes condições de tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café.....	87
Tabela 21 – Síntese de xilitol e Yp/s da fermentação mediada pela levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 em diferentes condições de tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café.....	88
Tabela 22 - Análise de variância e significância para a variável dependente Concentração de xilitol, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ completo com três pontos centrais.....	92
Tabela 23 - Análise de variância e significância para a variável dependente consumo de açúcar, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^{4-1}$ completo com três pontos centrais.....	93
O teste confirmatório da fermentação com os respectivos níveis estão evidenciados anteriormente estão expostos na Tabela 24 e Figura 30. ....	93
Tabela 24 – Resultado da fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café pela a levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037.....	93
Tabela 25 - Planejamento Fatorial $2^2$ para determinar melhor condição de hidrólise alcalina da fração sólida, variando-se a concentração de NaOH (mg/g) e tempo (min) de tratamento para proporcionar uma maior concentração de glicose (g/L) no meio e biomassa recuperada (%). ....	96
Tabela 26 – Concentração de glicose durante 48 horas de hidrólise enzimática da casca de café submetida a pré-tratamento alcalino com NaOH. ....	97
Tabela 27 - Análise de variância e significância para as variável dependente Biomassa Recuperada de acordo com resultados das variáveis independentes Concentração de NaOH e Tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico $2^2$ completo com três pontos centrais, visando a produção de etanol celulósico por a partir de hidrolisado enzimático da casca de café. ....	101

Tabela 28 - Fermentação do hidrolisado enzimático da casca de café pelos métodos SHF e SSF, evidenciando o consumo da glicose, produção de etanol e Yp/s de ambos métodos de fermentação. ....	102
--	-----





## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1.	PRODUÇÃO BRASILEIRA DE CAFÉ.....	21
2.2.	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	25
2.2.1.	Celulose .....	27
2.2.2.	Hemicelulose .....	29
2.2.3.	Lignina .....	30
2.3.	PROCESSOS DE TRANSFORMAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS .....	32
2.3.1.	Pré-tratamento com ácido diluído para obtenção de etanol de 2º geração .....	34
2.3.2.	Pré-tratamento alcalino para obtenção de etanol de 2º geração .....	36
2.3.3.	Hidrólise Enzimática .....	37
2.4.	FERMENTAÇÃO .....	40
2.4.1.	Fermentação de açúcares hexose .....	40
2.4.2.	Fermentação de açúcares pentose .....	42
3.	OBJETIVOS .....	47
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	49
4.1.	COLETA E PREPARO DA CASCA DE CAFÉ.....	49
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ .....	49
4.3.	PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA CASCA DE CAFÉ .....	50
4.3.1.	Pré-tratamento ácido em reator tipo bloco digestor .....	50
4.4.	Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico: Método <i>Liming</i> .....	51
4.5.	PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DE CAFÉ.....	51
4.6.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO SÓLIDA DESLIGNIFICADA.....	53
4.6.1.	Hidrólise e Fermentação em Separado ( <i>SHF - Separate Hydrolysis and Fermentation</i> ) .....	53
4.6.2.	Sacarificação e Fermentação Simultânea ( <i>SSF - Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> ).....	54
4.7.	FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS E CELULÓSICOS...	54
4.7.1.	Micro-organismos .....	54
4.7.2.	Preparo do inóculo.....	54
4.7.3.	Processo fermentativo .....	55
4.8.	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	58
4.8.1.	Análise de açúcares fermentescíveis por meio da técnica de DNS .....	58
4.8.2.	Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético e etanol por CLAE .....	58
4.8.3.	Determinação da concentração celular .....	58
4.9.	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS .....	59
4.9.1.	Fator de conversão de açúcares em etanol ( $Y_{p/s}$ ) .....	59
4.9.2.	Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ ).....	59
4.10.	ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	59

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	60
5.2.	PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO .....	62
5.3.1.	Teste fermentativo do hidrolisado obtido pela avaliação do procedimento padronizado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de casca de café .....	71
5.4.	ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO TRATAMENTO PARA DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE CAFÉ .....	74
5.5.	PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	95
5.5.1.	Fermentação do hidrolisado enzimático da casca de café por SHF e SSF.....	101
6.	CONCLUSÕES.....	104
7.	REFERÊNCIAS .....	105

## 1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é uma das principais fontes de energia renovável da terra, sendo utilizada na obtenção de produtos de importância comercial. Com a eminente escassez dos combustíveis fósseis, as fontes de energia alternativa oriundas do reaproveitamento de resíduos agroindustriais vêm sendo cada vez mais estudadas para possíveis aplicações na indústria, visando à produção de biocombustíveis.

O Brasil é um país fortemente agrícola e produz, anualmente, uma grande quantidade de biomassa vegetal, proveniente de resíduos agrofloretais, gramíneas e madeira, como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz e de trigo. Estas biomassas podem ser utilizadas em processos biotecnológicos para obtenção de bioprodutos de valor agregado. O Brasil é líder mundial na produção de café e, segundo a Embrapa (2013), 33% do café consumido no mundo é produzido no país. Em 2015, a produção de café no mundo, segundo a International Coffee Organization - ICO, foi estimada em cerca de 141,9 milhões de sacas de 60 kg e desse total o Brasil produziu mais de 41,1 milhões de sacas, exportando, entre o período de julho de 2014 a julho de 2015, 36,49 milhões de sacas. Porém, durante o processamento do café uma quantidade significativa de resíduos, como a casca de café, são gerados como co-produtos, causando problemas ambientais e de armazenamento. Devido a composição desta matéria prima não existe um emprego adequado e viável que comporte o volume gerado desta biomassa vegetal, sendo esta depositada no solo ou queimada.

Biomassas de origem vegetal, como a casca do café, são basicamente constituídas por três frações que se encontram intimamente associadas dando origem à estrutura recalcitrante do vegetal. Sendo elas a celulose correspondendo entre 35-50% da estrutura da biomassa, a hemicelulose com 20-35% e lignina com 10-25%. É importante ressaltar que uma parcela desta composição é representada por cinzas e extrativos, porém esta composição varia em função de diversos fatores, dentre eles a espécie e variedade das plantas e as condições de solo onde foram plantadas.

Para o emprego desta biomassa vegetal na síntese de produtos de interesse industrial, faz-se necessário o uso de quatro processos distintos, sendo eles: procedimentos de pré-tratamento para fragilizar ou romper a matriz lignocelulósica, no âmbito de liberar uma das três principais frações que a compõem; a hidrólise enzimática, visando a despolimerização da celulose em glicose, por meio da ação de enzimas celulolíticas; fermentação, o qual se constitui na assimilação e conversão dos açúcares em um produto de interesse, por meio de micro-organismos fermentadores; e a recuperação do produto, podendo ser por destilação, quando etanol, ou precipitação, quando xilitol.

No contexto biotecnológico a casca de café ainda é uma matéria prima pouco explorada e de caráter promissor, considerando sua composição estrutural e o volume gerado, sendo este depositado de forma indevida no meio ambiente. Este fator reforça a necessidade de mais estudos e condições propícias de uso em vias biotecnológicas para uma melhor empregabilidade desta biomassa, a qual se encontra ainda pouco explorada. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar condições adequadas de pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática, considerando as diferentes particularidades desta biomassa, para liberação de açúcares fermentescíveis, os quais serão destinados a produção de etanol e xilitol por via fermentativa.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. PRODUÇÃO BRASILEIRA DE CAFÉ

O café (*Coffea* sp.) é um dos principais produtos agrícolas no mundo, sendo uma das atividades agroindustriais mais lucrativas. As duas principais variedades cultivadas para aplicações comerciais são *Coffea arabica* e *Coffea robusta* (PANDEY *et al.*, 2000a).

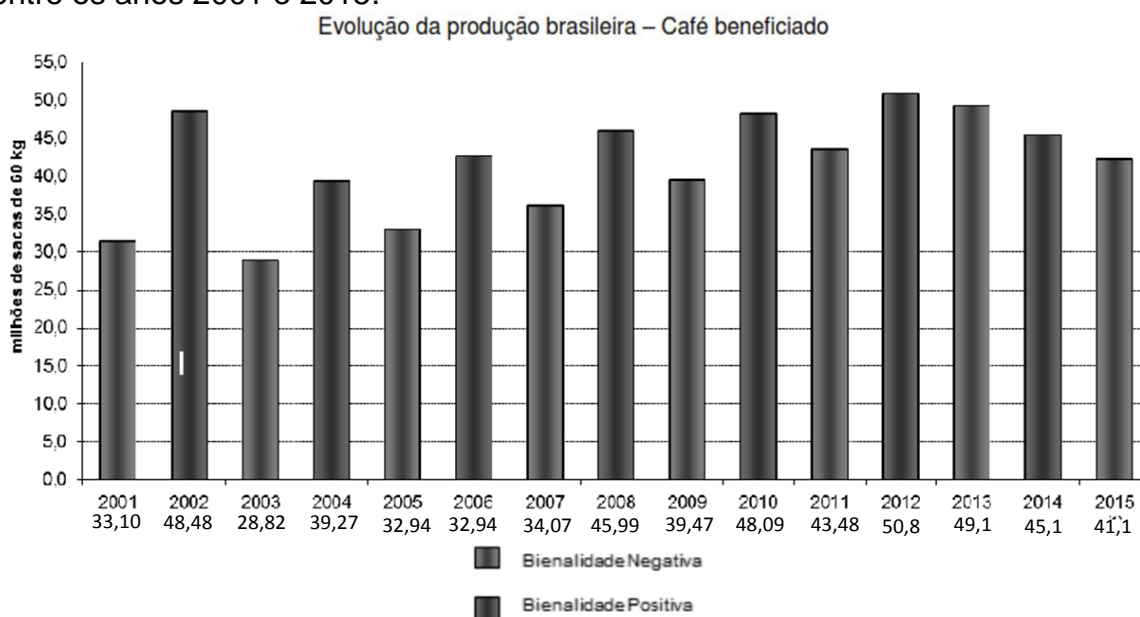
Segundo o Sindicato da Indústria de Café - Sindicafé (2013), o café possui importância singular na economia mundial, sendo um dos produtos primários de maior valor agregado comercializados no mundo, superado apenas pelo petróleo. Seu cultivo, processamento, comercialização, transporte e mercado proporcionam milhões de empregos em todo o mundo. O café é fundamental para a economia e política de muitos países em desenvolvimento, sendo uma importante atividade no processo de estruturação econômica em países produtores.

A produção de café para a safra de 2013, variedade arábica e conilon (Robusta), nos estados brasileiros, foi estimada em uma produção de 46,98 e 50,16 milhões de sacas de 60 kg do produto cultivado, respectivamente, com custo médio de R\$ 300,00/saca, sendo estes valores inferiores aos obtidos na safra de 2012/2013. Isto se deve ao ano de baixa bienalidade da safra, onde as avaliações apresentaram redução de 7,6% do café arábica e 1,3% do café conilon, comparados aos resultados de safras precedente (CONAB, 2013).

A bienalidade é uma constante na cultura do cafeeiro, podendo ser considerada com sendo o fenômeno da alternância de grandes e pequenas produções ao longo do tempo. Esse fenômeno é mais pronunciado no café arábica, mas também ocorre no café conilon, normalmente, com menor intensidade devido às práticas de poda e alternância de ramos plagiotrópicos produtivos (MENDONÇA, 2011). Segundo Rena e Maestri (1985), essa alternância bienal de produção é própria da natureza fisiológica do cafeeiro que necessita vegetar em um ano para produzir bem no ano seguinte.

Referente ao ano de 2014 (bienalidade positiva) não foi observado um aumento na produção de café, onde foi contabilizado cerca de 45,1 milhões de sacas de café. Esse valor foi ainda inferior ao apresentado em 2013 (bienalidade negativa) devido, possivelmente, a ações de fatores climáticos. Já no ano de 2015 (bienalidade negativa) foi obtido cerca de 41,1 milhões de sacas de café (Figura 1), sendo previsto, sob condições climáticas favoráveis, uma maior produção para a ano de 2016 (CONAB, 2015).

Figura 1 - Evolução na produção brasileira de café no período compreendido entre os anos 2001 e 2015.



Fonte: adaptado de CONAB (2015)

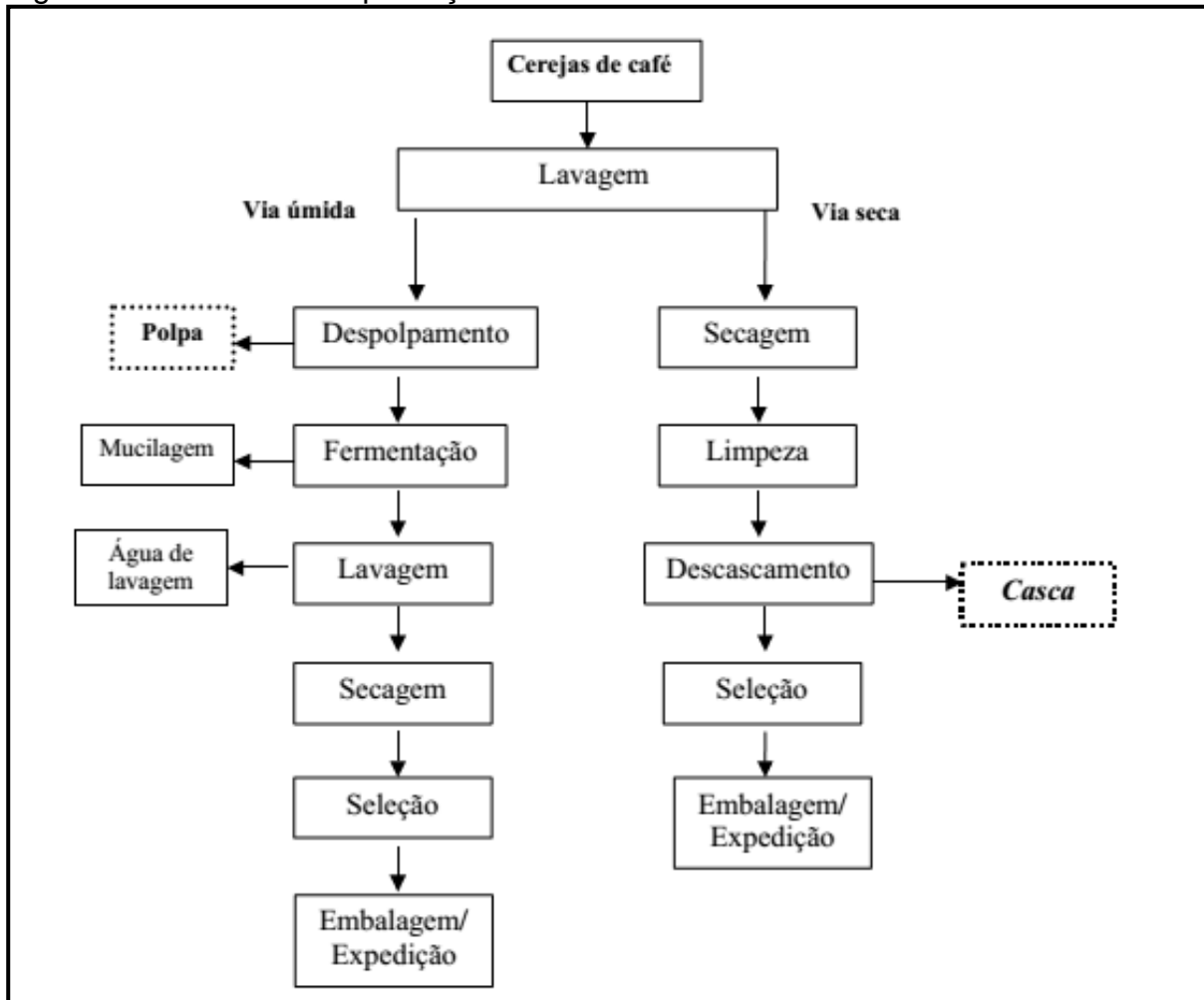
Essa variação do ciclo de produção bienal das lavouras foi reduzida por meio de alguns melhoramentos, como o adensamento das lavouras, irrigação, manejo de podas e o plantio de variedades mais produtivas (CONAB, 2013).

O Estado de Minas Gerais foi o maior produtor do café arábica em 2015, estimando cerca de 22,302 milhões de sacas na safra 2015, representando 61,69% da produção brasileira. Isto se deve ao fato do estado de Minas Gerais apresentar lavouras com boas condições, concentrando a maior área de plantio (1.181,3 mil hectares), seguido de São Paulo (215,1 mil hectares), sendo 97,7 % predominantes da espécie arábica. Isto impulsiona investimentos tecnológicos como mecanização, manejo, irrigação e tratamentos culturais, proporcionando crescimento na produção de café do Estado. O Conselho dos Exportadores de

Café do Brasil reportou que a exportação de café verde atingiu uma produção 1.156,141 toneladas, entre o período de janeiro a julho de 2015, representando um decréscimo de 1,13% quando comparado ao mesmo período do ano passado (CECAFE, 2015; CONAB, 2015).

Dedecca (1957) mostra que o fruto cereja é constituído de exocarpo ou epicarpo (casca), mesocarpo (polpa ou mucilagem) e o endocarpo, contendo o grão recoberto pelo pergaminho. Existem dois processos para a obtenção do grão comercializável, obtidos por via úmida e por via seca (Figura 2). O processo úmido é uma operação que demanda grande quantidade de água. Neste processo as cerejas de café são lavadas em água corrente para remoção de impurezas, e encaminhadas para etapa de fermentação de 24 a 36 horas. Posteriormente, são lavadas energicamente para eliminação de polpa remanescente. Os grãos são secados ao sol em áreas cimentadas ou artificialmente em secadoras. Após secos os grãos são selecionados eletronicamente ou manualmente e acondicionados em sacas de 60 Kg prontos para exportação (SOCCOL; 2002; CAFEICULTURA, 2011).

Figura 2 - Processos de produção do café.



Fonte: Soccol (2002)

O processamento do café obtido por via seca destina as cerejas, logo após a colheita, a um processo de desidratação ao sol em grandes áreas de secagem. Nesta via, as cerejas são espalhadas em finas camadas, revolvidas frequentemente e cobertas durante a noite e no período de chuvas. Ao final do processo o grão deve atingir 12% de umidade, caso contrário, o material é submetido a uma secagem artificial final por meio de secadores estáticos, rotatórios ou verticais (OLIVEIRA *et al.*, 2001; VILELA *et al.*, 2001).

Os resíduos mais importantes durante o processamento dos grãos de café são a polpa e casca, obtidos pelas via úmida e via seca, respectivamente. A polpa é o resíduo da despolpa úmida do café cereja, composta de epicarpo e parte do mesocarpo. As diferenças básicas entre esses materiais são de que a casca é obtida seca e contém o pergaminho, enquanto a polpa é úmida e não



possui o pergaminho, pois este fica envolto no grão de café como forma de proteção (MATIELLO, 1991; BARCELOS, 2001).

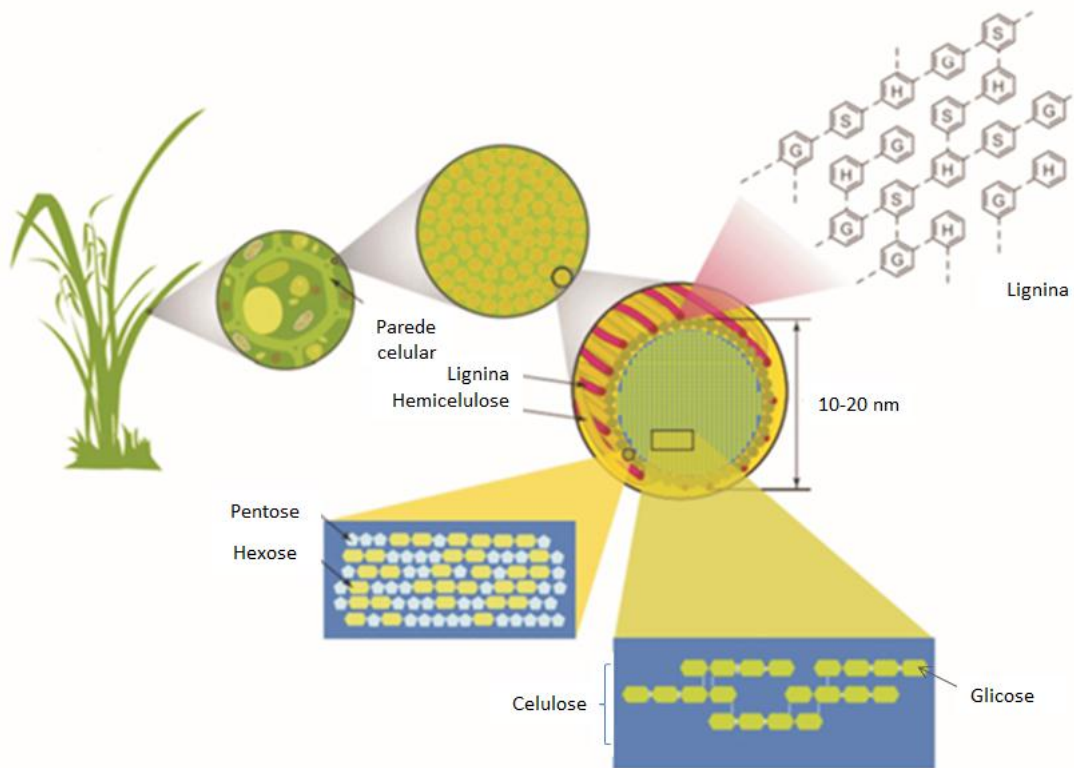
Como 80% do café produzido no Brasil é produzido por via seca, estima-se que seja gerado toneladas de casca de café por safra colhida e processada, sendo o volume deste resíduo semelhante ao da produção de grãos. Ou seja, é considerado que 50% do café colhido vire resíduo industrial, que neste caso é um sub-produto sem utilização viável e com concentrações elevadas de componentes como cafeína, polifenóis e taninos. Desta forma, o emprego deste resíduo agroindustrial para obtenção de compostos com valor agregado é considerado uma atividade de interesse econômico e ambiental (SOCCOL, 2002; VALE *et al.*, 2007).

## 2.2. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa vegetal ou lignocelulósica é formada por células organizadas em lamela média, parede celular e membrana plasmática (Figura 3). A parede celular das células dos vegetais são fontes ricas em polímeros de açúcares interligados (celulose e hemicelulose), as quais representam as frações mais expressivas da biomassa vegetal e o composto orgânico com maior concentração na terra (SELEGHIM, 2009; GIRIO *et al.*, 2010).

A biomassa lignocelulósica é formada por compostos de alto peso molecular. Sua estrutura é constituída por fibras compostas por celulose (homopolímero de hexose), hemicelulose (heteropolímero composto por pentose e hexose) e lignina (compostos fenólicos), nas proporções de 40% celulose, 30% de hemicelulose e 20% de lignina. Os demais compostos, como pectina, proteína, extrativos (materiais não-estruturais solúveis, tais como material nitrogenado, clorofila e graxa) e cinzas representam aproximadamente 10% da biomassa vegetal (IRANMAHBOOB *et al.*, 2002; GIRIO *et al.*, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura do tecido vegetal e seus principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina).



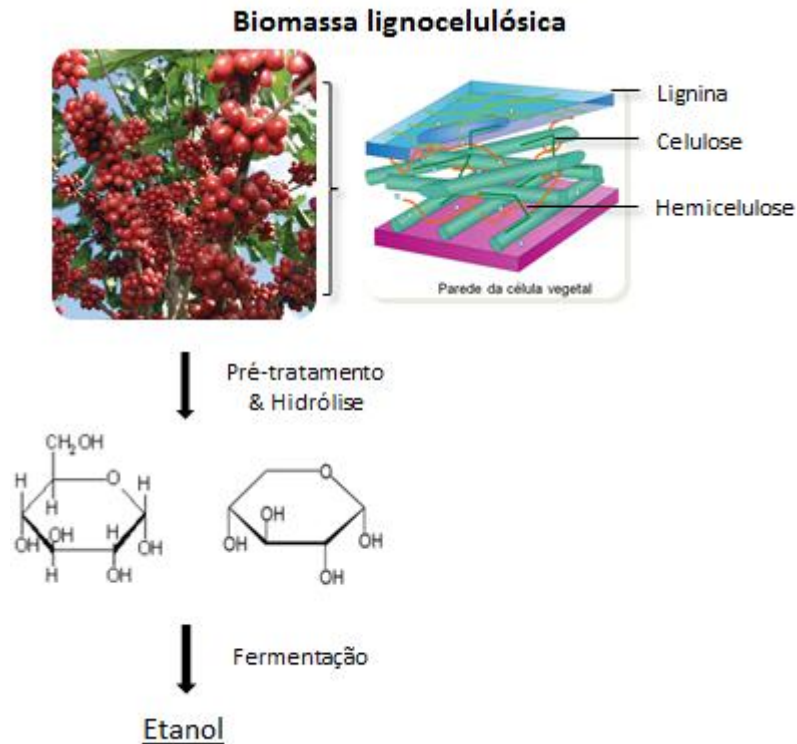
Fonte: Rubin (2008)

A parede de uma célula vegetal é tipicamente formada por uma rede de microfibrilas de celulose, as quais estão entrelaçadas por moléculas de hemicelulose. Os espaços vazios entre a membrana plasmática e lamela média são preenchidos por lignina, que funciona como elemento ligante dos componentes da parede celular, proporcionando rigidez e proteção a biomassa. Desta forma, estes três compostos representam cerca de 90% do peso seco do vegetal, sendo a celulose e hemicelulose, dependendo da espécie estudada, responsáveis por 66% de toda biomassa vegetal (SELEGHIM *et al.*, 2009).

O acúmulo de elevadas quantidades de biomassa vegetal, como resíduos agroindustriais, causa redução na formação de nitrato no solo e a queima destas biomassas vegetais residuais causam danos ao meio ambiente (LIN, TANAKA, 2006). Desta forma, para dar um destino ecológico e sustentável a essas biomassas, foram desenvolvidas técnicas que proporcionam a quebra dos polímeros de açúcar em açúcares fermentescíveis, os quais são destinados para

produção de etanol de 2<sup>o</sup> geração, como esquematizado na Figura 4.

Figura 4 - Principais etapas envolvidas na produção de etanol de 2<sup>o</sup> geração.



Fonte: Adaptado de Santos (2012)

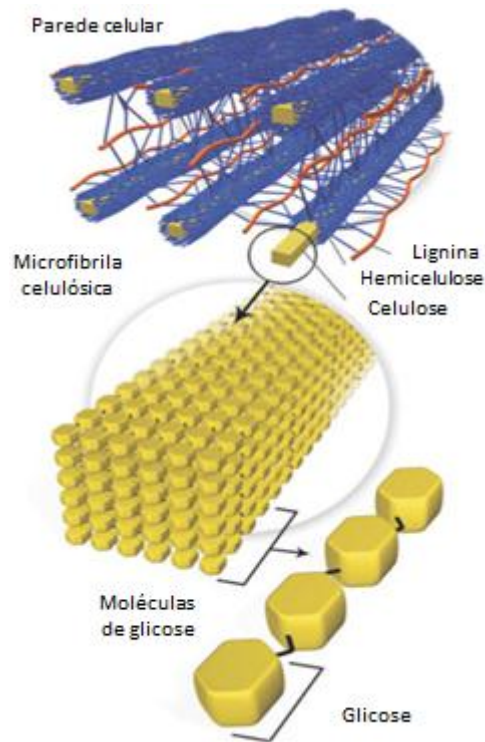
A composição dos constituintes da biomassa lignocelulósica pode variar conforme a espécie vegetal, idade, fase de crescimento entre outras condições. Pode-se observar um menor teor de lignina na parede celular de gramíneas quando comparadas àquelas da estrutura de madeiras de coníferas (*softwoods*). Nestas madeiras a lignina é o composto de maior abundância (SANTOS *et al*, 2012).

### 2.2.1. Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo base estrutural das células das plantas. Sua porcentagem varia nas plantas em função da origem, condição e espécie do vegetal, porém geralmente corresponde a aproximadamente 33% dos tecidos vegetais. A celulose caracteriza-se como um homopolímero não-ramificado e linear, cuja cadeia se constitui de unidades de anidroglicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (CANILHA *et al.*, 2010).

Na parede celular das plantas, as cadeias de celulose são arranjadas de forma compacta, na forma de microfibrilas (Figura 5), que apresentam regiões cristalinas. Tais regiões são consequência do grande número de ligações de hidrogênio (PANDEY *et al.*, 2000b; STICKLEN, 2008; GUTMAIS, 2008).

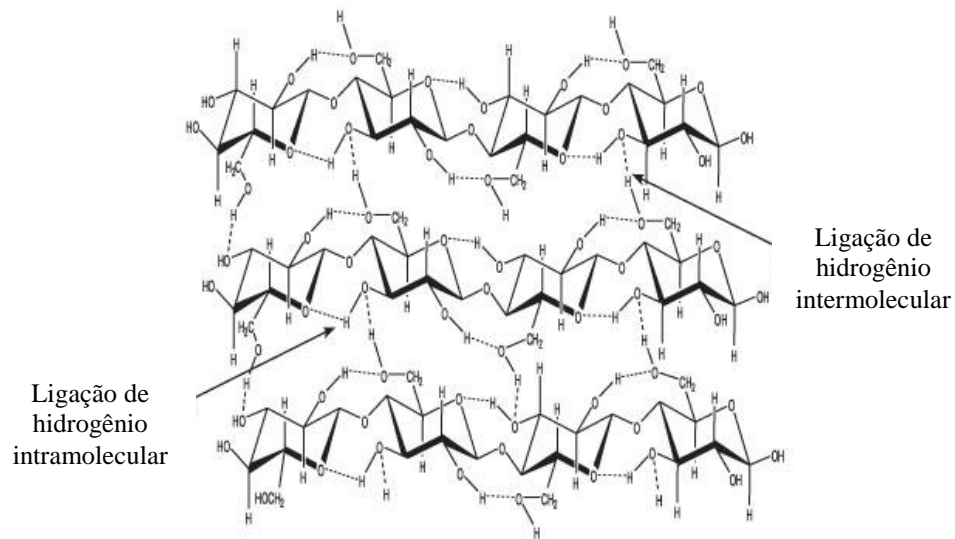
Figura 5- Distribuição das cadeias de celulose em materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Kondo (1997)

As fibras de celulose são consideradas estruturas recalcitrantes porque são resistentes à degradação. Esta recalcitrância deve-se às ligações de hidrogênio inter e intramolecular (Figura 6), as quais são responsáveis pela ligação das redes cristalinas, tornando a celulose um polímero altamente resistente a tratamentos químicos e biológicos (GAMBARATO, 2010).

Figura 6 - Representação do arranjo estrutural das ligações nas fibras de celulose.



Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (2012)

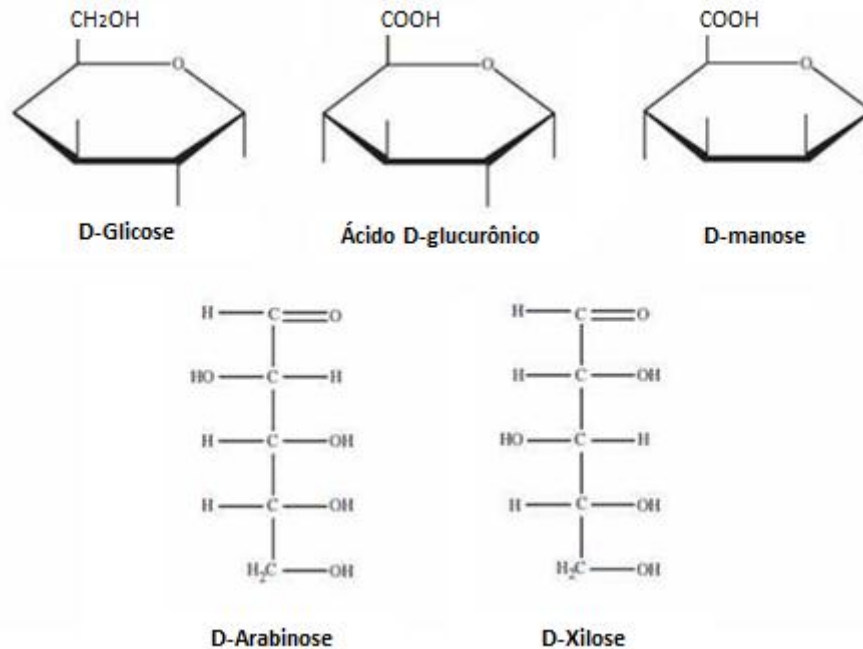
### 2.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose distingue-se da celulose por ser um polímero de carboidratos com composição variada de açúcares. Assim, diferente da celulose (homopolímero) a hemicelulose é considerada um heteropolímero que, em geral, corresponde a 15-35% da biomassa vegetal. Apresenta cadeias menores, lineares e ramificadas. A hemicelulose está organizada de maneira intercalada nas microfibrilas de celulose, em um estágio anterior à lignificação, conferindo elasticidade e flexibilidade ao agregado de microfibrilas de celulose, separando-as e impossibilitando que estas entrem em contato (AGUIAR, 2010; MARTINS, 2005).

Enquanto a celulose é composta exclusivamente por D-glicose, a hemicelulose é constituída por pentoses ( $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose e  $\alpha$ -D-galactose) e ácidos urônicos (ácido  $\alpha$ -D-glucurônico, ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e ácido  $\alpha$ -D-galacturônico) (Figura 7). Outros açúcares como  $\alpha$ -L-ramnose e  $\alpha$ -L-fucose podem estar presentes em pequenas quantidades. Além disso, algumas hidroxilas (-OH) que estão presentes nos açúcares podem ser substituídas por radicais acetil. A hemicelulose, quando comparada a celulose, apresenta um peso molecular menor e por apresentar uma estrutura ramificada é mais propensa à hidrólise

ácida (PALMQVIST *et al.*, 2000; DEMIRBAS, 2005; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007; MAMMAN *et al.*, 2008; GIRIO *et al.*, 2010).

Figura 7 - Principais açúcares constituintes da porção hemicelulósica da parede celular.

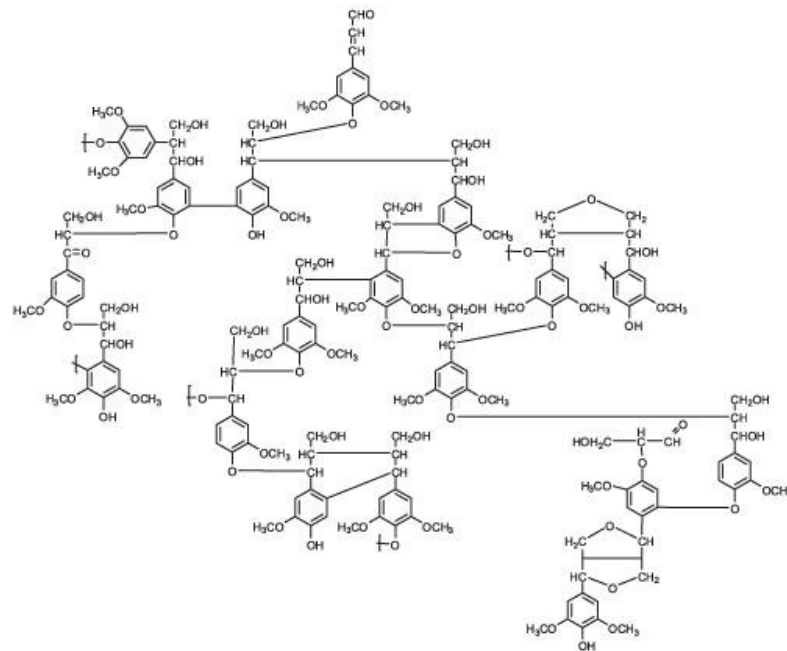


Fonte: Mamman *et al.* (2008)

### 2.2.3. Lignina

A lignina é uma macromolécula amorfa e altamente ramificada, podendo ser encontrada na lamela média e na parede secundária das células vegetais, porém em menor concentração (FASANELLA, 2008). Diferente dos outros compostos presentes na biomassa vegetal, a lignina apresenta em sua estrutura inúmeros grupos aromáticos e alifáticos, com diversos anéis fenilpropânicos, ligados por meio de ligações do tipo éter (hidroxilas primárias e secundárias, carbonilas, carboxilas, ésteres e ligações etilênicas) ou do tipo carbono-carbono, conforme a Figura 8 (RAMIRES, 2010; SANTOS, 2012).

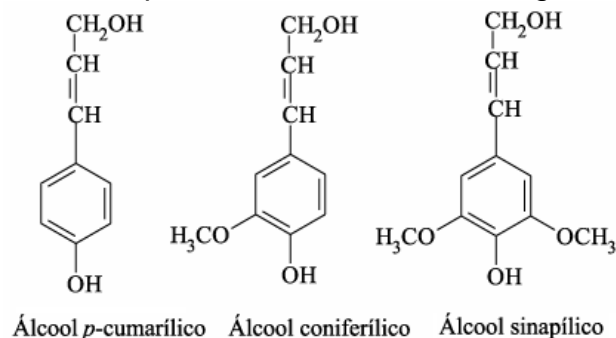
Figura 8 - Representação da estruturação dos compostos presentes na lignina.



Fonte: Santos *et al.* (2012)

A lignina é sintetizada a partir de três compostos principais, sendo eles álcool coniferílico, álcool *p*-cumárilico e álcool sinapílico (Figura 9). De acordo com o grau de metoxilação a subunidade básica do álcool coniferílico é o guaiacil, do álcool *p*-cumárilico é o *p*-hidroxifenil e do álcool sinapílico é o siringil. O resultado final dessa polimerização é uma estrutura heterogênea. Ressalta-se ainda que a proporção desses monômeros varia entre as espécies vegetais e esta relação tem sido utilizada para fins taxonômicos (FENGEL; WEGENER, 1989; PÉREZ *et al.*, 2002, RAMOS, 2003).

Figura 9 - Unidades básicas que formam a estrutura da lignina.



Fonte: Budziak *et al.* (2004)

Na madeira do eucalipto, a lignina é formada por unidades siringila e guaiacila (lignina S-G); em coníferas, é formada por unidades guaiacila e *p*-hidroxifenila (lignina G-H). Em gramíneas, como a cana-de-açúcar, a formação da lignina envolve a polimerização dos três tipos de unidades monoméricas (lignina H-G-S) (RIO *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2008).

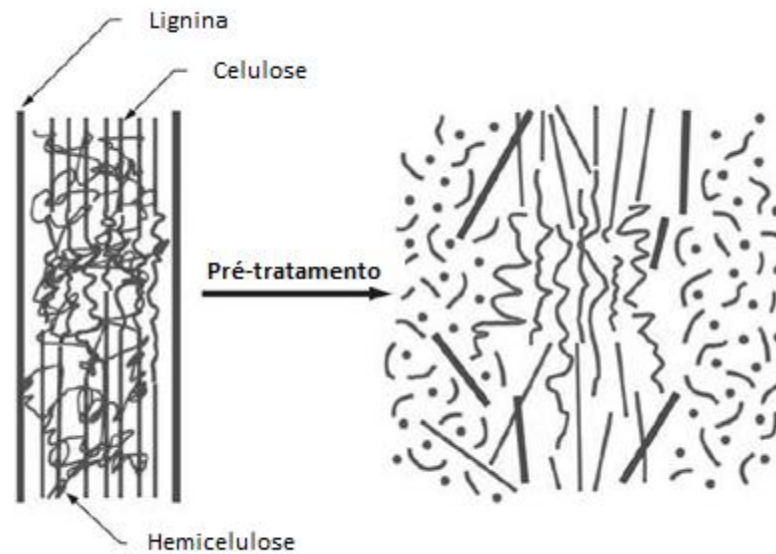
A lignina é depositada como o último componente na parede vegetal, recobrando as microfibrilas celulósicas fortalecendo a parede celular vegetal e conferindo às plantas resistência e proteção. A lignina também exerce um importante papel no transporte de água e nutrientes nas plantas e atribui resistência para os tecidos vegetais frente a degradação química e ou biológica (MARABEZI, 2009).

### 2.3. PROCESSOS DE TRANSFORMAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

A redução da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a liberação dos polissacarídeos estão entre as prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico e para a obtenção de produtos em processos desenvolvidos em biorrefinaria. Portanto, um processamento prévio e adequado destes materiais é necessário para romper a parede celular (Figura 10), seja solubilizando a hemicelulose em monômeros de pentose, solubilizando a fração lignina em soluções alcalinas sob altas temperaturas para que enzimas hidrolíticas possam acessar a macroestrutura da biomassa a fim de aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (MOSIER *et al.*, 2005; WYMAN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; HIMMEL *et al.*, 2007).



Figura 10 - Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.



Fonte: Mosier *et al.* (2005)

A etapa de pré-tratamento influencia no custo do processo uma vez que visa reduzir a toxicidade da fermentação de açúcares pentose, aumentar a taxa de hidrólise enzimática, reduzir a carga de enzima utilizada no processo, aumentar o poder de mistura dos reagentes, a concentração e a purificação dos produtos obtidos, a demanda no tratamento de resíduos, entre outras variáveis do processo. Sendo assim, a etapa de processamento da biomassa vegetal necessita ser de baixo custo, evitando o elevado consumo de reagentes químicos, a alta demanda energética e favorecendo a degradação dos materiais lignocelulósicos (WYMAN *et al.*, 2005).

Segundo Sun e Cheng (2002), para a etapa de pré-tratamento, vários processos foram propostos e desenvolvidos podendo-se destacar os processos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes (Tabela 1).

Dentre as técnicas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, destaca-se a utilização da hidrólise com ácido diluído, a hidrólise alcalina (NaOH, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), a hidrólise enzimática, o tratamento hidrotérmico e o AFEX como os métodos mais estudados e promissores no processo de obtenção de etanol a partir da biomassa vegetal (MOSIER *et al.*, 2005; SÁNCHEZ, 2008; CARDONA, 2010).

Tabela 1 - Principais métodos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol.

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos	Métodos combinados
Vapor	Hidrólise ácida	Fungos decomposição branca	Amônia e vapor (AFEX)
Moinho de facas	Hidrólise alcalina	Fungos decomposição parda	Explosão a vapor
Moinho de bola	Amônia		SO <sub>2</sub> e vapor

Fonte: Silva (2010)

### 2.3.1. Pré-tratamento com ácido diluído para obtenção de etanol de 2º geração

Dentre os tipos de pré-tratamento existentes, a hidrólise utilizando ácido diluído é a mais comumente utilizada e tem sido aplicada em diversos resíduos agroindustriais. É possível empregar uma ampla faixa de reagentes no processo, sendo o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o mais utilizado. É possível, também, o uso dos ácidos clorídrico, fosfórico, nítrico e hidroclórico no processo de pré-tratamento ácido (RAMOS, 2003; MACEDO, 2008).

O processo de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos utilizando a hidrólise com ácido diluído é conduzido sob condições de alta temperatura, pressão e concentração do reagente catalisador. Dependendo destes valores, o tempo de exposição da biomassa ao tratamento pode variar amplamente. Este processo objetiva promover a solubilização da fração hemicelulósica, liberando monômeros de açúcares fermentescíveis de cinco carbono em sua estrutura. Conseqüentemente este método facilita o futuro acesso à celulose quando esta biomassa for submetida à uma etapa de sacarificação (Hidrólise enzimática) (MUSSATTO *et al.*, 2007; HENDRIKS, 2009).

Dentre os diferentes métodos de fragilização da matriz lignocelulósica, os métodos de pré-tratamento com ácidos diluídos ou concentrados podem levar à formação e liberação de vários compostos tóxicos às células microbianas na etapa de fermentação em função das condições operacionais empregadas. Estes

compostos são divididos em três principais grupos baseados em sua origem, incluindo os ácidos alifáticos (ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico), derivados de furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e compostos fenólicos. Estes compostos podem estar presentes em diferentes concentrações no hidrolisado, sendo os fatores que podem determinar a presença destes compostos e suas concentrações podem estar ligados não apenas nas condições do processo, mas também na origem da matéria-prima. Desta forma, faz-se necessária uma remoção parcial ou completa destes compostos, por meio de um processo de destoxificação, para uma futura utilização deste hidrolisado, uma vez que, se não removidos, estes compostos serão tóxicos e afetarão negativamente o desempenho dos micro-organismos no processo de fermentação.

O método de pré-tratamento por meio de hidrólise ácida também pode ser conduzido com ácido concentrado, no intuito do aumento da solubilização da fração hemicelulósica. Porém, além de uma maior solubilização deste heteropolímero, o uso de ácidos concentrados na hidrólise necessita de intenso cuidado, pois estes reagentes são tóxicos, corrosivos, favorecem maior precipitação de lignina solubilizada, maior formação de hidroximetilfurfural e maior liberação de ácido acético (FENGEL; WEGENER, 1989; SHEVCHENKO, 1999; RAMOS, 2003).

A concentração de hemicelulose e lignina em um material lignocelulósico depende de fatores como a espécie da planta a partir da qual a biomassa é obtida, idade da colheita, entre outros. Assim, não há método de pré-tratamento específico para todos os tipos de materiais lignocelulósicos (CLAASSEN *et al.*, 1999). Durante o pré-tratamento com ácido diluído dos materiais lignocelulósicos, ocorre à hidrólise da fração hemicelulose, solubilizando-a diretamente em açúcares fermentescíveis (xilose, arabinose, entre outros), os quais são solúveis em água. Além desta solução rica em açúcares pentoses, também é formado um resíduo sólido e rico em celulose e lignina.

O pH do hidrolisado hemicelulósico obtido do processo de pré-tratamento ácido diluído necessita ser neutralizado para a sua utilização nos processos fermentativos, para que não haja inibição do crescimento dos micro-organismos por um pH desfavorável (SAHA, 2003).

A hidrólise com ácido sulfúrico diluído empregando-se  $H_2SO_4$  tem sido o processo de escolha para aplicações industriais, uma vez que apresenta alto rendimento de açúcares a partir da hemicelulose (75-90% de xilose) (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; MACEDO, 2008), e, também, por facilitar o processo subsequente que consiste na hidrólise enzimática da celulose, devido a uma maior exposição das fibras de celulose (YU; LOU; WU, 2008).

Em um estudo realizado por Saha e Bothast (1999), avaliou-se o pré-tratamento com ácido diluído e o procedimento de hidrólise enzimática na conversão de amido, celulose e hemicelulose de fibra de milho em açúcares fermentescíveis. A hemicelulose e o amido foram convertidos em açúcares simples pelo pré-tratamento com ácido diluído, e o resíduo celulósico proveniente desta etapa foi convertido em glicose utilizando enzimas comerciais. O procedimento envolveu o pré-tratamento das fibras de milho (15% de sólidos, m/v) com ácido diluído (0,5%  $H_2SO_4$ , v/v) a 121 °C por 1h, a fim de separar a fração hemicelulósica, seguido de sacarificação do material pré-tratado com extratos comerciais de enzimas celulase e  $\beta$ -glicosidase. O rendimento de açúcares monoméricos a partir da fibra de milho apresentou-se na faixa de 85-100% do rendimento teórico. Desta forma, observou-se que o pré-tratamento com ácido diluído, em condições de temperatura favorável para a minimizar a formação de compostos inibidores, seguido de sacarificação enzimática da porção celulósica foi um processo viável para a geração de açúcares fermentescíveis a partir da fibra de milho.

### **2.3.2. Pré-tratamento alcalino para obtenção de etanol de 2° geração**

Assim como a hemicelulose, a lignina também forma uma barreira física protetora ao ataque enzimático da fração celulósica, não sendo completamente removida na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico (PAN *et al.*, 2005; ÖHGREN *et al.*, 2007).

Oliveira (2008) propõe que o pré-tratamento alcalino deve ser realizado posteriormente à remoção da fração hemicelulósica, uma vez que, após realizado o processo de hidrólise ácida, ocorre um processo de desacetilação, por meio da quebra do heteropolímero, liberando moléculas de ácido acético no hidrolisado

hemicelulósico (fração líquida).

Existem vários métodos utilizados para a remoção de lignina das biomassas vegetais, e dentre estes estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação kraft e polpação organosolv. Estas técnicas são geralmente empregadas em materiais lignocelulósicos “in natura”, os quais apresentam uma estrutura morfológica bem rígida e recalcitrante, necessitando assim de condições de reação mais severas (concentração de álcali > 10% e temperatura acima de 150 °C) (SÁNCHEZ; CARDONA, 2010).

A remoção da lignina de um material anteriormente submetido a uma etapa de pré-tratamento é feito empregando-se o método de extração alcalina, o qual consiste em um processo com condições de reação mais amenas (concentração de álcali máxima de 4% e temperaturas na ordem de 70 °C) (SILVA, 2009). Sua ação baseia-se na clivagem da estrutura da lignina pela saponificação dos grupos ésteres, tornando a fração celulósica mais reativa (GÓMEZ, 1985; MACHADO, 2000).

Mussatto *et al.* (2007) avaliaram o efeito da hemicelulose e da lignina na hidrólise enzimática da fração celulósica de bagaço de malte e observaram que a razão da conversão celulósica (definida pelo rendimento de glicose + celobiose) a partir da celulignina (celulose + lignina) foi 3,5 vezes superior do que a hidrólise enzimática do lignocelulósico não pré-tratado, e foi de 4 vezes maior a partir da polpa celulósica, correspondendo a 85,6% de rendimento de glicose.

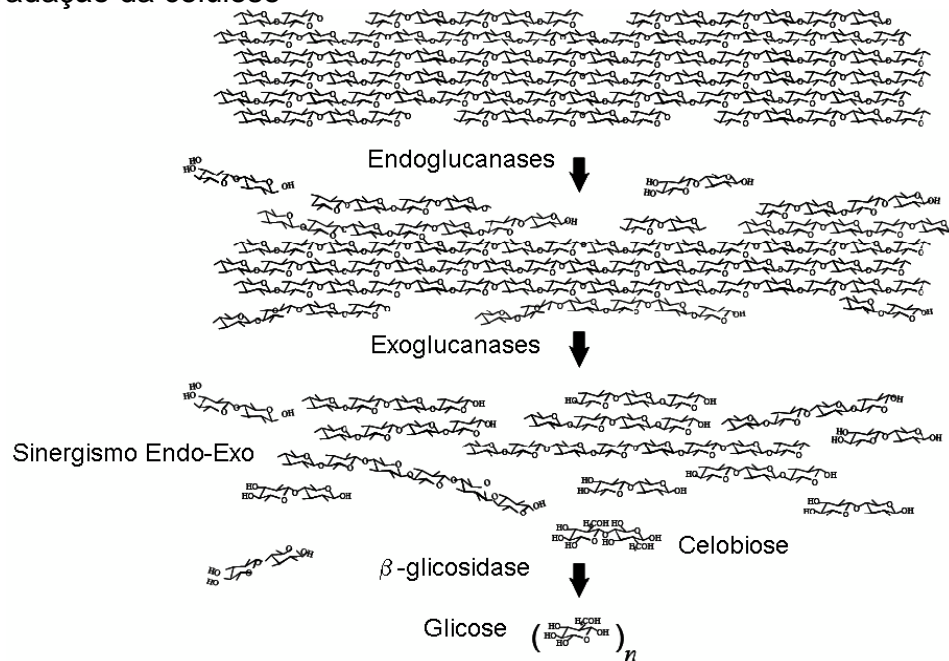
### **2.3.3. Hidrólise Enzimática**

Para realizar a hidrólise enzimática de um material lignocelulósico com alto rendimento em açúcares, tanto de hexoses quanto de pentoses, deve-se remover ou alterar a estrutura da lignina e da hemicelulose. Após a etapa de pré-tratamento e a remoção da lignina remanescente deste processo, é necessária uma etapa de hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis. No processo de hidrólise enzimática, a hidrólise da celulose é catalisada por enzimas específicas denominadas de enzimas celulolíticas ou celulasas.

As enzimas hidrolíticas atuam nas fibras de celulose, liberando os seus monômeros constituintes. Diante da heterogeneidade da estrutura da cadeia celulósica, a qual apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e por áreas menos ordenadas ou amorfas, a sacarificação enzimática da biomassa depende de uma multiplicidade de atividades específicas complementares cujo sinergismo é essencial para que todo carboidrato disponível seja hidrolisado. A conversão da celulose em monômeros de glicose é feita empregando-se enzimas celulolíticas celobiohidrolases (CBHs), também chamadas de exo-1,4- $\beta$ -glucanases, as endo-1,4- $\beta$ -glucanases (EGs) e as  $\beta$ -glicosidases (BGs). Estas enzimas atuam em diferentes sítios da cadeia celulósica (Figura 11) de forma sinérgica (ARO, 2005; PITARELO, 2007; GALBE, 2002), onde:

- I. Endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4), a qual ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, criando cadeias com extremidades livres;
- II. Exoglucanase ou celobiohidrolase (1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolase ou EC 3.2.1.91.) a qual se liga nas extremidades das cadeias e gera principalmente glicose e celobiose.
- III.  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21), responsável por clivar a celobiose produzindo duas moléculas de glicose.

Figura 11 - Modo de ação das celulasas em um sistema enzimático cooperativo na degradação da celulose



Fonte: Pitarelo (2007)

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é limitada por vários fatores tais como o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose e a área superficial acessível (CHANG, 2000; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; HENDRIKS, 2009). Entretanto, vários pesquisadores apontam que as duas principais causas de resistência dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática são: (1) a baixa acessibilidade às fibras celulósicas (micro) cristalinas, as quais restringem a atividade das celulasas, e (2) a presença de hemicelulose e principalmente de lignina na superfície da celulose, impedindo a ação das celulasas ao substrato (KIM, 2006; ZHANG *et al.*, 2006).

O fungo *Trichoderma reesei* é o micro-organismo mais utilizado industrialmente para a produção de celulasas. Entretanto, apresenta como desvantagem, a baixa produção de  $\beta$ -glicosidase, e isto restringe a conversão de celobiose em glicose proporcionando inibição da atividade das celulasas pelo acúmulo de celobiose (XIA, 2004; CORREDOR, 2006). Portanto, um suplemento de  $\beta$ -glicosidase, obtido a partir do fungo *Aspergillus* sp, por exemplo, é necessário para reduzir o efeito inibitório da celobiose nas celulasas e aumentar o rendimento de conversão da celulose em glicose (CHEN; ZHAO; XIA, 2008).

Vários pesquisadores têm realizado estudos de sacarificação enzimática de materiais lignocelulósicos utilizando xilanases (1,4- $\beta$ -D-xilanase, EC 3.2.1.8) como um suplemento às celulases, deixando a fração celulósica mais acessível à ação das celulases proporcionando um aumento na conversão da celulose em glicose. As xilanases são enzimas que tem como função degradar a cadeia principal de xilana, constituinte da estrutura hemicelulósica, e podem ser produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, dependendo do substrato e das condições de crescimento (PETERSEN, 2009; ÖHGREN *et al.*, 2007; TABKA *et al.*, 2006).

## 2.4. FERMENTAÇÃO

A fermentação é um conjunto de reações enzimáticas, que ocorrem no interior da célula microbiana, com o intuito de gerar energia para o crescimento e manutenção das atividades metabólicas.

### 2.4.1. Fermentação de açúcares hexose

A produção de bioetanol a partir de hidrolisados de biomassa é de grande interesse para o país, uma vez que no território brasileiro existe uma grande biodiversidade, o que gera variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais. O etanol é aquele obtido a partir dos açúcares extraídos diretamente das plantas, como milho ou cana-de-açúcar. O etanol de 2<sup>o</sup> geração é obtido a partir da fermentação da glicose presente na biomassa lignocelulósica (GOLDEMBERG, 2009).

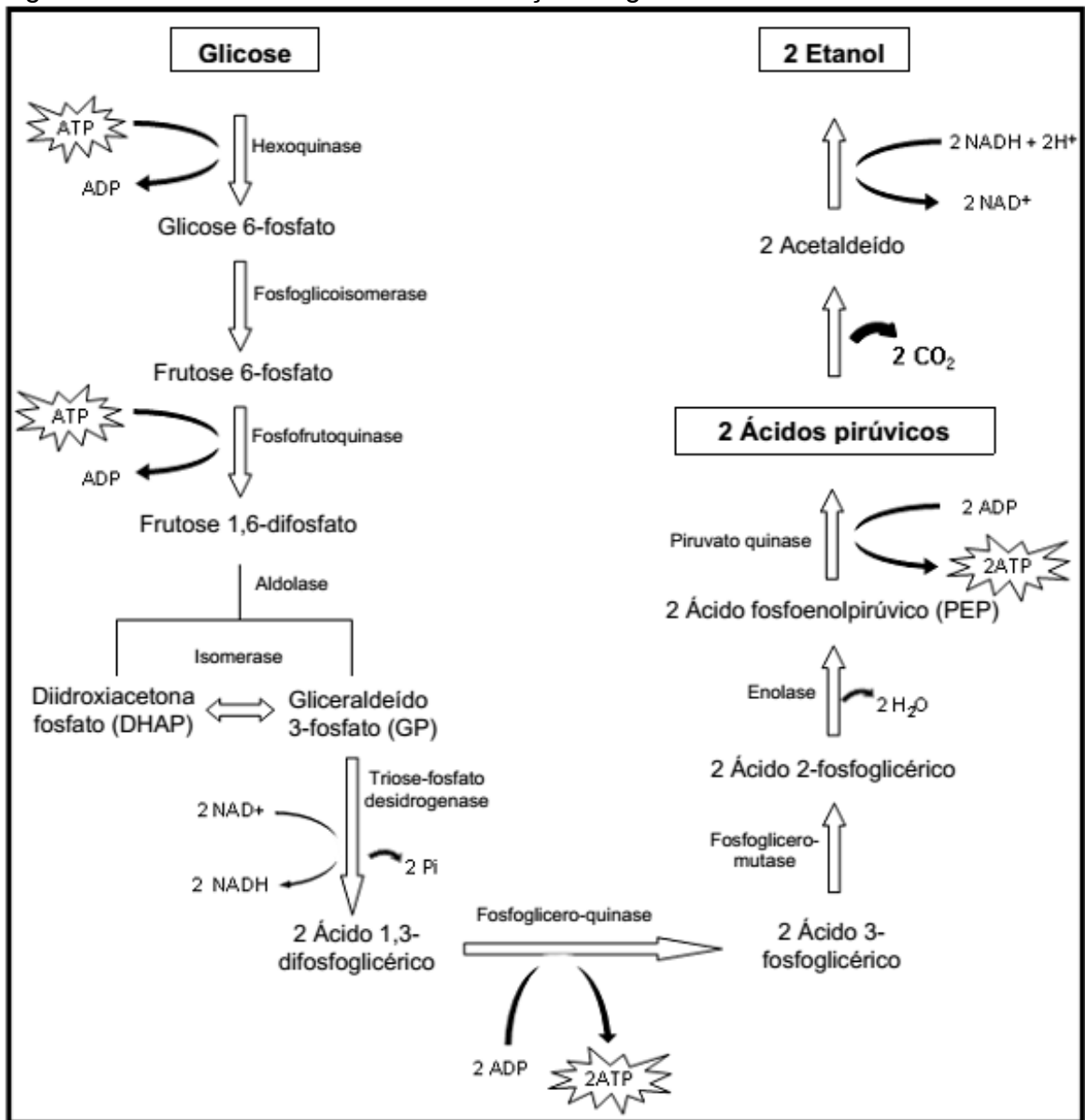
Vásquez *et al.* (2007), relatou que há interesse industrial no desenvolvimento de processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais, para a produção de bioetanol de 2<sup>o</sup> geração. Isto se deve ao fato do etanol apresentar algumas diferenças importantes em relação aos combustíveis convencionais derivados de petróleo. A principal delas é o elevado teor de oxigênio, que constitui 35% em massa do etanol. As características do etanol possibilitam a combustão mais limpa e o melhor desempenho dos motores,



contribuindo para a redução das emissões poluidoras. Além disso, comporta-se como um verdadeiro aditivo para a gasolina (GOLDEMBERG *et al.*, 2008).

Existem diferentes métodos para a obtenção de etanol, sendo elas mediadas por uma via sintética ou por uma via fermentativa (BORZANI *et al.*, 2001). A via de obtenção de etanol mais utilizada no Brasil é a fermentativa (Figura 12) por questões econômicas, domínio de tecnologia e disponibilidade de biomassa (VIEIRA *et al.*, 2009).

Figura 12 – Rota metabólica na fermentação da glicose à etanol.



Fonte: Tortora *et al.* (2005)

O desempenho do processo fermentativo depende diretamente das enzimas glicolíticas, uma vez que podem ser estimuladas ou inibidas por diversos fatores, como pH, nutrientes, entre outros. As leveduras são os micro-organismos mais utilizados na fermentação alcoólica, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mais comumente utilizada nestes processos. Porém, bactérias também são capazes de produzir etanol, mas não são empregadas industrialmente por questões econômicas. Para a fermentação alcoólica é adicionada uma levedura que metaboliza os carboidratos, transformando-os em etanol e liberando dióxido de carbono (HAHN-HAGERDAL, 2006).

#### **2.4.2. Fermentação de açúcares pentose**

Micro-organismos capazes de fermentar pentoses presentes na biomassa hemicelulósica podem ser divididos em dois grupos: micro-organismos naturalmente fermentadores e micro-organismos geneticamente modificados (AGBOGBO, 2008). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma das mais eficazes produtoras de etanol, é caracterizada por apresentar uma alta produção de etanol a partir de hexoses e alta tolerância a etanol e outros compostos inibitórios, como os que estão presentes em hidrolisados ácidos de biomassa lignocelulósica. Entretanto, devido ao fato da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não ser capaz de utilizar pentoses, a produção de etanol a partir de hidrolisados compostos majoritariamente por açúcar pentose utilizando-se linhagens naturais de *S. cerevisiae* não é possível (OLSSON, 1993; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2001).

O uso de linhagens microbianas capazes de fermentar somente glicose não cabe no contexto de etanol de 2<sup>o</sup> geração. O emprego sustentável e economicamente viável de biomassas lignocelulósicas envolve micro-organismos capazes de assimilar e converter de todos os açúcares presentes em um hidrolisado lignocelulósico, tais como xilose, arabinose, celobiose, galactose, manose e glicose, com alto rendimento e produtividade em etanol (VAN MARIS *et al.*, 2006; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; HAHN-HAGERDAL, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2007; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Muito embora seja comum uma levedura capaz de assimilar pentoses conseguir metabolizar a arabinose aerobicamente, a maioria delas não são capazes de fermentar este açúcar em etanol. Como exemplo tem-se a levedura

*Scheffersomyces stipitis*, capaz de produzir etanol a partir de glicose, galactose, manose, xilose e celobiose. Entretanto, a arabinose, mesmo após assimilada, não pode entrar nos cálculos de fermentação devido esta levedura não possuir os mecanismos da conversão deste açúcar a etanol (AGBOGBO *et al.*, 2008; VAN MARIS *et al.*, 2006; GIRIO *et al.*, 2010).

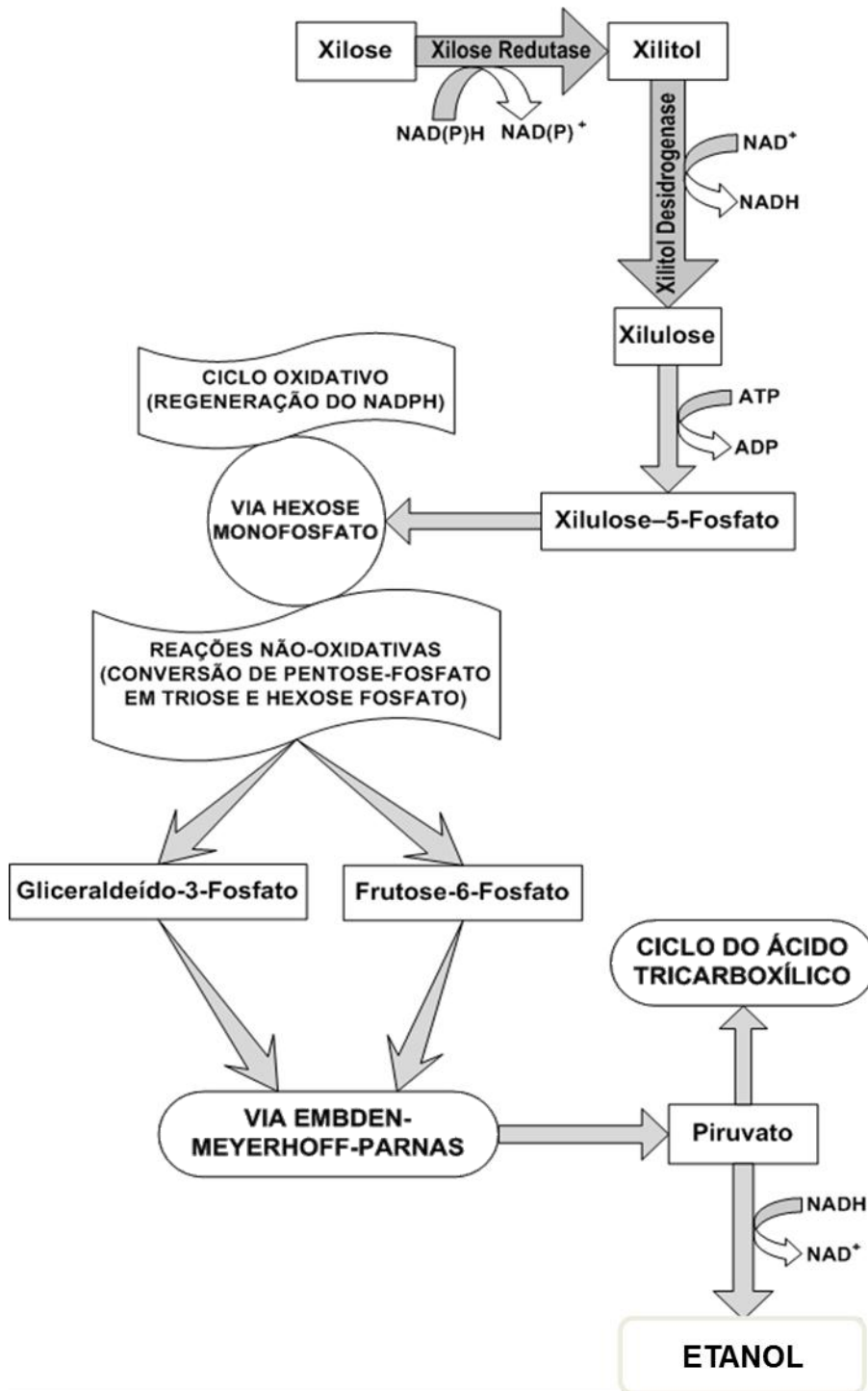
Quanto aos micro-organismos assimiladores de pentose, as leveduras *Scheffersomyces stipitis* (anteriormente chamado de *Pichia stipitis*), *Scheffersomyces shehatae*, *Candida guilliermondii* e *Pachysolen tannophilus* são micro-organismos promissores para aplicação industrial, na produção de etanol e xilitol uma vez que assimilam e fermentam a xilose com destacado rendimento (BOTHAST, 1997; GONZALEZ *et al.*, 2009; CHO *et al.*, 2010).

As propriedades desejáveis em micro-organismos fermentadores de pentose necessárias para aplicação em hidrolisados de hemicelulose são eficiente utilização de hexoses e pentoses, taxas de fermentação rápidas, alta produção, alta tolerância ao produto formado e aos inibidores presentes no hidrolisado, fermentação em valores baixos de pH e a altas temperaturas, alta viabilidade e rentabilidade, posse de características apropriadas de floculação e de utilização de uma ampla variedade de substratos (PASHA, 2007). No entanto, nenhum micro-organismo capaz de satisfazer a todas essas características foi encontrado ou desenvolvido.

A assimilação das pentoses segue uma via metabólica diferente das hexoses, chamada de via das pentoses-fosfato, e que não é comum a todos os micro-organismos (PARAJÓ, 1998b). A via metabólica utilizada pelas leveduras para a conversão de xilose em etanol (Figura 13) ocorre inicialmente pela redução da xilose em a xilitol. Esta reação é catalisada pela enzima *xilose* redutase XR, na presença de NADH e/ou NADPH. Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela coenzima NAD<sup>+</sup> ligado a xilitol desidrogenase – XDH. Desta forma, a xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, molécula que pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via hexose monofosfato, a intermediários da via EMP (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato), os quais podem então ser

metabolizados por esta via, conectada a outras como o ciclo de Krebs e as reações de fermentação alcoólica. A especificidade das enzimas XR e XDH aos cofatores reduzidos e oxidados varia de acordo com a espécie de levedura avaliada (DA SILVA *et al.*, 1996; WILSON *et al.*, 2003).

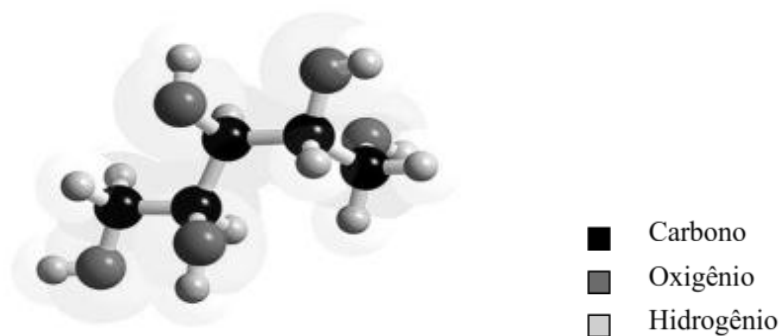
Figura 13 - Metabolismo de xilose por leveduras.



Existe uma íntima relação entre a especificidade da enzima XR aos cofatores NADH ou NADPH e o acúmulo de xilitol no citoplasma do micro-organismo com sua posterior excreção para o meio. Quando a atividade da XR de um determinado micro-organismo depende de NADH ou NADPH, o cofator  $\text{NAD}^+$  utilizado na redução da xilose a xilitol pode ser recuperado na etapa seguinte, seja em condições anaeróbicas ou de limitação de oxigênio. Neste caso, e sob tais condições, o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol, não havendo acúmulo de xilitol. Quando a atividade da XR de um micro-organismo depende apenas de NADPH (reduzido), sob condições de limitação de oxigênio observa-se acúmulo de xilitol, uma vez que, nestas condições, a capacidade da cadeia respiratória de recuperação do cofator oxidado ( $\text{NAD}^+$ ) é baixa, o que leva a uma diminuição da atividade da enzima XDH, diminuindo a velocidade de transformação, e fazendo com que a célula a excrete o xilitol para o meio extracelular (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN, 1998; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

O Xilitol é um poliálcool formado por cinco carbonos ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$ ) amplamente presente na natureza em muitas frutas e vegetais, sendo a ameixa amarela a fruta com maior teor de xilitol (AMINOFF *et al.*, 1978). Sua molécula possui estrutura aberta conhecida como um polihidroxiálcool acíclico, ou pentitol, uma vez que possuem cinco grupos OH na molécula, e cada grupo hidroxila se encontra ligado a um átomo de carbono (Figura 14) (MÄKINEN, 2000).

Figura 14 - Molécula de xilitol.



Fonte: Química (2015)

O xilitol possui poder adoçante similar ao da sacarose, sendo 2,4 vezes mais doce que o manitol e 2 vezes mais doce que o sorbitol. Além de poder adoçante, o xilitol possui propriedades físico-químicas e fisiológicas importantes, que o coloca como produto em potencial para aplicações em diversos setores industriais, como produção de bala, dentifrícios, cremes (AGUIAR *et al.*, 1999; BAR, 1991).

A produção biotecnológica de xilitol e etanol por meio do cultivo de leveduras em hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir de resíduos agroindustriais é de grande interesse econômico. Isso porque, esse processo pode agregar valor aos resíduos lignocelulósicos, substituir o caro processo químico de obtenção de xilitol, além de promover um aproveitamento completo dos materiais, utilizando as frações celulósica e hemicelulósica, para a obtenção de etanol, biocombustível de grande interesse econômico e ambiental (SCHIRMER-MICHEL, 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### **Geral:**

Avaliar processos de hidrólise da casca de café a fim de estudar a sua fermentabilidade para a produção de etanol e xilitol.

#### **Específicos:**

- Caracterizar a biomassa da casca de café quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos.
- Determinar as condições de hidrólise ácida dessa biomassa que favoreçam uma melhor obtenção dos açúcares fermentescíveis (glicose e xilose).
- Determinar as condições de pré-tratamento alcalino dessa biomassa que favoreça uma melhor obtenção de açúcar fermentescível (glicose), por meio de hidrólise enzimática.
- Tratar e fermentar o hidrolisado ácido (hemicelulósico) selecionado, visando à produção de etanol e xilitol.
- Avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados celulósicos por meio de fermentações conduzidas em *SHF* e *SSF*, visando a obtenção de etanol.





## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. COLETA E PREPARO DA CASCA DE CAFÉ

A casca de café, variedade arábica (*Coffea arábica*), foi cedida, gentilmente, pelo professor Luiz Carlos Rodrigues da Universidade Federal Fluminense- UFF.

Esta biomassa foi exposta a luz solar para secagem, previamente aos processos de pré-tratamentos. Para tanto, antes de qualquer uso da casca de café o teor de umidade foi averiguado, por meio de uma balança de umidade modelo I-TERMO L, com infravermelho, por um período de 30 minutos.

### 4.2. CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ

A casca de café foi submetida a caracterização química para quantificação da concentração de compostos como extrativos, celulose, hemicelulose, lignina e cinzas presentes em sua composição. Para esta caracterização, utilizou-se a metodologia proposta por Gouveia *et al.* (2009), com reações realizadas em triplicatas.

A quantificação foi realizada triplicata, em béqueres de vidro, onde 2 g das amostras de casca de café foram tratadas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% (v/v), em banho termostaticado a 45 °C por 7 minutos, permanecendo em contínua agitação durante todo o processo. A reação foi então interrompida com 275 mL de água destilada e o material foi transferido quantitativamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL e, posteriormente, autoclavados a 121 °C durante 30 minutos. O material foi filtrado Whatman® n°1, previamente tarados e a fração líquida alojada em balão volumétrico de 500 mL, onde o mesmo foi completado com água destilada até o volume total. A fração sólida foi lavada com água destilada e seca até peso constante para determinar lignina insolúvel e posteriormente cinzas, enquanto fração líquida foi filtrada e submetida a análise em Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotométrica para determinar os demais compostos.

### 4.3. PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA CASCA DE CAFÉ

#### 4.3.1. Pré-tratamento ácido em reator tipo bloco digestor

Foram realizadas reações de hidrólise ácida em reator tipo bloco digestor, em ampolas de aço inox, com capacidade de 500 mL de amostras (Figura 15). Utilizou-se a proporção de 1:4 sólido/líquido, para o estudo das condições de pré-tratamento da casca de café com ácido sulfúrico diluído por meio de um planejamento fatorial  $2^3$ , com 3 repetições no ponto central, variando-se: a temperatura (120-160 °C); tempo de pré-tratamento (10-30 min); concentração de ácido  $H_2SO_4$  (100-200 mg/g), para remoção e utilização da fração hemicelulósica (Tabela 2).

Figura 15 – Bloco digestor, marca PHD, utilizado para reações de hidrólise ácida da casca de café.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 2 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis avaliados no processo de hidrólise por meio de planejamento fatorial  $2^3$ , com três pontos centrais, para variáveis independentes concentração de  $H_2SO_4$  (mg/g), tempo (min) e temperatura ( $^{\circ}C$ ) no processo de hidrólise ácida da casca de café seca.

Variáveis	Condições		
	(-)	(0)	(+)
Concentração de $H_2SO_4$ (mg/g)	100	150	200
Tempo (min)	10	20	30
Temperatura ( $^{\circ}C$ )	120	140	160

(-) nível baixo; (0) ponto central; (+) nível alto

Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.4. Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico: Método *Liming*

O hidrolisado da casca de café utilizado em estudo exploratório foi submetido ao processo de destoxificação pelo método *Liming*, onde foi adicionado o reagente NaOH para elevação do pH do meio até 7, permanecendo este nestas condições durante 30 minutos, sob agitação e posteriormente filtrado. Em seguida o pH foi reduzido para 5,5 (condição de fermentação) com ácido fosfórico, filtrado e seguido da adição do carvão ativo 3% m/v. Os frascos foram colocados em incubadora de movimento rotatório à  $60^{\circ}C$  e 200 rpm, por um período de 1 hora, sendo posteriormente filtrados a vácuo com papel filtro de celulose qualitativo, marca Unifil, com gramatura de 85 g, para remoção do carvão ativo.

#### 4.5. PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA CASCA DE CAFÉ

Foram avaliadas condições de deslignificação alcalina com hidróxido de sódio (NaOH), por meio de um planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 3), com 3 repetições no ponto central, variando o tempo de tratamento (60-100 min) e a concentração de hidróxido de sódio (100-200 mg/g) ; mantendo em todos os experimentos a relação sólido/líquido 1:10.

Tabela 3 - Variáveis independentes e seus respectivos níveis avaliados no processo de hidrólise por meio de planejamento fatorial  $2^2$  com três pontos centrais, para variáveis independentes tempo (min) e concentração de NaOH no processo de pré-tratamento alcalino da casca de café.

Variáveis	Condições		
	(-)	(0)	(+)
Tempo (min)	60	80	100
Concentração de NaOH (mg/g)	100	150	200

(-) nível baixo; (0) ponto central; (+) nível alto

Fonte: Arquivo Pessoal

Para as operações de pré-tratamento alcalino empregou-se autoclave vertical, utilizando 60 g de casca de café com teor de umidade de 10%, armazenado em frascos Erlenmeyer de 1 L da respectiva solução contendo a solução de NaOH (Figura 16).

Figura 16 – Frascos Erlenmeyers contendo casca de café, durante o preparo dos experimentos para deslignificação da biomassa.



Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO SÓLIDA DESLIGNIFICADA

A hidrólise enzimática da fração sólida, previamente deslignificada nas condições descritas no ítem anterior, foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo amostras das biomassas em estudo na proporção 10% m/v. Este conteúdo sólido foi disperso em tampão citrato 0,05 N. Para a reação de sacarificação enzimática, foi adicionado a enzima comercial Dyadic (Dyadic Inc, Florida) na proporção de 20 FPU/ g de casca de café pré-tratada. A reação ocorreu em incubadora de movimento rotatório à 200 rpm, 50 °C, durante 48 horas.

Após estabelecidas as condições de pré-tratamento alcalino, por meio da liberação de glicose pela hidrólise enzimática em cada tratamento, a biomassa selecionada foi avaliada em sistema de Hidrólise e Fermentação Separado (SHF) e Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF), conforme descritas nos itens 4.5.1 e 4.5.2.

##### **4.6.1. Hidrólise e Fermentação em Separado (*SHF - Separate Hydrolysis and Fermentation*)**

A hidrólise enzimática em sistema SHF foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.5. Ao término da hidrólise, o resíduo sólido foi então separado por meio de centrifugação a 2000 x g por 20 minutos e o sobrenadante suplementado com extrato de levedura (5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,3 g/L) e empregado para fermentação visando a produção de etanol utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* 174. O inóculo adicionado possuía uma concentração celular de 0,5 g/L desta levedura e conduziu-se o processo em incubadora de movimento rotatório à 150 rpm, 30 °C, durante 48 horas.

#### **4.6.2. Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*)**

O processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea foi realizado inicialmente sob as mesmas condições da Hidrólise e Fermentação em Separado, conforme descrito no item anterior, como diferencial do processo de hidrólise enzimática à 50 °C ser interrompido ao término das primeiras 24 horas, tendo as condições de temperatura reajustadas para 30 °C, favorecendo a fermentação. Após estas 24 horas, o hidrolisado foi suplementado e inoculado conforme citado no item anterior.

### **4.7. FERMENTAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS E CELULÓSICOS**

#### **4.7.1. Micro-organismos**

Foram utilizadas para a fermentação dos hidrolisados as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037, *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 e *Saccharomyces cerevisiae* 174, provenientes do banco de leveduras do Laboratório de Processos Fermentativos, do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, EEL-USP.

As células foram cultivadas em caldo YMPG para ativação do metabolismo celular. Posteriormente, estas células foram centrifugadas durante 10 min à 2000 x g, coletadas por meio de alça de platina e semeadas em placas contendo o composto sintético Agar YMPG pelo método de semeadura em superfície e incubados em estufa de crescimento nas condições de 30 °C por 24 horas.

#### **4.7.2. Preparo do inóculo**

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado com a alçada de uma pequena alíquota de cada levedura, separadamente, em suas respectivas placas. Estas alíquotas foram submersas em meio líquido nutritivo, as quais foram reativadas em condições apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições de incubação e suplementação de meio de cultura utilizados no preparo do inóculo das leveduras *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, *C. guilliermondii* FTI 20037 e *S. cerevisiae* 174.

Suplemento (Inóculo)	Levedura		
	<i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2	<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	<i>S. cerevisiae</i> 174
Glicose (g/L)	-	-	30
Xilose (g/L)	30	30	-
Peptona (g/L)	20	20	20
Extrato de Levedura (g/L)	10	10	10
Tempo (min)	30	30	30
Agitação (rpm)	250	250	200

Fonte: Arquivo pessoal

Os reagentes de suplementação foram preparados separadamente e adicionados assepticamente, evitando que ocorra reação de Maillard no preparo dos meios.

#### 4.7.3. Processo fermentativo

Após estabelecida as condições adequadas para o processo de pré-tratamento, o hidrolisado selecionado foi submetido à fermentação, utilizando as leveduras *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 e *Candida guilliermondii* FTI 20037 para o hidrolisado hemicelulósico e *Saccharomyces cerevisiae* 174 para o hidrolisado enzimático.

A suplementação nutricional para os meios de cultura foram ajustadas separadamente para as fermentações, de forma que cada suplementação forneça condições nutricionais para o respectivo micro-organismo. As células obtidas de acordo com as condições da Tabela 5 foram utilizadas nos processos fermentativos, de acordo com as condições propostas na Tabela 6.

Tabela 5 – Suplementação do meio de cultura designado para fermentação e produção de etanol e xilitol.

Suplemento (Fermentação)	Levedura		
	<i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2	<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	<i>S. cerevisiae</i> 174
Glicose (g/L)	Presente no Hidrolisado	Presente no Hidrolisado	Presente no Hidrolisado
Xilose (g/L)	Presente no Hidrolisado	Presente no Hidrolisado	-
Peptona (g/L)	-	5	1
Extr. Levedura (g/L)	3	3	1
Extr. Malte (g/L)	3	-	-
Extr. Farelo de Arroz	-	10% v/v	-
Sulfato de amônio (g/L)	5	2	--
Cloreto de cálcio (g/L)	-	0,1	-
(NH <sub>4</sub> ) HPO <sub>4</sub>	-	-	0,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	1,0
MgSO <sub>4</sub>	-	-	0,5
MnSO <sub>4</sub>	-	-	0,5

Fonte: Arquivo pessoal



Tabela 6 - Condições propostas para processo fermentativo.

Levedura	Fermentação	
	Temp. (°C)	Agitação (rpm)
<i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2	30	200
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	30	200
<i>S. cerevisiae</i> 174	30	150

Fonte: Arquivo pessoal

O hidrolisado hemicelulósico obtido sob as condições pré-estabelecidas de pré-tratamento da biomassa foi utilizado para fermentação com a levedura *S. shehatae* UFMG HM 52.2, visando à produção de etanol; e *C. guilliermondii* FTI 20037 visando a produção de xilitol. Foram avaliadas as condições de fermentação dos hidrolisados por meio de um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , visando um melhor tratamento do hidrolisado hemicelulósico para fermentação, onde foi estudado a variação da concentração de carvão ativo (%); pH; temperatura (°C); e tempo (min), nas condições apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições propostas para realização do planejamento fatorial  $2^{4-1}$ , com três pontos centrais, para variáveis independentes carvão ativado (%), pH, temperatura (°C) e tempo (min) para determinar as melhores condições de fermentação do meio por *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 e *C. guilliermondii* FTI 20037

Variáveis	Condições		
	(-)	(0)	(+)
Carvão Ativado (%)	3	6,5	10
pH	4,5	5	5,5
Temperatura (°C)	30	45	60
Tempo (min)	30	45	60

(-) nível baixo; (0) ponto central; (+) nível alto

Fonte: Arquivo pessoal

## 4.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.8.1. Análise de açúcares fermentescíveis por meio da técnica de DNS

Os açúcares redutores foram quantificados por meio do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Lima *et al.* (2013) e Miller (1959), com a elaboração de uma curva padrão com glicose, com amostras em triplicatas para a obtenção da equação da reta através da média da absorbância determinadas a 540 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B, sendo o resultado expresso em g/L.

### 4.8.2. Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético e etanol por CLAE

As concentrações de glicose, xilose, xilitol, ácido acético e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, EU).

Para a análise do teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol, as amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel ácido sulfúrico 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

### 4.8.3. Determinação da concentração celular

A concentração celular no meio de fermentação foi determinada pela leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente construída.

## 4.9. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

### 4.9.1. Fator de conversão de açúcares em etanol ( $Y_{p/s}$ )

A estimativa de  $Y_{p/s}$  foi obtida correlacionando-se a massa de etanol produzida ( $\Delta P$ ) com a massa de açúcares consumidos ( $\Delta S$ ), em gramas, calculado pela Equação 1.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad 1$$

onde  $P_f$  é a concentração final do produto;  $P_i$  a concentração inicial do produto,  $S_f$  concentração final de açúcares (xilose e glicose) e  $S_i$  a concentração inicial de açúcares (xilose e glicose).

### 4.9.2. Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ )

A produtividade volumétrica em etanol, a qual representa a concentração de etanol produzida (g/L) por tempo (h), foi calculada de acordo com a seguinte Equação 2:

$$Q_p = \frac{P_f - P_i}{t} \quad 2$$

onde,  $t$  é o tempo de fermentação,  $P_f$  a concentração final do produto e  $P_i$  a concentração inicial do produto

## 4.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa Statistica 10.0, em que foram avaliados as respostas quanto à obtenção de açúcares, síntese do bioetanol, síntese de xilitol e consumo de substrato, por meio de gráficos de Pareto, Superfície de Resposta e Análise de variância ao nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa vegetal é um composto lignocelulósico, renovável e abundante no planeta, sendo disponível para uso cerca de  $1 \times 10^{10}$  milhões de toneladas anualmente, sob forma de resíduo agroindustrial. Estes dispõem como seus principais componentes estruturais a celulose, hemicelulose e lignina. A interação destes componentes garante a integridade química e física do vegetal, conferindo-lhe resistência mecânica e proteção contra grande parte dos agentes biológicos, como fungos, bactérias e uma grande variedade de insetos (BALAT, 2011; ALVIRA *et al.*, 2010; BLANCH *et al.*, 2008)

No presente estudo a casca de café foi submetida à análise químico estrutural, pelo método descrito no item 4.1 para a quantificação das frações celulose, hemicelulose e lignina dispostas em sua estrutura, além de cinzas e extrativos. É possível observar a composição estrutural da casca de café utilizada neste estudo na Tabela 8.

Tabela 8 – Componentes estruturais e não estruturais da casca de café *in natura*.

<b>Componentes</b>	<b>Casca de café (% em massa seca)</b>
<b>Extrativos</b>	38,05
<b>Celulose</b>	24,53
<b>Hemicelulose</b>	19,86
<b>Lignina</b>	13,68
<b>Cinzas</b>	0,36
<b>Total</b>	<b>96,48%</b>

Fonte: Arquivo pessoal

Além de celulose, hemicelulose e lignina, os materiais lignocelulósicos apresentam, em menores proporções, vários compostos extrativos, como o

amidos, graxas, óleos essenciais, proteínas e resinas, pectinas, entre outros. Este relato da literatura é amplamente observado em biomassas do tipo gramíneas, mais especificamente o bagaço de cana-de-açúcar. No presente estudo foi notória a quantidade de extrativos obtidos da casca de café, que correspondeu a 38,05% do peso total da biomassa. Este resultado difere dos comumente encontrados no bagaço de cana-de-açúcar, em que Canilha *et al.* (2011), utilizando o mesmo método de extração com água seguida de etanol, obtiveram 9,1% de extrativos e Rocha *et al.* (2011), obtiveram 4,6% de extrativos, porém utilizando apenas o etanol como solvente. Por outro lado, Martin *et al.* (2007) obtiveram 6,1% de compostos extraídos, mas utilizando apenas água como solvente. Assim, os valores químico-composicionais da casca de café, extraídos com etanol e água, diferem dos demais trabalhos da literatura, quando comparados ao bagaço de cana de açúcar, tal fato pode ser explicado devido à diferente natureza das biomassas.

De acordo com a Tabela 11 obtiveram-se valores de 24,53%, 19,86%, 13,68% e 0,36% referentes a composição da casca de café, considerando as frações constituídas por celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, respectivamente. Os valores obtidos são inferiores aqueles observados por Canilha *et al.* (2011), que relatou cerca de 45% de celulose, 25,8% de hemicelulose, 19,1% de lignina e 1% de cinzas em bagaço de cana de açúcar também extraído com água e etanol. Da mesma forma, Gouveia *et al.* (2009), obtiveram valores de 42,8% de celulose; 25,8% de hemicelulose e 22,1% de lignina e 1,4% de cinzas. De forma semelhante, Rocha *et al.* (2011) trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar extraído apenas com etanol como solvente, obtiveram valores de 45,5%; 27%; 21,1% e 2,2%, respectivamente. Silva (2012), utilizando casca de café como biomassa, encontrou valores de 43,8% de celulose, 31,51% de hemicelulose e 24,35% de lignina, fechando o balanço em um total de 99,66%, entretanto o mesmo não incluiu em seus gráficos o teor de extrativos da biomassa, pressupondo que este foi desconsiderado, justificando uma maior porcentagem dos demais componentes. Já Bekalo e Reinhardt (2010) apresentaram valores de 24,5% de celulose, 29,7% hemicelulose, diferindo dos outros autores por apresentar valor hemicelulose superior ao de celulose, 23,7% de lignina e 6,2% de cinzas, consideravelmente maior que o do presente estudo, porém sem elucidar valores de extrativos. Ferraz e Silva (2009), caracterizando a casca de

café, obtiveram valores de 23,08% de celulose, 23,85% de hemicelulose e 28,8% de lignina, sendo este o maior valor encontrado nesta fração, referente a outros trabalho, e 0,71% de cinzas.

Além do tipo de biomassa utilizado, as diferenças observadas foram notórias por ter sido considerado, neste trabalho, os valores de extrativos na caracterização da casca de café. Desta forma, vale ressaltar que diferentes métodos de análise, matriz da biomassa ou espécie utilizada podem ser fatores que interferem nos valores obtidos. E apesar dos resultados da caracterização observada na literatura, quando se utilizou o bagaço de cana de açúcar, diferir dos apresentados neste trabalho, observa-se, com exceção dos extrativos, que a tendência da grandeza na ordem dos compostos permanece a mesma, sendo a celulose permanece como o polímero mais abundante, seguido da hemicelulose e seguido de lignina e cinzas.

## 5.2. PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO

### 5.2.1. Hidrolisado hemicelulósico da casca de café: bloco digestor

A casca do café utilizada na presente etapa deste estudo foi submetida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, em proporções variadas, em um reator de bancada com capacidade de 500 mL em cada ampola.

Nesta etapa a casca de café não foi submetida a processo de moagem previamente ao pré-tratamento. Levou-se em consideração, também o fato que o uso da casca de café possibilitou uma melhor proporção massa/volume, uma vez que a biomassa não possui caráter esponjoso e ser morfológicamente menor que  $1 \text{ cm}^2$ . Desta forma, as reações de hidrólise ácida neste estudo foi empregado o uso da casca de café sob hidrólise na proporção de 1:4 massa/volume, visando uma maior concentração de açúcares no hidrolisado. Assim, este processo evitou gasto energético com a concentração do hidrolisado e possível conversão dos açúcares nos compostos furfural e hidroximetilfurfural.

Para quantificar a melhor condição de hidrólise, foi seguido um planejamento fatorial  $2^3$ , com 3 pontos centrais, variando-se os fatores:  $H_2SO_4$ ; tempo; e temperatura. A resposta avaliada foi a quantidade de açúcares redutores obtidos em g/L em cada tratamento, sendo este analisado pelo método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS), por meio de análise espectrofotométrica. Os resultados obtidos neste experimento estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 – Concentração de açúcares redutores e valores de pH do hidrolisado hemicelulósico obtido no Planejamento experimental  $2^3$ , com três pontos centrais, variando concentração de  $H_2SO_4$ , tempo e temperatura de reação de hidrólise ácida da casca de café, tendo como variável resposta a concentração de açúcares redutores.

Condições	Variáveis Independentes			Variável Resposta	pH
	$H_2SO_4$ (mg/g)	Tempo (min)	Temperatura ( $^{\circ}C$ )	Açúcares Redutores (g/L)	-
1	100	10	120	23,56	2,13
2	200	10	120	26,44	0,9
3	100	30	120	22,67	2,08
4	200	30	120	30,26	0,9
5	100	10	160	28,69	1,2
6	200	10	160	59,33	0,8
7	100	30	160	46,50	1,1
8	200	30	160	59,33	0,8
9 (PC)	150	20	140	44,06	0,9
10 (PC)	150	20	140	44,32	0,8
11(PC)	150	20	140	48,01	0,9

**PC: ponto central**

Fonte: Arquivo pessoal

Ressalta-se que, nesta etapa, foram necessários apenas cerca de 35 minutos para o aquecimento do reator a temperatura desejada e aproximadamente 30 minutos para o seu resfriamento, em banho de água corrente. Isto diminuiu a interferência resultante de longos períodos de aquecimento e resfriamento em reator, fato que pode comprometer o experimento e o resultado desejado.

O procedimento para a separação das frações sólida e líquida após o processo de hidrólise no reator de bancada foi o mesmo utilizado após o pré-tratamento em reator de 50L, de modo que a filtração foi realizada em tecido de algodão. O hidrolisado hemicelulósico coletado foi transferido para frascos de plástico com capacidade de 500 mL e armazenados em câmara fria a 4 °C.

Assim como ocorrido na etapa anterior, ao submeter a casca de café ao pré-tratamento ácido, a fração hemicelulósica do material lignocelulósico foi despolimerizada, e os açúcares resultantes permaneceram solubilizados na fração líquida. Desta forma, o ácido atuou como um catalisador em temperaturas elevadas, promovendo a clivagem das ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4) e liberação dos monômeros da hemicelulose (ALVIRA *et al.*, 2010). Após o pré-tratamento, as características físicas do hidrolisado da casca do café apresentaram particularidades que dificultaram o processamento do material. O hidrolisado hemicelulósico da casca de café, quando tratado na proporção de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com 100 mg/g de biomassa, mostrou uma coloração marrom e extremamente turva, com grande resistência no processo de filtração a vácuo, congestionando os poros do filtro e impedindo a passagem do líquido. Suspeitou-se da presença de pectinas no hidrolisado, entre outros compostos. Desta forma, foi de extrema necessidade o uso de centrífuga para solucionar o problema. Entretanto, o aspecto permaneceu o mesmo após este processo, seguido de filtração a vácuo (Figura 17). Ressalta-se que este fato não foi observado nos hidrolisados de casca de café com proporção de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com 200 mg/g de biomassa, sendo estes mais translúcidos e de fácil manuseio. Possivelmente, as condições mais severas de pré-tratamento foi capaz de degradar possíveis compostos resistentes a condições mais brandas.



Figura 17 - Hidrolisado hemicelulósico da casca de café tratado com 100 mg/g  $H_2SO_4$  após filtração a vácuo.

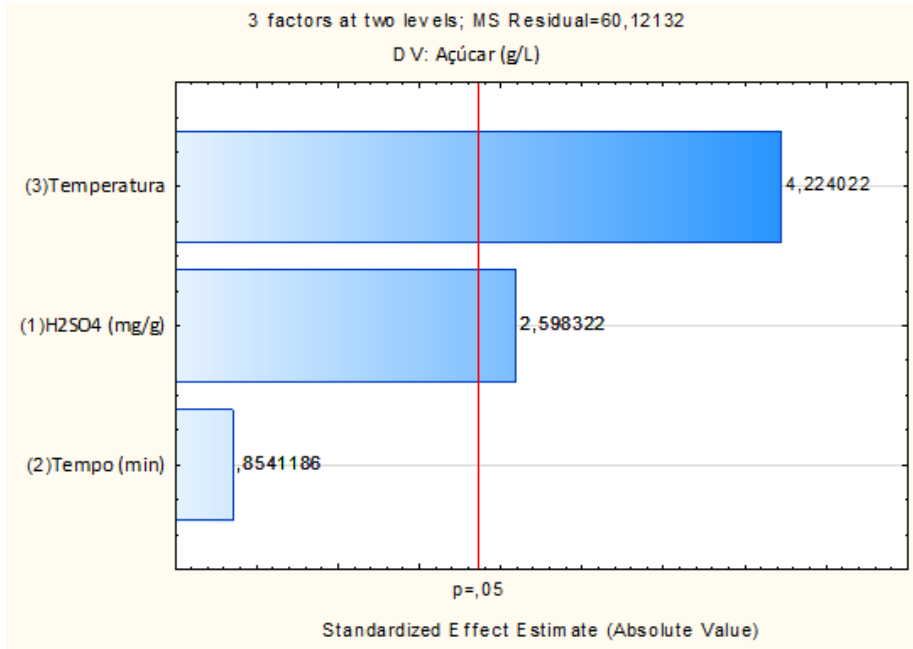


Fonte: Arquivo pessoal

Foram observados diferentes valores de pH para os diferentes hidrolisados hemicelulósicos obtidos, variando entre 0,8 (condições mais severas) e 2,17 (condição mais branda). Narciso (2007), trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar obteve um hidrolisado com pH 1,35, enquanto Santos (2005), ainda nesta mesma condição de hidrólise, obteve um pH de 0,4 em seu hidrolisado.

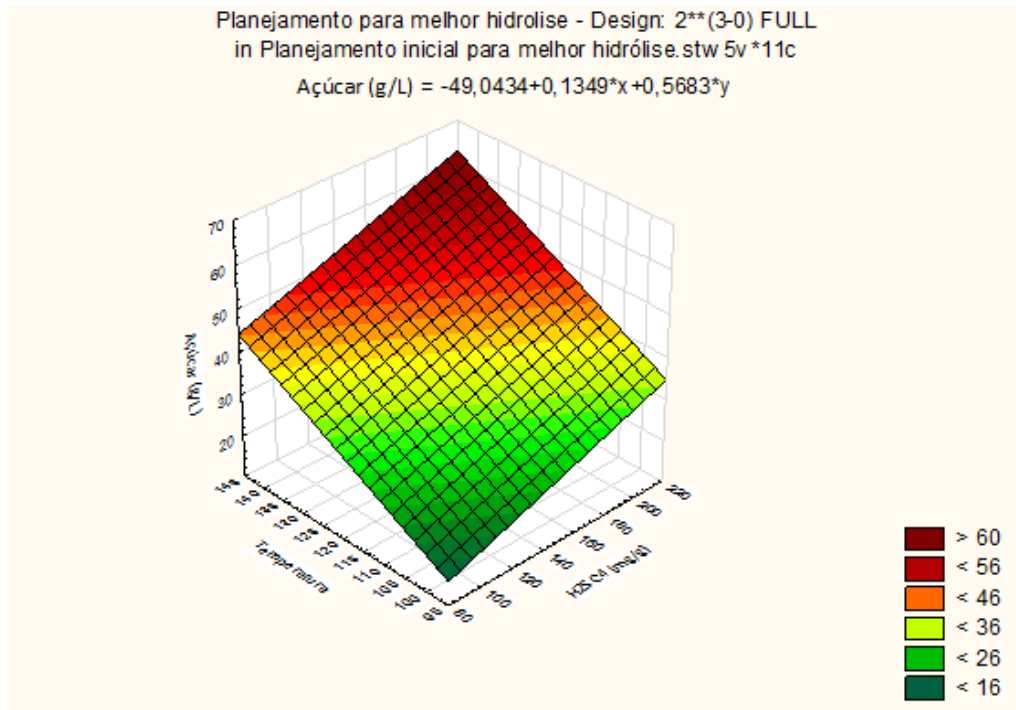
Os valores de pH podem variar devido a diversos fatores, como condições de pré-tratamento, volume de ácido utilizado, variedade da biomassa e quantidade de ácido acético proveniente da liberação de radicais acetil da fração hemicelulósica. A quantidade de açúcar liberado nas condições com menor concentração de  $H_2SO_4$ , indicou que, provavelmente, concentrações mais altas deste ácido foram necessárias para promover o rompimento das ligações da fração hemicelulósica e liberação de monômeros. Por outro lado, foi observado que, em condições de tratamento mais severas, ou seja, com altas concentrações de ácido, concentrações maiores de açúcares redutores foram obtidas, conforme Figura 18, Figura 19 e Tabela 10.

Figura 18 - Gráfico de pareto referente a influencia da temperatura,  $H_2SO_4$  e tempo na concentração de açúcares do hidrolisado hemicelulósico, com as variáveis dependente concentração de açúcar e variáveis independentes temperatura, concentração de  $H_2SO_4$  e tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^3$  completo, com três pontos centrais.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 19 - Gráfico de superfície de resposta para a variáveis dependente concentração de açúcar, de acordo com resultados das variáveis independentes temperatura e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2<sup>3</sup> completo com três pontos centrais.



Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 10 - Análise de variância para as variáveis dependentes concentração de açúcar, de acordo com resultados das variáveis independentes concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2<sup>3</sup> completo com três pontos centrais.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	405,896	1	405,896	6,75128	0,035512
<b>Tempo</b>	43,860	1	43,860	0,72952	0,421304
<b>Temperatura</b>	1072,706	1	1072,706	17,84236	0,003917
<b>Error</b>	420,849	7	60,121		
<b>Total SS</b>	1861,885	10			

Fonte: Arquivo Pessoal

Em seguida, realizou-se um experimento de confirmação da melhor condição proposta, por meio da concentração de  $H_2SO_4$  e temperatura nos níveis altos e tempo no nível baixo e o hidrolisado hemicelulósico obtido foi submetido à análise de açúcares fermentescíveis por meio de Cromatografia Líquida de alta eficiência. Os resultados obtidos com o pré-tratamento ácido da casca do café apresentaram um total de 31,35 g/L de xilose e 12,42 g/L de glicose. A concentração de ácido acético no hidrolisado da casca de café, também mensurado em CLAE, apresentando valores de 1,25 g/L de ácido acético (Tabela 11). E ressalta-se que os dados apresentados neste procedimento foram obtidos por meio de procedimentos que reduzissem o tempo de aquecimento e resfriamento do reator.

Tabela 11 – Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico da casca de café obtido a partir do tratamento 200 mg/g  $H_2SO_4$ , 160 °C e 10 minutos.

Biomassa	Hidrolisado Hemicelulósico			
	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	pH
<b>Casca de café</b>	31,35	12,42	1,25	0,8

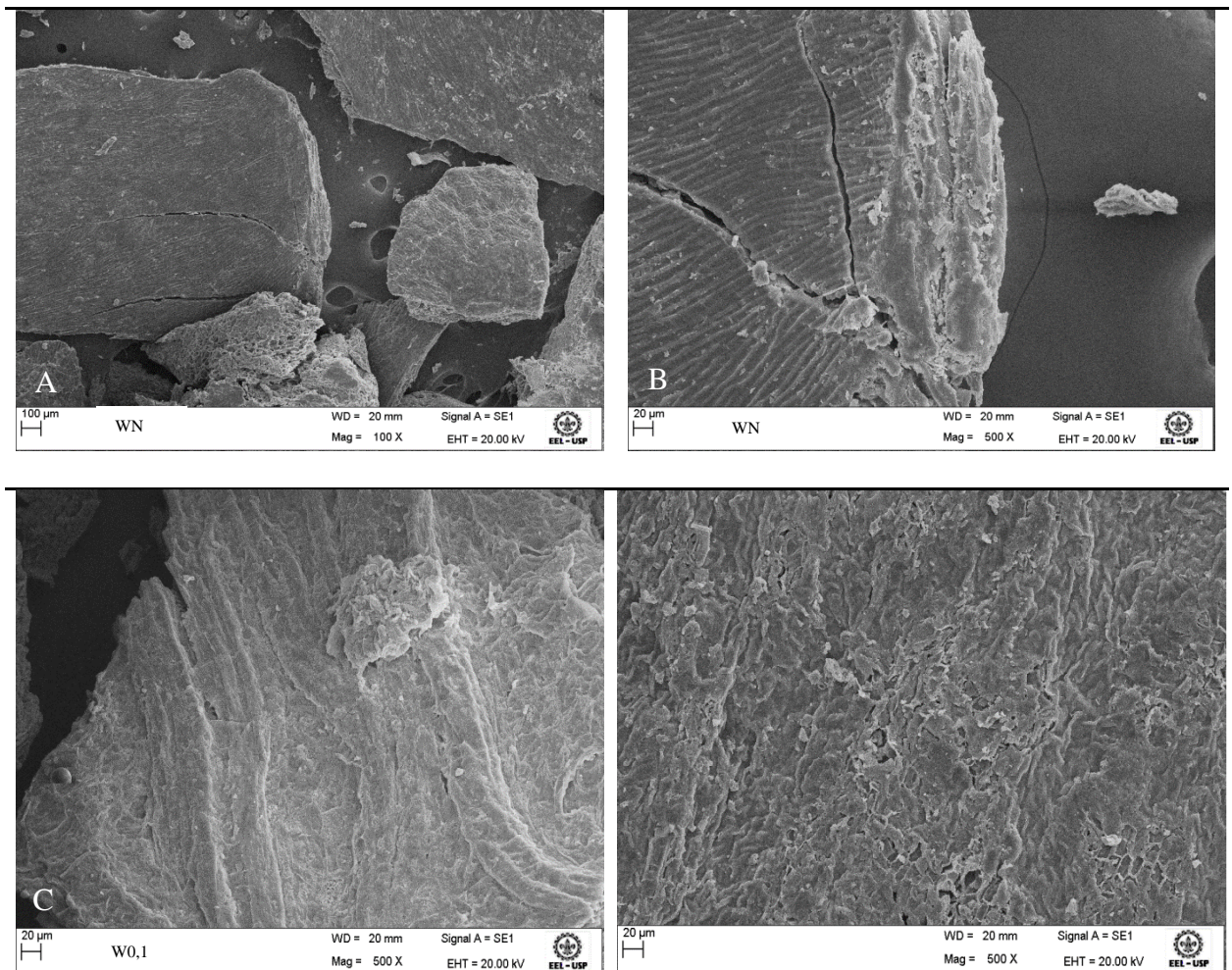
Fonte: Arquivo Pessoal

Conforme resultados (Tabela 15), as condições propostas para a hidrólise ácida, produziram um hidrolisado rico em monômeros de xilose e glicose. Sendo a concentração de xilose 2 vezes superior que a de glicose, indicando que a hemicelulose foi mais susceptível à hidrólise nas condições utilizadas do que a celulose. Este comportamento é corroborado pela literatura, uma vez que a hemicelulose, devido à sua estrutura, é mais susceptível a reação de hidrólise que a celulose (FENGEL; WENEGER, 1989). Entretanto, em trabalhos similares, porém com bagaço de cana de açúcar, e realizados sob condições de hidrólise semelhantes, é possível observar uma diferença significativa na proporção xilose/glicose encontrada no hidrolisado, de modo que a proporção de glicose se encontra nitidamente inferior, como observado por Chaud (2010), Sarrouh (2009) e Cunha (2006), que relataram concentrações de 1,82 g/L, 1,6 g/L e 1,3 g/L de

glicose, respectivamente, no hidrolisado concentrado e 12,0 g/L de xilose e 0,41 g/L de glicose por Fonseca (2009), analisando hidrolisado bruto e sem concentrar.

Na Figura 20 é possível observar que o processo de hidrólise ácida destruiu a biomassa, de modo que a uniformidade presente na superfície da casca do café *in natura* sofreu fragmentação. Ficou evidente que o ácido sulfúrico influenciou na degradação da hemicelulose, modificando a morfologia do material.

Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da estrutura da casca de café *in natura* (A e B) e submetido a processo de hidrólise com ácido diluído (C e D), em diferentes concentrações, sendo C – 100 mg/g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; e D – 200 mg/g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por meio de fotomicrografia obtida em MEV.



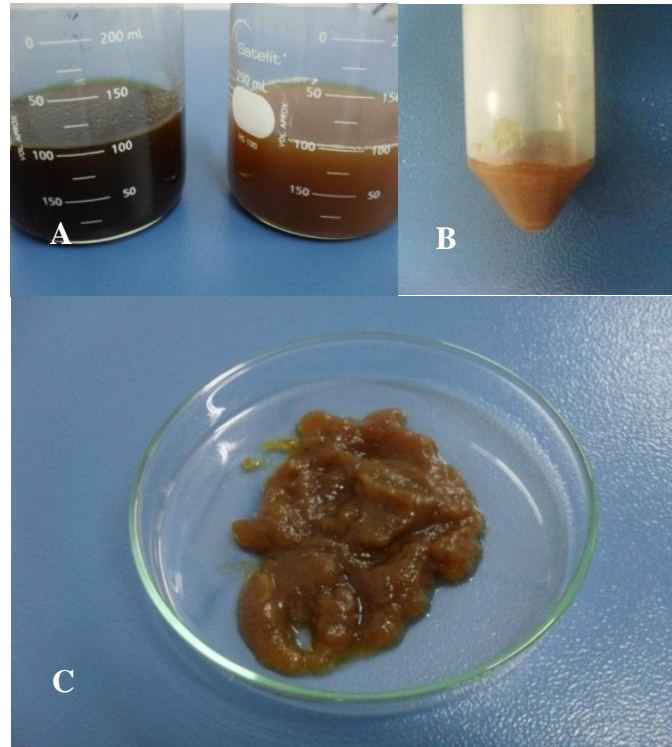
Fonte: Arquivo pessoal

### 5.3. Avaliação do procedimento padronizado de destoxificação no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de casca de café

O hidrolisado obtido a partir da hidrólise da casca de café é um hidrolisado de caráter complexo e precisa passar por etapas para remoção de compostos indesejados que venham interferir no processo de fermentação. Segundo Naidu e Murthy (2010), a casca de café é um substrato rico em compostos fenólicos. Os compostos fenólicos exibem propriedades fisiológicas, os quais atuam como antialérgico, antiarteriogênico, antiinflamatório, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, mas também podem comprometer a qualidade de um processo fermentativo tendo em vista sua natureza de agente antimicrobiano (BALASUNDRAM, 2006). O processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico é necessário para remover esses compostos inibitórios formados durante o processo de hidrólise. Para tanto, o método *Liming* foi empregado visando à remoção destes compostos indesejados e, conseqüentemente, clarificação do hidrolisado, sendo esta uma resposta à remoção desses compostos.

Porém, ao submeter o hidrolisado hemicelulósico da casca de café ao processo de destoxificação, foi possível observar uma mudança nítida na coloração do meio, onde ao alterar o pH para 7 o hidrolisado ficou nitidamente negro e opaco. Em seguida, o mesmo proporcionou uma notável dificuldade na realização do procedimento, quanto à filtração (Figura 21a), gelificando também parte do seu volume quando pH alterado e, após aplicação, retendo partículas do carvão ativo ao final do processo, os quais permaneceram no hidrolisado com uso de exaustivas filtrações, inviabilizando o processo de contagem celular nas etapas seguintes, durante as fermentações do hidrolisado. No processo de destoxificação, grandes *pellets* gelatinosos foram formados e sedimentados após o processo de centrifugação (Figura 21b-c), resultando em uma média de 50% ou mais de volume do hidrolisado hemicelulósico inicial perdido na etapa, conseqüentemente, ocorrendo também perda de açúcares fermentescíveis.

Figura 21 - Hidrolisado hemicelulósico da casca do café submetido ao método de destoxificação *Liming*. (A) Diferença de cor entre o hidrolisado destoxificado (esquerda) e não tratado (direita); (B) formação de corpo de fundo após centrifugação de 50 mL de hidrolisado em destoxificação, (C) corpo de fundo gelatinoso formado durante o método destoxificação *Liming*.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 5.3.1. Teste fermentativo do hidrolisado obtido pela avaliação do procedimento padronizado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de casca de café

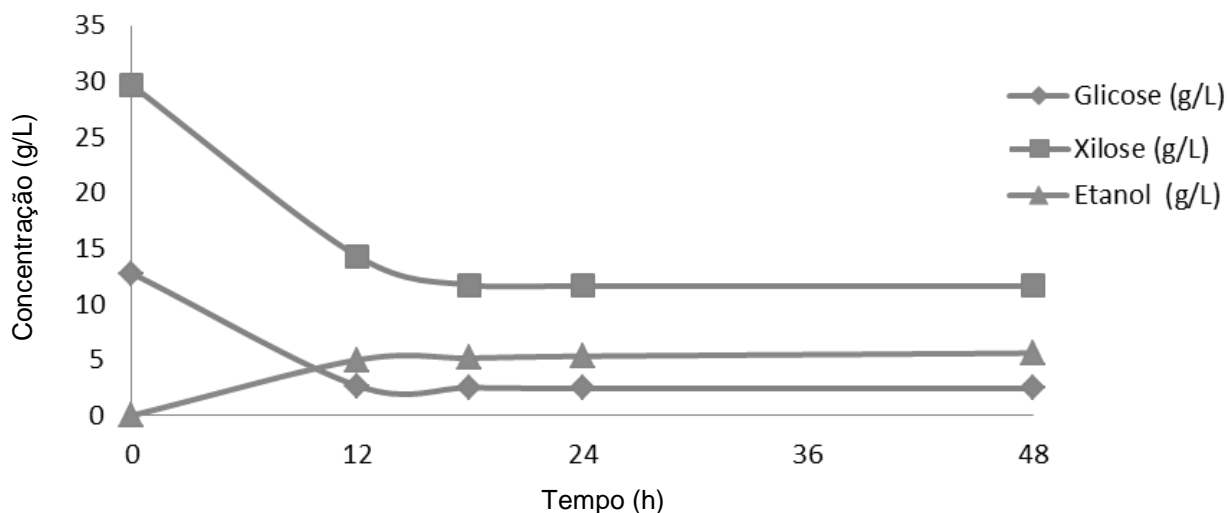
Para minimizar os efeitos de perda, junto com o hidrolisado destoxificado com NaOH para o aumento do pH, também foram realizados testes utilizando os reagentes hidróxido de sódio e hidróxido de amônio para remoção das impurezas, entretanto não houve mudanças notórias quanto as perdas já citadas acima. Para efeito desse teste, o hidrolisado destoxificado com NaOH foi suplementado destinado à fermentação com *Scheffersomyces shehatae* HM 52.2 a 30 °C e 200 rpm, durante 48 horas. Os resultados obtidos na fermentação estão apresentados na Tabela 12 e o perfil fermentativo na Figura 22.

Tabela 12 – Produção de etanol e consumo de açúcar pela levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 a partir do hidrolisado de casca de café destoxificado com NaOH.

Fermentação – <i>S. shehatae</i> UFMG HM 52.2			
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)
0	12,76	29,62	0
12	2,66	14,30	4,99
18	2,50	12,72	4,95
24	2,43	12,62	4,99
48	2,42	12,61	5,1

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 22 – Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café destoxificado com NaOH com a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.



Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 21, observa-se que houve um consumo parcial e simultâneo dos açúcares fermentescíveis no hidrolisado, porém, entre 12 e 18 horas de fermentação, as células já não apresentaram mais indícios de atividade metabólica durante a fermentação, possivelmente inativadas por estarem em condições desfavoráveis. Observou-se também que as mesmas estavam



cobertas de um pigmento preto. Esta pigmentação foi causada pela permanência do carvão ativo no hidrolisado, mesmo após exaustivas centrifugações e filtrações. Assim, foi possível observar que o processo de *Limming* não proporcionou efeito desejado na destoxificação e clarificação do hidrolisado de casca de café. Para uma melhor compreensão do possível desafio, o mesmo procedimento foi efetuado em hidrolisados de casca de café submetidas a reação com 100 mg/g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e no primeiro hidrolisado obtido em estudo, mediado em reator de 50 litros, estando ele concentrado ou não. Entretanto, não foi observado diferença em nenhum dos casos analisados e o mesmo ou caso semelhante não foi encontrado na literatura.

De forma geral, o método de pré tratamento com ácido diluído na biomassa lignocelulósica tem sido extensivamente empregado e estudado para as mais diversas matérias primas. Moutta *et al.* (2012) aplicaram o método na palha da cana-de-açúcar, um outro sub produto do processamento de cana-de-açúcar. Já Kim *et al.* (2011) verificaram boas condições para a hidrólise de palha de cevada e Roberto, Mussato e Rodrigues (2003) obtiveram resultados satisfatórios para o pré-tratamento de palha de arroz. Sendo assim, apesar das perdas e desvantagens relacionadas ao processo, o pré-tratamento com ácido diluído ainda é um processo promissor e o mais comum e extensamente explorado para a liberação de açúcares fermentescíveis em processos biotecnológicos, uma vez que libera os monômeros constituintes da hemicelulose (Chandel *et al.*, 2012). Entretanto, devido à diversidade de biomassas lignocelulósicas disponíveis como subprodutos industriais, exemplificando a casca de café, faz-se necessária busca de novos caminhos ou adaptações de métodos para um eficiente emprego desta biomassa em processos biotecnológicos.

#### 5.4. ESTUDO DA VARIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO TRATAMENTO PARA DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE CAFÉ

Frente à dificuldades encontradas durante o processo de destoxificação do hidrolisado, para a fermentação, foram estipulados condições previamente otimizadas, de acordo com a literatura, avaliando as melhores condições do hidrolisado para esta etapa. Assim, a fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café foi estabelecida sob condições variadas de estudo, em um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , com três pontos centrais, para estabelecer melhores condições do meio, visando à produção de etanol, pela levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2. Para tanto, determinou-se a variação dos seguintes fatores do tratamento do hidrolisado: concentração de carvão ativo; pH do hidrolisado; temperatura da reação, e tempo.

##### **5.4.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2**

A levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 foi cultivada em meio Ágar Sabouraud 2% (Labsynth) pelo método *Ágar Plate* e armazenada em estufa incubadora a 30 °C durante 24 hr. O inóculo foi cultivado em meio previamente autoclavado e após 24 horas o cultivo foi interrompido e submetido à centrifugação a 2600 x g durante 10 minutos em tubos Falcon de 50 mL estéreis. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com água destilada estéril.

A presença de nutrientes no meio de fermentação é um fator de grande importância para o desenvolvimento do processo, uma vez que, mesmo com o hidrolisado contendo sais e compostos oriundos da biomassa, liberados durante a hidrólise, os micro-organismos presentes para a fermentação necessitam de nutrientes diferenciados para seu crescimento e suas funções metabólicas (SILVA, *et al.*, 2011). Para a fermentação do hidrolisado obtido a partir do planejamento proposto para tratamento do mesmo, os meios foram suplementados de forma padrão com (g/L): sulfato de amônio, 5; extrato de malte,

3; e extrato de levedura, 3; distribuído em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com volume de trabalho de 50 mL, nas condições de 30° C a 200 rpm durante 48 hr, com retirada periódica de amostras, sendo utilizado 1g/L de células em cada condição do planejamento.

Os resultados obtidos durante o planejamento fatorial, para a produção de etanol e consumo dos açúcares fermentescíveis (xilose e glicose) nos processos fermentativos foram expressos na Tabela 13. Para a realização dos cálculos utilizou-se o tempo de 24 horas, tendo em vista um melhor desempenho na produção de etanol quando comparado ao tempo de 48 horas. Os valores quanto à porcentagem da assimilação de açúcares fermentescíveis no tempo de 24 e 48 horas, estão apresentados na Tabela 14. Os valores de  $Y_{p/s}$ , na síntese do etanol, não foram incluídos como fator resposta ao planejamento devido a grande variação no consumo dos açúcares fermentescíveis, tornando-o mesmo um possível falso positivo na escolha da melhor condição. Os respectivos valores da produção de etanol e parâmetro fermentativo ( $Y_{p/s}$  e  $Q_p$ ), também no tempo de 24 e 48 horas, estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 13 – Planejamento experimental 2<sup>4-1</sup>, com três pontos centrais, variando concentração de carvão ativo, pH, temperatura e tempo de reação de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de casca de café, submetido a processo de fermentação para produção de etanol de 2<sup>o</sup> geração, tendo como variável resposta a concentração de etanol sintetizado e açúcares fermentescíveis consumidos em um período de 24 horas de fermentação.

Tratamento	Carvão (%)	pH	Temperatura	Tempo (min)	Etanol (g/L)	Açúcar Consumido (%)
1	3	1	30	60	0,0	3,87
2	10	1	30	30	1,5	17,74
3	3	5	30	30	2,7	31,29
4	10	5	30	60	5,1	66,45
5	3	1	60	30	0,3	3,55
6	10	1	60	60	0,4	16,13
7	3	5	60	60	0,3	13,23
8	10	5	60	30	5,8	66,77
9	6,5	3	45	45	3,7	41,29
10	6,5	3	45	45	3,3	37,10
11	6,5	3	45	45	3,4	35,48

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 14 – Consumo (%) de açúcares fermentescíveis pela levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 nas diferentes condições de tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café.

Tratamento	Açúcares fermentescíveis consumidos (%)	
	24 h	48 h
1	3,87	28,85
2	17,74	55,74
3	31,29	60,60
4	66,45	65,56
5	3,55	46,01
6	16,13	50,88
7	13,23	69,47
8	66,77	85,59
9	41,29	58,60
10	37,10	60,76
11	35,48	58,27

Fonte: Arquivo pessoal

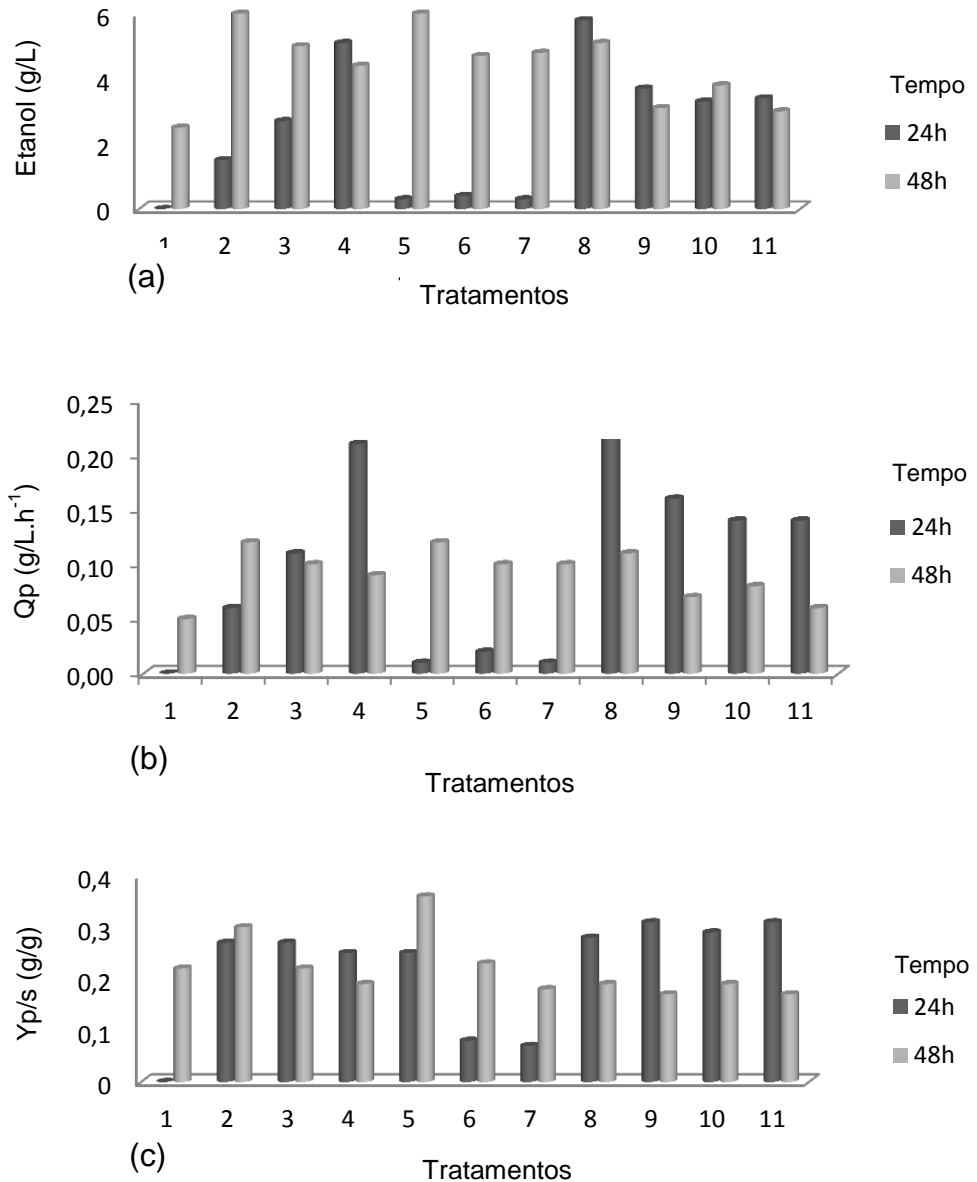
Tabela 15 – Produção de etanol e valores de  $Y_{p/s}$  da fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café pela levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em diferentes condições de tratamento.

Tratamento	Etanol (g/L)			$Y_{p/s}$ (g/g)		$Q_p$ (g/L.h <sup>-1</sup> )	
	0h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	0,0	0,0	2,5	0,00	0,22	0,00	0,05
2	0,0	1,5	6,0	0,27	0,30	0,06	0,12
3	0,0	2,7	5,0	0,27	0,22	0,11	0,10
4	0,0	5,1	4,4	0,25	0,19	0,21	0,09
5	0,0	0,3	6,0	0,25	0,36	0,01	0,12
6	0,0	0,4	4,7	0,08	0,23	0,02	0,10
7	0,0	0,3	4,8	0,07	0,18	0,01	0,10
8	0,0	5,8	5,1	0,28	0,19	0,24	0,11
9	0,0	3,7	3,1	0,31	0,17	0,16	0,07
10	0,0	3,3	3,8	0,29	0,19	0,14	0,08
11	0,0	3,4	3,0	0,31	0,17	0,14	0,06

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 23, verifica-se que a maior produção de etanol foi observada no tratamento número 8, no qual obteve-se 5,8 g/L de etanol em 24 horas de fermentação, proporcionando também a melhor produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) com valor de 0,24 g/L.h<sup>-1</sup> de etanol. Entretanto, quanto ao fator de conversão a etanol ( $Y_{p/s}$ ), não foi observado no presente estudo para a mesma amostra, sabendo que o melhor  $Y_{p/s}$  foi correspondente aos tratamentos 9 e 11 (0,31 g/g de etanol). Porém, os mesmos não possuíam resultados promissores, considerando-se a assimilação do substrato, consumindo menos que 50% do açúcar disponível. Assim, mesmo com valor de  $Y_{p/s}$  inferior, os melhores parâmetros fermentativos permaneceram nas condições de tratamento 8.

Figura 23 – Produção de etanol e valores de  $Y_{p/s}$  e  $Q_p$  da fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos da casca de café pela levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em diferentes condições de tratamento.

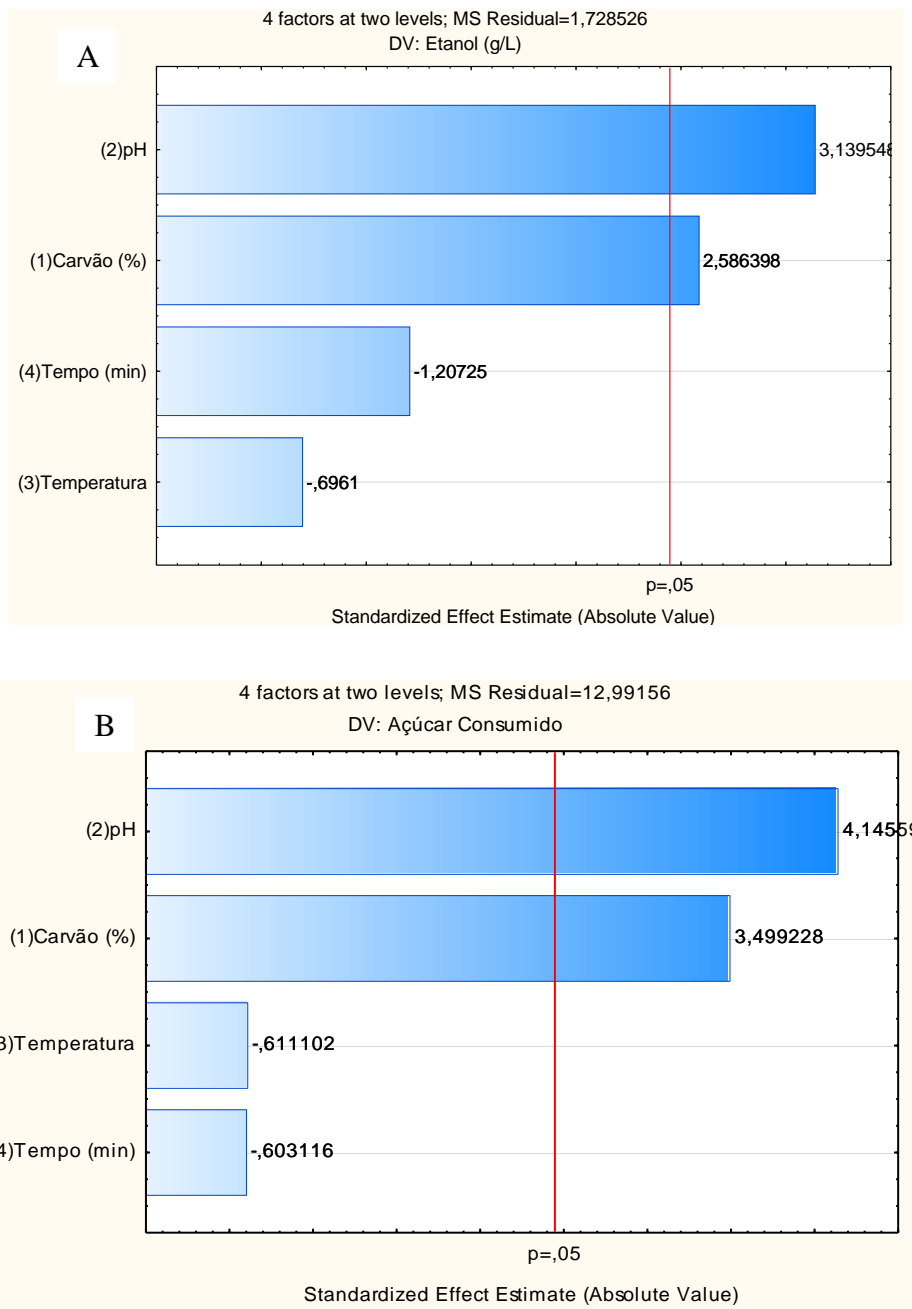


Fonte: Arquivo pessoal

Os resultados das análises estatísticas para determinar as melhores condições de tratamento, tendo como variável resposta a síntese de etanol e o açúcar consumido, foram representadas por meio de gráficos de pareto

(Figura 24), gráfico de superfície de resposta (Figura 25) e análise de variância (Tabela 16 e Tabela 17).

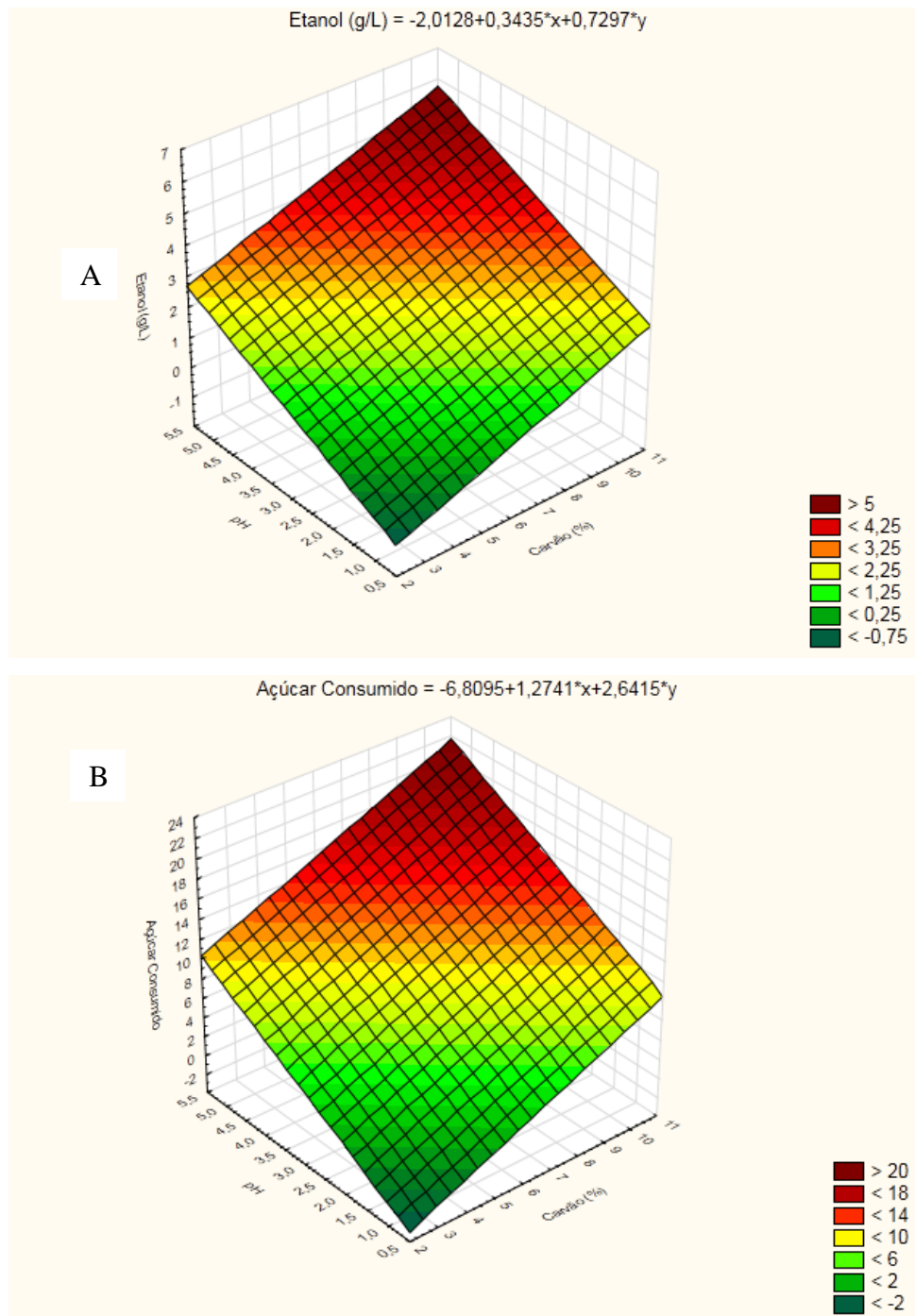
Figura 24 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes concentração de etanol (A) e variável dependente açúcar consumido (B) de acordo com resultados da variável independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  completo com três pontos centrais, para estudo de condições de ganho de açúcar, visando a produção de etanol em 24 hr de fermentação a partir de hidrolisado hemicelulósico da casca de café.



Fonte: Arquivo pessoal



Figura 25 – Gráfico de superfície de resposta para a variável dependente Concentração de etanol (A) e variável dependente açúcar consumido (B), de acordo com resultados das variáveis independentes pH e concentração carvão ativado, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  com três pontos centrais, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico da casca de café.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 16 - Análise de variância e significância para a variável dependente etanol, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativado, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  completo com três pontos centrais.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)Carvão (%)</b>	11,56290*	1	11,56290	6,689457	0,041412
<b>(2)pH</b>	17,03768*	1	17,03768	9,856764	0,020079
<b>(3)Temperatura</b>	0,83757	1	0,83757	0,484556	0,512415
<b>(4)Tempo (min)</b>	2,51923	1	2,51923	1,457442	0,272766
<b>Error</b>	10,37116	6	1,72853		
<b>Total SS</b>	42,32853	10			

Fonte: Arquivo pessoal \* significativo à nível de confiança 95%

Tabela 17 - Análise de variância e significância para a variável dependente Consumo de Açúcar, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  completo com três pontos centrais.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)Carvão (%)</b>	159,076*	1	159,0764	12,24459	0,012838
<b>(2)pH</b>	223,272*	1	223,2725	17,18596	0,006041
<b>(3)Temperatura</b>	4,8516	1	4,8516	0,37345	0,563551
<b>(4)Tempo (min)</b>	4,7257	1	4,7257	0,36375	0,568513
<b>Error</b>	77,9494	6	12,9916		
<b>Total SS</b>	469,875	10			

Fonte: Arquivo pessoal \* significativo à nível de confiança 95%

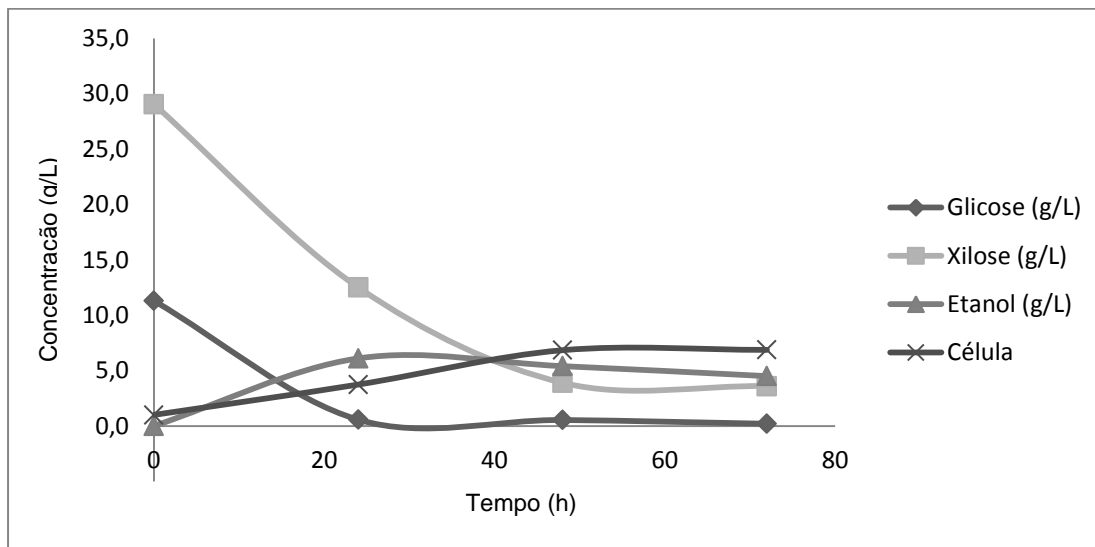
De acordo com os resultados da análise estatística, observou-se que os níveis de concentração de carvão ativado e pH nos tratamentos do hidrolisado hemicelulósico da casca de café devem ser ajustados para os níveis superiores, enquanto os demais, temperatura e tempo, podem ser mantidos sob níveis baixos devido à sua pequena influência no processo de síntese de etanol e consumo de açúcares. O teste confirmatório da fermentação com os respectivos níveis estão apresentados na Tabela 18 e Figura 26.

Tabela 18 – Resultado da fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Xilose (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Célula (g/L)</b>	<b>Y p/s (g/g)</b>
<b>0</b>	11,3	27,1	0,0	1,0	-
<b>24</b>	0,6	12,5	6,1	3,74	0,27
<b>48</b>	0,5	3,9	5,4	6,84	0,16
<b>72</b>	0,2	3,6	4,5	6,87	0,13

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 26 - Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2.



Fonte: Arquivo pessoal

Assim como foi observado no tratamento 4 e 8 do planejamento fatorial, a maior produção de etanol foi observada no período de 24 horas de fermentação, com um valor de  $Y_p/s$  de 0,16 g/g e produção total de 6,1 g/L de etanol neste período, seguido de um decréscimo ao longo da fermentação. Possivelmente, após este período, uma assimilação de parte do etanol produzido. Este comportamento sugere uma possível estratégia de sobrevivência, tendo em vista a baixa concentração de açúcar fermentescível no período após 48 horas, em que foi possível observar o decréscimo do produto ou uma possível interação quanto à aeração do meio, visto que o oxigênio dissolvido no meio favorece a assimilação do etanol (SKOOG *et al.*, 1992). Porém, diferente da maioria dos tratamentos propostos no planejamento estatístico fatorial e utilizando os níveis indicados pela análise estatística, foi possível observar um desempenho satisfatório quanto ao consumo de substrato e síntese de produto, considerando o fato da sobrevivência e atividade celular até o final do processo, visto que a levedura continuou seu crescimento até 72 horas de fermentação, fato este que anteriormente se encerrava antes mesmo das 24 primeiras horas de fermentação.

#### **5.4.2. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037**

A produção comercial de xilitol pode ocorrer por processo químico, porém a via biotecnológica de produção deste poliol vem sendo extensivamente estudada há décadas a fim de se obter rendimento semelhante ao proporcionado pelo processo químico e diminuir os altos custos dos processos de recuperação e purificação, que limitam a utilização comercial deste adoçante (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). Assim como realizado no item anterior com a levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, destinada a produção de xilitol, também foi cultivada inicialmente em meio Ágar Sabouraud 2% (Labsynth) pelo método Ágar Plate e armazenada em estufa incubadora a 30 °C durante 24 h. O inóculo foi cultivado em meio estéril, contendo (g/L): xilose, 30; peptona, 20; e extrato de levedura, 10; sob agitação de 200 rpm, a 30 °C. Após 24 horas, o cultivo foi interrompido e submetido à centrifugação a 2600 x g durante 10 minutos em tubos Falcon de 50 mL autoclavados. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com água destilada estéril.

As condições do planejamento fatorial também seguiram as mesmas condições e níveis descritos no ítem anterior, porém, nesta etapa, visando a produção de xilitol. Os fatores resposta considerados no estudo da fermentação do hidrolisado de casca de café foram descrito na Tabela 19. Para a realização dos cálculos também foi utilizou o tempo de 24 horas, tendo em vista um melhor desempenho na produção de xilitol, quando comparado ao tempo de 48 horas. Os valores quanto à porcentagem da assimilação de açúcares fermentescíveis no tempo de 24 e 48 horas, estão descritos na tabela Tabela 20. Os valores de  $Y_{p/s}$ , na síntese do xilitol, não foram incluídos como fator resposta ao planejamento devido a grande variação no consumo dos açúcares fermentescíveis, tornando o mesmo um possível falso positivo na escolha da melhor condição. Os respectivos valores da produção de xilitol e parâmetro fermentativo ( $Y_{p/s}$  e  $Q_p$ ), também no tempo de 24 e 48 horas, estão dispostos na Tabela 21.

Tabela 19 – Planejamento experimental  $2^{4-1}$ , com três pontos centrais, variando concentração de carvão ativo, pH, Temperatura e Tempo de reação de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de casca de café, submetido a processo de fermentação pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 para produção de xilitol.

Tratamento	Carvão (%)	pH	Temperatura	Tempo (min)	Xilitol (g/L)	Açúcar Consumido (%)
1	3	1	30	60	0,00	73,1
2	10	1	30	30	1,28	78,8
3	3	5	30	30	0,00	77,2
4	10	5	30	60	1,13	81,1
5	3	1	60	30	0,00	75,7
6	10	1	60	60	2,82	79,8
7	3	5	60	60	0,00	76,5
8	10	5	60	30	1,12	78,5
9	6,5	3	45	45	1,46	77,8
10	6,5	3	45	45	1,48	78,0
11	6,5	3	45	45	1,43	80,8

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 20 – Consumo (%) de açúcares fermentescíveis pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 nas diferentes condições de tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café.

Tratamento	Açúcares fermentescíveis consumidos (%)	
	24 h	48 h
1	3,87	28,85
2	17,74	55,74
3	31,29	60,60
4	66,45	65,56
5	3,55	46,01
6	16,13	50,88
7	13,23	69,47
8	66,77	85,59
9	41,29	58,60
10	37,10	60,76
11	35,48	58,27

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 21 – Síntese de xilitol e Yp/s da fermentação mediada pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 em diferentes condições de tratamento do hidrolisado hemicelulósico da casca de café.

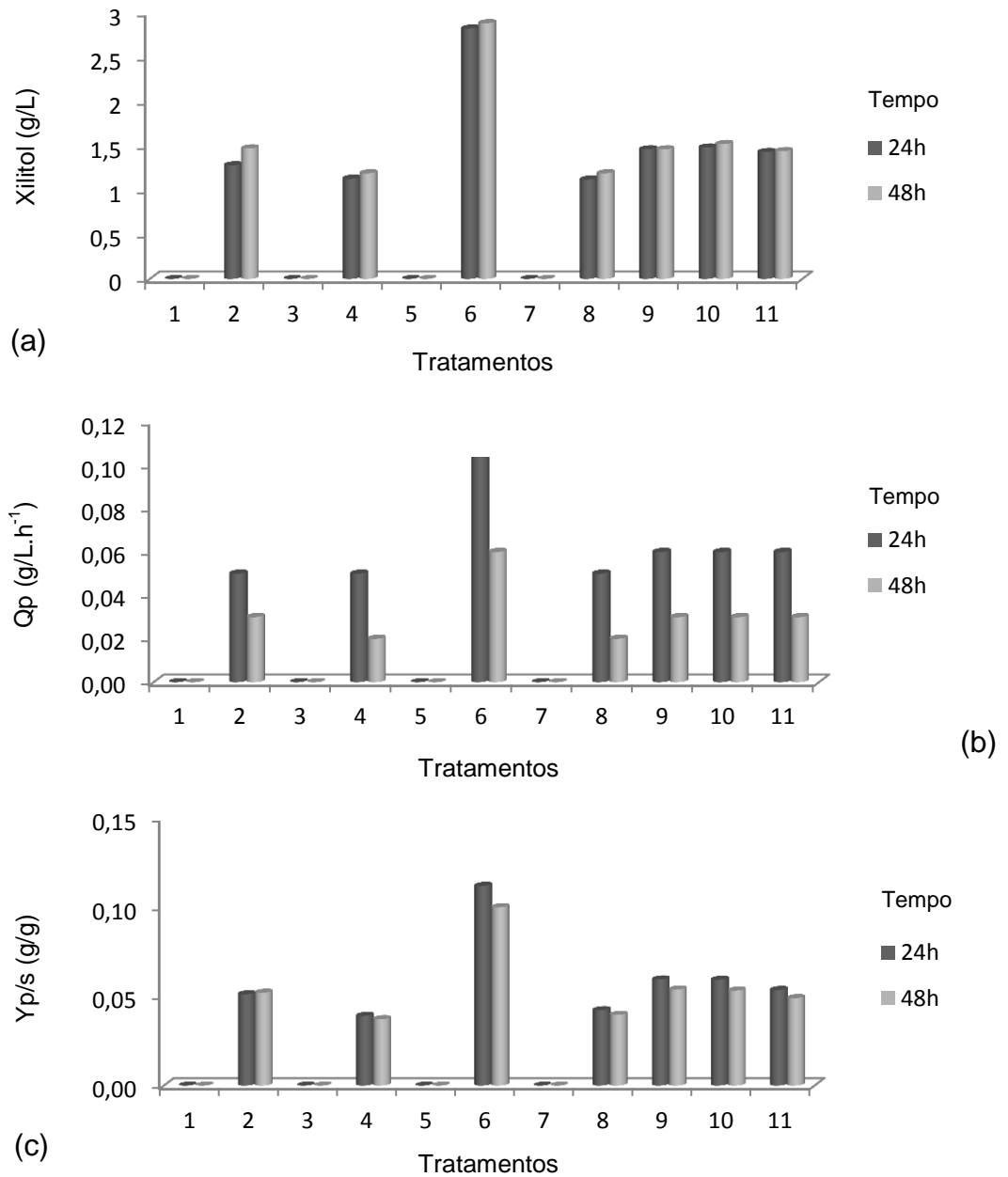
Tratamento	Xilitol (g/L)			Y p/s (g/g)		Qp (g/L.h <sup>-1</sup> )	
	0h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,0	1,28	1,47	0,05	0,05	0,05	0,03
3	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,0	1,13	1,19	0,04	0,04	0,05	0,02
5	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,0	2,82	2,88	0,11	0,10	0,12	0,06
7	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,0	1,12	1,19	0,04	0,04	0,05	0,02
9	0,0	1,46	1,46	0,06	0,05	0,06	0,03
10	0,0	1,48	1,52	0,06	0,05	0,06	0,03
11	0,0	1,43	1,44	0,05	0,05	0,06	0,03

Fonte: Arquivo pessoal

Vários micro-organismos são capazes de converter xilose em xilitol, destacando-se as leveduras, particularmente espécies de *Candida* sp., pela maior eficiência de conversão, conforme reportado por Winkelhausen e Kuzmanova (1998), em que este micro-organismo foi capaz de produzir até 37 g/L de xilitol. Entretanto o mesmo desempenho não foi observado no presente trabalho, no qual foi obtido a maior produção em 24 horas de fermentação com 2,82 g/L de xilitol, gerando um valor de Yp/s de 0,11 g/g e Qp de 0,12 g/L.h<sup>-1</sup>. A produção de xilitol e valores de Yp/s e Qp da fermentação dos hidrolisados hemicelulósico da casca de café pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 estão descritos na Figura 27 por meio de comparação entre 24 e 48 horas de fermentação.



Figura 27 – Produção de Xilitol e valores de  $Y_{p/s}$  e  $Q_p$  da fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos da casca de café pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

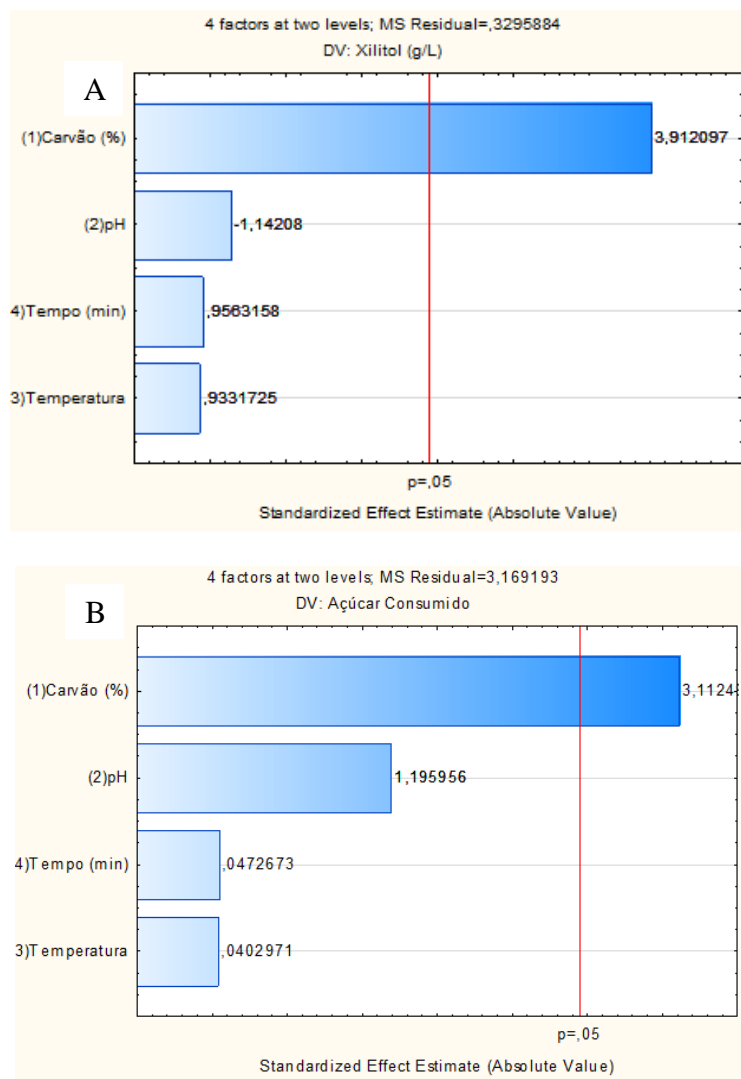


Fonte: Arquivo pessoal

Os resultados referentes a análise estatística do planejamento experimental  $2^{4-1}$ , variando concentração de carvão ativo, pH, temperatura e tempo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, fermentado pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 estão relatados na Figura 28 e Figura 29, evidenciando os resultados por meio de gráfico de pareto e superfície de resposta. Na Tabela

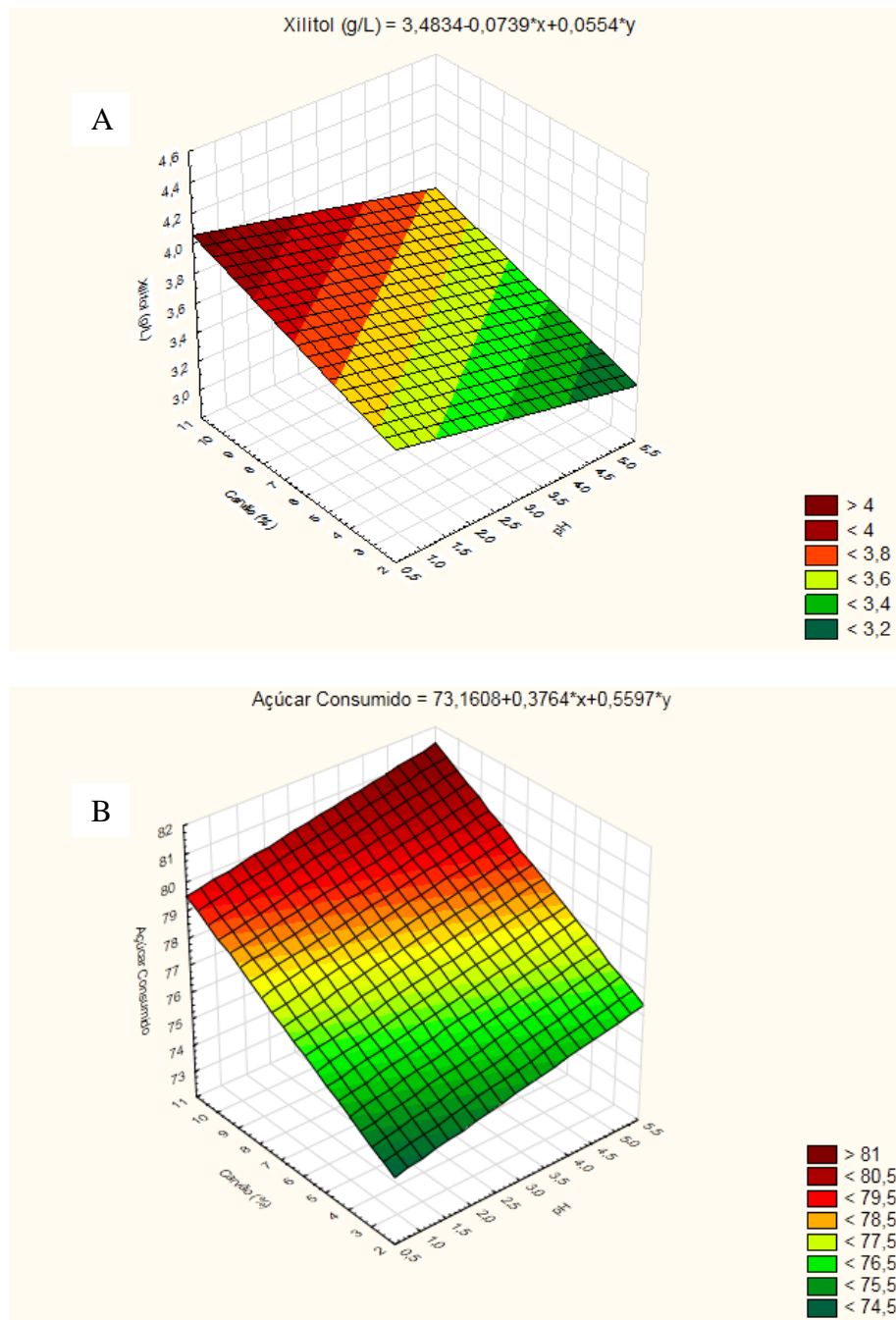
22 e Tabela 23 relata-se a análise de variância e significância para a concentração de xilitol e açúcar consumido, respectivamente, com a necessidade de se trabalhar com concentrações de carvão em nível alto, enquanto os demais fatores devem atuar de forma menos custosa.

Figura 28 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes concentração de xilitol (A) e Variável dependente Açúcar Consumido (B) de acordo com resultados da variável independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  completo com três pontos centrais.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta para a variável dependente Concentração de xilitol (A) e variável dependente açúcar consumido (B), de acordo com resultados das variáveis independentes pH e concentração carvão ativado, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  com três pontos centrais, visando a produção de xilitol por a partir de hidrolisado hemicelulósico da casca de café.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 22 - Análise de variância e significância para a variável dependente Concentração de xilitol, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  completo com três pontos centrais.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)Carvão (%)</b>	5,044187*	1	5,044187	15,30450	0,007873
<b>(2)pH</b>	0,429896	1	0,429896	1,30434	0,296941
<b>(3)Temperatura</b>	0,287009	1	0,287009	0,87081	0,386744
<b>(4)Tempo (min)</b>	0,301422	1	0,301422	0,91454	0,375841
<b>Error</b>	1,977530	6	0,329588		
<b>Total SS</b>	8,040044	10			

Fonte: Arquivo pessoal \* significativo à nível de confiança 95%.

Tabela 23 - Análise de variância e significância para a variável dependente consumo de açúcar, de acordo com resultados das variáveis independente pH, carvão ativo, tempo e temperatura, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^{4-1}$  completo com três pontos centrais.

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>(1)Carvão (%)</b>	30,70193*	1	30,70193	9,687618	0,020783
<b>(2)pH</b>	4,53293	1	4,53293	1,430311	0,276828
<b>(3)Temperatura</b>	0,00515	1	0,00515	0,001624	0,969164
<b>(4)Tempo (min)</b>	0,00708	1	0,00708	0,002234	0,963834
<b>Error</b>	19,01516	6	3,16919		
<b>Total SS</b>	54,26225	10			

Fonte: Arquivo pessoal \* significativo à nível de confiança 95%.

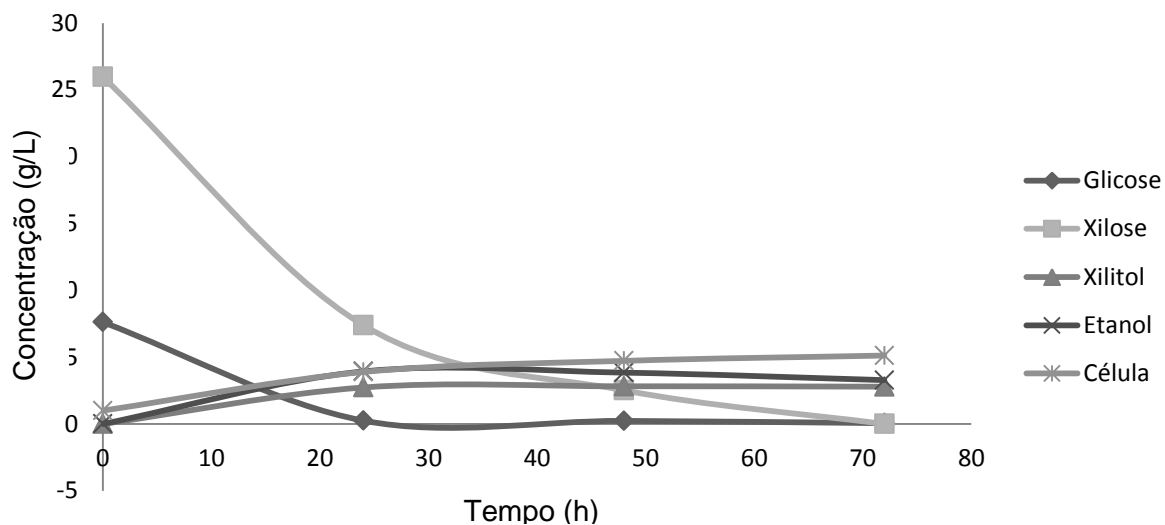
O teste confirmatório da fermentação com os respectivos níveis estão evidenciados anteriormente e expostos na Tabela 24 e Figura 30.

Tabela 24 – Resultado da fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café pela a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

<b>Fermentação - <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037</b>						
<b>Tempo (hr)</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Xilose (g/L)</b>	<b>Xilitol (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Célula (g/L)</b>	<b>Y p/s (g/g)</b>
<b>0</b>	7,62	25,97	-	-	1,0	-
<b>24</b>	0,25	7,39	2,73	3,93	3,89	0,27
<b>48</b>	0,23	2,52	2,82	3,84	4,72	0,16
<b>72</b>	0,06	0,00	2,79	3,28	5,12	0,13

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 30 - Fermentação do hidrolisado hemicelulósico da casca de café com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.



Fonte: Arquivo pessoal

O fator de bioconversão de açúcar fermentescível, mais especificamente a xilose, em xilitol pode ser influenciada por uma série de efeitos, os quais podem modificar o metabolismo da levedura, sendo possível citar fatores como pH do meio, tempo do inóculo (24 horas), temperatura (30); concentração de xilose (50-60 g/L) e relação glicose:xilose (1:5) (SILVA, 2006; FELIPE *et al.*,1997). Nesses casos, com exceção dos dois últimos, a concentração de xilose e a relação glicose:xilose, que no presente trabalho foram 30 g/L de concentração de xilose e a relação glicose:xilose foi de 1:3 (característica do hidrolisado hemicelulósico de casca de café), todos os demais parâmetros corroboraram com os descritos no presente estudo. Analisando as melhores condições sugeridas pela análise estatística, foi possível observar um consumo total dos açúcares (glicose e xilose) presentes no hidrolisado entre o período de 48 e 72 horas de fermentação, fato este ainda não alcançado neste estudo. A melhor produção de xilitol ocorreu no tempo de 48 horas de fermentação, entretanto com pouca variação quando comparado à produção observada no tempo de 24 horas de fermentação em que houve o menor valor de  $Y_p/s$  da reação com 0,27g/g de xilitol, seguido por 0,16 g/g em 48 horas e 0,13 g/g em 72 horas.

Novamente, mesmo seguindo as condições recomendadas pela análise estatística, houve produção de etanol durante a fermentação para xilitol, sendo produzido até 3,93 g/L de etanol em 24 horas. Houve também um notório crescimento da levedura durante as primeiras 24 horas, onde a massa celular quase quadruplicou sua concentração, evidenciando que o planejamento proposto para destoxificação do hidrolisado hemicelulósico proporcionou um favorável efeito ao crescimento celular.

## 5.5. PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Matérias primas de caráter lignocelulósico são amplamente utilizadas como substratos em processos biotecnológicos para a produção de etanol celulósico ou de outros compostos de valor agregado por apresentarem polímeros de açúcares em sua cadeia e por serem uma fonte de substrato de baixo valor (REDDY, 2005). Para tanto, a deslignificação alcalina é uma etapa fundamental para promover uma melhor área de contato da biomassa pré-tratada com o *pool* de enzimas celulolíticas. No presente estudo, a deslignificação da biomassa foi realizada em autoclave vertical, utilizando frascos Erlenmeyer de 1L contendo 60 g de casca de café, com 10% de umidade, solubilizadas em solução de hidróxido de sódio (NaOH), mantendo em todos os tratamentos a relação sólido/líquido 1:10. O estudo das melhores condições de deslignificação da casca de café para a hidrólise enzimática foi feito por meio de um planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 25), com 3 repetições no ponto central, tendo como variável independente o tempo (min) de tratamento e a concentração de hidróxido de sódio (mg/g). Os fatores resposta analisados foram a concentração de glicose (g/L) solubilizada em 24 horas e a biomassa recuperada (%).

A hidrólise enzimática da biomassa previamente deslignificada foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo a respectiva amostra na proporção 10% m/v, embebidos em solução tampão citrato 0,05 N. Para reação de sacarificação enzimática, foi adicionado a enzima comercial *Dyadic* (Dyadic Inc, Florida) na proporção de 20 FPU/ g de casca de café pré-tratada. A reação ocorreu a 200 rpm, à 50 °C, durante 48 horas.

Tabela 25 - Planejamento Fatorial  $2^2$  para determinar melhor condição de hidrólise alcalina da fração sólida, variando-se a concentração de NaOH (mg/g) e tempo (min) de tratamento para proporcionar uma maior concentração de glicose (g/L) no meio e biomassa recuperada (%).

<b>Tratamento</b>	<b>NaOH (mg/g)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Biomassa recuperada (%)</b>
<b>1</b>	100	60	25,73	55,0
<b>2</b>	200	60	26,50	41,0
<b>3</b>	100	100	24,11	51,5
<b>4</b>	200	100	28,24	39,3
<b>5</b>	150	80	25,23	42,8
<b>6</b>	150	80	28,55	42,6
<b>7</b>	150	80	29,17	42,8

Fonte: Arquivo pessoal

Foi possível observar a recuperação de glicose em 24 horas de hidrólise enzimática na casca de café submetida a diferentes condições de tratamento proposto no planejamento fatorial. Na Tabela 26 e Figura 31 observa-se valores referentes às 48 horas de hidrólise enzimática da casca de café previamente tratada com solução contendo hidróxido de sódio, destacando-se a maior quebra da cadeia celulósica e disponibilização das frações de glicose durante as primeiras 24 horas de reação.

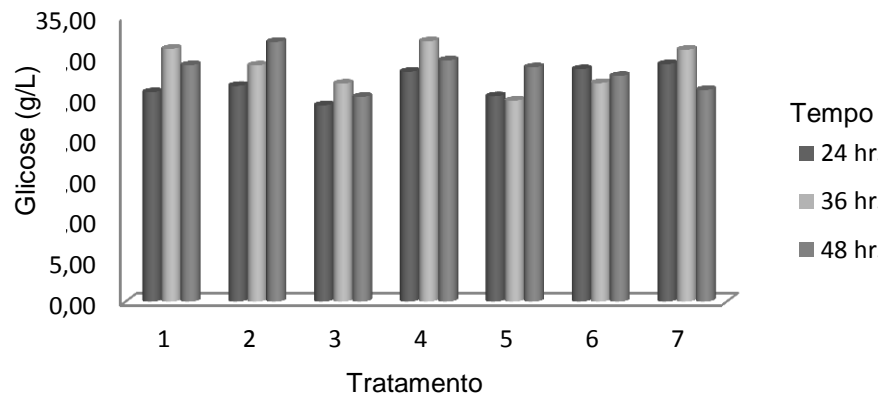


Tabela 26 – Concentração de glicose durante 48 horas de hidrólise enzimática da casca de café submetida a pré-tratamento alcalino com NaOH.

Tratamento	Glicose (g/L)			
	0h	24h	36h	48h
1	0	25,73	31,06	29,04
2	0	26,50	29,01	31,91
3	0	24,11	26,77	25,15
4	0	28,24	31,98	29,63
5	0	25,23	24,69	28,78
6	0	28,55	26,85	27,72
7	0	29,17	30,94	26,00

Fonte: Arquivo pessoal

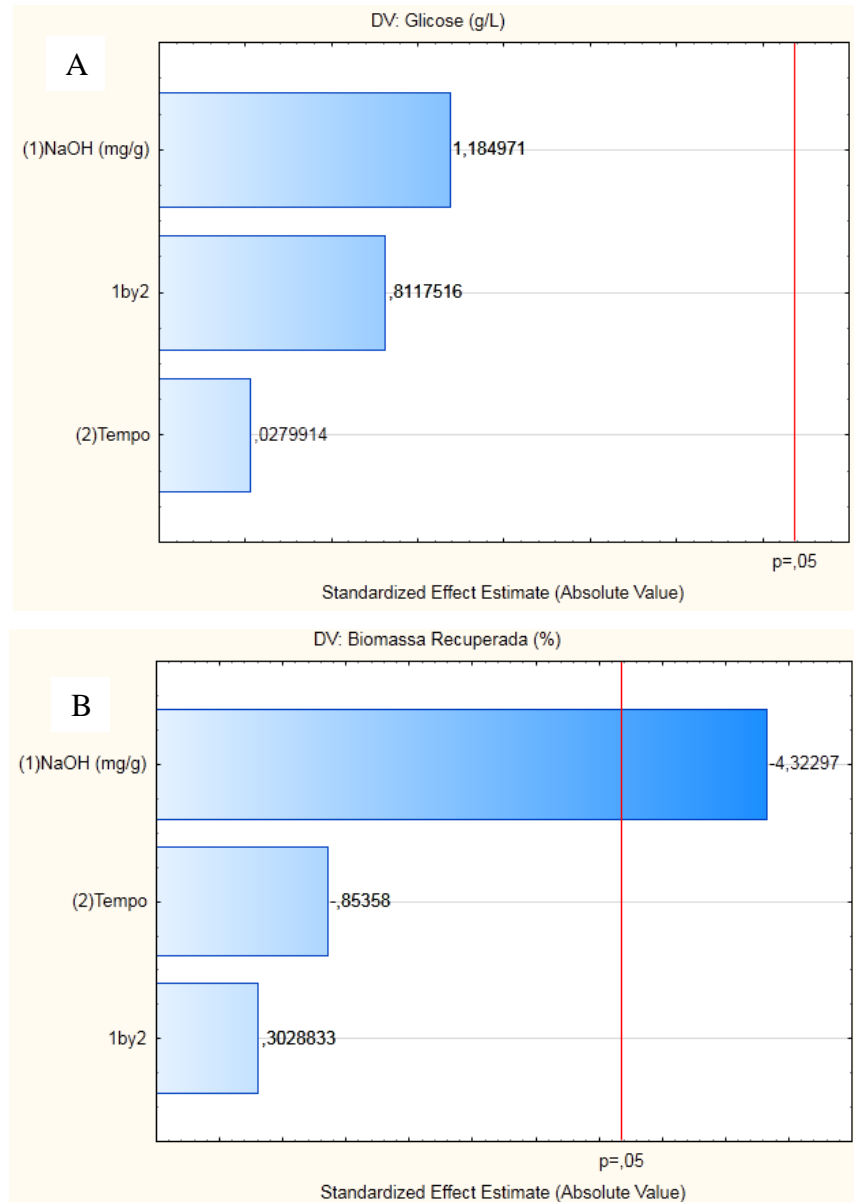
Figura 31 - Concentração de glicose (g/L) durante 48 horas de hidrólise enzimática da casca de café submetida a pré-tratamento alcalino com NaOH.



Fonte: Arquivo pessoal

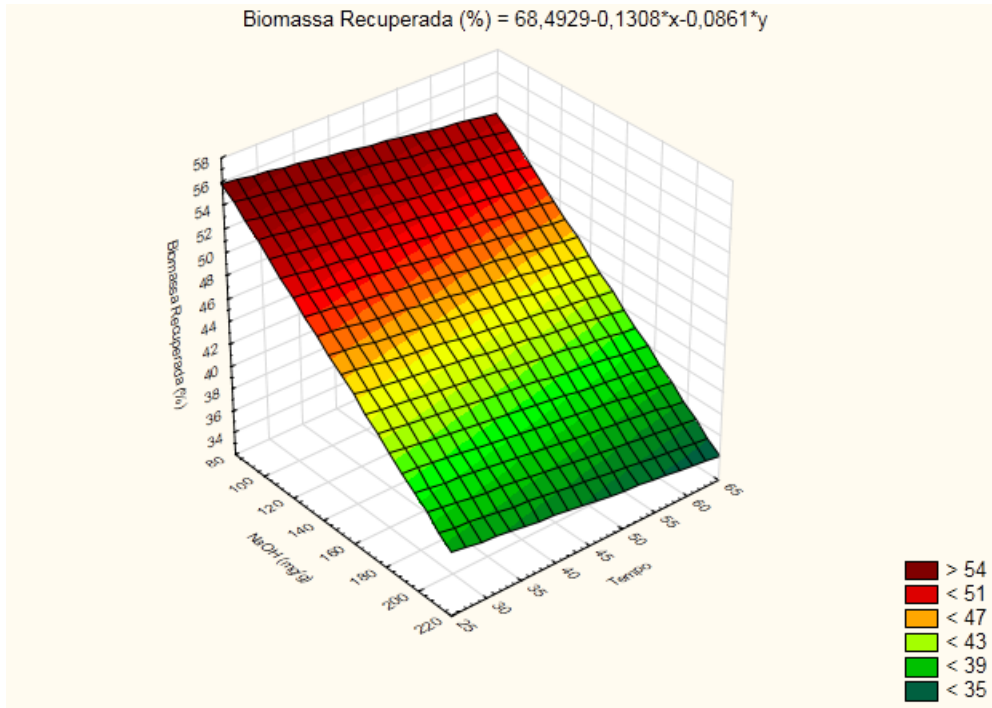
A análise do planejamento fatorial  $2^2$  está descrita na Figura 32 com gráficos de Pareto correspondente aos efeitos das variáveis concentração de NaOH (mg/g) e tempo (min) de reação às variáveis resposta glicose (g/L) e biomassa recuperada (%); Figura 33 apresentou a superfície de resposta correspondente à variável resposta biomassa recuperada (%); e a Tabela 27 referente à análise de variância e significância para o fator resposta biomassa recuperada (%). Observou-se que ao considerar apenas a variável resposta glicose (g/L), não houve diferença significativa entre cada tratamento, considerando que mesmo sob condições de pré-tratamento distintas, a obtenção de açúcar foi homogênea. Contudo, ao avaliar os resultados referentes ao fator resposta biomassa recuperada (%) foi possível observar significância quanto ao fator concentração de NaOH, sugerindo atuar sob condição ou nível baixo no processo.

Figura 32 - Gráfico de pareto com a variável dependente glicose (A) e variável dependente biomassa recuperada (B) de acordo com resultados das variáveis independentes concentração de NaOH e tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^2$  completo com três pontos centrais, visando a produção de etanol celulósico a partir de hidrolisado enzimático da casca de café.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 33 - Gráfico de superfície de resposta para a variável dependente biomassa recuperada de acordo com resultados das variáveis independentes concentração de NaOH e tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico  $2^2$  completo com três pontos centrais, visando a produção de etanol celulósico por a partir de hidrolisado enzimático da casca de café.



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 27 - Análise de variância e significância para as variável dependente Biomassa Recuperada de acordo com resultados das variáveis independentes Concentração de NaOH e Tempo, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2<sup>2</sup> completo com três pontos centrais, visando a produção de etanol celulósico por a partir de hidrolisado enzimático da casca de café.

	SS	df	MS	F	p
<b>(1)NaOH (mg/h)</b>	171,17*	1	171,173	18,688	0,0228
<b>(2)Tempo</b>	6,674	1	6,6736	0,72860	0,4560
<b>1 by 2</b>	0,840	1	0,8403	0,09174	0,781
<b>Error</b>	27,478	3	9,1595		
<b>Total SS</b>	206,16	6			

Fonte: Arquivo pessoal \* significativo à nível de confiança 95%.

### 5.5.1. Fermentação do hidrolisado enzimático da casca de café por SHF e SSF

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica requer pré-tratamentos químicos/enzimáticos para a hidrólise da celulose e da hemicelulose, liberando carboidratos (hexoses e pentoses), que posteriormente podem ser convertidos a etanol por micro-organismos fermentadores (ARO, 2012). Verificou-se em ambas as fermentações, que nas primeiras 12 horas de fermentação a maior parte da glicose foi assimilada, consumindo em torno de 75% do açúcar disponível, conforme se pode observar na Tabela 28. Na Figura 34 também foi possível observar o desempenho da levedura quanto ao consumo de glicose e síntese de etanol em ambos os métodos, SHF e SSF.

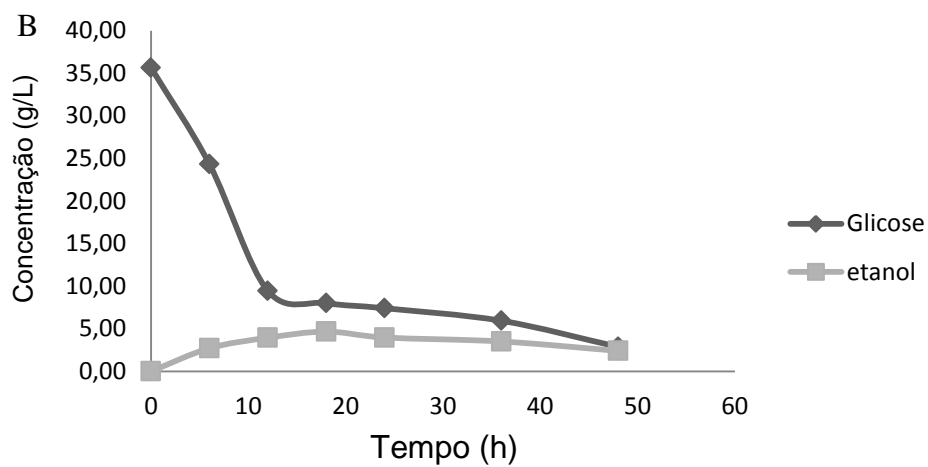
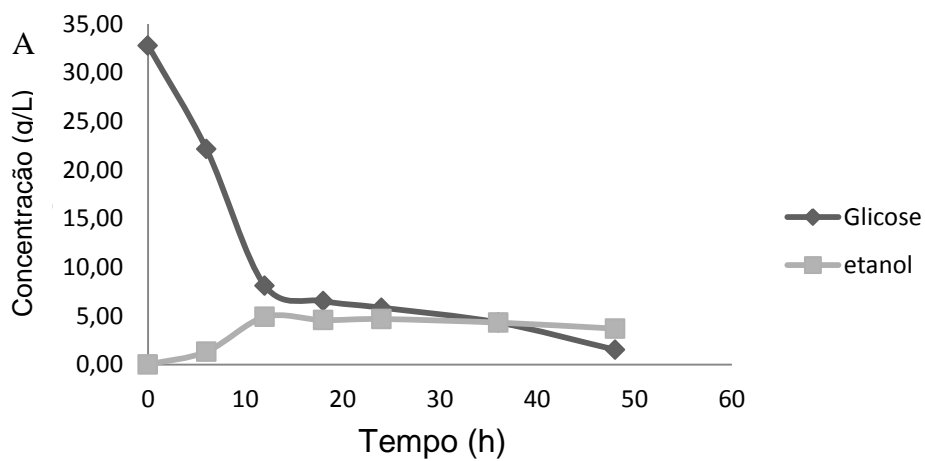
A maior produção de etanol na fermentação pelo método SHF foi observada no período de 12 horas de fermentação com um total de 4,89 g/L de etanol, apresentando também neste ponto o melhor resultado de Yp/s com 0,20 g/g de etanol produzido. O perfil fermentativo apresentado pelo método fermentativo SSF foi similar ao observado no método SHF, em que grande parte do substrato foi assimilado ainda nas primeiras 12 horas de fermentação. Entretanto, a maior produção de etanol foi observada após 18 horas de fermentação, com um total de 4,66 g/L de etanol produzido com um Yp/s de 0,17 g/g de etanol, sendo este o segundo melhor resultado neste ensaio, antecedendo apenas o valor de Yp/s de 6 horas de fermentação apresentando 0,24 g/g de etanol produzido. Navya (2013), obteve um total de 65,5 g/L de etanol por meio de SSF em casca de café previamente submetida a um pré-tratamento do tipo explosão a vapor seguida de hidrólise enzimática com celulase extraída a partir de fungo filamentosos.

Tabela 28 - Fermentação do hidrolisado enzimático da casca de café pelos métodos SHF e SSF, evidenciando o consumo da glicose, produção de etanol e Yp/s de ambos métodos de fermentação.

Tempo	SHF			SSF		
	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	Yp/s (g/g)	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	Yp/s (g/g)
0	32,78	0,00	0,00	35,64	0,00	0,00
6	22,14	1,33	0,12	24,32	2,71	0,24
12	8,10	4,89	0,20	9,45	3,94	0,15
18	6,52	4,56	0,17	8,00	4,66	0,17
24	5,84	4,67	0,17	7,40	3,97	0,14
36	4,31	4,30	0,15	5,93	3,50	0,12
48	1,52	3,68	0,12	2,86	2,40	0,07

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 34 - Fermentação do hidrolisado enzimático da casca de café pelos métodos SHF (A) e SSF (B), visando a produção de etanol celulósico.



Fonte: Arquivo pessoal

## 6. CONCLUSÕES

- A caracterização química da casca de café apresentou um elevado teor de extrativos quando comparado a outras biomassas, representando estes 38,05% da biomassa em estudo.
- Foi possível estabelecer condições adequadas de hidrólise ácida da casca de café, para produção de etanol e xilitol, sendo as variáveis pH e carvão ativado (%) significantes para a produção de etanol e apenas a variável carvão ativado para produção de xilitol;
- O método de destoxificação por *Liming* não contribuiu para um tratamento adequado do hidrolisado hemicelulósico da casca de café;
- As variáveis concentração de carvão ativado e pH foram significativas no tratamento do hidrolisado hemicelulósico, proporcionando maior produções de etanol por fermentação com a levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2;
- A variável concentração de carvão ativado foi significativa no tratamento do hidrolisado proporcionando maior produção de xilitol por fermentação com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037;
- Foi possível extrair glicose a partir da celulose da casca de café por meio de hidrólise enzimática da casca de café, previamente tratada com NaOH;
- Foi possível produzir etanol celulósico por meio dos processos fermentativos SHF e SSF, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* 174;
- A casca de café, preferencialmente, deve passar por processo para remoção de seus extrativos para posteriormente ser submetida a processos de pré-tratamento.



## 7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p.1515-1524, 2008.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.340-349, 2007.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851–4861, 2010.
- AMINOFF, C.; VANNINEN, E.; DOTY, T. Xylitol: occurrence, manufacture and properties. **Oral Health**, v.68, p.28–29, 1978
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.719–739, 2005.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.858-875, 2011.
- BAR, A. Xylitol. *in: alternative sweetener*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, p.349-379, 1991.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, Vanessa L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI - CG/EM). **Química Nova**, v.31, n.8, p.2035-2041, 2008.

BARCELOS, A. F.; PAIVA, P. C. A.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, V. B.; CARDOSO, R. M. Composição química da casca e polpa desidratada de café (*coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 2001, Vitória. Anais do II Simpósio de Pesquisas do Café do Brasil. Brasília: Embrapa, 2001.

BEKALO S. A, REINHARDT H. W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**; v.43, p.1049–60, 2010.

BLANCH, H. W.; ADAMS, P. D.; ANDREWS-CRAMER, K. M.; FROMMER, W. B.; SIMMONS, B. A.; KEASLING, J. D. Addressing the need for alternative transportation fuels: the Joint BioEnergy Institute. **ACS Chemical Biology**. v.3, n.1, p.17-20, 2008.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, v.3, 2001. 254p.

BOTHAST, R. J.; SAHA, B. C. Ethanol production from agricultural biomass substrates. In: NEIDLEMAN, S. L.; LASKIN, A. I. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**. v.44, p.261-286, 1997.

BROWNELL, H. H.; SADDLER, J. N. Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, p.228-235, 1987.

BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v.27, n.3, p.399-403, 2004.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S. ALMEIDA & SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. A. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.8, n.44, p.48-54, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.1467-1475, 2011.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4754-4766, 2010.

CECAFE. Resumo das exportações de café. <http://www.cecafe.com.br/Menu/noticias/noticias.asp> . Acesso em: 17/05/2013.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p.1947-1950, 2007.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; ARRUDA, P. V.; MILESSI, T. S. S.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State-of-the-art. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K.(eds), **D-Xylitol: fermentative production, application and commercialization**. Heidelberg: Springer, p.39-61, 2012.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.86, n.1, p.5-37, 2000.

Cafeicultura. Disponível em: <http://www.revistacafeicultura.com.br/>. Acesso em: 18/05/2013.

CONAB. Levantamento de safra. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>. Acesso em: 17/05/2013.

CONAB. Levantamento de safra. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_09\\_30\\_11\\_17\\_06\\_boletim\\_cafe\\_setembro\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_30_11_17_06_boletim_cafe_setembro_2015.pdf) . Acesso em: 20/11/2015

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n.44, p.48-54, 2010.

CHAUD, L. C. S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

- CHO, D. H.; SHIN, S. J.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y. H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.101, n.13, p.4947-4951, 2010.
- CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B., LÓPEZ CONTRERAS, A. M.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, n.6, p.741-755, 1999.
- CORREDOR, D. Y.; BEAN, S. R.; WANG, D.; Pretreatment and enzymatic hydrolysis of sorghum fiber. **Cereal Chemistry**, v.84, p.61-66, 2006.
- CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006
- DA SILVA, S. S.; VITOLLO, M.; PESSOA J. R. A.; FELIPE, M. G. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.36, n.3, p.187-191, 1996.
- DEDECCA, D.M. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arábica* L. var. Typica Cramer. **Bragantia**, v.16, p.315-355, 1957.
- DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-337, 2005.
- EMBRAPA. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/>. Acesso em: 19/05/2013.
- HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v.315, p.804-807, 2007.
- FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- FELIPE, M. G. A.; VITOLLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v.13, n.1-2, p.11-14, 1997.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FERREIRA, A. D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FONSECA, B.D. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de Cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.2-12, 2009.

GALBE, M., AND ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.59, v.6, p.618-28, 2002.

GAMBARATO, B. C. **Estabelecimento e Validação de Modelos de Oxidação de Ligninas**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LULASIK. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, n.6, p.1-7, 2008.

GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Química Nova**, v.32, n.3, p.582-587, 2009.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1500-1503, 2009.

GONZÁLEZ-BENITO, G.; RODRÍGUEZ-BRAÑA, L.; BOLADO, S.; COCA, M.; GARCÍA-CUBERO, M.T. Batch ethanol fermentation of lignocellulosic hydrolysates by *Pichia stipitis*. Effect of acetic acid, furfural and HMF. **New Biotechnology**, v.25, p.261, 2009.

GUTMAIS, G. **Modulação do gene *ugp* e análise das alterações na composição dos carboidratos da parede celular primária e secundária de**

***Nicotiana tabacum e Eucalyptus grandis***. 2008. 142 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, GEERTJE.; FAAJI, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v.28, p.384-410, 2005.

HAHN-HAGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GARDONYL, M.; VAN ZYL, W. H.; CORDERO OTERO, R. R.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.73, p.53-84, 2001.

HAHN-HAGERDAL, B. Bio-ethanol - The fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v.24, n.12, 2006.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10–18, 2009.

IRANMAHBOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimizing acid hydrolysis: A critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass and Bioenergy**, v.22, p.401-404. 2002

JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: **Pentoses and Lignin**. Berlin: Springer, v.27, p.1-32, 1983.

KIM, S. B.; KIM, H. J.; KIM, C. J. Enhancement of the enzymatic digestibility of waste newspaper using Tween, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.129-132, p.486-495, 2006.

KIM, S. B.; LEE, J. H.; OH, K. K.; LEE, S. J.; LEE, J. Y.; KIM, J. S.; KIM S. W. Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p.725-732, 2011.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.35, n.4, p.717-723, 1997.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. p.1081–1099, 2005.

LIMA, G. S.; MANHÃES, J. H. C.; PESSOA, T. N.; MIGUEL, D. L.; SIMÕES, M. L. G. Utilização de casca de café como substrato para produção de celulase por *Trichoderma* spp. In: **VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2013.

- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.69, p.627-642, 2006.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R, S. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v.32, p.582-595, 2008.
- MÄKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol?. **Medical Hypotheses**, v.54, p.603-613, 2000.
- MAMMAN, A. S.; LEE, J. M.; KIM, Y. C.; HWANG, I. T.; PARK, N. J.; HWANG, Y. K.; CHANG, J. S.; HWANG, J. S. Furfural: Hemicellulose/xylose - derived biochemical. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.2, p.438-454, 2008.
- MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de- açúcar. 2009.** 142 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*.** 2005. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- MARTIN, C.; ALRIKSSON, B.; SJÖDE, A.; NILVEBRANT, N. O.; JÖNSSON, L. J. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137-140, p.339-352, 2007.
- MATIELLO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo.** São Paulo: Globo, 1991. 320p.
- MENDONÇA, R. F.; RODRIGUES, W. N.; MARTINS, L. D.; TOMAZ, M. A. Abordagem sobre a bienalidade de produção em plantas de café. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, p.1-9, 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426-428, 1959.
- MINISTERIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 21/05/2013.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, n.6, p.673-686, 2005.

MOUTTA, R. O.; CHANDEL, A. K.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, M. B.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, S. S. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Technology**, v.14, n.1, p.53-60, 2012.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43, p.124-129, 2007.

NAIDU, M. M.; MURTHY, P. S. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.3, p.897-903, 2010.

NAVYA, P. N.; PUSHPA, S. M. Production, statistical optimization and application of endoglucanase from *Rhizopus stolonifer* utilizing coffee husk. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.36, n.8, p.1115-1123, 2013.

NARCISO, G. V.; SIMIONATO, K. P.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Avaliação da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em função de diferentes fatores de concentração do hidrolisado. In: 7º Congresso Nacional de Iniciação Científica e 5º Congresso Internacional de Iniciação Científica, **Anais do CONIC - SEMESP e do COINT-SEMP**, 2007.

ÖHGREN, K.; BURR, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, 98, p. 2503–2510, 2007.

International Coffee Organization. Disponível em: <http://www.ico.org/>. Acesso em: 19/05/2013.

OLIVEIRA, V. D.; FIALHO, E. T.; LIMA, J. A. F.; OLIVEIRA, A. I. G. D.; FREITAS, R. T. F. D. Substituição do milho por casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação, **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.424-436, 2001.

OLIVEIRA, W. E.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; ROCHA S. D. Untreated coffee husks as biosorbents for the removal of heavy metals from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, v.152, p.1073-1081, 2008.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysate. **Process Biochemistry**, v.28, p.249-257, 1993.



- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *in*: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.24, p.25-33, 2000.
- PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, N. J. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1069-1079, 2005.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN,.; MOHAN, R. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**. v.6, n.2, p.153-162, 2000a.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Biosource Technology**, v.74, p.69-80. 2000b.
- PARAJÓ, J. C.; Dominguez, H.; Dominguez, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66, p.25-40. 1998.
- PASHA, C.; KUHAD, R. C.; RAO, L. V. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS strain for better utilization of lignocellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.5, p.1480-1489, 2007.
- PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v.33, n.5, p.834. 2009.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO J.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose, and lignin: an overview. **International Microbiology**, v.5, p.53-63, 2002.
- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana- de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 142 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- PULS, J.; POUTANEN, K.; KORNER, H. U.; VIIKARI, L. Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.22, n.6, p.416-423, 1985.
- PULS, J.; SCHUSEIL, J. Chemistry of hemicellulose: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *In*: **Coughlan MP**,

**Hazlewood GP**, editors. Hemicelluloses and Hemicellulases. Portland Press; London, p.1-27, 1993.

QUÍMICA. Química sintética. Disponível em: <http://www.quimica.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1667&evento=5>. Acesso em: 08/07/2015.

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e gl.10<sup>1</sup>**. 2010. 262 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications, **Trends in Biotechnology**, v.23, n.1, p.22-27, 2005.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p.26-40, 1985.

DEL RÍO, J. C.; GUTIÉRREZ, A.; HERNANDO, M.; LANDÍN, P.; ROMERO, J.; MARTÍNEZ, A. T. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v.74, p.110-115, 2005.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v.17, p.171-6, 2003.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.633-670, 2011.

RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.454, p.841-846, Agosto 2008.

SADDLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L. P.; LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p. 1389-1404, 1982.

SÁNCHEZ, O. J; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270-5295, 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.

- SAHA, B.; BOTHAST, R.; Enzymology of xylan degradation. In: IMAM, S. H.; GREENE, R. V.; ZAIDI, B. R. **Biopolymers**: utilizing nature's advanced materials. American Chemical Society, Washington, 1999. p.167-194.
- SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v.35, n. 5, p.1004-1010, 2012.
- SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATTO, S. I.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v.40, p.113-118, 2005.
- SARROUH, B. F. **Estudos da Produção Biotecnológica de Xilitol em Reator de Leito Fluidizado Utilizando Bagaço de cana-de-açúcar e Células Imobilizadas: Avaliação de Parâmetros Operacionais e Viabilidade Econômica**. 2009. 185 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.
- SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v.99, n.8, p.2898-2904, 2008.
- SELEGHIM J.R; POLIKARPOV, I. Desafios para transformar conceitos em realidade. **Scientific American Brasil**, n.87, p.32-37. 2009.
- SINDICAFE: Disponível em: <http://www.sindicafesp.com.br/>. Acesso em: 20/05/2013.
- SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteus reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- SHEVCHENKO, S. M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion enzymatic hydrolysis of softwood – Structural features and possible uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.79; n.1-3, p.876, 1999.
- SILVA, J. P. **Caracterização da casca de café (*coffea arábica*, L) in natura, e de seus produtos obtidos pelo processo de pirólise em reator mecanicamente agitado**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SILVA, N. L. C., **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**, 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.28, n.1, p.151-156, 2011.

SILVA, N. L. C.; BASTOS, H. B.; BETANCUR, G. J. V.; MAEDA, R. N.; PEREIRA JR, N. Produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas residuais da indústria de celulose. *In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2009.

SILVA, C. J. S. M.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench reactor. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.115-119, 2006.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A.; FELIPE, M. G. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities by xylose-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.36, n.3, p.187-191, 1996.

SKOOG, K.; JEPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34, p.369-375, 1992.

SOCCOL, C. R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. *In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL*. v.1, p.83-98, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, p.1-11, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920 p.

ÚNICA. Disponível em <http://www.unica.com.br/unica.php>. Acesso em: 20/05/2013.

VALE, A. T.; GENTIL, L. V.; GONÇALEZ, J. C.; COSTA, A. F. Caracterização energética e rendimento de carbonização e resíduos de grãos de café (*coffea arábica*) e de madeira (*Cedrelinga catenaeformis*), DUKE. **Revista Cerne**, p. 416-420, 2007.

- VILELA, F. G.; PEREZ, J. R. O.; TEIXEIRA, J. C.; REIS, S. T. Uso da casca de café melosa em diferentes níveis na alimentação de novilhos confinados, **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.198-205, 2001
- VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.90, n.4, p.391-418, 2006.
- VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.
- VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; de SOUZA Jr., M. B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137-140, n.12, p.141-154, 2007.
- VIEIRA, G. E. G.; PICKLER, A.; CASTRO, J. G. D; CARDOSO, A. S.; FIGUEIREDO, R. L.; SILVEIRA, A. S.; MILHOMEM, C. C.; LEAL, E. R. M.; PEDROZA, M. M.; MAFRA, W. A.; SILVA, F. C.; LIMA, M. M.; CARVALHO, M. B.; BOAS, V. F. V. Obtenção de etanol a partir do mesocarpo de babaçu (*Orbignya* sp.). In: **2º SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOCOMBUSTÍVEIS**, 2009.
- WILSON, D. K.; KAVANAGH, K. L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo-keto reductases and opportunities for protein engineering. **Chemico-Biological Interactions**, v.143-144, p.515-521, 2003.
- WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.861, p.14, 1998.
- WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.; LEE, Y. Y. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. **Bioresource Technology**, v.96, n.18, p.2026-2032, 2005.
- XIA, L., SHEN, X. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, v.91, n.3, p.259-262, 2004.

ZHANG, Y. H. P., HIMMEL, M. E., MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-481, 2006.