



EVANDRO GALVÃO TAVARES MENEZES

**PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO ÚMIDO DO
CAFÉ**

LAVRAS - MG

2012

EVANDRO GALVÃO TAVARES MENEZES

**PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO ÚMIDO DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Fabiana Queiroz

Coorientador

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Menezes, Evandro Galvão Tavares.

Produção de etanol utilizando resíduos do processamento úmido
do café / Evandro Galvão Tavares Menezes. – Lavras : UFLA, 2012.
235 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Fabiana Queiroz.

Bibliografia.

1. Polpa de café. 2. Celulose. 3. Hidrólise enzimática. 4. Pré-
tratamento alcalino. 5. Fermentação. 6. Bioetanol. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 662.88

EVANDRO GALVÃO TAVARES MENEZES

**PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO ÚMIDO DO CAFÉ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2012.

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves UFLA

Dra. Maria Lucia Bianchi UFLA

Dra. Evelyn de Souza Oliveira UFMG

Dra. Fabiana Queiroz
Orientadora

LAVRAS - MG

2012

A Deus, por ter sido meu alicerce, permitindo, através de pequenos passos, que eu alcançasse todos meus objetivos.

Aos meus pais, por sempre acreditarem no meu potencial.

E a todos que torceram por mim nesta caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que conquistei e por me dar força para vencer todos os desafios.

A minha mãe, Helena, por ser minha inspiração, um exemplo de vitória, sabedoria e dedicação e ao meu pai, Hugo, pela amizade e a certeza de que sempre poderei contar com alguém em todos os momentos da minha vida.

A Aline, minha irmã, por ser minha companheira na madrugada da UFLA e amiga em todos os momentos.

A minha namorada, Edimila, por tanto carinho, compressão e por ter sido tão importante na minha formação pessoal.

À Universidade Federal de Lavras, que me proporcionou a oportunidade de fazer o mestrado no Departamento de Ciências de Alimentos.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

À EMBRAPA Café, pelo financiamento do projeto.

A empresas Luziânia por ceder o melaço utilizado nas pesquisas, a Novozymes por ceder gentilmente a enzimas.

Ao departamento de biologia da UFLA principalmente a professora Rosane Freitas Schawn pelo disponibilização das leveduras.

Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos que colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Fabiana Queiroz, por toda paciência e ensinamentos prestados. Ao professor José Guilherme Lembi Ferreira Alves, que me ensinou os primeiros passos na universidade e até hoje faz parte da minha vida acadêmica.

Ao professor Carlos José Pimenta ,por ter me confiado este projeto.

Às professoras Maria Lúcia Bianchi e Evelyn Souza de Oliveira, por ter disponibilizado seu tempo para participarem da defesa da dissertação.

Às técnicas Tina e Flávia, por terem ajudado em diversas análises.

A Creuza, por ter sido uma verdadeira mãe, por ter mostrado que, mesmo nos piores momentos, nada como um bom caso e uma boa risada.

Ao amigo André e ao Departamento de Química, por me ajudar com as análises cromatográficas.

A Juliana, pela tão valiosa ajuda em todas as etapas deste trabalho e pela amizade formada.

Às meninas do laboratório, Grazy, Mariane, Vanessa e Ana, por terem me ajudado tanto e pela amizade formada nesses dois anos de convivência.

Aos amigos Isabela, Deyckson, Renato, Moises, Gerson e aos demais amigos da UFLA, por tudo de bom que vivemos nesses anos de convivência.

Aos amigos de República, Rilson e Edinaldo, pelo companherismo.

Aos amigos Talles, Eric, Júlio, Tamires, Anirene e demais amigos de Nepomuceno, que tanto torceram por mim.

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade do uso da polpa de café gerada durante o processamento úmido na produção de bioetanol. O primeiro passo foi a caracterização da polpa de café, sendo verificada a existência de consideráveis concentrações de açúcares redutores e celulose, os quais poderiam ser aproveitados na fermentação alcoólica. A polpa de café foi submetida a diferentes processos de extração dos componentes solúveis, sendo o de melhor eficiência o que envolvia trituração a frio e prensagem. O extrato obtido foi utilizado sozinho e como diluente do caldo de cana-de-açúcar e de melaço para formar o meio da fermentação. Pelos resultados, ficou evidente que a utilização de extrato não tem efeitos prejudiciais na fermentação alcoólica. A polpa de café prensada foi submetida ao pré-tratamento alcalino, utilizando-se hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio e, como reator, uma autoclave, a 121 °C, com o objetivo favorecer a hidrólise enzimática. Por meio dos resultados demonstrou-se que, para a polpa de café, o tratamento com hidróxido de sódio foi mais eficiente. Após a escolha do melhor pré-tratamento, a polpa foi submetida a ensaios de hidrólise enzimática. Esta etapa foi realizada para que concentrações ideais de massa (polpa de café pré-tratada) e de enzimas celulasas e celobiasas fossem selecionadas, aumentando, assim, a concentração de glicose no meio. Escolhidas as melhores condições de hidrólise, o meio foi submetido à fermentação por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT 1. Por meio dos resultados obtidos pode-se demonstrar que a polpa de café pode ser utilizada para a produção de bioetanol, com isso agregando valor a um resíduo agroindustrial.

Palavras-chave: Polpa de café. Celulose. Pré-tratamento alcalino. Hidrólise enzimática. Fermentação. Bioetanol.

ABSTRACT

This work was conducted with the purpose of evaluating the viability of the use of coffee pulp generated during the moist processing in bioethanol production. The first step was the characterization of coffee pulp, the existence of marked concentrations of reducing sugars and cellulose being found, which could be used in alcoholic fermentation. Coffee pulp was submitted to different processes of extraction of soluble components, the one of best efficiency being that which involved cold grinding and expelling. The extract obtained was utilized singly and as a diluent of the sugar cane juice and of molasses to form the fermentation medium. From the results, it was evident that the use of extract has no harmful effects in alcoholic fermentation. The expelled coffee pulp was submitted to the alkaline pre-treatment by utilizing sodium hydroxide and calcium hydroxide and, as a reactor, an autoclave at 121 °C, with the aim of furthering enzymatic hydrolysis. By means of the results, it was demonstrated that for the coffee pulp, the treatment with sodium hydroxide was the most efficient. After the choice of the best pre-treatment, the pulp was submitted to the enzymatic hydrolysis assays. This step was undertaken for the ideal concentrations of mass (pre-treated coffee pulp) and of enzymes cellulases and cellobioses to be selected, increasing thus the concentration of glucose in the medium. Chosen the best hydrolysis conditions; the medium was submitted to the fermentation by yeasts *Saccharomyces cerevisiae* CAT 1. By means of the results obtained, one can demonstrate that coffee pulp can be utilized for bioethanol production, from that, adding value to an agroindustrial residue.

Keywords: Coffee pulp. Cellulose. Alkaline pre-treatment. Enzymatic hydrolysis. Fermentation. Bioethanol.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Fluxograma dos experimentos realizados	20
Figura 1	Estrutura do grão de café	25
Figura 2	Parede celular vegetal	34
Figura 3	Fórmula estereoquímica da Celulose (ZHANG; YANG;BEARIETE 2011)	35
Figura 4	Fórmula estereoquímica das hemiceluloses (ZHANG; YANG;BEARIETE 2011)	37
Figura 5	Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica (HSU et al.,1980)	41
Figura 6	Mecanismo da hidrólise da celulose por ação do ácido	51
Figura 7	Representação esquemática da ação catalítica das celulases	54
Figura 8	Formas de produção de etanol a partir de material lignocelulósico ...	56

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Figura 1	Consumo de açúcares redutores totais durante a fermentação do caldo de cana diluído com água (F1) e diluído com extrato de polpa de café (F2)	95
Figura 2	Consumo de açúcar na fermentação do melaço diluído com água destilada (Tratamento F3) e diluído com extrato de polpa de café (Tratamento F4)	96
Figura 3	Consumo de açúcar na fermentação do extrato da polpa de café (Tratamento F5)	97
Figura 4	Evolução do pH durante a fermentação do caldo de cana diluído com água (F1) e diluído com extrato de polpa de café (F2); e da fermentação do melaço diluídos com água (F3) e extrato de polpa de café (F4)	98
Figura 5	Evolução do pH durante a fermentação do extrato da polpa de café	100
Figura 6	Produção de etanol a partir de meio com caldo de cana-de-açúcar diluído em água (F1) e diluído com extrato da polpa de café (F2) ..	101
Figura 7	Produção de etanol a partir de meio com melaço diluído em água (F3) e diluído com extrato da polpa de café (F4)	103
Figura 8	Produção de etanol a partir do extrato da polpa de café (F5).....	104

ARTIGO 2

Figura 1	Curvas de contorno para o teor de celulose residual para pré-tratamento da polpa de café	151
Figura 2	Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta porcentagem de celulose remanescente na polpa de café pré-tratada	152
Figura 3	Curvas de contorno para o teor de hemicelulose residual presente na matéria pré-tratada.....	154
Figura 4	Curva de contorno para o teor eficiência do pré-tratamento alcalino da polpa de café.....	156
Figura 5	Curvas de contorno para o teor de açúcares redutores.....	164
Figura 6	Curvas de contorno para glicose	166

ARTIGO 3

Figura 1	Hidrolise enzimática da polpa de café pré-tratada com diferentes quantidades de massa	195
Figura 2	Curva de contorno do hidrolisado tendo como resposta o teor de açúcares redutores.....	204
Figura 3	Curva de contorno do hidrolisado tendo como resposta o rendimento	204

ARTIGO 4

Figura 1	Gráfico de concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose durante a fermentação	228
----------	---	-----

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Produção estimada do café safra 2010, em mil sacas de 60 kg.....	22
Tabela 2	Composição da Polpa de Café (em base seca).....	27

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1	Teores médios e desvio padrão para teores de pectinas, polifenóis, amido e açúcares da polpa e dos extratos da polpa de café, em base úmida.....	91
Tabela 2	Contagem de células para os tratamentos de fermentação F1, F2, F3, F4 e F5 sendo os valores expressos em 10^8 células/mL.....	106
Tabela 3	Crescimento celular durante a fermentação em g de massa seca/L de meio.....	109
Tabela 4	Fatores de conversão Y_p/s e Y_x/s , eficiência fermentativa e produtividade em etanol.....	110

ARTIGO 2

Tabela 1	Níveis do Planejamento experimental para otimização do pré-tratamento alcalino da polpa de café.....	131
Tabela 2	Teores dos constituintes da polpa de café, em porcentagem, dados baseados na matéria seca (MS).....	139
Tabela 3	Rendimento em massa do pré-tratamento ($Rend_{massa}$) e as porcentagens de celulose (RC), lignina (RL) e hemicelulose (RH) remanescentes na polpa de café pré-tratada sendo os resultados expressos em porcentagem e eficiência do pré-tratamento.....	141
Tabela 4	Resultados dos coeficientes da equação para as porcentagens de celulose (RC), de lignina (RL) e de hemiceluloses remanescentes	147
Tabela 5	Resultados dos coeficientes da equação para eficiência do pré-tratamento.....	148
Tabela 6	ANOVA para o teor residual de celulose, hemicelulose e lignina..	149
Tabela 7	Teores de açúcares redutores totais e redutores, glicose e rendimento da hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada segundo planejamento fatorial DCCR, acrescido de dois ensaios (18 e 19).	158
Tabela 8	Resultados dos efeitos e coeficientes da equação sobre o teor de açúcares redutores	161

Tabela 9	ANOVA para o teor de açúcares redutores e teor de glicose da polpa de café pré-tratado e submetido a hidrólise.....	162
----------	---	-----

ARTIGO 3

Tabela 1	Níveis do Planejamento experimental para otimização da hidrólise enzimática da polpa de café	185
Tabela 2	Constituintes da polpa de café antes e após pré-tratamento com hidróxido de sódio determinados por caracterização química. Os resultados foram expressos em % da biomassa em base seca.....	190
Tabela 3	Rendimento em massa e teores remanescentes de celulose, lignina e hemicelulose, para os pré-tratamentos envolvendo substâncias alcalinas e contendo apenas água destilada.....	192
Tabela 4	Açúcares redutores, redutores totais e glicose dos tratamentos após 72h de hidrólise enzimática	197
Tabela 5	Teores de açúcares redutores totais e redutores, glicose e rendimento da hidrólise dos tratamentos.....	198
Tabela 6	Efeitos e coeficientes da equação sobre o teor de açúcares redutores e rendimento de glicose	202
Tabela 7	ANOVA para teores de açúcares redutores (AR) e rendimento	203

ARTIGO 4

Tabela 1	Constituintes da polpa de café antes e após pré-tratamento com hidróxido de sódio determinados por caracterização química	224
Tabela 2	Teores de açúcares redutores, glicose e rendimento da conversão da celulose em glicose.....	226
Tabela 3	Resultados dos teores de etanol, rendimento da conversão de glicose em etanol (Yp/s) e eficiência fermentativa (Ef).....	229

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	17
	INTRODUÇÃO GERAL	17
1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Café	21
2.1.1	Tipo de processamento e resíduos	23
2.1.2	Composição da polpa de café	24
2.1.3	Utilizações dos resíduos do café	28
2.2	Fermentação alcoólica	28
2.3	Biomassa lignocelulósica	34
2.3.1	Celulose	35
2.3.2	Hemiceluloses	36
2.3.3	Lignina	37
2.3.4	Extrativos e outros compostos	37
2.4	Pré-Tratamento de materiais lignocelulósicos	38
2.4.1	Pré-tratamento físico	42
2.4.2	Pré-tratamento biológico	44
2.4.3	Pré-Tratamentos químicos	46
2.5	Sacarificação da celulose	50
2.6	Processos de hidrólise e fermentação	55
4	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	61
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	74
	ARTIGO 1 Utilização do extrato da polpa de café para a produção de álcool	75
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1	Matéria-prima	82
2.2	Processo de obtenção do extrato da polpa de café	82
2.2.1	Análises dos extratos da polpa de café	83
2.3	Processo fermentativo	84
2.3.1	Microrganismo	85
2.3.2	Planejamento experimental	85
2.3.3	Preparo do inóculo	86
2.3.4	Fermentação do mosto	86
2.3.5	Análises do processo fermentativo	87
2.3.5.1	Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer	87
2.3.5.2	Contagem de células em placa	87
2.3.5.3	Massa seca ou biomassa	87

2.3.5.4	Açúcares Redutores Totais (ART)	88
2.3.5.5	Teor de etanol	88
2.3.10	Conversão do substrato em etanol ($Y_{p/s}$) e Eficiência Fermentativa (E_f)	88
2.3.11	Conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$)	89
2.3.12	Produtividade em etanol	90
2.4	Análise estatística	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.1	Processo de extração	91
3.2	Fermentação	94
3.2.1	Açúcares redutores totais (ART)	94
3.2.2	Potencial hidrogeniônico (pH)	97
3.2.3	Teor de etanol	100
3.2.4	Contagem de células	105
3.2.5	Massa Seca	108
3.2.6	Fatores de conversão, eficiência fermentativa e produtividade em etanol	109
4	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	115
	ARTIGO 2 Otimização do pré-tratamento alcalino da polpa de café para produção de bioetanol	123
1	INTRODUÇÃO	125
2	MATÉRIAL E MÉTODOS	130
2.1	Polpa de café	130
2.2	Caracterização da polpa de café	130
2.3	Pré-tratamento	130
2.4	Métodos analíticos	133
2.4.1	Umidade	133
2.4.2	Extrativos	133
2.4.3	Cinza	134
2.4.4	Determinação da composição química por Vans Soest	134
2.4.5	Açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART)	135
2.4.6	Determinação de glicose	135
2.4.7	Rendimento em massa da polpa de café submetida ao pré-tratamento alcalino	136
2.4.8	Porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose remanescente na polpa de café pré-tratada	136
2.4.9	Rendimento da hidrólise da celulose no material pré-tratado	137
2.4.10	Eficiência do pré-tratamento	138
2.5	Análise Estatística	138
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
3.1	Caracterização da polpa de café	139

3.2	Pré-tratamento alcalino.....	141
4	CONCLUSÕES.....	167
	REFERÊNCIAS.....	168
	ARTIGO 3 Otimização da hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio.....	175
1	INTRODUÇÃO.....	177
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	182
2.1	Substrato e enzimas.....	182
2.2	Pré-tratamento Alcalino.....	182
2.3	Estudo da concentração da polpa pré-tratada na hidrólise enzimática.....	183
2.4	Otimização da hidrólise enzimática.....	184
2.5	Métodos analíticos.....	185
2.5.1	Umidade.....	185
2.5.2	Extrativos.....	185
2.5.3	Determinação da composição química por Vans Soest.....	186
2.5.4	Açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART).....	186
2.5.5	Determinação de glicose.....	187
2.5.6	Rendimento em massa do pré-tratamento ($Rend_{massa}$).....	187
2.5.7	Porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose remanescente no pré-tratado.....	188
2.5.8	Rendimento da hidrólise da celulose presente no material pré-tratado (Rendimento hidrólise).....	188
2.6	Análise Estatística.....	189
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	190
3.1	Caracterização da polpa de café in natura triturada e prensada e após pré-tratamento alcalino.....	190
3.2	Estudo da concentração da polpa pré-tratada na hidrólise enzimática.....	194
3.3	Otimização da hidrólise enzimática.....	197
	REFERÊNCIAS.....	206
	ARTIGO 4 Fermentação alcoólica do hidrolisado da polpa de café pré-tratada.....	212
1	INTRODUÇÃO.....	214
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	217
2.1	Substrato e enzimas.....	217
2.2	Pré-tratamento.....	217
2.4	Fermentação.....	218
2.4.1	Microrganismo.....	218
2.4.2	Preparo do inóculo.....	219
2.4.3	Fermentação do mosto.....	219
2.5	Métodos.....	220

2.5.1	Umidade	220
2.5.2	Extrativos	220
2.5.3	Determinação da composição química por Vans Soest	221
2.5.4	Açúcares redutores (AR)	221
2.5.5	Determinação de glicose	221
2.5.6	Rendimento da hidrólise da celulose presente no material pré-tratado (Rendimento hidrólise)	222
2.5.7	Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer	222
2.5.8	Teor Alcoólico	222
2.5.9	Conversão do substrato em etanol (Yp/s) e Eficiência Fermentativa (Ef)	223
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	224
3.1	Caracterização da polpa de café e pré-tratamento	224
3.2	Hidrólise enzimática	225
3.3	Fermentação	227
3.3.1	Açúcares redutores (AR) e glicose	227
3.3.2	Etanol e rendimento da conversão de substrato em etanol (Yp/s), eficiência fermentativa e contagem de células	228
4	CONCLUSÃO	231
	REFERÊNCIAS	232

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O café destaca-se como o produto agrícola de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais.

A cafeicultura dá origem a um volume elevado de resíduos, gerados no processamento, como restos de colheitas dispostos de modo inadequado no meio ambiente, cuja utilização tem sido objeto de vários estudos. Para cada tonelada de grãos de café produzida, uma tonelada de cascas é gerada durante o processamento a seco (SAENGER et al., 2001). A polpa de café é o principal resíduo originado no processamento úmido do café maduro, representando aproximadamente 40% do peso seco do grão de café, sendo rico em carboidratos, proteínas, minerais e apreciáveis quantidades de taninos, cafeína e potássio.

A casca e a polpa de café são ricas em nutrientes e compostos orgânicos, além de conter compostos como cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000a). Estes resíduos, em geral, apresentam grande potencial, possibilitando a exploração econômica, mas, apesar da grande disponibilidade, existe pouca aplicação tecnológica para eles.

Dois diferentes processos são utilizados para o processamento do café que são a via seca, a qual processa o café na sua forma intacta, produzindo frutos secos, como café em coco ou café natural e a via úmida, no qual se retira a casca antes da secagem, podendo-se retirar ou não a mucilagem. Nos últimos anos, verifica-se uma tendência crescente para a utilização eficiente e adição de valor aos resíduos agroindustriais, como polpa e casca de café, bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, bagaço de maçã, sabugo de milho, etc. (PANDEY et al., 2000a) e não apenas o descarte como ocorre na maioria dos casos.

Diversos processos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais como matéria-prima para a produção de produtos químicos a granel e produtos de valor agregado, tais como proteínas unicelulares, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários biologicamente ativos (PANDEY et al., 2000a). Outra forma de utilização, por se tratar de um material lignocelulósico, seria a produção de etanol.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a viabilidade técnica do emprego da polpa de café para obtenção de bioetanol. Esta dissertação está dividida em referencial teórico e quatro artigos. A primeira parte refere-se à revisão bibliográfica, o primeiro artigo à utilização do extrato da polpa de café para a produção de álcool, o segundo artigo à análise e otimização do pré-tratamento alcalino da polpa de café, o terceiro artigo estuda a otimização da hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio e o quarto artigo refere-se à fermentação do hidrolisado da polpa de café.

O fluxograma da Figura 1 tem a finalidade de demonstrar, com maior facilidade, as etapas deste trabalho.

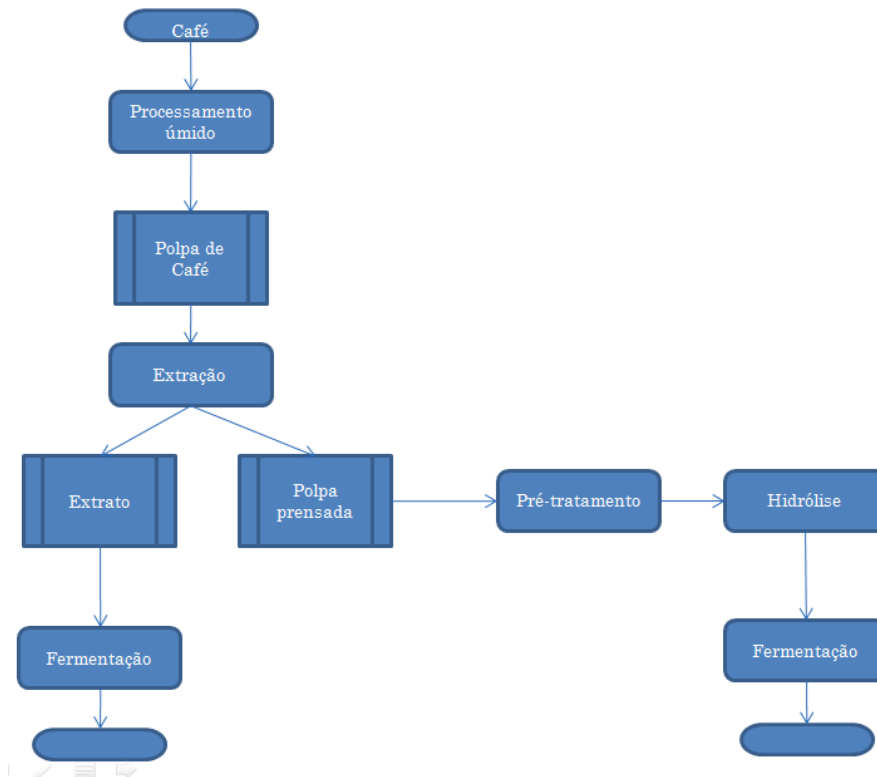


Figura 1 Fluxograma dos experimentos realizados

Aplicações de resíduos agroindustriais na obtenção do bioetanol oferecem uma alternativa para a possível falta de substratos e, por outro lado, ajuda a resolver o problema da poluição ambiental.

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a viabilidade da utilização da polpa de café, obtida do processamento por via úmida, para a produção de bioetanol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Café

O cafeeiro é uma planta pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, sendo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* Pierre as que se destacam, economicamente, em todo o mundo.

O café arábica (*Coffea arabica*) é o fruto de uma planta tropical de altitude adaptada a clima úmido com temperaturas amenas. As condições térmicas para a cultura encontram-se definidas pelas temperaturas médias anuais entre 18 °C e 23 °C (faixa ideal: 19 °C a 22 °C). O café robusta, *Coffea canephora*, oriundo de regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas, está adaptado a condições de temperatura com médias anuais entre 22 °C e 23 °C (ARGOLLO, 2004).

O café destaca-se como um dos produtos agrícolas de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais (SAENGER et al., 2001). A produção de 2011 girou em torno de 43,48 milhões de sacas beneficiadas (produção brasileira de café arábica e conilon) e foi 9,6%, ou 4,61 milhões de sacas, menor que o volume de 48,09 milhões de sacas produzidas na safra anterior. Esta redução deveu-se, principalmente, ao ano de baixa bienalidade e à irregularidade nas precipitações pluviométricas no segundo semestre de 2010 e no início de 2011, que prejudicaram as lavouras que se encontravam na fase de enchimento dos grãos, sobretudo nos estados de Minas Gerais (regiões Sul de Minas e Cerrado Mineiro), na Bahia e em Rondônia (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012).

A produção do café arábica representa 74,0% (32,19 milhões de sacas) da produção do país e tem como maior produtor o estado de Minas Gerais, com 68,0% (21,88 milhões de sacas) de café beneficiado. O conilon participa na

produção nacional com 26,0% de café beneficiado. O estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor dessa espécie, com 75,2% (8,49 milhões de sacas) de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012).

Os dados das produções dos estados na safra de 2011 podem ser observados na Tabela 1, sendo os maiores produtores os estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo.

Tabela 1 Produção estimada do café safra 2010, em mil sacas de 60 kg

Região	Safr		
	Arábica	Robusta	Total
Minas Gerais	21.882	299	22.181
- Sul e Centro-Oeste	10.442	0	10.442
- Cerrado - Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste.	4.001	0	4.001
- Zona da Mata - Jequitinhonha, Mucuri, Rio Doce,	7.439	299	7.738
- Central e Norte.	0	0	0
Espírito Santo	3079	8494	11.573
São Paulo	3.111,5	0	3.112
Paraná	1.842	0	1.842
Bahia	1.548,9	741,1	2.290
- Cerrado	429	0	429
- Planalto	1.119,9	0	1.119,9
- Atlântico	0	741,1	741,1
Rondônia	0	1.428,3	1.428,3
Mato Grosso	11	126,8	137,8
Pará	0	184	184
Rio de Janeiro	247	13	260
Outros	467,1	9,5	476,6
Brasil	32.188,5	11295,7	43.484,2

Fonte: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2012)

A produção de Minas Gerais está estimada em 22.181.826 sacas de café, na safra 2011, com variação percentual de 3,37% para mais ou para menos. A produtividade média do estado atingiu 22,16 sacas de café por hectare. Em comparação com a safra anterior, a estimativa sinaliza uma redução da produção cafeeira em 11,82% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012).

2.1.1 Tipo de processamento e resíduos

O café, depois de colhido, pode ser processado por duas vias diferentes, a via úmida e a via seca. Em ambos os casos, o principal objetivo é secar o café o mais rápido possível, retirando água até níveis seguros para o armazenamento e o beneficiamento. Dependendo do método de processamento do café cereja, ou seja, processo úmido ou seco, os sólidos residuais obtidos têm diferentes terminologias, sendo esta polpa ou casca, respectivamente (PANDEY et al. 2000a).

O processamento do café gera resíduos que são pouco aproveitados, mesmo sendo ricos em nutrientes. Frutos de café maduros podem ser processados por três métodos distintos. O processo mais simples e rústico é o processamento a seco, que é utilizado para fermentar o café ao sol em plataformas e ou no cimento. No processo úmido, a polpa e ou mucilagem são removidos mecanicamente e os grãos são fermentados em tanques, com um grande volume de água. O processo semisseco é uma variação do processo por via úmida, em que os frutos de café também têm a polpa extraída, mas o processo de fermentação ocorre diretamente em uma plataforma (VILELA et al., 2010).

O processo por via seca é a técnica mais simples e comum. Nele, os frutos são secos ao sol em terreiros ou recebem neles a pré-secagem, que é

complementada em secadores mecânicos. Depois de secos, os grãos de café são levados a um descascador para a remoção do material que envolve os grãos de café, que são o produto de interesse econômico (OLIVEIRA et al., 2001). Nesse procedimento, a mistura do cereja com o verde provoca perda de qualidade da bebida, pela diferença de umidade inicial em cada um deles. O processamento por via úmida representa um avanço para a qualidade final do produto obtido.

Segundo Borem (2004), o processamento por via úmida pode ocorrer por três diferentes caminhos: primeiro, o descascado, quando apenas a casca e parte da mucilagem são retiradas em descascadores mecânicos; segundo, o desmucilado quando se remove a casca e, posteriormente, o máximo de mucilagem por abrasão (desmucilador mecânico) e, por último, o despulpado, quando se removem a casca mecanicamente e a mucilagem por fermentação biológica.

Hoje em dia, há uma pressão política e social grande para reduzir a poluição resultante das atividades industriais. Quase todos os países desenvolvidos e em desenvolvimento estão tentando se adaptar a esta realidade, modificando seus processos para que seus resíduos possam ser reciclados. Conseqüentemente, a maioria das grandes empresas já não descarta esses resíduos, mas sim os utiliza como matéria-prima para outros processos (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

2.1.2 Composição da polpa de café

A casca de café é oriunda da limpeza do café em coco, composta de epicarpo (casca), mesocarpo (mucilagem), endocarpo (pergaminho) e película prateada. A polpa é o resíduo da despulpa úmida do café cereja, composta de epicarpo e parte do mesocarpo (MATIELLO, 1991 apud BARCELOS et al., 2002). As diferenças básicas entre casca e polpa de café é que a casca é obtida

seca e contém o pergaminho, enquanto a polpa é úmida e não tem o pergaminho, pois esse fica envolto no grão de café, como forma de proteção. Na Figura 2 está ilustrado o grão de café.



Figura 2 Estrutura do grão de café

O café cereja, com base na matéria seca, pode ser dividido nas seguintes porções: 29% de polpa, 12% de pergaminho, 5% de filme prateado e 54% de grão (BRESSANI; ESTRADA; JARQUIN, 1972). Segundo os mesmos autores, obtiveram-se, na análise da polpa desidratada (em base seca), valores de 2,5% de extrato etéreo, 21,0% de fibra bruta, 11,2% de proteína bruta, 0,554% de cálcio, 0,116% de fósforo, 1,76% de potássio e 1,5% de cafeína.

Resultados semelhantes foram encontrados por Elias (1978), em cujo trabalho a polpa de café apresentou 76,7% de umidade, e os teores em base seca, de 10% de proteína, 2,5% de extrato etéreo, 21% de fibras, 50% de carboidratos e 8% de cinzas.

Segundo Elias (1978), a fração de carboidratos é representada em base seca por: 27,65% de celulose, 12,40% de açúcares redutores, como a glicose, 2,02% de açúcares não redutores e um total de 6,52% de substâncias pécicas. O mesmo autor também encontrou, na polpa de café, 17,5% de lignina e 3% de

proteína lignificada, 1,80% a 8,56% de taninos, 2,6% de ácido clorogênico e 1,6% de ácido cafeico.

Ulloa et al. (2004) determinaram, para a polpa de café, concentrações de 8% de proteína, 2,9% de extrato etéreo, 8,9% de cinzas, 28,6% de celulose, 2% de compostos fenólicos, 0,74% de taninos e 1,8% de cafeína.

Com relação à concentração da lignina, Barcellos et al. (2001) determinaram 11,70% para polpa de café, ocorrendo diminuição em seus teores durante o armazenamento.

Ulloa et al. (2004) encontraram, para polpa de café valores de celulose variando entre 16,5% a 32,2%, de hemicelulose 1% a 11,6% de lignina 12,2% a 20,5%.

Avallone et al. (2000), encontraram as seguintes frações dos carboidratos na mucilagem: 29,6% de arabinose, 12,6% de xilose, 13,6% de galactose, 4,2% de ramanose e 30,5% de glicose, sendo esta mucilagem obtida por desmucilador mecânico, comprovando o alto teor de açúcares que poderiam ser aproveitados em processos biotecnológicos.

Em trabalho recente, Brum (2007) encontrou, para constituição da polpa de café obtida pelo processamento por via úmida, os valores contidos na Tabela 2.

Tabela 2 Composição da polpa de café (em base seca)

Composição	Polpa
*Holocelulose (%)	52,50±0,30
Celulose (%)	25,90±0,30
Lignina insolúvel (%)	16,48±0,16
Lignina solúvel (%)	1,07±0,18
Hemicelulose (%)	26,60±0,30
**Extrativos (%)	26±1
Cinza (%)	9,65±0,03
Tanino condensado (%)	3,90±0,08
Nitrogênio (%)	1,85±0,06
P (%)	0,16±0
K (%)	3,65±0,06
Ca (%)	0,3±0
MG (%)	0,07±0
S (%)	0,018±0,010
B (ppm)	33,20±0,4
Cu (ppm)	13,55±0,35
Mn (ppm)	32,95±0,05
Zn (ppm)	9,25±0,25
Fe (ppm)	172,30±5,9

Fonte: Brum (2007)

*Holocelulose= celulose + hemicelulose

** Extrativos= frações solúveis em água e em álcoois

Revisando a literatura relacionada ao assunto, verifica-se a existência de divergências entre os dados de diferentes trabalhos, o que é explicado pela grande variedade de cultivares, condições de cultivo e tipo de processamento, entre outros fatores.

A polpa do café e a casca obtidas durante a transformação do café cereja pelos processos úmido ou seco, respectivamente, contêm quantidades de cafeína, taninos e materiais orgânicos, o que os torna tóxicos em sua natureza, quando descartados no meio ambiente. No entanto, sendo rico em matéria orgânica, este substrato torna-se interessante para processos microbianos no intuito de obter produtos de valor agregado (PANDEY et al., 2000a).

2.1.3 Utilizações dos resíduos do café

Tradicionalmente, a casca e a polpa de café têm se limitado a apenas aplicações como fertilizantes, alimentação de animais e compostagem, entre outras utilizações mais simples. Nestas aplicações, utiliza-se somente uma pequena fração do resíduo gerado durante o processamento do café e não são tecnicamente muito eficientes. O foco atual é em aplicações desse substrato em bioprocessos. Tentativas têm sido feitas para aprimorar as formas de utilização tradicionais e obter novas formas de utilização da polpa e casca do café, como, por exemplo, a eliminação de compostos tóxicos (compostos fenólicos, taninos, cafeína) e, posteriormente, a utilização na alimentação animal, o uso com eficiência do substrato para a produção de produtos com valor agregado como cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, *flavour* e aroma de certos compostos, entre outros. Estes subprodutos, por possuírem quantidade elevada de açúcares fermentescíveis, constituem um substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras (PANDEY et al., 2000a).

Os avanços na biotecnologia industrial oferecem melhores oportunidades para aproveitamento econômico de resíduos agroindustriais, como polpa e casca de café (PANDEY et al., 2000a).

2.2 Fermentação alcoólica

O etanol pode ser obtido por duas formas: por síntese química e por via biológica ou fermentativa. Por via sintética se obtém o etanol a partir de hidrocarbonetos não saturados, como o eteno e o etino, provenientes de gases de petróleo e da hulha. Nos países em que há grandes reservas de petróleo e indústria petroquímica avançada, é a forma econômica de se produzir álcool. A via fermentativa é a maneira mais importante para a produção de álcool etílico,

no Brasil (LIMA et al., 2001). A via fermentativa envolve a presença de microrganismos ou enzimas presentes nestes.

De acordo com Amorim, Basso e Alves (1996), a levedura, como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. Se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol. A célula de levedura tem compartimentos diferenciados para a atividade metabólica e a fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria.

A fermentação é uma transformação bioquímica provocada num substrato (como, por exemplo, a glicose) por fermento vivo ou por princípio ativo extraído deste fermento. O setor alcooleiro utiliza leveduras do gênero *Saccharomyces*. Nas grandes indústrias produtoras de etanol, são utilizadas leveduras de panificação prensadas e secas, ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação (MADHAVAN et al., 2009).

Foi verificado, em algumas usinas brasileiras, que as “leveduras de pão” que eram inoculadas para iniciar o processo fermentativo desapareciam do processo, sendo substituídas por outras leveduras, durante o período da safra. Isso ocorria devido às condições estressantes e competitivas presentes na fermentação industrial, como altas concentrações de etanol, alta temperatura, estresse osmótico devido à presença de açúcares e sais, acidez e contaminação bacteriana, que favoreciam o desenvolvimento de cepas mais resistentes que, no caso, vinham junto com a cana-de-açúcar do campo (BASSO et al., 2008).

Antes da fermentação existe o preparo do inóculo. O inóculo é preparado com adição subsequente de volumes de substrato em quantidades e concentrações crescentes até atingir o volume útil de levedura adaptada ao meio (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

Dentre as matérias açucaradas costuma-se distinguir as diretamente fermentescíveis e as não diretamente fermentescíveis. As primeiras são as que contêm monossacarídeos e se limitam aos sucos de frutas. Sua importância reside na produção de álcool em bebidas como o vinho e a cidra. As não diretamente fermentáveis são as que contêm dissacarídeos, que fermentam após uma hidrólise, às quais se dá o nome de inversão e que se realizam naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação. A sacarose é a representante mais importante dos componentes da cana-de açúcar e dos melaços, sendo quebrada pela *Saccharomyces cerevisiae* e utilizada para a produção de etanol (LIMA et al., 2001). Também existem aqueles materiais que não são fermentáveis pela levedura, como, por exemplo, materiais lignocelulósicos que necessitam de tratamentos antes de serem disponibilizados para fermentação.

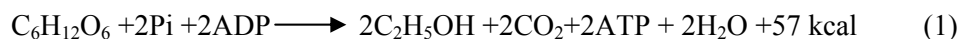
A disponibilidade e a forma dos açúcares são importantes já no processo de transporte para o interior da célula fermentativa de *Saccharomyces*. Alguns açúcares podem ser indisponíveis para a fermentação a partir desta etapa, como é o caso da lactose, que não é fermentescível por *Saccharomyces* devido à restrição no sistema de transporte, hidrólise e metabolismo da galactose (LIMA et al., 2001). No processo de fermentação alcoólica, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* convertem as hexoses (C6) em etanol e não fermentam as pentoses (C5), podendo os carboidratos C5 causar inibição do processo fermentativo (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996).

De acordo com Chen et al. (2010), a xilose influencia a fermentação de glicose por *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionando perda de rendimento.

Com isso, muitas vezes, é necessário fazer a hidrólise da hemicelulose (polímero constituído predominantemente de xilose e arabinose) por meio de xilanases e, posteriormente, sua separação da glicose. Após a separação, o caldo de xilose pode ser fermentado por outros microrganismos. Este processo de fermentação em separado de glicose e xilose é conhecido e, normalmente, para a fermentação da xilose, são utilizados microrganismos como *Pichia stipitis*, *Candida shahatae* e *Pachysolen tannophilus*. Já para a fermentação da glicose, na maioria das vezes, prefere-se a *Saccharomyces cerevisiae*, pelo fato de ela apresentar maior rendimento, em relação às demais.

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro, denominado glicólise, tem a função de quebrar a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio, há uma tendência para a atuação das enzimas pirúvato-descarboxilase e alcooldesidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um balanço desta etapa (Equação 1). Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs (Equação 2), em que será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (LIMA et al., 2001).

Equação de Gay-Lussac



Ciclo de Krebs



A partir das conversões realizadas por células desses microrganismos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, obtém-se o álcool combustível que, quando originado de produtos agrícolas, é conhecido como bioetanol. A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (88 g) e 57 kcal de energia. Assim, o rendimento teórico da conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) para a produção de é de 0,511 g de etanol/g de glicose.

Um dos fatores que tornam a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica no Brasil é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país (LIMA et al., 2001).

Há várias maneiras de classificar as matérias-primas para a produção de etanol, mas qualquer um dos critérios que se adote deixa algo a desejar. Elas podem ser classificadas em matérias açucaradas, agrupando cana, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; em matérias amiláceas e feculentas, agrupando grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos, como mandioca, batata-doce, babaçu e em matérias celulósicas, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel (CANILHA et al., 2010).

O bioetanol produzido a partir de amido de milho e sacarose da cana-de-açúcar é, atualmente, o combustível renovável mais comum. No entanto, fica evidente que a utilização em larga escala do bioetanol exigirá a biomassa lignocelulósica a ser utilizada como matéria-prima (GRAY et al., 2006 apud OHGREN et al., 2007, p.834).

Biomassa, ou bioenergia, é uma das alternativas energéticas mais importantes por causa de preocupações ambientais e da escassez futura de energias fósseis. A utilização de biomassa tem o benefício da redução da geração de poluentes (ZHANG; YANG; BLASIAK, 2011).

Atualmente, tem sido demonstrado em estudos que o bioetanol pode ser produzido de biomassa de diversas matérias-primas. Como exemplos, podem ser estudados os subprodutos agrícolas, como palha de milho e arroz, bagaço de cana-de-açúcar e forragem, entre outros, proporcionando uma fonte de biomassa bastante disponível e de baixo preço (KIM; DALE, 2004).

No entanto, produzir etanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas é mais difícil do que a partir de açúcar ou amido.

Os açúcares do bagaço de cana-de-açúcar, casca da mandioca, palha de milho e arroz, assim como aqueles de qualquer outro material lignocelulósico, encontram-se na forma de polímeros, como celulose e hemiceluloses (Figura 3), associados entre si e recobertos por uma macromolécula aromática (lignina), formando a microfibrila celulósica. Esta, por sua vez, constitui a parede celular ou fibra vegetal, uma estrutura difícil de ser desestruturada e convertida em monossacarídeos fermentescíveis (CANILHA et al., 2010).

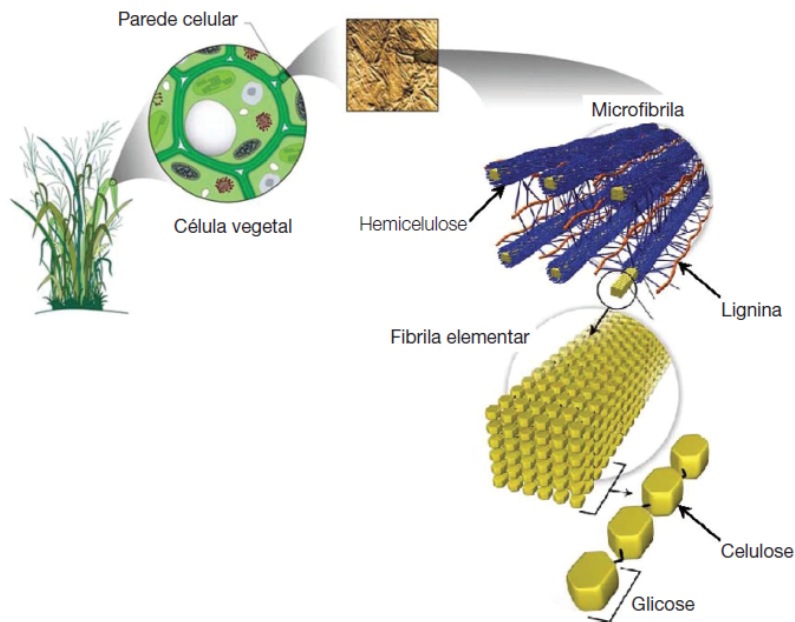


Figura 3 Parede celular vegetal

Fonte: US Department of Energy Genome Programs adaptado por CANILHA et al. (2010)

2.3 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal, a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera. São constituídos por três frações principais que, juntas, perfazem mais de 90% da massa seca total. São elas: celulose, hemiceluloses e lignina (PANDEY et al., 2000). Além destes compostos estruturais, os materiais lignocelulósicos contêm outros compostos minoritários, como cinzas, proteínas e compostos fenólicos, entre outros.

2.3.1 Celulose

A celulose (Figura 4), constituinte mais abundante da parede celular vegetal, é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), apresentando um grau de polimerização de até 10.000 unidades de glicose. A estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta a agregação das cadeias celulósicas em “fibrilas elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (DING; HIMMEL, 2006; MATTHEWS et al., 2006; VAN SOEST, 1994).

Como pode ser visto na Figura 3, existe uma íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina), de tal modo que impõe dificuldades para a recuperação dos açúcares constituintes da celulose na forma de monômeros com elevado grau de pureza (SUN; CHENG, 2002).

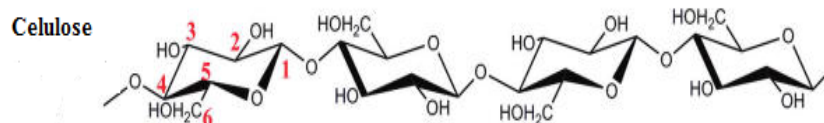


Figura 4 Fórmula estereoquímica da celulose (ZHANG; YANG; BLASIAK, 2011)

2.3.2 Hemiceluloses

Outro constituinte das plantas são as poliooses ou hemiceluloses (Figura 5), que não constituem uma única substância, mas, sim, uma mistura de polissacarídeos de baixa massa molecular, os quais estão associados com celulose e a lignina. As unidades de açúcares que formam as poliooses podem ser subdivididas em grupos, tais como pentoses, hexoses e deoxi-hexoses e ácidos hexurônicos (SAHA et al., 2003).

Hemiceluloses são polímeros de açúcares representando, em geral, de 15% a 35% da biomassa da planta e que podem conter pentoses (β -d-xilose, α -l-arabinose), hexoses (β -d-manose, β -d-glicose, α -d-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -d-glicurônico, α -d-4-O- α e metilgalacturonic-d-galacturônico ácidos). Outros açúcares, como a α -l-ramnose e α -l-fucose, também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos de hidroxila destes açúcares podem ser parcialmente substituídos com grupos acetil (GIRIO et al., 2010).

Hemicelulose é um grande grupo de polissacarídeos encontrados nas paredes celulares primárias e secundárias das plantas em toda a Terra. Elas são classificadas como material solúvel em solução alcalina após a remoção de substâncias pécticas e têm grau de polimerização muito menor, comparada com a de celulose (XIAO; SUN; SUN, 2001).

De acordo com Saha et al. (2003), hemiceluloses em resíduos agrícolas consistem, principalmente, de unidades de xilose e arabinose.

As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

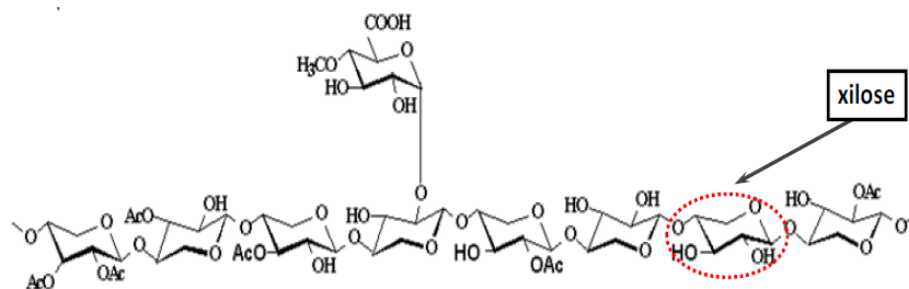


Figura 5 Fórmula estereoquímica das hemiceluloses (ZHANG; YANG; BLASIAK, 2011)

2.3.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização de unidades fenil-propano (álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). Constitui a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose e envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose. Enquanto as paredes celulares de gramíneas apresentam os menores teores de lignina, aquelas de madeiras de coníferas (*softwoods*) são as mais ricas neste componente (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

2.3.4 Extrativos e outros compostos

Os componentes de menor massa molecular, presentes na biomassa lignocelulósica, incluem uma variedade de compostos orgânicos cuja presença é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Esses componentes não residem na parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe abrange materiais conhecidos como extrativos, por serem extraíveis em água e solventes orgânicos

neutros ou volatilizados por arraste de vapor. A segunda classe inclui materiais que não são comumente extraíveis, com os agentes mencionados, como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas (RAMOS, 2003).

Os extrativos são frequentemente responsáveis por determinadas características da planta, como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e as propriedades abrasivas (D'ALMEIDA, 1998). Nos extrativos podem ser encontrados gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteroides e hidrocarbonetos de elevada massa molar e alguns carboidratos.

2.4 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

A conversão de compostos lignocelulósicos a etanol é, conforme Sun e Cheng (2002), dividida em dois principais processos: a hidrólise da celulose para produzir açúcares simples e a fermentação destes por via microbiológica a etanol. A hidrólise é usualmente catalisada pelas enzimas celulasas e a fermentação realizada por leveduras ou bactérias. Os fatores que afetam hidrólise da celulose incluem a porosidade (área de superfície acessível) do material lignocelulósico, cristalinidade da fibra de celulose e conteúdo de hemicelulose (dificulta o acesso da celulase à celulose, diminuindo a eficiência da hidrólise). Esses fatores podem ser contornados utilizando-se pré-tratamentos do material do qual se quer obter etanol, removendo-se parte da lignina e hemicelulose, pela redução da cristalinidade e pelo aumento da porosidade da celulose.

Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, então, submetê-la à hidrólise enzimática (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Segundo Gamez et al. (2006), o pré-tratamento é uma das operações unitárias fundamentais para o sucesso da conversão de materiais lignocelulósicos em etanol. Isto é devido ao fato da existência de uma estreita associação entre os três principais componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina).

A hidrólise da celulose à glicose em meio aquoso catalisada pelas enzimas celulase tem uma taxa de rendimento muito baixa, devida à estrutura altamente cristalina da celulose, a qual dificulta o acesso aos sítios ativos das enzimas ao substrato. A dificuldade aumenta também porque celulase adsorve fisicamente sobre ligninas. Além disso, a lignina restringe a hidrólise, pois esconde a superfície celulósica, impedindo o intumescimento das fibras. Logo, torna-se necessária uma etapa de pré-tratamento, a fim de quebrar a estrutura cristalina da lignocelulose e ou remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática (OGEDA; PETRI, 2010).

O papel principal de um método de pré-tratamento é diminuir a interação entre os principais componentes da parede celular e torná-los susceptíveis aos processos de sacarificação (hidrólise da celulose) e fermentação (GAMEZ et al., 2006).

A fim de hidrolisar enzimaticamente a biomassa lignocelulósica com sucesso, é muito importante o uso de um pré-tratamento adequado porque, além da cristalinidade da celulose, outros fatores, como grau de polimerização (DP), teor de umidade e área da superfície disponível, também são fatores que impedem ou dificultam o ataque de enzimas.

O grau de cristalinidade da celulose é um fator importante que afeta a hidrólise enzimática do substrato. Tem sido relatado que uma diminuição na cristalinidade da celulose influencia especialmente a taxa inicial de hidrólise da celulose por celulase (LAUREANO-PEREZ et al., 2005). O pré-tratamento

físico ou químico que rompe a estrutura cristalina de celulose é frequentemente utilizado para melhorar a hidrólise enzimática.

O grau de polimerização está essencialmente relacionado com outras características do substrato, tais como cristalinidade. Despolimerização depende da natureza do substrato celulósico. Na hidrólise enzimática, endoglucanases hidrólizam em sítios internos das cadeias de celulose, preferencialmente menos ordenados (menor grau de polimerização), sendo as principais responsáveis pela diminuição do grau de polimerização de substratos celulósicos (ALVIRA et al., 2010).

Acessibilidade do substrato para as enzimas celulolíticas é um dos principais fatores que influenciam o processo de hidrólise. Assim, um dos principais objetivos do pré-tratamento é aumentar a área de superfície disponível para o ataque enzimático (ALVIRA et al., 2010).

A remoção de hemicelulose aumenta o tamanho dos poros médios dos substratos e, portanto, aumenta a acessibilidade e a probabilidade de a celulose ser hidrolisada (CHANDRA et al., 2007). Por outro lado, a recuperação dos açúcares hemicelulósicos nos materiais pré-tratados seria interessante para se obter mais fermentáveis totais na produção de açúcar. Neste caso, os requisitos enzimáticos hemicelulósicos para a modificação devem ser levados em conta (KUMAR; WYMAN, 2009).

Em estudos anteriores concluiu-se que o tamanho dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas é um dos principais fatores limitantes na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (CHANDRA et al., 2007).

Esses fatores limitam a hidrólise enzimática eficiente dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis, o que pode ser contornado utilizando-se pré-tratamentos do material do qual se quer obter etanol. Um pré-tratamento satisfatório inclui: (1) perturbar e remover a matriz cruzada de lignina e hemiceluloses que incorpora as fibras de celulose, (2) quebrar as

ligações de hidrogênio na celulose cristalina e (3) aumentar a porosidade e a área superficial da celulose para a hidrólise enzimática subsequente (LI et al., 2010).

Na Figura 6 apresentam-se as transformações que ocorrem durante o pré-tratamento, com alteração da estrutura do complexo e mudança das características da celulose.

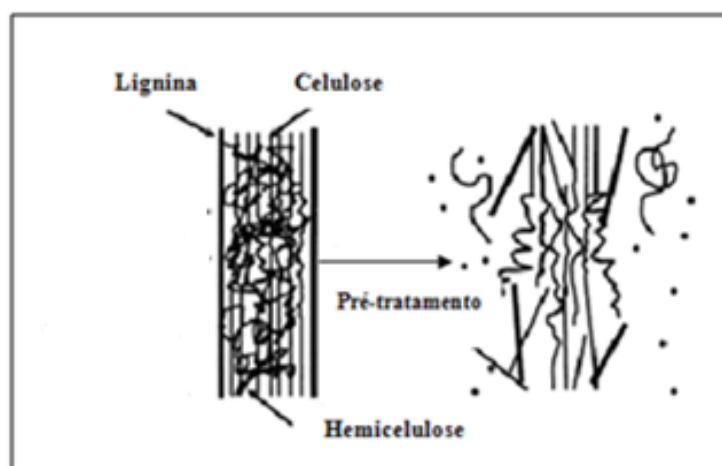


Figura 6 Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica (HSU; LADISCH; TSAO, 1980)

Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes características físico-químicas, é necessário adotar tecnologias apropriadas de pré-tratamentos com base nas propriedades da biomassa lignocelulósica de cada matéria-prima (ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento pode também influenciar fortemente os custos, a concentração de compostos tóxicos, as taxas de hidrólise enzimática, a carga de enzima, a concentração do produto final, a purificação de produtos, as exigências de tratamento de resíduos e a geração de outras variáveis do processo. E, claro, a operação de pré-tratamento em si deve ser de baixo custo e

evitar o consumo elevado de produtos químicos caros e altas demandas de energia e de degradação e perdas da matéria-prima (WYMAN, 2005).

Compostos tóxicos gerados e suas quantidades dependem de matéria-prima e do pré-tratamento. Produtos da degradação do pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos podem ser divididos nas seguintes classes: ácidos carboxílicos, derivados de furanos e compostos fenólicos. Os derivados furano principais são furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), derivados da degradação pentoses e hexoses, respectivamente (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Ácidos fracos são, principalmente, acéticos e fórmicos e, por último, compostos fenólicos podem ser ácidos, cetonas e aldeídos (KLINKE et al., 2002).

Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, que incluem explosão a vapor, tratamento com substâncias ácidas, substâncias alcalinas e microrganismos, entre outros tratamentos.

2.4.1 Pré-tratamento físico

Os pré-tratamentos físicos incluem um potencial significativo com relação aos demais pré-tratamentos, havendo menores riscos em relação ao impacto ambiental e menores perigos que processos químicos.

Pré-tratamentos físicos também podem ser utilizados para aumentar a reatividade do material pré-tratado frente às enzimas hidrolíticas. Por exemplo, a redução granulométrica do material de partida por moagem (cominuição), embora altamente desfavorável do ponto de vista de consumo energético, aumenta a área superficial disponível e diminui a cristalinidade da celulose, favorecendo a sacarificação enzimática (RIVERS; EMMERT, 1987 apud CANILHA et al., 2010, p. 50).

Outro método físico bastante utilizado atualmente é a explosão a vapor. Esse método consiste no aquecimento do material a temperaturas elevadas com vapor saturado, seguido de uma súbita descompressão do equipamento. Este pré-tratamento pode ser realizado utilizando-se diferentes temperaturas e tempos. Utilizam-se, nesse pré-tratamento, temperaturas entre 160 °C e 260 °C (correspondendo à pressão de 0,69–4,83 MPa) por um período de alguns segundos até minutos (SUN; CHENG, 2002). Martin et al. (2007) verificaram que quanto maiores o tempo e a temperatura, maior foi o rendimento na obtenção de açúcares redutores. No entanto, também há a formação de compostos, como furfural e 5-hidroximetilfurfural, que são tóxicos a leveduras, sendo, portanto, inibidores do processo fermentativo.

O objetivo de uma explosão a vapor é solubilizar a hemicelulose para tornar a celulose mais acessível para hidrólise enzimática e evitar a formação de inibidores (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). O processo por explosão a vapor modifica física e quimicamente os materiais lignocelulósicos, provocando a degradação da hemicelulose e a redistribuição de lignina, devido à alta temperatura, assim aumentando o potencial de hidrólise de celulose (SUN; CHENG, 2002).

A lignina é removida parcialmente durante a explosão a vapor, sendo grande parte dela redistribuída na superfície da fibra como resultado da fusão e das reações de despolimerização/repolimerização (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007).

Este pré-tratamento combina forças mecânicas e efeitos químicos devido à hidrólise (auto-hidrólise) de grupos acetil presentes nas hemiceluloses. A auto-hidrólise ocorre quando as temperaturas elevadas promovem a formação de ácido acético a partir de grupos acetil. Além disso, a água também pode atuar como um ácido em altas temperaturas. Os efeitos mecânicos são causados

porque a pressão é subitamente reduzida e fibras são separadas devido à descompressão explosiva (PAN et al., 2005).

Em comparação com os métodos de pré-tratamento alternativos, as vantagens de explosão a vapor incluem impacto ambiental significativamente menor, investimento de capital mais baixo e consumos energéticos menores (AVELLAR; GLASSER, 1998).

De acordo com Gamez et al. (2006), a explosão a vapor tem como desvantagem produzir um material de densidade relativamente baixa, portanto, gasta grande quantidade de matéria-prima para obter quantidade suficiente de substrato a ser hidrolisado e também a necessidade de se realizar processos de desintoxicação com o objetivo de remover inibidores da hidrólise da celulose e fermentação, tais como ácidos fenólicos e subprodutos derivados da desidratação de pentoses e hexoses (furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente).

2.4.2 Pré-tratamento biológico

Pré-tratamento com fungos tem sido explorado para disponibilizar materiais lignocelulósicos para aplicações na alimentação e fabricação de papel. Recentemente, esta abordagem ecológica tem recebido atenção como um método de pré-tratamento para melhorar a sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica em processos de produção de etanol (ALVIRA et al., 2010). Pré-tratamentos biológicos utilizam microrganismos, principalmente os fungos marrom, branco e de podridão macia, que degradam lignina e hemicelulose e muito pouco de celulose, a qual é mais resistente do que os outros componentes (SANCHEZ, 2009).

A degradação da lignina por fungos da podridão branca é mais eficaz para pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos, ocorrendo através

da ação de enzimas que degradam lignina, tais como peroxidases e lacases. Vários fungos podridão-branca, tais como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* foram examinados em diferentes biomassas lignocelulósicas, mostrando alta eficiência em deslignificação (KUMAR et al., 2009). Esses fungos são taxonomicamente diversos, sendo a maioria deles pertencente à subdivisão Basidiomicetos. Outros fungos capazes de promover esta degradação inicial são da classe dos Ascomicetos. Nestes últimos, a degradação ocorre em velocidades mais baixas (FASANELLA, 2008).

Algumas bactérias também podem ser utilizadas para o pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos

A atividade lignolítica ocorre devido a um grupo de enzimas responsáveis pelo processo de oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos da molécula de lignina, chamadas de lignases, entre as quais estão as lacases e as varias formas de peroxidases (manganês peroxidase e lignina peroxidase). A combinação das enzimas manganês peroxidase ou lignina peroxidase e lacase compõe o sistema enzimático mínimo necessário para a degradação da lignina (LEE, 1997).

As vantagens da deslignificação biológica sobre os métodos anteriores podem incluir condições amenas de reação, maior rendimento do produto e menos inibidores da fermentação, demanda menos energia e menor resistência à pressão e à corrosão do reator (LEE, 1997).

Vários parâmetros de cultivo afetam a atividade das enzimas lignolíticas produzidas por fungos. Entre estes estão disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, microelementos, pH e temperatura (VAN DER MERWE, 2002 apud FASANELLA, 2008, p.29).

No entanto, o principal inconveniente para o desenvolvimento de métodos biológico é a baixa taxa de hidrólise obtida na maioria desses processos em comparação com outras tecnologias (SUN; CHENG, 2002).

2.4.3 Pré-tratamentos químicos

As principais tecnologias de pré-tratamento situam-se dentro desse grupo, incluindo pré-tratamentos ácidos, alcalinos ou oxidativos. Nesse tipo de processo, a maior parte dos pré-tratamentos difere nos mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular, que resulta numa acessibilidade melhorada da enzima, além de rendimentos maiores. Em pré-tratamentos catalisados por ácidos, a camada de hemiceluloses é hidrolisada, enquanto nos pré-tratamentos catalisados por bases, parte da lignina é removida e a hemicelulose tem que ser posteriormente hidrolisada pelo uso de hemicelulases (OGEDA; PETRI, 2010).

Um tratamento químico tem como objetivo aumentar a superfície do substrato por inchaço das fibras e a modificação ou a remoção da hemicelulose e ou da lignina para tornar a celulose mais acessível para hidrólise enzimática (HSU, 1996; MOSIER et al., 2005). Para que a sacarificação enzimática da celulose seja eficiente, é necessário que as enzimas consigam “chegar” até esta molécula. Entretanto, a parede da célula vegetal é impermeável a grandes moléculas, incluindo proteínas, como as celulasas. Para superar essa barreira, reagentes que incluem (mas não se restringem a) ácidos e bases devem ser utilizados para solubilizar a hemicelulose e ou a lignina e, assim, aumentar a porosidade da matriz (MOSIER et al., 2005).

O pré-tratamento ácido pode ser feito com ácidos diluídos ou concentrados. A principal reação que ocorre durante o pré-tratamento ácido é a hidrólise da hemicelulose. Durante o pré-tratamento ácido, a lignina solubiliza e

rapidamente condensa e precipita na forma de ácido (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A utilização de ácidos concentrados é menos atraente para a produção de etanol, devido à formação de compostos de inibição. Além disso, ocorrem problemas de corrosão nos equipamentos e a recuperação do ácido é desvantagem importante quando o pré-tratamento é com ácido concentrado (ALVIRA et al., 2010).

A utilização de ácidos diluídos é uma prática bastante comum no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Esses tratamentos ocorrem em altas temperaturas, podendo remover parte da lignina e dissolver hemicelulose (WYMAN, 2005).

Tratamentos com ácidos resultam em uma grande quantidade de compostos inibitórios à fermentação, como compostos fenólicos, ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), devendo passar por processos de desintoxicação dessas substâncias antes de realizar a hidrólise e a fermentação (CHEN et al., 2007).

De acordo com Alvira et al. (2010), o pré-tratamento ácido pode ser realizado em alta temperatura (por exemplo, a 180 °C), durante um curto período de tempo, ou à temperatura mais baixa (por exemplo, 120°C), para maior tempo de retenção (30 a 90 minutos).

No entanto, dependendo da temperatura do processo, são formados compostos da degradação de açúcares, tais como furfural e HMF e compostos aromáticos da degradação de lignina são detectados e afetam o metabolismo de microrganismos na etapa de fermentação (SAHA et al., 2005).

Segundo Martin, Klinke e Thomsen (2007), o ácido acético formado deve-se à hidrólise do grupo acetil presente na molécula de hemicelulose. Os compostos fenólicos são formados principalmente da degradação parcial da

lignina, o furfural é formado da degradação de pentoses e o HMF, da decomposição de hexoses.

O ácido sulfúrico tem algumas limitações importantes, incluindo a corrosão, o que exige materiais de construção caros. A formação dos produtos de degradação e a liberação de inibidores na fermentação da biomassa são outras características do pré-tratamento ácido. O tratamento com ácido fosfórico é um método seguro, econômico e eficiente para ser tomado como pré-tratamento da estrutura cristalina da celulose, que pode também ser facilmente reciclado e reutilizado. Portanto, o ácido fosfórico é um agente potencial para a decomposição altamente eficiente da celulose cristalina, por gerar maior produtividade de açúcares fermentáveis na hidrólise enzimática (UM; KARIM; HENK, 2003). Os ácidos clorídrico e nítrico também foram testados na hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos (MOSIER et al., 2005a).

Ácidos orgânicos, tais como ácidos fumárico ou maleico, estão surgindo como alternativas para melhorar a hidrólise da celulose para a produção de etanol. Neste contexto, ambos os ácidos foram comparados com o ácido sulfúrico, em termos de rendimento da hidrólise da palha de trigo e formação de compostos de degradação de açúcares durante o pré-tratamento. Resultados mostraram que os ácidos orgânicos podem pré-tratar a palha de trigo com alta eficiência, embora o ácido fumárico seja menos eficaz do que o ácido maleico. Além disso, menor quantidade de furfural foi formada no pré-tratamento com ácido maleico e fumárico do que com ácido sulfúrico (KOOTSTRA et al., 2009).

Outros pré-tratamentos possíveis são aqueles com a utilização de solventes orgânicos. Numerosos solventes orgânicos ou misturas aquosas podem ser utilizados, incluindo metanol, etanol, acetona, etileno glicol e álcool tetra-hidrofurfurilmetacrilato, a fim de solubilizar a lignina e fornecer celulose tratada para a hidrólise enzimática (ZHAO; CHENG; LIU, 2009). Comparando com

outros pré-tratamentos químicos, a principal vantagem do processo é a recuperação de lignina relativamente pura como um subproduto (ZHAO; CHENG; LIU, 2009).

Solventes orgânicos precisam ser separados, pois eles podem ser inibitórios para hidrólise enzimática e fermentação de microrganismos (SUN; CHENG, 2002). O alto preço comercial de solventes é outro fator importante a considerar para aplicações industriais.

Tratamentos alcalinos são um dos pré-tratamentos mais utilizados em materiais lignocelulósicos, como o bagaço da cana-de-açúcar.

Pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para a solubilização da lignina, exibindo menores efeitos sobre a solubilização da celulose e hemicelulose que os pré-tratamentos ácidos ou hidrotermais (CARVALHEIRO; DUARTE; GIRIO, 2008).

Em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento, o pré-tratamento alcalino geralmente utiliza baixas temperaturas e pressões, até mesmo condições ambientais. O tempo de pré-tratamento, no entanto, é relatado em termos de horas ou dias, sendo muito maior do que outros processos de pré-tratamento. Uma desvantagem significativa do pré-tratamento alcalino é a conversão de algumas bases em sais irrecuperáveis e ou a incorporação de sais na biomassa, durante as reações de pré-tratamento (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

O pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos provoca inchaço, levando à diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, maior área de superfície interna, ao rompimento da estrutura da lignina e à separação dos vínculos estruturais entre a lignina e carboidratos (BAUDEL, 2006).

Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são adequados para os pré-tratamentos alcalinos. O primeiro provoca inchaço, aumento da superfície interna da celulose e redução do grau de polimerização e cristalinidade, o que

provoca o rompimento de estrutura das lignina (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), também conhecido como cal, tem sido amplamente estudado. O pré-tratamento com cal remove substâncias amorfas, como a lignina, contribuindo, assim, para a melhoria do processo de hidrólise (ALVIRA et al., 2010).

Hidróxido de sódio e outras bases apresentam como desvantagens o alto custo e as dificuldades de recuperar os reagentes após a sua utilização. O pré-tratamento com cal é mais barato e de fácil recuperação, sendo uma alternativa para a remoção da lignina (WYMAN et al., 2005). No entanto, com a utilização de óxido de sódio, o tratamento apresenta-se mais brando que quando se utiliza hidróxido de sódio ou outras bases e, com isso, é necessário maior tempo de pré-tratamento.

Segundo Chang et al. (2001), para aumentar a eficiência da ação dos álcalis deve-se fazer a adição de oxigênio, devido à oxidação das partículas lignocelulósicas. A fração de celulose remanescente no material pré-tratado é posteriormente submetida à hidrólise, também conhecida por sacarificação, podendo esta ser enzimática ou ácida.

2.5 Sacarificação da celulose

Na hidrólise (sacarificação) são quebradas as ligações glicosídicas nas frações de celulose em seu componente do açúcar (glicose). A hidrólise pode ser ácida ou enzimática, tendo como objetivo a disponibilização de açúcares fermentescíveis. A hidrólise ácida quebra as moléculas de celulose por meio da adição de ácido; no caso da hidrólise enzimática utilizam-se enzimas secretadas por microrganismos.

Para a hidrólise ácida, existem basicamente dois processos. Em um utilizam-se ácidos concentrados e, no outro, ácidos diluídos para catalisar a sacarificação.

Segundo Daniel (1994 apud Ogeda e Petri 2010, p.1554), a hidrólise ácida (Figura 7) inicia com a protonação do oxigênio glicosídico com posterior quebra da ligação C₁-O. O carbocátion gerado é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C₁. O ataque nucleofílico da água com regeneração do ácido encerra a etapa de despolimerização (se esta ocorrer no interior da cadeia da celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais).

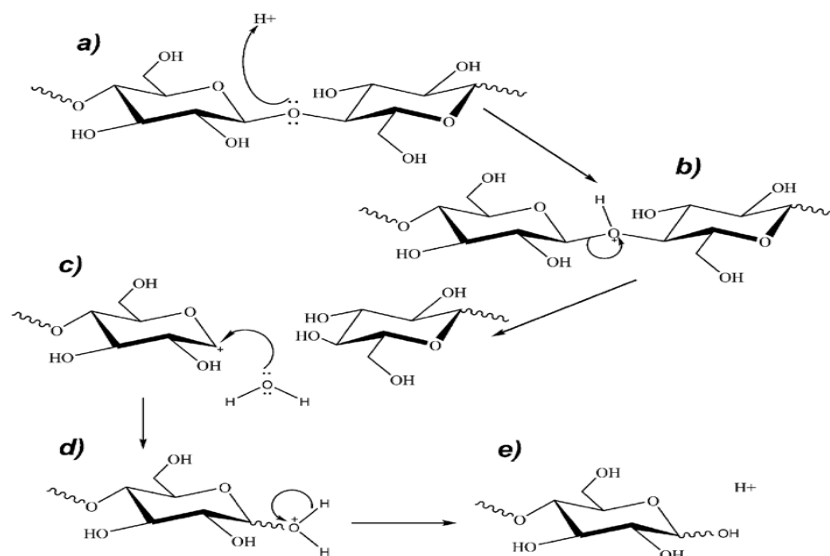


Figura 7 Mecanismo da hidrólise da celulose por ação do ácido
Fonte: Ogeda; Petri (2010)

A hidrólise ácida da biomassa é um método rápido e bem conhecido. No entanto, para o desenvolvimento do processo são necessárias a utilização de equipamentos resistentes à corrosão e altas temperaturas, que correspondem, eventualmente, a altas pressões, que têm custo elevado (MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2007).

Em comparação com a hidrólise enzimática, o ácido pode penetrar mais facilmente na lignina e a taxa de hidrólise é mais rápida. No entanto, a rápida degradação da glicose e a decomposição de monossacarídeo a tornam menos vantajosa (LENIHAN et al., 2010).

Ácidos concentrados, como H_2SO_4 e HCl , são poderosos agentes de hidrólise da celulose. No entanto, são tóxicos, corrosivos e perigosos e requerem reatores que sejam resistentes à corrosão. Hidrólise ácida diluída tem sido desenvolvida com sucesso para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, podendo conseguir elevados rendimentos de conversão da celulose, evitando os efeitos adversos anteriores (ESTEGHLALIAN, 1997 apud SUN; CHENG, 2002, p.4).

Segundo Oliveira e Vasconcelos (2006), a hidrólise ácida é mais rápida que a enzimática, no entanto, requer maior controle sobre o processo para evitar reações indesejáveis. Como citado anteriormente, a utilização de ácidos pode produzir compostos inibitórios da fermentação (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A taxa e o grau de hidrólise enzimática são influenciados pela resistência de transferência de massa, incluindo a resistência provocada por um filme em torno da celulose e a resistência através dos poros e capilares das partículas de celulose (YEH; HUANG; CHEN, 2010). Alguns fatores que influenciam a hidrólise enzimática são: (1) concentração de substrato, (2) carga de enzima, (3) tamanho das partículas da matéria-prima e (4) tempo de hidrólise,

afetando, assim, o rendimento em açúcar da hidrólise enzimática (RUDOLF et al., 2005; LI et al., 2010).

A hidrólise enzimática da celulose consiste de três etapas: adsorção de enzimas celulase sobre a superfície da celulose, biodegradação da celulose em açúcares menores e dessorção da celulase (SUN; CHENG, 2002).

A hidrólise enzimática é conduzida através de enzimas celulolíticas, que são altamente específicas. Estas são, usualmente, uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulases que estão envolvidas no processo de hidrólise são os de endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002). As exo-1,4- β -D-glicanases ou celobio-hidrolases hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses; as endo-1,4- β -D-glicanases, ou endoglicanases, hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória e as 1,4- β -D-glicosidases promovem a hidrólise da celobiose em glucose e podem também clivar unidades glucosídicas a partir de celooligossacarídeos. Coletivamente chamadas de celulases, atuam em sinergia para hidrolisar a celulose, criando sítios acessíveis umas para as outras e aliviando problemas de inibição pelos produtos (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002). Na Figura 8 é mostrada uma representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas.

As endo-1,4- β -glucanases, ou 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolases (EC 3.2.1.4), atuam randomicamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas β -(1,4). Sua atividade catalítica pode ser medida por meio da diminuição da viscosidade do meio decorrente da diminuição de massa molar média da celulose ou derivados de celulose. As celobio-hidrolases (exo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.91) atuam nos terminais redutores das cadeias de celulose, liberando D-celobiose, que pode ser detectada pelas técnicas de HPLC ou CG. As β -D-glicosidases, ou β -D-glucoside gluco-hidrolases (EC 3.2.1.21), catalisam a liberação de unidades monoméricas de D-

glicose a partir da celobiose solúveis, evitando o efeito da concentração de celobiose sobre as demais enzimas (LYND; WYMAN, 1999; LI; CONVERSE; WYMAN, 2003; OGEDA; PETRI, 2010).

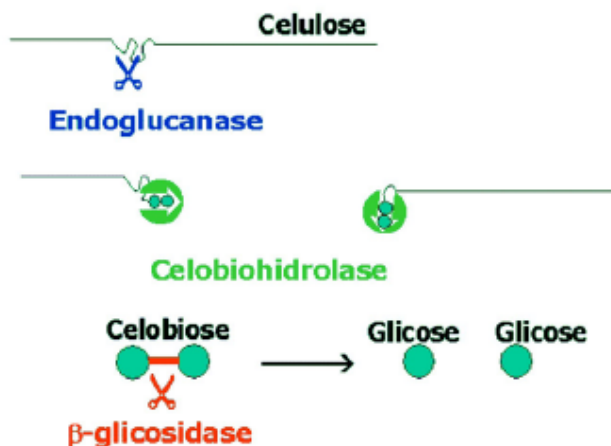


Figura 8 Representação esquemática da ação catalítica das celulasas
 Fonte: Tébéka et al. (2009) adaptado por Ogeda; Petri, (2010)

No mecanismo sinérgico exo-endo, as endoglucanases clivam randomicamente cadeias na superfície da celulose, fornecendo, assim, numerosos sítios adicionais para o ataque das celobio-hidrolases. Logo, cada evento hidrolítico catalisado por uma endoglucanase resulta em novos sítios para as celobio-hidrolases (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002).

Atualmente, os complexos de celulase comercializados contêm níveis baixos de β-glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos. Segundo Sun e Cheng (2002), a atividade da celulase é inibida por celobiose e, em menor medida, por glicose. Vários métodos têm sido desenvolvidos para reduzir a inibição, incluindo o uso de alta concentração de enzimas, a suplementação de β-glicosidasas durante a hidrólise e a remoção de

açúcares durante a hidrólise por ultrafiltração ou emprego de processos de simultâneas sacarificação e fermentação (SSF) (item 2.6).

Os produtos da hidrólise são, normalmente, açúcares redutores, incluindo glicose. A hidrólise enzimática é, geralmente, realizada em condições mais brandas (pH 4,8 e temperatura de 45 °C a 50 °C) e não tem problemas de corrosão (DUFF; MURRAY, 1996).

Após a hidrólise, o meio pode ser fermentado, por exemplo, por leveduras, sendo a mais usada a *Saccharomyces Cerevisiae*, que converte os açúcares fermentescíveis em etanol, o qual é concentrado ao final da fermentação por destilação.

2.6 Processos de hidrólise e fermentação

Os materiais lignocelulósicos, depois de hidrolisados, disponibilizam fração de açúcares fermentescíveis, podendo, então, ser utilizados pelas leveduras ou outros microrganismos. Na literatura são descritos três modelos principais de operação da sacarificação e fermentação para a produção de bioetanol (Figura 9), partindo de materiais lignocelulósicos: hidrólise e fermentação separadas (SHF), o processo simultâneo de sacarificação e fermentação (SSF) e o processo misto, que é denominado de semissimultâneo, sacarificação e fermentação (SSSF).

Até o momento, são mais utilizados os processos de hidrólise e fermentação separada (SHF) e sacarificação e fermentação simultâneos (SSF) (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

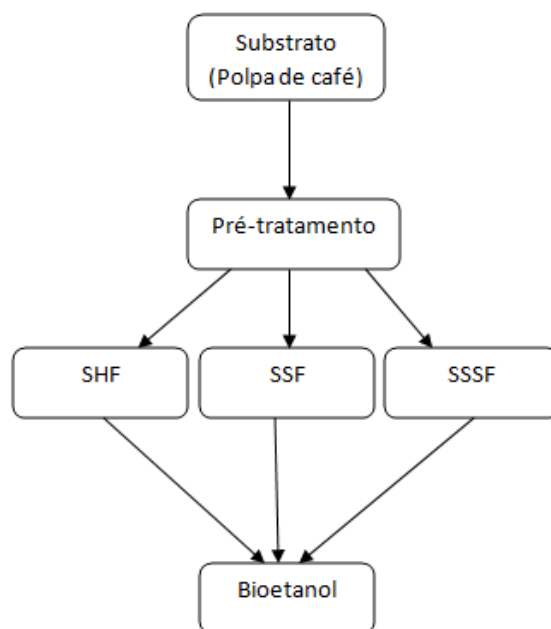


Figura 9 Formas de produção de etanol a partir de material lignocelulósico

O primeiro modo de operação, conhecido como hidrólise e fermentação separada (SHF), consiste na realização da hidrólise, com posterior inativação das enzimas e fermentação. O segundo método é composto da sacarificação e a hidrólise simultâneas (SSF). Neste método, a adição de enzimas (celulases) e de leveduras é simultânea, portanto, os processos de quebra da celulose e fermentação ocorrem ao mesmo tempo. Existe, por último, o processo misto, conhecido como semissimultâneo sacarificação e fermentação (SSSF). Este processo é dividido em duas fases: a primeira é a pré-hidrólise, em que, inicialmente, adiciona-se apenas enzima ao substrato e incuba-se por um período de tempo a uma temperatura ideal para hidrólise. Posteriormente, a temperatura é abaixada e adicionam-se mais enzimas e também leveduras, iniciando-se, então, o processo de fermentação e sacarificação simultâneo.

A eficiência dos processos para a produção de etanol pode ser avaliada por dois indicadores, que são: produtividade, sendo definida como a massa de etanol produzido por massa de matérias-primas secas por unidade de tempo ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e o rendimento, sendo este a massa de etanol produzido por unidade de massa do material utilizado seco (g.g^{-1}). O processo SSF, geralmente, tem maior produtividade do que o SHF, pois o primeiro tem menor tempo de operação. No entanto, para o rendimento não há nenhuma conclusão consensual, dependendo de cada caso (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

Ohgren et al. (2007) compararam SHF e SSF utilizando diferentes cepas de leveduras empregando sabugo de milho pré-tratado como substrato. Em seus resultados, os autores verificaram que, em todos os casos, os melhores resultados quanto à produtividade e rendimento foram obtidos realizando-se hidrólise e fermentação simultânea (processo SSF).

As vantagens do SSF podem ser atribuídas à menor inibição da enzima celulase, devido ao acúmulo de produto da hidrólise (glicose) e ao maior tempo de hidrólise enzimática, comparado com o SHF, em que a hidrólise é encerrada quando as celulasas são inativadas (SHEN; AGBLEVOR, 2010; PARK et al., 2010). Além disso, SSF apresenta como vantagem o requerimento de menor quantidade de celulasas e equipamentos (PARK et al., 2010).

Segundo Park et al. (2010), apesar dessas vantagens, o SSF apresenta como desvantagem a diferença de temperatura ótima da celulase na sacarificação (50°C) e da levedura durante a fermentação (entre 28°C e 35°C).

Segundo Sun e Cheng (2002), as desvantagens que precisam ser consideradas para o SSF incluem: (1) temperatura incompatível da hidrólise e fermentação; (2) tolerância dos microrganismos ao etanol e (3) inibição de enzimas pelo etanol.

Por sua vez, o tratamento SHF apresenta como vantagem a taxa de hidrólise mais rápida, por ser realizado em condições otimizadas, não realizadas

no SSF devido ao fato de a levedura já estar presente no meio (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

É preciso considerar que as enzimas devem ser avaliadas do ponto de vista de todo o processo, e não apenas em relação a algumas operações isoladamente. Assim, por exemplo, determinada enzima pode permitir alto rendimento na hidrólise, mas inibir a fermentação, impedindo sua adoção em processos SSF (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

Se uma pré-hidrólise é aplicada antes da fermentação e, posteriormente, é realizada uma nova adição de enzima e de microrganismos fermentadores, esse processo tem as vantagens de ambos os tratamentos. Este processo pode ser referido como semissacarificação e fermentação simultâneas (SSSF), que inclui uma fase pré-hidrolítica e uma fase de SSF. Espera-se que SSSF tenha tanto maior produtividade quanto rendimento que SSF e SHF, se um tempo adequado de pré-hidrólise for selecionado (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

4 CONCLUSÃO

A polpa de café obtida pelo como resíduo do processamento úmido do café foi utilizada para a produção de bioetanol, obtendo-se resultados satisfatórios. Inicialmente, a polpa de café passou por um processo de extração dos compostos solúveis em água, o qual tem o objetivo de aproveitar esta fração na fermentação. Foram realizadas quatro formas diferentes de extração, sendo elas: apenas prensagem da polpa; trituração e prensagem; aquecimento a 60 °C, por 15 minutos, trituração e prensagem e aquecimento em autoclave, trituração e prensagem.

As análises realizadas para os extratos foram pectinas, polifenóis, amido e açúcares. Os resultados obtidos demonstraram que apenas influenciou de maneira positiva a adição de trituração no processo, pois não aumentou o teor de polifenóis (inibidor de fermentação) e foi o único processo que proporcionou aumento significativo no teor de açúcares totais.

O extrato foi utilizado na fermentação. Foram realizados cinco tratamentos, que foram: contendo apenas caldo de cana diluído, caldo de cana diluído com extrato, melação, melação diluído com extrato da polpa de café e apenas o extrato. Ao analisar a fermentação, mostrou-se que a adição de extrato de café na fermentação não influenciou de maneira negativa a produção de etanol. Após a retirada do extrato, a polpa de café prensada foi submetida a um pré-tratamento, objetivando a disponibilização da celulose para a hidrólise enzimática. Para o pré-tratamento realizou-se um delineamento composto central rotacional, tendo como variáveis independentes as concentrações hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio e tempo de reação (autoclave). Como variáveis repostas foram verificados os teores de celulose, lignina e hemiceluloses remanescentes, além de açúcares redutores e glicose liberados durante uma hidrólise enzimática padrão para todos os tratamentos. Como resultados,

observou-se que apenas a concentração de hidróxido de sódio influenciou de maneira positiva o pré-tratamento da polpa, sendo as melhores condições obtidas: 0% de hidróxido de cálcio, 4% de hidróxido de sódio e 25 minutos. A polpa de café pré-tratada foi submetida à otimização da hidrólise enzimática e, para isso, utilizou um DCCR, tendo como as variáveis independentes as concentrações de celulases e celobiasas. Ao final do processo, mostrou-se que as concentrações de 25,78 FPU/g de substrato e de celobiasa 28,95 CBU/g de substrato apresentaram maiores rendimentos e teores de glicose. Por último, o hidrolisado foi submetido à fermentação utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* CAT1. Ao fermentar o hidrolisado, mostrou-se possível o aproveitamento de polpa de café por completo. Sendo assim, fica evidente a possibilidade da utilização da polpa de café para a produção de bioetanol.

REFERÊNCIAS

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n. 1, p. 13-18, July 1996.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, July 2010.

AMORIM, H. C.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. Piracicaba: FEALQ, 1996.

ANTIER, P. et al. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus-niger* c28b25 for solid-state fermentation of coffee pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, n. 3, p. 254-260, Mar. 1993.

ARGOLLO, F. A. M. **Arquitetura do café**. Campinas: Imprensa Oficial do Estado, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 11. ed. Arlington: AOAC International, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 11. ed. Arlington: AOAC International, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC International, 1990.

AVALLONE, S. et al. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 8, p. 1308-1311, Nov./Dec. 2000.

AVELLAR, B. K.; GLASSER, W. G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 205-218, Mar. 1998.

BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Z. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 551-573, Oct. 2008.

BARCELOS, A. F. et al. Fatores Antinutricionais da Casca e da Polpa Desidratada de Café (*Coffea arabica* L.) Armazenadas em Diferentes Períodos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1325-1331, jul./ago. 2001.

BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros Bromatológicos da casca e polpa desidratada de café em diferentes períodos. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, jul./ago. 2002.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, Nov. 2008.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICA SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2006. Disponível em: <<http://www.inovação.unicamp.br/etanol/report/hidrólise%20baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2010.

BELLUCO, A. E. S. **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes**. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BORÉM, F. M. **Pós-colheita do café**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUIN, R. Pulpa e pergamino de café. I.: composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, San José, v. 22, n. 3, p. 299-304, July/Sept. 1972.

BRINGHENT, L. **Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

BROWING, B. L. **The chemistry of wood**. New York: Interscience, 1963.

BRUM, S. S. **Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para produção de novos materiais**. 2007. 138 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise Ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Analytica**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 48-53, jan. 2010.

CARRASCO, F. Thermomechanochemical pretreatment of wood in a process-development unit. **Wood Science and Technology**, New York, v. 26, n. 6, p. 413-428, Sept. 1992.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GIRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 67, n. 11, p. 849-864, Nov. 2008.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 108, p. 67-93, 2007.

CHANG, V. S. et al. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass - Poplar wood and newspaper. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 94, n. 1, p. 1-28, Apr. 2001.

CHEN, Y. et al. Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 18, p. 6994-6999, Sept. 2010.

CHEN, Y. et al. Xylose and cellulose fraction from corncob with three different strategies and separate fermentation of them bioethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 18, p. 6994-6999, Sept. 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores agropecuários**. Brasília: Conab, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

D' ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: D' ALMEIDA, M. L. O. **Celulose e papel**: tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica. 2. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1998. p. 45-106.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 19, n. 3, p. 220-225, Aug. 1996.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 3, p. 597-606, 2006.

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 55, n. 1, p. 1-33, Jan. 1996.

ELIAS, L. G. Composición de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, 1978. p. 19-29.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 101, n. 1, p. 41-60, Apr. 2002.

FARRELL, A.E. et al. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, Oxford, v. 311, n. 5760, p. 506-508, Jan. 2006.

FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas lignolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

GAMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 1, p. 78-88, May 2006.

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, July 2010.

GOMIDE, F. L.; DEMUNER, E. B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método klason modificado. **O papel**, São Paulo, v. 47, n. 8, p. 36-38, Aug. 1986.

HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 1, p. 10-18, Jan. 2009.

HSU, T. A. Pretreatment of Biomass. In: WYMAN, C. E. **Handbook on bioethanol, production and utilization**. Washington: Taylor & Francis, 1996.

HSU, T. A.; LADISCH, M. R.; TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, Lodon, v. 10, n. 5, p. 315–319, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos: volume 1.** 2. ed. São Paulo: I.A.L., 1985.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KENNEDY, F.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, E. P. A. **Wood and cellulosics: industrial utilization, biotechnology, structure and properties.** New York: Halsted, 1987.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 361-375, Apr. 2004.

KLINKE, H. B. et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, n. 1, p. 15-26, Mar. 2002.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 126-131, Oct. 2009.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Berlin, v. 57, p. 45–125, 1997.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, Apr. 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. **Biotechnology Progress**, New York, v. 25, n. 2, p. 302-314, Mar./Apr. 2009.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 124, v. 1-3, p. 1081-1099, 2005.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 1-24, July 1997.

LENIHAN, P. et al. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 156, n. 2, p. 395-403, Jan. 2010.

LI, C. L. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4900-4906, July 2010.

LI, J. B.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 16, p. 3061-3068, Nov. 2007.

LI, X.; CONVERSE, A. O.; WYMAN, C. E. Characterization of molecular weight distribution of oligomers from autocatalyzed batch hydrolysis of xylan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 107, n. 1-3, p. 515-522, Apr. 2003.

LI, X.; KIM, T. H.; NGHIEM, N. P. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 15, p. 5910-5916, Aug. 2010.

LIMA, U. A. et al. **Biotechnologia industrial**: volume 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, n. 5, p. 777-793, Sept./Oct. 1999.

MADHAVAN, A. et al. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1037-1047, Apr. 2009.

MARTIN, C. et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 109, n. 1267, p. 33-39, Jan. 2007.

MARTIN, C.; JONSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 3-4, p. 386-395, Mar. 2003.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 3, p. 426-432, Feb. 2007.

MATTHEWS, J. F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I beta. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 138-152, Jan. 2006.

MEDEIROS, A. B. P. et al. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. **Brazilian journal of microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 245-248, June 2003.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MOSIER, N. et al. Features of promizing technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673–686, Apr. 2005.

MOSIER, N. et al. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 18, p. 1986-1993, Dec. 2005a.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, London, v. 43, n. 1, p. 1-14, Jan. 2006.

NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4583-4589, July 2008.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1-10, 2010. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/No%20Prelo/RV/RV09400.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2010.

OHGREN, K. et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 5, p. 834-839, May 2007.

OLIVEIRA, V. D. et al. Substituição do milho por casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação, **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 424-436, mar./abr. 2001.

OLIVEIRA,M.; VASCONCELOS,Y. Revolução no canivial: novas usinas, variedades produtiva, pesquisas genéticas são as soluções para aumentar a oferta de álcool. **Revista Pesquisa Fapesp**, São Paulo, n. 122, 2006. Disponível em: <[www.revistapesquisa.fapesp.br /index.php?ed+155&lg=>](http://www.revistapesquisa.fapesp.br/index.php?ed+155&lg=>)>. Acesso em: 18 Aug. 2010.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 25-33, Aug. 2000.

PAN, X. J. et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121, n. 6, p. 1069-1079, 2005.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 69-80, Aug. 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000a.

PARK, I. et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry**, London, v. 45, n. 4, p. 487-492, Apr. 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, v. 6, p. 863-871, Nov./Dec. 2003.

RIJKE, R. de; HEIDE, R. Flavour compounds in rum, cognac and whisky. In: PIGGOTT, J. R. (Ed.). **Flavour of distilled beverages: origin and development**. Florida: Verlag Chemie International, 1983. p. 79-92.

ROJAS, J. B. U. et al. A. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002

RUDOLF, A. et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 2, p. 195-204, July 2005.

SAENGER, M. et al. Combustion of coffee husks. **Renewable Energy**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 103-121, May 2001.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to eth anol. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, Dec. 2005.

SAHA, B. C. et al. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n. 5, p. 279-291, May 2003.

SALMONES, D. et al. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 5, p. 537-544, Mar. 2005.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 185-194, Mar./Apr. 2009.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 185-194, Mar./Apr. 2009.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bietanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 27-33, jan. 2009.

SHEN, J. C.; AGBLEVOR, F. A. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1098-1107, Aug. 2010.

SOUZA, M. D. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar-pré-tratado**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, Amsterdam, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, Sept. 2008.

ULLOA, J. B. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. **Waste Management**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 87-97, 2004.

UM, B. H.; KARIM, M. N.; HENK, L. L. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, n. 1-3, p. 115-125, 2003.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Ithaca, 1994.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010a.

VILELA, F. G. et al. Uso da casca de café melosa em diferentes níveis na alimentação de novilhos confinados. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 198-205, jan./fev. 2001.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, Dec. 2005.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 74, n. 2, p. 307-319, 2001.

YEH, A. I.; HUANG, Y. C.; CHEN, S. H. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 79, n. 1, p. 192-199, Jan. 2010.

ZHANG, X. L.; YANG, W. H.; BLASIAK, W. Modeling Study of Woody Biomass: Interactions of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin. **Energy & Fuels**, Washington, v. 25, n. 10, p. 4786-4795, Oct. 2011.

ZHAO, X. B.; CHENG, K. K.; LIU, D. H. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 5, p. 815-827, Apr. 2009.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, London, v. 2, n. 3, p. 51-68, set. 2009.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

UTILIZAÇÃO DO EXTRATO DA POLPA DE CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE ÁLCOOL

RESUMO

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância no cenário nacional. Durante o processamento dos grãos são gerados resíduos, os quais são dispostos de formas inadequadas no meio ambiente. Basicamente, existem duas formas de processamento do café, por via seca e por via úmida. Quando processado por via úmida, o café gera como resíduos a polpa e a água de lavagem. Este trabalho foi realizado com os objetivos de selecionar um processo eficiente para a obtenção de um líquido da polpa de café denominado de extrato da polpa de café e avaliar a fermentação alcoólica deste extrato adicionado ou não ao melaço e caldo de cana, visando à produção de bioetanol. No processo de obtenção do extrato da polpa de café foi estudado o efeito do tratamento térmico (60 °C e 121 °C) e da trituração no rendimento e na composição do extrato. Para selecionar o processo de extração mais eficiente, os extratos foram analisados quanto ao teor de açúcares redutores e redutores totais, amido, compostos fenólicos e pectina. Foi realizado um estudo da fermentação empregando-se cinco meios diferentes: caldo de cana diluído com água, caldo de cana diluído com extrato da polpa de café, melaço diluído com água, melaço diluído com extrato da polpa de café e apenas o extrato da polpa de café. O processo selecionado para a obtenção do extrato da polpa de café foi de trituração à temperatura ambiente, seguido de prensagem. Na etapa de fermentação foi utilizado um isolado de usina de álcool *Saccharomyces cerevisiae* Cat1. Durante a fermentação, mediram-se açúcares redutores totais, contagem de células, massa seca e etanol, células totais e biomassa. Como resultado, verificou-se que a adição do extrato da polpa de café não influenciou negativamente a fermentação, podendo, assim, ser utilizado para diluir o caldo de cana e o melaço durante a produção de bioetanol.

Palavras-chave: Polpa de café. Extração. Açúcares fermentescíveis. Fermentação. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Coffee is one of the products of greatest importance in the Brazilian scenario. During grain processing, residues are generated, which are disposed in inadequate forms into the environment. Basically, there are two forms of coffee processing: by dry via and by moist via. When processed by moist via, coffee generates residues of pulp and washing water. This work was conducted with the objectives of selecting an efficient process for obtaining a liquid of coffee pulp named coffee pulp extract and evaluating the alcoholic fermentation of this extract, added or not to the molasses and sugar cane juice, aiming at the obtaining of bioethanol production. In the process of obtaining coffee pulp extract, the effect of the thermal treatment and of the milling upon the yield and composition of the extract were investigated. To select the most efficient extraction process, the extracts were analyzed as to content of reducing sugar and total reducing sugars, starch, phenolic compounds and pectin. A fermentation study was conducted by employing five different media: sugar juice diluted with water, cane juice diluted with coffee pulp extract and only coffee pulp extract. The process selected for obtaining coffee pulp extract was that of grinding at room temperature, followed by expelling. In the fermentation step, an alcohol plant isolate *Saccharomyces cerevisiae* Cat1 was used. During fermentation, total reducing sugars, cell count, dry mass and ethanol, total cells and biomass were measured. As a result, it was found that the addition of coffee pulp extract did not influence negatively fermentation, its being able, so, to be used to dilute both the cane and molasses during biotechnological production.

Keywords: coffee pulp. Extraction. Fermentable sugars. Fermentation. *Saccharomyces cerevisiae*.

1 INTRODUÇÃO

O café destaca-se como o produto agrícola de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais, localizado na região sudeste do país.

A safra de café beneficiado, no Brasil, em 2010, fechou com uma produção de 48,09 milhões de sacas de 60 kg, representando um acréscimo de 21,9% ou 8,62 milhões de sacas, quando comparado com a produção de 39,47 milhões de sacas obtidas na safra 2009. Tal crescimento é justificado pelo ano de bialidade positiva, aliado às condições climáticas favoráveis durante o ciclo da cultura (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010).

O fruto do café é composto do epicarpo (casca), mesocarpo (mucilagem), endocarpo (pergaminho), película prateada e grão. Para o consumo do café é necessário o processamento do fruto.

A cafeicultura gera um volume elevado de resíduos que consistem de restos de colheitas e resíduos gerados no processamento, que são dispostos de modo inadequado no meio ambiente. Recentemente, tem sido objeto de vários estudos a utilização deste resíduos.

Frutos de café maduros podem ser processados por três métodos distintos para a obtenção do café beneficiado. O processo mais simples e rústico é processamento a seco, que consiste na fermentação e secagem do café ao sol, em plataformas. Neste processo não se retira a casca antes da secagem do café cereja. No processo úmido, a polpa e ou a mucilagem são removidos mecanicamente e os grãos são fermentados em tanques com um grande volume de água. O processo semiseco é uma variação do processo por via úmida, em que os frutos de café também têm sua polpa extraída, mas o processo de fermentação ocorre diretamente em uma plataforma (VILELA et al., 2010).

No entanto, Pandey et al. (2000) classificaram os métodos de beneficiamento do café em processo úmido ou seco e o resíduos sólidos

(subprodutos) obtidos são denominados polpa ou casca, respectivamente, sendo de natureza orgânica e ricos em nutrientes.

Embora a natureza dos compostos presentes na polpa e na casca de café seja semelhante, a composição e a concentração de cada um dos componentes podem ser bastante diferentes, dependendo do modo de processamento, das cultivares e de tipo de solo, entre outros fatores (PANDEY et al., 2000).

Segundo Elias (1978), a polpa de café apresenta 76,7% de umidade e os seguintes teores em base seca: 10% de proteína, 2,5% de extrato etéreo, 21% de fibras, 50% de carboidratos e 8% de cinzas. Ulloa (2004) encontrou 8% de proteína, 2,9% de extrato etéreo, 8,9% de cinzas, 28,6% de celulose, 2% de polifenóis, 0,7% de taninos e 1,8% de cafeína. Muitos destes componentes podem ser extraídos com água.

Avallone et al. (2000) determinaram as frações dos carboidratos da mucilagem da polpa retirada durante o processamento úmido do café e encontraram as seguintes frações dos carboidratos: 29,6% de arabinose, 12,6% de xilose, 13,6% de galactose, 4,2% de ramanose e 30,5% de glicose, sendo esta mucilagem obtida por desmucilador mecânico, demonstrando que esses compostos podem ser utilizados para processos biotecnológicos.

Os resíduos do processamento do fruto do café são ricos em cafeína, taninos, compostos fenólicos e matéria orgânica, tornando-os tóxicos quando descartados no meio ambiente. Uma alternativa para o seu aproveitamento seria seu uso em processos biotecnológicos para a obtenção de produtos de valor agregado e contribuindo, ao mesmo tempo, para a diminuição do impacto ambiental causado por esses resíduos agroindustriais (PANDEY et al., 2000). Uma forma inadequada de aplicação destes resíduos é como adubo em áreas cultiváveis, podendo causar sérios problemas ambientais, incluindo a liberação de quantidades excessivas de taninos e fenóis no solo, o que poderia inibir o crescimento da raiz (VELAZQUEZ-CEDENO; MATA; SAVOIE, 2002).

Tradicionalmente, a casca e a polpa de café têm se limitado a aplicações, como fertilizantes, alimentação de animais e compostagem, entre outras utilizações mais simples. Nestas aplicações utiliza-se somente uma pequena fração do resíduo gerado durante o processamento do café e não são tecnicamente muito eficientes. O foco atual é em aplicações desse substrato em bioprocessos. Tentativas têm sido feitas para aprimorar as formas de utilização tradicionais e obter novas formas de utilização da polpa e casca do café, como, por exemplo, a eliminação de compostos tóxicos (compostos fenólicos, taninos, cafeína) e a utilização na alimentação animal, o uso com eficiência do substrato para a produção de produtos com valor agregado, como cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, *flavour* e aroma de certos compostos, entre outros. Estes subprodutos, por possuírem quantidade elevada de açúcares fermentáveis, constituem um apropriado substrato para o cultivo de fungos e leveduras (PANDEY et al., 2000). Uma das alternativas seria utilização para a produção de etanol tanto da fração de carboidrato solúvel em água quanto do material lignocelulósico. A vantagem de se obter o extrato antes do processo de deslignificação é que, durante o processo de deslignificação, os compostos solúveis em água seriam perdidos.

O setor alcooleiro utiliza-se de leveduras do gênero *Saccharomyces*. Nas grandes indústrias produtoras de etanol são utilizadas leveduras de panificação prensadas e secas, ou leveduras selecionadas, com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação.

Estas fermentações são realizadas com mostos de caldo de cana ou melaço, diluídas em água, ou uma mistura de ambos dentro de um curto período de 6 a 12 horas (AMORIM et al., 2011).

A indústria de fermentação alcoólica utiliza densidades celulares muito altas para os caldos de fermentação (caldo de cana-de-açúcar e ou melaço diluído) contendo de 150 a 200 g de açúcar total (principalmente sacarose) por

litro do meio, ficando a produção de etanol em torno de 8-11% (v/v), com alta produtividade (WHEALS et al., 1999).

Numa planta de produção de etanol, alguns fatores de estresse incluem leveduras, teor de açúcares, concentração de inibidores, concentração de etanol e pH, entre outros.

Leveduras com menor resistência a esses fatores têm dificuldades no processo fermentativo, as quais podem levar a uma redução no seu crescimento e nas taxas de sobrevivência e resultar em menor eficiência fermentativa (QUEROL et al., 2003).

O pH é um fator que influencia significativamente as fermentações industriais, devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, a taxa de fermentação e a formação de subprodutos (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996). O etanol é bem conhecido como um inibidor do crescimento. A taxa de produção de etanol e sua acumulação dentro das células de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações levam a quedas da viabilidade (DASARI et al., 1990). Concentrações elevadas de açúcar podem inibir o crescimento de leveduras e atividades de fermentação. Um teor excessivamente elevado de açúcar inicial pode resultar em inibição do crescimento por estresse osmótico, o que ocorre quando a concentração de certos solutos torna-se tão alto que um gradiente de pressão osmótica grande é estabelecido através da membrana celular (PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006). Por esse motivo faz-se a diluição do caldo de cana-de-açúcar empregado na fermentação para valores próximos a 18 °Brix (18% de sólidos solúveis).

Processos de fermentação que usam cepas de leveduras selecionadas têm como principais vantagens: (1) um processo mais rápido de iniciação; (2) baixo risco de contaminação por fermentação espontânea; (3) taxas de fermentação mais rápidas e uniformes; (4) menor competição por nutrientes essenciais; (5)

níveis superiores de rendimento e (6) baixos teores de açúcares residuais (SILVA; ROSA; OLIVEIRA, 2006).

Dentre os compostos presentes na polpa de café, os compostos fenólicos são conhecidos por serem potentes inibidores da fermentação (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). Eles causam perda de integridade da membrana biológica dos microrganismos como a *Saccharomyces cerevisiae*, afetando a capacidade das barreiras seletivas das membranas e a matriz enzimática dos microrganismos (HEIPIEPER et al., 1994; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). Estes compostos incluem álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos (ALMEIDA et al., 2007). Compostos fenólicos de baixo peso molecular são os mais tóxicos para os microrganismos (LARSSON et al., 2000).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar diferentes processos para a obtenção do extrato da polpa de café, avaliando a eficiência na extração dos compostos nela presentes e avaliar a sua utilização na produção de etanol adicionado ou não com melão ou caldo de cana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

A polpa de café cereja oriunda do beneficiamento por via úmida foi cedida por um produtor da região rural de Lavras, Minas Gerais, safra 2010. As amostras foram transportadas ao Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos, congeladas e armazenadas em freezer a -18°C, até o momento das análises. Para o estudo do processo de extração cerca de 8 kg de polpa foram descongeladas, homogeneizadas aos líquidos exsudados durante o descongelamento e separados em quatro partes iguais, sendo cada uma destinada a um dos tratamentos de estudo do processo de extração.

Para fermentação foram utilizados extrato de polpa de café, caldo de cana-de-açúcar (21% de sólidos solúveis totais, pH igual a 4,8 e 205 g de açúcares redutores totais/L de caldo de cana-de-açúcar) e melaço (70% de sólidos solúveis totais, pH igual a 5,2 e 689 g de açúcares redutores totais/L de melaço).

2.2 Processo de obtenção do extrato da polpa de café

A partir da polpa do café foram realizados quatro diferentes processos para a retirada da fração solúvel da polpa, denominada de extrato da polpa. Para cada processo de extração foram empregados 2 kg de polpa de café e do líquido exsudado do descongelamento

E1: Processo de extração controle: prensagem da polpa de café (prensa manual, Macanuda);

E2: processo de extração com tratamento mecânico: a amostra foi triturada em liquidificador industrial. A parte líquida foi separada por filtração em organza e a parte sólida foi prensada em prensa manual (prensa manual, Macanuda). Sendo os dois líquidos misturados posteriormente;

E3: processo de extração termomecânico com aquecimento em banho-maria: a amostra foi aquecida a 60 °C e mantida nessa temperatura, por 15 minutos, em banho (Modelo Q226M2, Quimis) sem agitação, sendo posteriormente triturada em liquidificador. A parte líquida foi separada por filtração em organza e a parte sólida foi prensada em prensa manual;

E4: processo de extração termomecânico com aquecimento em autoclave, seguido de trituração e prensagem: 4 erlenmeyes de 1 L contendo, cada um, 500 g da amostra foram autoclavados (autoclave vertical, Primatec), a 121 °C, por 15 minutos e, em seguida, foram triturados em liquidificador industrial. A parte líquida foi separada por filtração em organza e a parte sólida foi prensada em prensa manual.

Nos quatro processos descritos não foi adicionada água pura ou água de lavagem do café, sendo realizadas quatro repetições para cada processo de extração.

2.2.1 Análises dos extratos da polpa de café

Dos extratos da polpa de café obtidos dos processos de extração E1, E2, E3 e E4 foram realizadas as análises de pectinas totais, pectinas solúveis, fenóis, amido, açúcares redutores e açúcares totais, sendo todas realizadas em triplicata.

Amido: o amido presente no extrato da polpa de café foi extraído quimicamente e determinado por espectrofotometria, segundo método de Somogy adaptado por Nelson (1944). A leitura foi realizada em comprimento de

onda de 620 nm e os resultados expressos em gramas de amido por 100 g de extrato da polpa de café.

Pectina total e solúvel: foram extraídas segundo a técnica descrita por McCready e McComb (1952) e determinadas colorimetricamente segundo Bitter e Muir (1962), sendo os resultados expressos em mg de ácido galacturônico por 100 g de extrato da polpa de café.

Açúcares redutores e totais: os açúcares foram determinados pelo método proposto por Laneenyon, citado pela Association of Official Agricultural Chemists (1992) e dosados pela técnica de Somogyi adaptada por Nelson (1944). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm, com sistema computadorizado. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Polifenóis: os polifenóis foram extraídos e dosados segundo a técnica de Goldstein e Swain (1963), com algumas modificações. Foram feitas três extrações sucessivas em metanol 80%. Para a determinação, foi utilizada a metodologia de Folin-Denis, conforme Association of Official Agricultural Chemists (1992). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a 760 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de polifenóis na polpa e no extrato. O método baseia-se na oxidação de hidroxilas fenólicas pelo reagente de Folin-Denis, em meio alcalino, com produção de composto de coloração azul. O ácido tânico foi utilizado como padrão.

pH: o potencial hidrogeniônico foi determinado por potenciômetro digital, modelo Quimis, tipo Q-400 A.

2.3 Processo fermentativo

Selecionado o método de extração para a obtenção do extrato da polpa de café, foi realizado o estudo da fermentação empregando-se, como meio de fermentação, caldo de cana, melaço, extrato da polpa de café e suas misturas.

2.3.1 Microrganismo

Para fermentação, foram utilizados *Saccharomyces cerevisiae*, codificado como CAT 1, isolado de usina de álcool (BASSO et al., 2008), pertencente à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do DBI/UFLA, armazenado sob a forma liofilizada.

2.3.2 Planejamento experimental

Para o estudo da fermentação foram realizados cinco tratamentos. Para cada ensaio, foram realizadas três repetições e os extratos utilizados foram os obtidos na extração E2.

F1: o meio de fermentação foi preparado apenas com caldo de cana-de-açúcar e água destilada, e o teor de sólidos solúveis ajustado para 18 °Brix. Para este tratamento, foram utilizados 600 mL de caldo de cana e 100 mL de água destilada.

F2: no preparo do meio de fermentação, o extrato da polpa de café foi utilizado para diluir o caldo de cana-de-açúcar, e o teor de sólidos solúveis ajustado para 18 °Brix. Utilizaram-se, em sua composição, 560 mL de caldo de cana e 140 mL de extrato da polpa de café.

F3: o meio de fermentação foi preparado com melaço diluído com água destilada, sendo o teor de sólidos solúveis ajustado para 18 °Brix. Foram utilizados 180 mL de melaço adicionados de 520 mL de água destilada.

F4: no preparo do meio de fermentação, o extrato da polpa de café foi utilizado para diluir o melaço para 18 °Brix. Foram utilizados 131,25 mL de melaço e 568,75 mL de extrato da polpa de café.

F5: o meio de fermentação foi preparado com extrato da polpa de café, com teor de sólidos solúveis totais de 8 °Brix. Neste tratamento utilizaram-se 700 mL de extrato da polpa de café.

Todos os meios de fermentação foram suplementados utilizando-se sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) (0,1 g/L) e sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,2 g/L).

2.3.3 Preparo do inóculo

Com o propósito de adaptar e aumentar a população de células até valores iguais a 10^8 células viáveis/mL, inicialmente, foi realizada a reativação utilizando 1 g da levedura liofilizada em 10 mL de água destilada estéril, a 38 °C, por 30 minutos. Posteriormente, este volume foi inoculado em 100 mL de caldo de cana-de-açúcar a 5 °Brix. Após 12 horas de incubação, a 28 °C, sob agitação de 150 rpm em incubadora com agitação orbital (Incubadora modelo 430RDB, Nova Ética), o teor de sólidos solúveis totais chegou a 2 °Brix. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200 mL de caldo de cana a 7 °Brix. Ao se atingir 2 °Brix, o mesmo procedimento foi repetido, mas, desta vez, adicionando-se 350 mL de caldo de cana, a 12 °Brix. Ao atingir novamente 2 °Brix e uma concentração de célula 10^8 células viáveis/mL, este meio foi utilizado como inóculo da fermentação.

2.3.4 Fermentação do mosto

Antes de iniciar a fermentação, os meios foram autoclavados, a 121 °C, durante 20 minutos.

Para iniciar a fermentação, foram adicionados 10% v/v do inóculo a cada tratamento. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 1 L,

contendo 700 mL de meio e inóculo, dispostos em incubadora à temperatura de 30 °C, durante 24 horas. Para o estudo cinético, foram retiradas amostras do mosto fermentado nos tempos de 0, 2, 4, 8, 10, 12, 14 e 24 horas. Foram realizadas as análises de açúcares redutores totais, contagem de células em câmara de Neubauer e em placas, viabilidade, massa seca, pH e teor alcoólico.

2.3.5 Análises do processo fermentativo

2.3.5.1 Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer

A contagem e a viabilidade foram realizadas em câmara de Neubauer após diluições adequadas, utilizando-se a coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

2.3.5.2 Contagem de células em placa

Amostras de 1 mL foram coletadas no início e ao final do processo fermentativo; as alíquotas foram devidamente diluídas em tubos contendo água peptonada, sendo espalhados 100 µL de cada diluição em meio extrato de levedura, peptona, glicose e ágar (YEPD). As placas foram incubadas, a 30 °C, por 72 horas. Após este período, foi realizado a contagem das colônias e os resultados expressos em UFC/mL.

2.3.5.3 Massa seca ou biomassa

As amostras coletadas, após centrifugação e separadas do sobrenadante, foram secas em estufa, a 60 °C, por 24 horas, colocadas em dessecador, por 30 minutos e pesadas em balança analítica (ANDRIETTA; ANDRIETTA; RODRIGUES, 1995).

2.3.5.4 Açúcares redutores totais (ART)

Para a determinação de açúcares redutores totais foi utilizado o método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico), desenvolvido por Miller (1959). As amostras retiradas durante a fermentação foram diluídas e os resultados foram expressos em g de açúcares redutores totais/L de meio.

2.3.5.5 Teor de etanol

Para a análise do teor alcoólico foi utilizado cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG-17A), com coluna capilar Carbowax 20M (30 m, 0,25 mm x 0,25 μ m), com gradiente de temperatura, iniciando em 40 °C, por 4 minutos, aquecendo até 220 °C e permanecendo por 2 minutos, utilizando rampa de aquecimento de 25 °C/min. Foi feita injeção automática do tipo *splitless* a cada 0,30 segundos, com temperatura de 250 °C. O detector utilizado foi o de ionização de chama (FID), com temperatura de 300 °C. Como gás de arraste foi utilizado hélio com fluxo linear.

Para a quantificação dos teores de etanol nas amostras, foi realizada uma calibração com base em padrão com soluções com concentrações conhecidas de etanol (padrão analítico da Merck).

2.3. 10 Conversão do substrato em etanol (Y_p/s) e eficiência fermentativa (E_f)

O fator de conversão do substrato em etanol foi calculado em gramas de etanol produzido por gramas de açúcares redutores totais consumidos, empregando-se a equação 1.

$$Y_{p/s} = P/(S_0 - S) \quad (1)$$

em que

P = concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

S₀ = concentração de açúcares redutores totais no início da fermentação (g ART/L);

S = concentração de açúcares redutores totais no final da fermentação (g ART/L).

A eficiência fermentativa é a fração do açúcar metabolizado que se converteu em etanol. A eficiência fermentativa foi calculada pela relação entre o rendimento do etanol observado no processo e o rendimento teórico (equação 2).

$$E_f = \left(\frac{Y_{p/s}}{0,511} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.3. 11 Conversão de substrato em células (Y_{X/S})

Expressa a massa celular produzida em relação a massa de ART consumida. Este parâmetro fornece a quantidade de massa celular produzida por grama de açúcar consumido, sendo calculado pela Equação 3, dada por:

$$Y_{X/s} = (X - X_0)/(S_0 - S) \quad (3)$$

em que

X₀ = concentração inicial de células da fermentação (g de matéria seca/L de meio);

X = concentração final de células da fermentação (g de matéria seca/L de meio).

2.3.12 Produtividade em etanol

A produtividade em etanol (Q_p) expressa o teor produzido de etanol em certo intervalo de tempo. A produtividade em etanol é calculada empregando-se a Equação 4:

$$Q_p = P / t_f \quad (4)$$

sendo

P= concentração de etanol no final da fermentação (g etanol/L);

t_f = tempo total da fermentação (horas).

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado na etapa da fermentação foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos foram analisados por análise de variância pelo programa SISVAR 5.1[®] (FERREIRA, 2008). Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste Tukey, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Processo de extração

As médias e os desvios padrões das análises de pectina solúvel e total, polifenóis, amido e açúcares redutores e totais, para os tratamentos de extração encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 Teores médios e desvio padrões para teores de pectinas, polifenóis, amido e açúcares da polpa e dos extratos da polpa de café, em base úmida

Amostra	Pectina solúvel ¹	Pectina total ¹	Polifenóis (%)	Amido (%)	Açúcares totais (%)	Açúcares redutores (%)
Polpa ²	0,25±0,03 (1,39)	0,69±0,04 (3,83)	0,30±0,01 (1,67)	2,60 ±0,01 (14)	2,17±0,11 (12)	1,85±0,05 (10,2)
E1	0,07±0,03 ^a	0,18±0,01 ^a	0,08±0,0 ^a	0,10±0,01 ^a	4,69±0,25 ^a	4,01±0,13 ^a
E2	0,09±0,01 ^a	0,18±0,01 ^a	0,08±0,0 ^a	0,42±0,12 ^b	5,12±0,32 ^b	4,01±0,2 ^a
E3	0,07±0,01 ^a	0,16±0,01 ^a	0,12±0,0 ^b	0,67±0,18 ^{bc}	5,45±0,15 ^b	4,12±0,11 ^a
E4	0,25±0,01 ^b	0,49±0,01 ^b	0,19±0,01 ^c	1,17±0,16 ^d	5,48±0,19 ^b	4,30±0,07 ^b

* Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

¹ Unidade: mg de ácido poligalacturônico/100 g de extrato da polpa de café

² Valores entre parênteses são apresentados em base seca, sendo a umidade da polpa 82%

Comparando-se o processo de extração 1 (E1 - apenas prensagem) e o processo de extração 2 (E2 - trituração e prensagem) observa-se um aumento no teor de amido e de açúcares totais, fato ocorrido devido à maior solubilização destes compostos, favorecida pelo processo de trituração da amostra. O emprego de temperaturas em torno de 60 °C durante a trituração e posterior prensagem (E3) elevou a extração de polifenóis, observando-se, na Tabela 1, teores de

polifenóis maiores no tratamento E3, em comparação com os obtidos no E2 (temperatura ambiente na trituração). Deve-se ressaltar que um elevado teor de polifenóis é indesejável na etapa de fermentação.

Dentre os compostos analisados quando se utilizou autoclave no processo de extração (E4), houve um aumento nos teores de pectina solúvel e total, polifenóis, amido e açúcares redutores em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). Entretanto, o único processo que alterou de modo significativo a presença de açúcares totais no extrato da polpa de café foi a trituração nesta etapa.

Neste trabalho foram encontrados 3,83%, em base seca, de pectina total na polpa de café, valor bem inferior ao apresentado por Elias (1978) que determinou a concentração de pectinas totais na polpa de café em 6,5% em base seca. Esta baixa concentração pode ser explicada pela possível degradação durante o período de armazenamento da polpa de café ou, mesmo, pela diferente variedade de café.

Os teores de pectinas totais em base úmida situaram-se próximos ao encontrado na polpa apenas após ser submetida a um tratamento térmico mais intensivo, tratamento E4 (Tabela 1).

Com relação à extração de pectina, apenas o processo E4 apresentou valores diferentes significativamente dos demais tratamentos, tanto para pectinas solúveis quanto para totais, mostrando que somente a utilização de elevadas temperaturas (autoclave a 121 °C) influenciou de maneira significativa a extração destes compostos. No processo de obtenção do extrato não é desejável a extração da pectina, pois a pectina não é utilizada pela *Saccharomyces cerevisiae* e também pode causar o aumento da viscosidade do meio, o que acarretaria uma perda na eficiência da fermentação.

A polpa de café apresentou 1,67% de polifenóis em base seca, enquanto Ulloa (2004) encontrou 2% desses compostos em base seca da polpa de café, portanto próximo ao encontrado neste trabalho.

A extração com aquecimento em autoclave destacou-se das demais por extrair maior teor de polifenóis. Os métodos de extração E1 (controle) e E2 (sem tratamento térmico e com trituração) apresentaram os menores resultados. Compostos fenólicos são conhecidos por serem potentes inibidores da fermentação (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004); além de estarem presentes na polpa de café, eles podem ser gerados a partir da decomposição parcial da estrutura lignocelulósica, havendo estudos nos quais eles são formados durante a degradação de carboidratos (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

O teor de amido no extrato obtido a frio e submetido à trituração (E2) foi estatisticamente semelhante ao extraído a 60 °C (E3) e maior que o controle. O maior valor foi observado para o tratamento E4 utilizando autoclave e trituração. Esse teor de amido solúvel oriundo da extração pode ser utilizado por *Saccharomyces cerevisiae*, após sofrer processo de hidrólise, no qual o amido é quebrado em glicose.

Com relação aos teores de açúcares, Elias (1978) encontrou 12,4% de açúcares redutores e 14,4% de açúcares totais na matéria seca da polpa de café, teores próximos aos determinados neste trabalho (10,2% e 12% para açúcares redutores e totais, respectivamente). Para a extração dos açúcares totais presentes na polpa de café, pode-se notar que os tratamentos E2 (5,12%), E3 (5,45%) e E4 (5,48%) apresentaram valores semelhantes a 5% de significância e superiores ao obtido pelo tratamento E1 (controle), o que demonstra que o tratamento E2 apresenta-se vantajoso por ser conduzido à temperatura ambiente.

O pH da polpa de café foi de 4,55, estando este valor próximo ao encontrado por Rojas et al. (2002), que foi de 4,5. Para o pH do extrato da polpa

de café, todos apresentaram valores muito próximos (pH de 4,53 para o tratamento E1; 4,51 para o E2; 4,49 para o E3 e 4,49 para o E4).

O processo de extração E4 apresentou rendimento de 25,28 g de extrato/100g de polpa de café, sendo este valor menor que os encontrados para os processos de extração E1, E2 e E3 (26,81, 27,17 e 27,2 g de extrato/100 g de polpa de café). Isso pode ter ocorrido devido à evaporação de líquido durante o processo de autoclavagem.

Entre os resultados da Tabela 1 verifica-se que a trituração da polpa favoreceu um aumento da extração de açúcares redutores, que é desejável no processo de fermentação, sendo que a extração E2 tem vantagens sobre os demais por apresentar teores de açúcares semelhantes ao tratamentos E3 e E4, além de possuir menores concentrações de pectinas e compostos fenólicos. O processo de extração E2 também tem menor gasto energético, por ser conduzido à temperatura ambiente. Assim, o processo de extração E2 foi selecionado para o preparo do extrato a ser utilizado nos experimentos de fermentação.

3.2 Fermentação

3.2.1 Açúcares redutores totais (ART)

Os gráficos das cinéticas de consumo de açúcares redutores durante a fermentação em meio de caldo de cana diluído com água a 18 °Brix (F1) e em meio de caldo de cana diluído com extrato da polpa de café a 18 °Brix (F2) podem ser observados na Figura 1, sendo os resultados expressos em g de açúcares redutores totais/L de meio.

Os tratamentos F1 e F2 terminaram a fermentação com 12 horas e não se observou diferença significativa no consumo de açúcar redutor entre ambos. Pode-se, então, concluir que o extrato da polpa de café obtido pelo tratamento

F2 não teve um efeito inibitório sobre a fermentação. Schwan et al. (2001) demonstraram que, na fermentação do caldo de cana, de 18 °Brix a 20 °Brix (180 a 200 g açúcares redutores totais/L do meio), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* não selecionada, a fermentação praticamente estabilizava após um período de 12 horas.

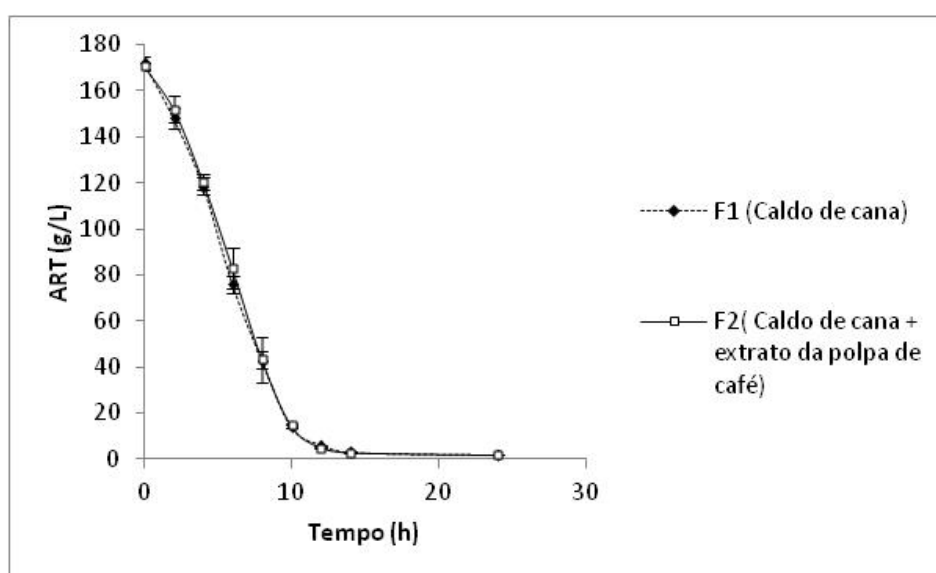


Figura 1 Consumo de açúcares redutores totais durante a fermentação do caldo de cana diluído com água (F1) e diluído com extrato de polpa de café (F2)

Para tratamento F1, a fermentação iniciou-se com 172 ± 3 g/L de açúcares redutores, reduzindo este valor para $6,3 \pm 0,1$ g/L, após 12 horas de fermentação. Já o tratamento F2 iniciou a fermentação com 171 ± 2 g/L e, após 12 horas, o teor de açúcar residual foi de $5,1 \pm 0,5$ g/L.

Na Figura 2 observam-se as curvas da cinética do consumo de ART para os tratamentos F3 e F4, que utilizaram, como meios para fermentação, melão diluído em água e em extrato da polpa de café, respectivamente, até 18 °Brix.

Em comparação com a fermentação empregando o caldo de cana (tratamento F2), foi utilizado mais extrato da polpa de café no tratamento F4 devido à maior concentração de açúcares presentes no melaço (70 °Brix) em relação ao caldo de cana (21 °Brix). No gráfico está demonstrado que as fermentações F3 e F4 terminam com 12 horas de fermentação.

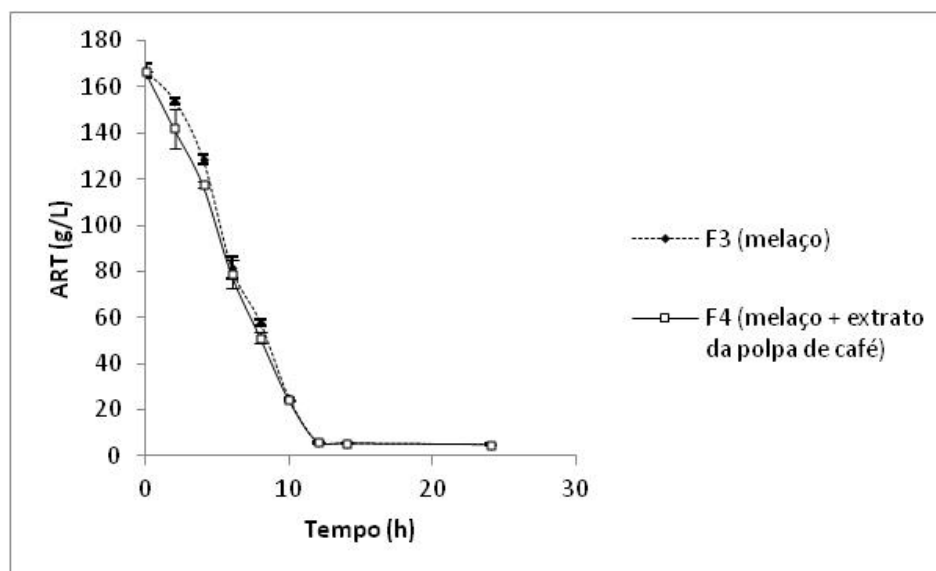


Figura 2 Consumo de açúcar na fermentação do melaço diluído com água destilada (Tratamento F3) e diluído com extrato de polpa de café (Tratamento F4)

Observando-se o gráfico, pode-se notar que, no tratamento F3, a fermentação iniciou-se com 167 ± 3 g/L de açúcares redutores, reduzindo este valor para $5,8 \pm 0,2$ g/L, após 12 horas de fermentação. Por sua vez, o tratamento F4 iniciou a fermentação com $166,6 \pm 0,2$ g/L e, após 12 horas, o teor de açúcar residual foi de $5,5 \pm 0,2$ g/L. Comparando-se estes dois tratamentos em todos os tempos de fermentação, observa-se que, no início da fermentação, houve uma pequena diferença entre as duas fermentações, sendo a taxa inicial de consumo de ART maior no tratamento F4. Isso pode ter ocorrido devido à capacidade do

extrato de café abaixar o pH (ver Figura 4) para valores próximos ao considerado ótimo para leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e também pela presença de glicose no extrato da polpa de café, sendo esta mais rapidamente consumida pelas leveduras.

Na fermentação do meio contendo apenas extrato da polpa de café, o consumo de açúcares redutores totais é apresentado na Figura 3. Nesta figura é mostrado que a levedura foi capaz de fermentar o extrato da polpa de café com 50 ± 2 g/L de açúcares redutores totais para $6,2 \pm 0,4$ g/L, em um tempo de 4 a 6 horas.

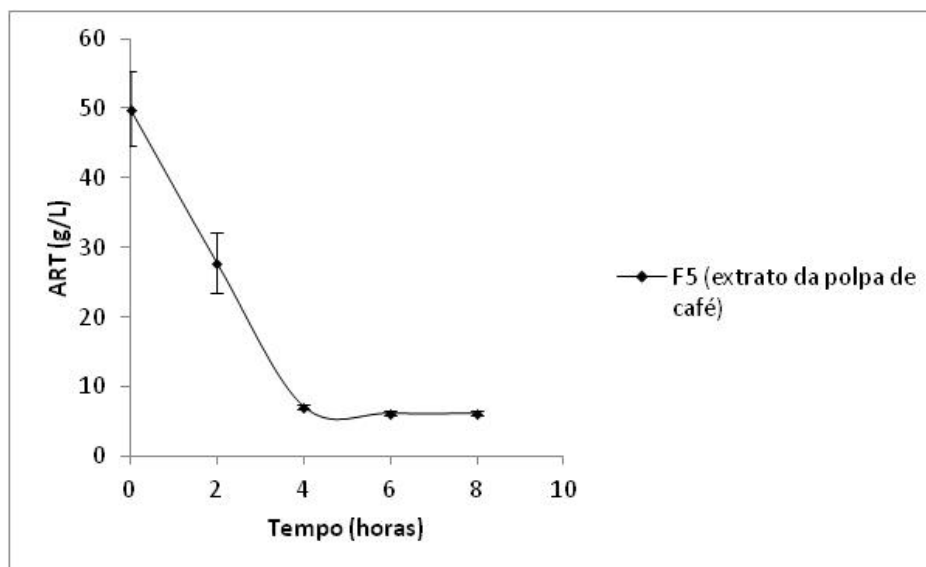


Figura 3 Consumo de açúcar na fermentação do extrato da polpa de café (Tratamento F5)

3.2.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

A evolução do pH durante a fermentação do tratamento F1 (caldo de cana-de-açúcar + água), tratamento F2 (caldo de cana + extrato da polpa de café), tratamento F3 (melaço + água) e tratamento F4 (melaço + extrato da polpa

de café) pode ser acompanhada na Figura 4. Como se pode notar, a adição da polpa de café diminui a variação de pH, sendo um fator benéfico à fermentação, pois o pH ótimo para a fermentação da *Saccharomyces cerevisiae* é próximo de 4,5. Dorta et al. (2006) relataram que pH baixo aumenta o efeito tóxico do etanol e ácidos orgânicos em leveduras, com influência sobre os parâmetros cinéticos, como rendimento alcoólico.

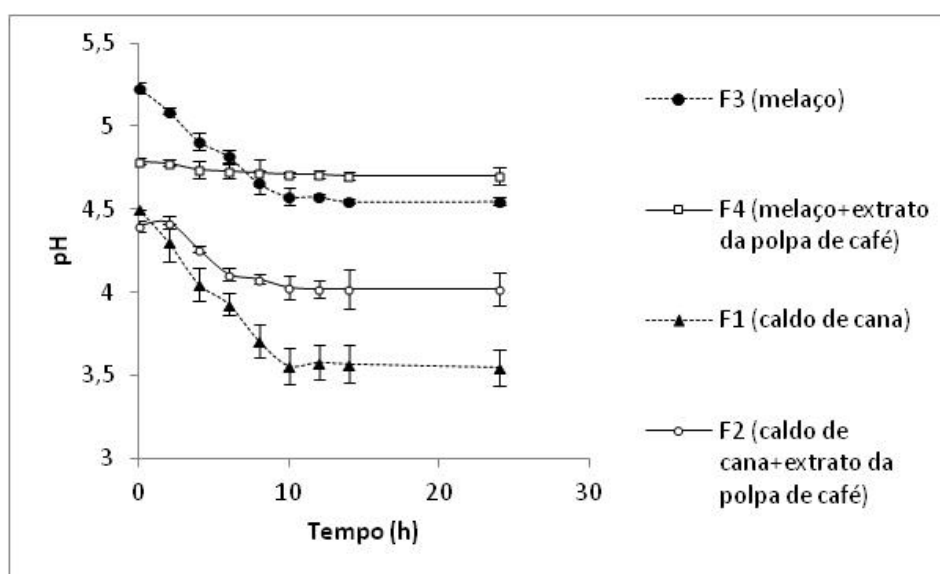


Figura 4 Evolução do pH durante a fermentação do caldo de cana diluído com água (F1) e diluído com extrato de polpa de café (F2), e da fermentação do melaço diluído com água (F3) e extrato de polpa de café (F4)

O pH é um fator que influencia significativamente as fermentações devido à sua importância no controle da contaminação bacteriana. As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo a faixa mais adequada entre 4 e 5. Os valores de pH dos mostos utilizados geralmente na produção industrial de etanol encontram-se entre 4,5 e 5,5 (LIMA et al., 2001).

Arshad et al. (2008) utilizaram melão diluído (29 °Brix) em diferentes pH iniciais variando de 4,5 a 5,3, à temperatura de 30 °C e demonstraram que a produção de etanol foi maior quando o pH estava em 4,5 (7,42% etanol), tendo no pH 5,3 sido obtido valor mais baixo (6,31% etanol). Desse modo, o abaixamento do pH, quando se utiliza o extrato da polpa de café, pode se tornar benéfico à fermentação alcoólica.

Quando se utiliza o melão, o efeito da adição do extrato da polpa de café é mais visível, como demonstrado na Figura 4. A adição de extrato de café abaixa o pH para valores de 4,8 no início do processo e o mantém praticamente constante durante toda a fermentação, indicando o efeito tampão que esse extrato exerce sobre o meio. Quando o pH é menor, minimiza-se a contaminação por bactérias. A contaminação bacteriana é um problema constante na produção de etanol. Níveis de ácido láctico, muitas vezes, podem aumentar durante uma contaminação, sugerindo que os contaminantes mais comuns são bactérias do ácido láctico. Contaminantes consomem substratos e nutrientes do meio, diminuindo o rendimento da fermentação alcoólica. Eles também produzem subprodutos que podem ser inibidores de leveduras, principalmente ácidos orgânicos.

De acordo com Narendranath e Power (2005), em plantas de produção de etanol, é prática comum a diminuição do pH do mosto para valores próximos de 4 ou menores, para que ocorra o controle de contaminação por bactérias. Ortiz-Muniz et al. (2010), que testaram a influência do pH na fermentação alcoólica utilizando meio sintético contendo glicose como fonte de carbono, observaram que uma variação do pH inicial de 6,5 para 4,5 favoreceu um aumento no fator de conversão de substrato em etanol (Y_p/s) de 0,3662 para 0,3869 g etanol/g de açúcar. No entanto, nos resultados obtidos por estes autores, o pH igual a 5,5 não influenciou de maneira significativa o fator de conversão com relação ao mesmo fator em pH igual a 4,5. Quando, neste

mesmo trabalho foi analisada a produtividade de etanol, verificou-se que, em pH inicial de 4,5 ($Q_p=1,58$ g etanol/L.h), a velocidade de produção de etanol é maior do que em meio com pH igual a 5,5 ($Q_p=1,25$ g etanol/L.h).

A variação do pH durante a fermentação do extrato da polpa de café é apresentada na Figura 5. Comparando-se o pH do extrato da polpa de café (pH de 4,51) com o valor do início da fermentação (pH de 4,23), observa-se uma variação, possivelmente devido à adição do inóculo e também à adição dos suplementos.

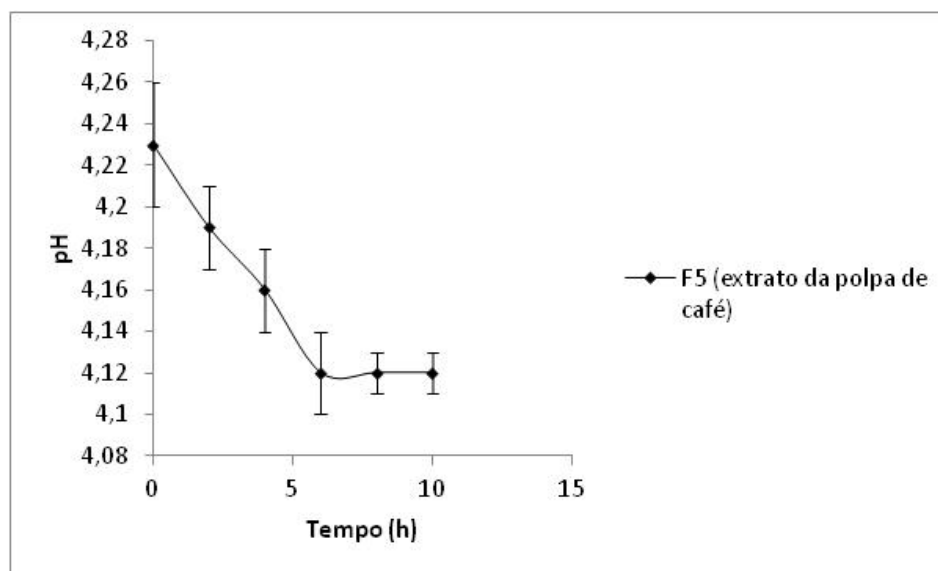


Figura 5 Evolução do pH durante a fermentação do extrato da polpa de café

3.2.3 Teor de etanol

Os resultados do teor alcoólico para os tratamentos F1 e F2 são apresentados na Figura 6. Pelo gráfico pode-se notar que houve uma pequena diferença na cinética de produção de etanol durante a fermentação utilizando o

caldo de cana-de-açúcar diluído com água (Tratamento F1) e o caldo de cana-de-açúcar diluído com extrato da polpa de café (Tratamento F2).

Basso et al. (2008) relatam que, empregando-se caldo de cana ou melaço em usinas de álcool como substratos, podem se alcançar concentrações de etanol que variam de 8%-11%v/v (63,12-86,8 g etanol/L), em um período de 6-11 horas.

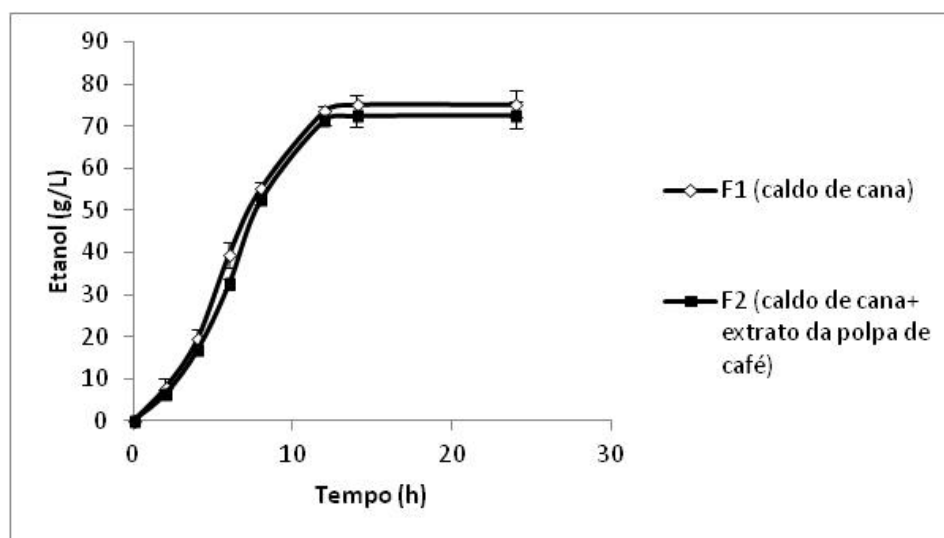


Figura 6 Produção de etanol a partir de meio com caldo de cana-de-açúcar diluído em água (F1) e diluído com extrato da polpa de café (F2)

Após 12 horas de fermentação, os teores alcoólicos obtidos foram de 73,6 g de etanol/L de meio e 71,5 g de etanol/L de meio, para os tratamentos F1 e F2, respectivamente (Figura 6).

Comparando-se os resultados para o teor alcoólico dos tratamentos F1 e F2, empregando-se teste de Tukey, a 5% de significância, verifica-se que existiu diferença significativa entre os dois tratamentos de fermentação, durante os tempos de 6 e 8 horas (dados não mostrados). Este fato pode ter ocorrido devido à adição de substâncias presentes no extrato da polpa de café, como os

polifênicos, que atrasaram a fermentação da *Saccharomyces cerevisiae*. Schwan et al. (2001), utilizando caldo de cana para fermentação com o teor de sólidos solúveis totais entre 18 °Brix e 20 °Brix, obtiveram teor alcoólico de, aproximadamente, 80 g/L de etanol, ao final da fermentação, resultado próximo ao obtido neste trabalho.

A diferença na cinética de produção do etanol para os tratamentos F1 e F2 pode ser explicada devido ao tempo necessário para a levedura fazer a desintoxicação dos componentes inibidores da fermentação alcoólica, aumentando, assim, a fase de adaptação (THOMSEN; THYGESEN; THOMSEN, 2009).

Para a fermentação do melaço houve maior diferença entre os tratamentos F3 (diluído com água) e F4 (diluído com extrato de polpa de café), principalmente nos tempos 4 e 6 horas de fermentação (Figura 7), possivelmente devido à maior quantidade de extrato de polpa de café empregada para diluição do melaço para 18 °Brix. No entanto, ao final da fermentação, os teores alcoólicos encontrados para os dois tratamentos foram semelhantes, sendo de 72,1 g etanol/L de meio e 70,1 g etanol/L, para os tratamentos F3 e F4, respectivamente.

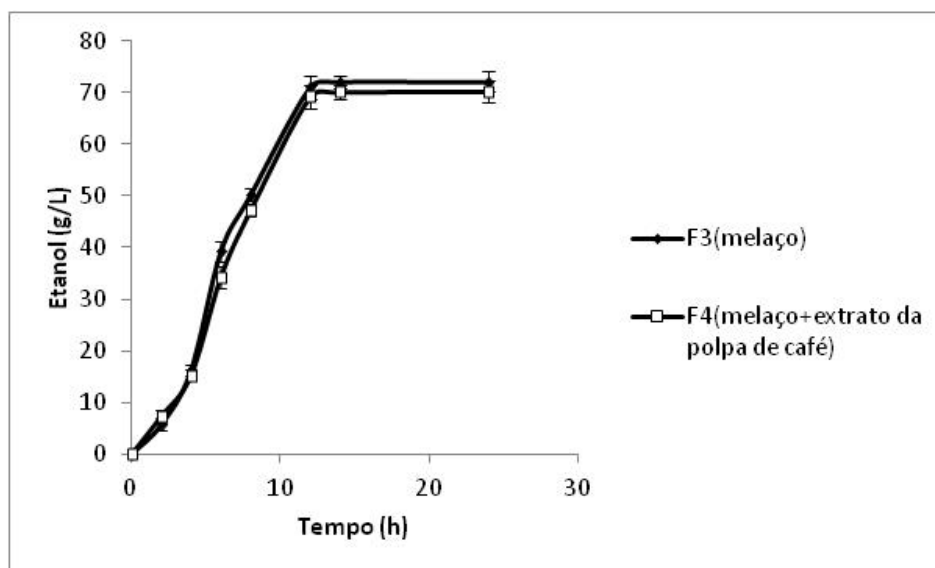


Figura 7 Produção de etanol a partir de meio com melaço diluído em água (F3) e diluído com extrato da polpa de café (F4)

Fermentação utilizando meio sintético contendo sacarose como fonte de açúcares, além da adição de outros suplementos, foi realizada por Laluce et al. (2009). O meio continha uma concentração inicial igual 180 g/L de açúcares redutores totais no mosto, obtendo-se, ao final da fermentação, concentração de 68,7 g/L de etanol, valores estes inferiores aos encontrados neste trabalho.

Bajaj e Sharma (2010) estudaram a fermentação do melaço diluído para 160 g de açúcares/L de meio com cepa selecionada de levedura (*S. cerevisiae* HAU-1) e obtiveram, após 24 horas de fermentação, 7,4% v/v de etanol (aproximadamente 59 g/L de etanol).

Já Marques e Serra (2004) utilizaram melaço diluído para 180 g ART/L na fermentação e obtiveram um teor alcoólico final médio de 53 g/L de etanol (6,8% v/v), o que leva a concluir que estes teores de açúcar produzem álcool em quantidade insuficiente para causar inibição significativa da levedura. Estes mesmos autores demonstraram que teores maiores de açúcares redutores totais

(valores maiores que 310 ART/L) provocam maior tempo de fermentação e parâmetros cinéticos anormais. Essa diferença de comportamento deve-se ao fato de que teores elevados de ART no início da fermentação podem promover uma inibição pelo substrato e acarretar uma demora para o consumo destes açúcares.

A produção de etanol durante a fermentação do extrato da polpa de café é apresentada na Figura 8. Devido às menores concentrações iniciais de açúcares presentes no extrato da polpa de café, é de se esperar valores de concentração menores de etanol no mosto fermentado, como foi obtido (18,3 g/L). Mas, por meio deste resultado, fica evidente a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* fermentar o extrato da polpa de café.

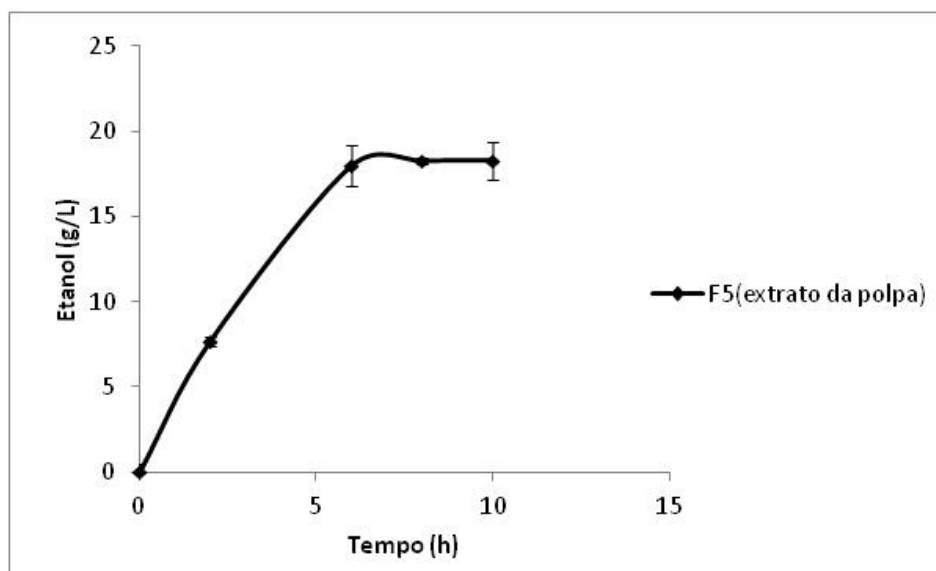


Figura 8 Produção de etanol a partir do extrato da polpa de café (F5)

3.2.4 Contagem de células

Os dados da contagem de células totais por câmara de Neubauer nas fermentações estudadas são apresentados na Tabela 2. Como se pode notar, não houve diferença entre a fermentação contendo caldo de cana diluído com água (Tratamento F1) e o meio contendo caldo de cana diluído com extrato da polpa de café (Tratamento F2). No início da fermentação, o tratamento F1 tinha $1,9 \times 10^8$, enquanto o tratamento F2 apresentou $1,8 \times 10^8$ células /mL de meio. Ao final da fermentação, tanto o tratamento F1 quanto o tratamento F2 apresentaram contagens iguais $3,4 \times 10^8$ células/ mL de meio e estes valores mantiveram-se constantes a partir de segunda hora de fermentação, não havendo praticamente alterações durante todo o processo fermentativo.

Para a contagem de células, não houve diferença entre as duas fermentações com melaço (Tratamento F3 e Tratamento F4). Nos tratamentos F3 e F4, as contagens totais iniciais foram de $1,9 \pm 0,2 \times 10^8$ células/ mL e $1,7 \times 10^8$ células/mL, respectivamente, e aumentaram para $3,6 \times 10^8$ células/ mL, ao final da fermentação.

Na fermentação com caldo de cana, a contagem de células estabilizou-se com, praticamente, 2 horas de fermentação, enquanto na contagem dos meios contendo melaço a estabilização dos valores ocorreu no tempo de 4 horas.

Tabela 2 Contagem de células para os tratamentos de fermentação F1, F2, F3, F4 e F5, sendo os valores expressos em 10^8 células/mL

Tempo	F1	F2	F3	F4	F5
0	1,9±0,2 ^{b1}	1,8±0,2 ^{b1}	1,9±0,2 ^{c1}	1,7±0,2 ^{c1}	1,9±0,2 ^{a1}
2	3,2±0,2 ^{a1}	3,3±0,2 ^{a1}	2,7±0,2 ^{b2}	2,6±0,1 ^{b2}	2,2±0,1 ^{a3}
4	3,4±0,1 ^{a1}	3,3±0,1 ^{a1}	3,4±0,1 ^{a1}	3,4±0,1 ^{a1}	2,2±0,1 ^{a2}
6	3,3±0,1 ^{a1}	3,3±0,1 ^{a1}	3,5±0,2 ^{a1}	3,5±0,1 ^{a1}	2,2±0,1 ^{a2}
8	3,4±0,1 ^{a1}	3,3±0,1 ^{a1}	3,5±0,0 ^{a1}	3,5±0,2 ^{a1}	2,1±0,2 ^{a2}
10	3,4±0,1 ^{a1}	3,4±0,2 ^{a1}	3,5±0,1 ^{a1}	3,6±0,0 ^{a1}	
12	3,4±0,1 ^{a1}	3,4±0,1 ^{a1}	3,6±0,2 ^{a1}	3,6±0,1 ^{a1}	
14	3,4±0,1 ^{a1}	3,4±0,2 ^{a1}	3,6±0,3 ^{a1}	3,6±0,2 ^{a1}	
24	3,4±0,1 ^{a1}	3,4±0,1 ^{a1}	3,6±0,2 ^{a1}	3,5±0,2 ^{a1}	

* Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Médias seguidas de números iguais na mesma linha não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Para o tratamento F1, as viabilidades no início e no final do processo foram de 92% e 87% de células viáveis, respectivamente. Para o tratamento F2, os valores foram de 94% e 85% de células viáveis, no início e no final do processo fermentativo. Estes resultados estão próximos ao obtidos por Lauce et al. (2009) que obtiveram valores, para a viabilidade final, entre 59,1% até 96,3%, utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* 63M isoladas de usinas de álcool nas seguintes condições: teor de sacarose variando entre 100 g/L até 200 g/L, temperatura ente 30 °C e 40 °C e tamanho do inóculo de 30 g de inóculo/ L meio até 40 g de inóculo/L de meio. O etanol é bem conhecido como um inibidor do crescimento. A taxa de produção de etanol e sua acumulação dentro das células de *Saccharomyces cerevisiae* levam à queda da viabilidade, explicando a taxa de viabilidade final menor em todos os tratamentos.

Basso et al. (2008), estudando leveduras selecionadas de usinas de álcoois do Brasil, realizando fermentações com caldo de cana-de-açúcar e

melaço, obtiveram, ao final do processo, viabilidade igual a 48% para fermento de panificação (selvagem) e 94% para fermento selecionado PE-2.

Ao se realizar a contagem por placas para os meios contendo caldo de cana, obtiveram-se, inicialmente, valores de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL e de 1×10^8 UFC/mL, ao final da fermentação, para o tratamento F1 e $3,2 \times 10^7$ UFC/mL e $1,08 \times 10^8$ UFC/mL para o tratamento F2. Estes resultados são semelhantes ao obtido por Schwan et al. (2001), em fermentação de caldo de cana, iniciando com, aproximadamente, 2×10^7 UFC/mL e, ao final da fermentação, era de 9×10^7 UFC/mL.

A viabilidade celular do tratamento F3, no início e no final do processo fermentativo, foi 90% e 82% de células viáveis, respectivamente. Para o tratamento F4, os valores foram de 89% e 80% de células viáveis, no início e no final do processo fermentativo. Mostrou-se que os valores de viabilidade inicial e final para os dois tratamentos são próximos e, com isso, deduz-se que o extrato da polpa de café não influenciou a viabilidade da *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação.

Realizando-se a contagem por placas para os meios contendo melaço, foi obtido, inicialmente, valores de $4,5 \times 10^7$ UFC/mL e $1,2 \times 10^8$ UFC/mL, ao final da fermentação, para o tratamento F3 e $4,7 \times 10^7$ UFC/mL e $1,35 \times 10^8$ UFC/mL para o tratamento F4.

O tratamento F5, contendo apenas extrato da polpa de café, demonstrou comportamento diferente dos demais tratamentos quanto à contagem de células em câmara de Neubauer, pois o número total de células aumentou menos que os demais tratamentos. Isso pode ter ocorrido devido à falta de nutrientes presentes no extrato da polpa de café e também nos inibidores presentes no próprio extrato da polpa de café. Inicialmente, a contagem era de $1,95 \times 10^8$ células/mL, chegando ao final da fermentação em $2,1 \times 10^8$ células/mL, tendo a contagem se mantido praticamente constante durante toda a fermentação.

Comparando-se com os demais tratamentos, o tratamento F5 foi o que apresentou maior queda na viabilidade celular, passando de 85% para 70%, durante o processo fermentativo. Isso pode ser explicado pela maior concentração de componentes prejudiciais à levedura no extrato, como, por exemplo, os compostos fenólicos (0,08% de polifenóis no extrato da polpa de café – E2).

A contagem em placas para o tratamento F5, inicialmente, foi de 2×10^7 UFC/mL e, após 10 horas de fermentação, 4×10^7 UFC/mL de meio fermentado, valores estes menores que os obtidos nos demais tratamentos. Fica evidente, assim, a necessidade da adição de caldo de cana ou melão no meio a ser fermentado, com o objetivo de fornecer maiores concentrações de açúcares.

3.2.5 Massa seca

Os valores para as biomassas dos cinco tratamentos são mostrados na Tabela 3. Para os tratamentos F1 e F2 ocorreu aumento da biomassa até 8-12 horas; a partir deste tempo a biomassa manteve-se constante para os dois tratamentos. Com relação aos tratamentos F3 e F4, existiu um acréscimo de biomassa até o tempo de 8 horas, mantendo-se praticamente constante até o final da fermentação. Por último, no tratamento F5, o teor de biomassa se manteve constante durante toda a fermentação. Os resultados para biomassa concordam com os da contagem de células. Como se observa, com base nos resultados, os tratamentos com caldo de cana-de-açúcar apresentaram maior formação de biomassa após 2 horas de fermentação, em relação aos tratamentos com melão. A partir deste ponto não existiu mais diferença significativa, a 5% de significância, entre os tratamentos.

Tabela 3 Crescimento celular durante a fermentação, em g de massa seca/L de meio

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
0	8,5±2,2 ^{a1}	8,5±2,2 ^{a1}	4,7±1,7 ^{a1}	6,7±3,7 ^{a1}	5,1±1,2 ^{a1}
2	15,5±3,6 ^{b1}	15,6±3,2 ^{b1}	6,8±1,9 ^{a2}	10,3±2,7 ^{a2}	5,2±2,5 ^{a3}
6	15,7±2,2 ^{b1}	13,1±4,2 ^{b1}	14,5±1,2 ^{b1}	13,9±2,5 ^{b1}	5,3±3,2 ^{a3}
8	18,2±2,7 ^{b1}	20,3±4,9 ^{c1}	17,5±3,2 ^{b1}	16,4±2,2 ^{b1}	7,6±1,2 ^{a3}
12	20,1±3,2 ^{bc1}	20,6±3,5 ^{c1}	16,3±1,2 ^{b1}	16,7±1,2 ^{b1}	
24	20,6±4,5 ^{bc1}	20,6±2,2 ^{c1}	16,8±2,5 ^{b1}	17,1±2,7 ^{b1}	

* Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças no mesmo tratamento em tempos diferentes estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

* Médias seguidas de números iguais na mesma linha não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos em um mesmo tempo, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Stroppa et al. (2009) estudaram leveduras *Saccharomyces cerevisiae* das linhagens RM01 e CV01, utilizando caldo de cana-de-açúcar, 19 °Brix, 1 g/L de cloreto de potássio, 4 g/L de extrato de levedura, 4 g/L de fosfato monobásico de potássio, 1 g/L de cloreto de amônia e 0,6 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado. Ao final da fermentação, atingiram concentrações superiores a 10 g biomassa seca/L, sendo os valores de, aproximadamente, 13 g biomassa seca/L, para RM01 e 12 g biomassa seca/L, para CV01, valores estes inferiores aos encontrados no presente trabalho.

3.2.6 Fatores de conversão, eficiência fermentativa e produtividade em etanol

Os valores médios e os desvios padrões dos fatores de conversão em relação à produção de etanol (Y_p/s), à produção de biomassa (Y_x/s), à eficiência fermentativa (E_f) e à produtividade em etanol (Q_p) encontram-se na Tabela 4. Os

tratamentos F1, F2, F3 e F4 terminaram a fermentação com 12 horas, enquanto o tempo de fermentação do tratamento F5 foi de 6 horas.

Tabela 4 Fatores de conversão Yp/s e Yx/s, eficiência fermentativa e produtividade em etanol

Tratamento	Yp/s g etanol/g ART	E _f (%)	Yx/s g células/g substrato	Q _p gEt/(L.h)
F1	0,44±0,01 ^a	87,25±1,96 ^a	0,071±0,006 ^a	6,13±0,02 ^a
F2	0,43±0,01 ^a	84,93±1,96 ^a	0,072±0,007 ^a	5,95±0,21 ^{ab}
F3	0,44±0,02 ^a	87,25±3,91 ^a	0,074±0,002 ^a	5,92±0,12 ^{ab}
F4	0,43±0,01 ^a	84,19±1,96 ^a	0,065±0,009 ^{ab}	5,77±0,19 ^b
F5	0,42±0,01 ^b	81,60±1,96 ^b	0,057±0,04 ^b	2,99±0,11 ^c

* Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Os fatores de conversão de substrato em etanol (Yp/s) para os quatro primeiros tratamentos foram de, aproximadamente, 0,44 (0,43 a 0,45) e, para o último tratamento (F5 - extrato da polpa de café), o rendimento foi de 0,42. Considerando que o máximo rendimento de produção de etanol em relação ao consumo de substrato é igual a 0,511, conclui-se os valores obtidos foram bons. Os quatro primeiros tratamentos não se diferenciaram uns dos outros, a 5% de significância, no entanto, o tratamento contendo apenas extrato da polpa de café obteve fator de conversão de substrato em etanol menor que os demais, o que pode ter ocorrido devido à ausência de nutrientes ou aos compostos inibidores da fermentação presentes no extrato da polpa de café. Os resultados demonstraram que as adições do extrato da polpa de café não influenciaram a conversão de substrato em etanol.

Andrietta, Migliari e Andrietta (1999) estudaram leveduras isoladas de usinas de álcool e encontraram valores de Yp/s que variaram entre 0,4395 e 0,4675 g de etanol/g de ART, estando os valores obtidos neste trabalho próximos ao encontrados por aqueles autores.

Por sua vez, Marini et al. (2009) fermentaram caldo de cana-de-açúcar utilizando cepas de leveduras selecionadas para a produção de cachaça e encontraram valores para os fatores de conversão de substrato em etanol que variaram de 0,2581 até 0,4001 g de etanol/g de ART, demonstrando que os valores para este parâmetro são bastante variados.

Oliveira et al. (2004) classificaram as leveduras de acordo com sua capacidade fermentativa, tomando como base Andrietta, Migliari e Andrietta (1999). Para o fator de conversão de substrato em etanol (Y_p/s), separaram-nas em quatro classes, sendo estas as de baixo valor de conversão, variando de 0,380 a 0,419 g/g; médio valor de conversão, de 0,420 a 0,450 g/g; alto valor de conversão, de 0,451 a 0,490 g/g e muito alto valor de conversão, de 0,491 a 0,510 g/g. Por esta classificação pode-se notar que todos os valores encontrados, com exceção do tratamento F5, pertencem à classificação média dos valores de conversão de substrato em etanol. Enquanto o tratamento F5 pertence à classe dos valores mais baixos.

Para a eficiência fermentativa, foram encontrados valores variando de 81,60% até 87,25% para a cepa de levedura selecionada *Saccharomyces cerevisiae* CAT1, tendo o menor valor da eficiência fermentativa sido encontrado para o tratamento contendo apenas extrato da polpa de café (F5).

Valores de eficiência de fermentação em usinas são relatados por Basso et al. (2008), nos quais, normalmente, se utilizam alta densidade celular, reciclagem de células e alta concentração de etanol, que levam ao alto rendimento em etanol (90%-92% da conversão de açúcar teórico em etanol). No entanto, os valores encontrados nos tratamentos F1, F2, F3 e F4, neste trabalho, são maiores que os obtidos por Silva, Rosa e Oliveira (2006), estudando cepas selecionadas de leveduras isoladas de alambiques utilizando meio sintético (15% sacarose), que encontraram valores para a eficiência fermentativa que variaram de 74,67% até 84,93%.

Liang et al. (2008), fermentando caldo de cana contendo 174 g de açúcares/L e melaço diluído para 154 g de açúcares/L, utilizando cepas de leveduras selecionadas livres e imobilizadas em suportes feitos de partes da cana-de-açúcar a 30 °C, obtiveram eficiências fermentativas que variaram de 90,18% até 94,14%. Maiores valores foram obtidos pelos autores quando utilizaram caldo de cana-de-açúcar com leveduras imobilizadas (94,14%), superior ao controle com células livre e caldo de cana-de-açúcar (90,36%).

Com relação aos valores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$), os quais se situaram entre 0,057 e 0,074 g de biomassa seca/g de ART, pode-se notar, na Tabela 4, que não existiu diferença significativa entre os quatro primeiros tratamentos. No entanto, o tratamento F5 (polpa de café) mostrou-se diferente dos três primeiros tratamentos e semelhante ao quarto (F4 - melaço e extrato da polpa de café). Isso demonstra que a adição de extrato da polpa de café ao meio com melaço ou cana-de-açúcar não influenciou o crescimento das leveduras.

Oliveira et al. (2004), estudando *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de alambiques, de destilarias de cachaça industrial e de álcool carburante, obtiveram valores para os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) na faixa de 0,039 a 0,072 g/g, utilizando meio sintético, com 150 g/L de glicose, estando os valores encontrados neste trabalho próximos aos dos autores.

Oliveira et al. (2004) desenvolveram metodologia para a classificação das linhagens de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica, utilizando o fator de conversão de substrato em biomassa. Classificaram como baixo para valores de $Y_{x/s}$ menor que 0,041, médio para valores entre 0,041 e 0,044 e alto para valores maiores que 0,044 g/g. Assim, os valores encontrados neste trabalho podem ser classificados como altos.

Stroppa et al. (2009) estudaram leveduras selecionadas (*Saccharomyces cerevisiae* RM01 e CV01) de alambiques utilizando como meio para

fermentação caldo de cana diluído a 9,4 °Brix (aproximadamente 94 g ART/L) suplementado de 1 g/L de cloreto de potássio; 4 g/L de extrato de levedura; 4 g/L de fosfato monobásico de potássio; 1 g/L de cloreto de amônia e 0,6 g/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado. Os autores obtiveram valores para os fatores de conversão de substrato em biomassa das duas linhagens estudadas de 0,179 e 0,185 g células secas/g ART, para as linhagens RM01 e CV01, sendo estes valores relativamente altos. Os próprios autores relatam que uma possível explicação para isso seria que os experimentos foram conduzidos em condições ótimas para crescimento celular de leveduras, enquanto, na maioria dos trabalhos, o objetivo é a produção de etanol.

Para a produtividade em etanol foram encontrados valores entre 6,13 g/(L.h) (Tratamento F1) até 2,99 g/(L.h) (Tratamento F5). Comparando-se com os resultados obtidos por Marini et al. (2009), os quais foram de 3,31 até 6,19 g/L.h, apenas o tratamento F5 não esteve neste limite, sendo que a este tratamento não se adicionou caldo de cana e nem melão.

Pelos dados obtidos para a produtividade em etanol (Q_p), observa-se que a adição do extrato da polpa de café não influenciou significativamente a fermentação com caldo de cana e a com melão. No entanto, quando se utilizou apenas extrato da polpa de café, a produtividade foi baixa, possivelmente devido ao baixo teor de açúcares presentes no meio a ser fermentado e aos compostos inibitórios da fermentação.

4 CONCLUSÃO

O melhor processo para a obtenção do extrato da polpa de café foi a trituração à temperatura ambiente, seguida de prensagem. Neste processo ocorreu uma liberação semelhante de açúcares totais e menores concentrações de pectina e compostos fenólicos que os processos de extração envolvendo tratamento térmico. Outro motivo importante é o menor gasto energético deste processo.

É possível a utilização do extrato resultante da trituração da polpa de café para adição ao caldo de cana-de-açúcar e melaço para a fermentação e produção de bioetanol. Consumo de açúcar, teor alcoólico, células totais, rendimento e tempo de fermentação não foram prejudicados pela adição de extrato da polpa de café ao meio com caldo de cana ou melaço.

Esse processo apresenta a vantagem de aproveitar os açúcares redutores do extrato presentes no resíduo gerado no processamento úmido do café e economizar água durante o processo de fermentação.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa; ao convênio Embrapa-Café e UFLA, pelo apoio financeiro do projeto; ao Departamento de Biologia, em especial à professora Rosane Freitas Schwan, pela disponibilização da levedura e à Usina Luciânia, por fornecer gentilmente o melaço utilizado nas pesquisas. E ao produtor de café Carlos Alberto pelo fornecimento da polpa.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 82, n. 4, p. 340-349, Apr. 2007.

AMORIM, H. C.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool**: controle e monitoramento. Piracicaba: FEALQ, 1996.

AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, Sept. 2011.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **STAB**: açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 13, n. 4, p. 22-25, 1995.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB**: açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 7, n. 5, p. 54-59, 1999.

ARSHAD, M. et al. Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 410-414, Nov. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Agricultural Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC, 1992.

AVALLONE, S. et al. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, n. 8, p. 1308-1311, Nov./Dec. 2000.

BAJAJ, B. K.; SHARMA, S. Construction of killer industrial yeast *saccharomyces cerevisiae* hau-1 and its fermentation performance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 477-485, Apr./June 2010.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, Nov. 2008.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A. modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 34, n. 4, p. 330-334, 1962.

BOCCAS, F. Production of pectinase from coffee pulp in solid-state fermentation system - selection of wild fungal isolate of high potency by a simple 3-step screening technique. **Journal of Food Science and Technology-Mysore, Índia**, v. 31, n. 1, p. 22-26, Jan./Feb. 1994.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 71, n. 1, p. 45-50, Jan. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores agropecuários**. Brasília: Conab, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2012.

DASARI, G. et al. Reasons for the apparent difference in the effects of produced and added ethanol on culture viability during rapid fermentations by *saccharomyces-cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 35, n. 2, p. 109-122, Jan. 1990.

DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 177-182, Feb. 2006.

ELIAS, L. G. Composición de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, 1978. p. 19-29.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análise e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 2, p. 371-383, Oct. 1963.

HEIPIEPER, H. J. et al. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic-solvents. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, n. 10, p. 409-415, Oct. 1994.

HOURS, R. A.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid-state cultures. **Biological Wastes**, Barking, v. 24, n. 2, p. 147-157, 1988.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 10-26, Nov. 2004.

LALUCE, C. et al. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 4, p. 627-637, June 2009.

LARSSON, S. et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, n. 1-9, p. 617-632, 2000.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid-determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, n. 11, p. 641-649, 1981.

LIANG, L. et al. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 12, p. 1605-1613, Dec. 2008.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**: volume 3. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

MADHAVAN, A. et al. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1037-1047, Apr. 2009.

MADHAVAN, A. et al. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1037-1047, Apr. 2009.

MARINI, M. M. et al. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cacha double dagger a: a comparative study. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 235-242, Feb. 2009.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 532-535, out./dez. 2004.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2239-2243, May 2005.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, n. 2, p. 375-80, May 1944.

OLIVEIRA, E. S. et al. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaca yeast. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 19-24, Feb. 2004.

ORTIZ-MUNIZ, B. et al. Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 85, n. 10, p. 1361-1367, Oct. 2010.

PALMQVIST, E. et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 63, n. 1, p. 46-55, Apr. 1999.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 25-33, Aug. 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 36-43, Feb. 2006.

QUEROL, A. et al. Adaptive evolution of wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 1-2, p. 3-10, Sept. 2003.

ROJAS, J. B. U. et al. A. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaca (Aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek: international journal of general and molecular microbiology**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

SILVA, C. L. C.; ROSA, C. A.; OLIVEIRA, E. S. Studies on the kinetic parameters for alcoholic fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains and non-hydrogen sulfide-producing strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 857-863, Aug. 2006.

STATISTICA ANALYSIS. Data Analysis Software System 8.0. **Stat-Soft**, Tulsa, 2008.

STROPPIA, C. T. et al. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 6, p. 1978-1983, Nov./dez. 2009.

THOMSEN, M. H.; THYGESEN, A.; THOMSEN, A. B. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 447-455, June 2009.

ULLOA, J. B. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. **Waste Management**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 87-97, 2004.

VELAZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 201-207, Apr. 2002.

VILELA, D. M. et al. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 8, p. 1128-1135, Dec. 2010.

WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 482-487, Dec. 1999.

ARTIGO 2

OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DA POLPA DE CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

RESUMO

Devido à alta demanda por combustível e preocupações com o meio ambiente, tem-se, cada vez mais, pesquisado fontes alternativas de combustíveis. Uma das alternativas é a utilização de matérias-primas lignocelulósicas na produção de bioetanol, presentes em grande quantidade no meio ambiente. No entanto, para uma conversão eficiente deste material em álcool, são necessárias as etapas de pré-tratamento de deslignificação, hidrólise e fermentação. Estudos têm demonstrado que o bioetanol pode ser produzido de biomassa de diversas matérias-primas, como, por exemplo, os subprodutos agrícolas, como palha de milho, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. O café destaca-se como o produto agrícola de grande relevância para o Brasil, especialmente para o estado de Minas Gerais. Na sua produção são gerados resíduos, como a polpa e a casca de café, durante o processamento úmido e seco, respectivamente. No intuito de aproveitar a polpa de café para a produção de bioetanol, este trabalho teve como foco otimizar o pré-tratamento alcalino da polpa de café prensada. Para isso, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), testando concentrações de hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e tempo de pré-tratamento e avaliando como resposta o teor de hemicelulose, lignina e celulose remanescentes, além da capacidade de hidrólise do resíduo. Como resultado, pode-se notar que o pré-tratamento utilizando 4% de hidróxido de sódio, 0% de hidróxido de cálcio e tempo de 25 minutos de tratamento foi o que apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: Polpa de café. Pré-tratamento. Açúcares fermentecíveis. Bioetanol.

ABSTRACT

Due to the high demand for fuel and concerns about environment, one has, more and more, investigated alternative sources of fuels. One of the alternatives is the use of lignocellulosic raw materials in bioethanol production, present in great amount in environment. Nevertheless, for an efficient conversion of this material into alcohol, are necessary the pre-treatment steps of delignification, hydrolysis and fermentation. Studies have demonstrated that bioethanol can be produced from biomass of several raw materials, such as for example, agricultural by-products as corn straw, rice straw and sugar cane bagasse. Coffee stands out as the agricultural product of great relevance to Brazil, especially to the state of Minas Gerais. In its production, residues as coffee pulp and husk are generated during the moist and dry processing, respectively. In order to use coffee pulp for bioethanol production, this work was intended to optimize the alkaline pre-treatment of expelled coffee pulp. For this purpose, a rotational central compound design (DCCR) was used, testing the concentrations of sodium hydroxide, calcium hydroxide and pre-treatment time and evaluating as response the content of remaining hemicellulose, lignin and cellulose, in addition to the hydrolysis capacity of the residue. As a result, one can notice that the pre-treatment utilizing 4% of sodium hydroxide, 0% of calcium hydroxide and 25 minute time of treatment was the one which presented best results.

Keywords: Coffee pulp. Pre-treatment. Fermentable sugars. Bioethanol.

1 INTRODUÇÃO

A alta demanda mundial por energia, o esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e a preocupação com as mudanças climáticas globais estimularam o ressurgimento do interesse na energia renovável (LYND et al., 2005).

O amido de milho e sacarose da cana-de-açúcar são, atualmente, as matérias-primas mais utilizadas para a produção de bioetanol. No entanto, fica evidente que a utilização em larga escala do bioetanol exigirá o aproveitamento da biomassa lignocelulósica como matéria-prima, além de outros resíduos agroindustriais (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006).

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima mais promissora, considerando sua grande disponibilidade e baixo custo, mas a produção comercial em larga escala do etanol combustível a partir de materiais lignocelulósicos ainda não foi implementada (BALAT; BALAT; CAHIDE, 2008). O principal problema de se transformar matérias-primas lignocelulósicas em combustível líquido é a viabilidade econômica (CHEN; QIU, 2010).

A conversão de biomassa lignocelulósica para o etanol, no entanto, é mais difícil do que o milho e melado, devido à complexa estrutura da parede celular da planta. Um pré-tratamento é necessário para alterar a composição estrutural e química da biomassa lignocelulósica, para facilitar a hidrólise rápida e eficiente de carboidratos em açúcares fermentáveis (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

Nos últimos anos, estudos indicam a produção de bioetanol a partir de biomassa de diversas matérias-primas, como, por exemplo, os subprodutos agrícolas palha de milho, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos do algodão. Uma fonte ainda pouco estudada são os resíduos gerados durante o processamento do café.

O café se destaca como o produto agrícola de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais. Durante a sua produção são gerados resíduos, como a polpa e casca de café, durante o processamento úmido e seco, respectivamente. Segundo Pandey et al. (2000), estes resíduos têm sido utilizados como matéria-prima para a produção de cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aroma, alimentação animal e também depositados no solo. Outra alternativa seria o seu emprego na produção de bioetanol, utilizando tanto a fração solúvel (açúcares, compostos fenólicos e pectinas, entre outros) quanto a fração lignocelulósica.

Segundo Elias (1978), a polpa de café tem 76,7% de umidade e os seguintes teores em base seca: 10% de proteína, 2,5% de extrato etéreo, 21% de fibras, 50% de carboidratos e 8% de cinzas, sendo a fração de carboidratos representada em base seca por 27,65% de celulose, 12,40% de açúcares redutores, como a glicose, 2,02% de açúcares não redutores e um total de 6,52% de substâncias pécicas.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos, principalmente, de celulose, lignina e hemicelulose, sendo que a quantidade de cada componente do material varia com a natureza do mesmo. A celulose é um polissacarídeo que pode ser reduzido a glicose por hidrólise química ou enzimática. A lignina é um polímero aromático heterogêneo, formado pela polimerização dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. A hemicelulose é um polissacarídeo que, sob hidrólise, produz xilose e outros monossacarídeos, como arabinose, manose, glicose e galactose. A celulose e a hemicelulose presentes em madeiras e resíduos agrícolas são altamente resistentes à despolimerização enzimática. Isto é causado pela presença da capa hemicelulose-lignina que rodeia a celulose, a qual impede o ataque enzimático (GARROTE; DOMINGUEZ; PARAJO, 2002).

Fatores tais como porosidade (área superficial acessível), cristalinidade das fibras de celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose do material também

afetam a hidrólise enzimática (SEWALT; GLASSER; BEAUCHEMIN, 1997); eles limitam a hidrólise enzimática eficiente dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Estes problemas podem ser contornados utilizando-se pré-tratamentos do material do qual se quer obter etanol. Um pré-tratamento satisfatório inclui: (1) perturbar e remover a matriz cruzada de lignina e hemiceluloses que incorpora as fibras de celulose, (2) romper as ligações de hidrogênio na celulose cristalina e (3) aumentar a área de porosidade e superfície de celulose para a hidrólise enzimática subsequente (LI et al., 2010).

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras e tecnologicamente menos avançadas no processo de conversão de biomassa em açúcares fermentáveis (LASER et al., 2002).

Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, que inclui a explosão a vapor, tratamento com substâncias ácidas, substâncias alcalinas e microrganismos, entre outros tratamentos.

Em comparação com outras tecnologias de pré-tratamento, o pré-tratamento alcalino, geralmente, utiliza baixas temperaturas e pressões, até mesmo em condições ambientais de pressão e temperatura. O tempo de pré-tratamento, no entanto, é relatado em termos de horas ou dias, sendo muito maior do que outros processos de pré-tratamento (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

Pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes para a solubilização da lignina, exibindo menores efeitos sobre a solubilização da celulose e hemicelulose que os pré-tratamentos ácidos ou hidrotermais (CARVALHEIRO; DUARTE; GIRIO, 2008).

Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são adequados para os pré-tratamentos alcalinos. NaOH provoca inchaço, aumento da superfície interna da celulose e redução do grau de polimerização e cristalinidade, o que

provoca o rompimento da estrutura da lignina (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), também conhecido como cal, tem sido amplamente estudado. O pré-tratamento com cal remove substâncias amorfas, como a lignina (ALVIRA et al., 2010). Hidróxido de sódio e outras bases apresentam como desvantagens o alto custo e dificuldades de recuperar os reagentes após a sua utilização. Hidróxido de cálcio é uma alternativa de reduzir os custos do pré-tratamento alcalino. O pré-tratamento com cal é mais barato e de fácil recuperação sendo uma alternativa para a remoção da lignina (WYMAN et al., 2005).

Após o pré-tratamento, é realizada a hidrólise do material; quando se utilizam enzimas, estas são denominadas hidrólise enzimática. Para comprovar a eficácia do pré-tratamento é necessário verificar as perdas dos componentes lignocelulósicos e a conversão da celulose em açúcares fermentescíveis por meio de um processo de hidrólise enzimática.

A hidrólise enzimática é conduzida através de enzimas celulasas, que são altamente específicas. As celulasas são, usualmente, uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidos no processo de hidrólise são endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002).

As exo-1,4- β -D-glucanases, ou celobio-hidrolases, hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades, liberando celobioses; as endo-1,4- β -D-glucanases, ou endoglucanases, hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória e as 1,4- β -D-glucosidases promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem, também, clivar unidades glicosídicas a partir de celuoligossacarídeos. Coletivamente chamadas de celulasas, atuam em sinergia para hidrolisar a celulose, criando sítios acessíveis umas para as outras e

aliviando problemas de inibição pelos produtos (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar o processo de pré-tratamento químico da polpa de café para facilitar a hidrólise enzimática, promovendo o aproveitamento da biomassa lignocelulósica da polpa visando à produção de etanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Polpa de café

Foi utilizada a polpa de café arábica obtida pelo descascamento do café cereja por via úmida. Este material foi cedido por um cafeicultor da região de Lavras, MG, safra 2010. O material foi armazenado em sacos plástico, a - 18 °C, em um freezer vertical. Antes das análises e dos tratamentos, a polpa foi triturada em liquidificador e prensada para remover o extrato aquoso.

2.2 Caracterização da polpa de café

Para a caracterização da polpa de café, foram realizadas as análises de umidade, cinzas, extrativo, lignina, celulose e hemicelulose.

2.3 Pré-tratamento

O pré-tratamento é uma etapa fundamental para o processo de produção de bioetanol. O objetivo é remover a lignina presente no material lignocelulósico para facilitar a ação das enzimas, que são substancialmente afetadas pela lignina e a hemicelulose. Para esta etapa foi escolhido o pré-tratamento alcalino, por ser mais eficiente na remoção da lignina. As substâncias alcalinas utilizadas foram hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), em concentrações determinadas segundo o delineamento composto central rotacional utilizando uma autoclave (autoclave vertical, Primatec) como reator, à temperatura de 121 °C. Outros autores, como Silverstein et al. (2007), também utilizaram autoclave para tratar o substrato.

Para a otimização do processo de pré-tratamento foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), fatorial completo 2^3 , incluindo os 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios, avaliando-se três variáveis independentes: concentração de NaOH (g/L), concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (g/L) e tempo do tratamento, sendo a temperatura do processo fixada em 121°C. Tendo como variáveis respostas teores residuais de lignina, hemicelulose, celulose, cinzas, rendimentos em massa, lignina, celulose e hemicelulose e também facilidade de hidrólise, a partir da medição de açúcares redutores, redutores totais e glicose, após uma hidrólise padrão.

Na Tabela 1 são apresentados os níveis estudados para cada variável, que foram selecionados baseando-se em estudos desenvolvidos por Zhang, Xu e Cheng (2011), Rabelo, Maciel e Costa (2009) e Xu et al. (2010).

Tabela 1 Níveis do planejamento experimental para otimização do pré-tratamento alcalino da polpa de café

Variável	-1,6818	-1	0	1	1,6818
[NaOH] (%m/v)	0	1,63	4	6,37	8
[Ca(OH) ₂] (%m/v)	0	1,63	4	6,37	8
Tempo (min)	16,5	20	25	30	33,4

Amostras de 100 g de polpa de café foram utilizadas para pré-tratamento com 500 mL de soluções de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio (concentração de polpa de café 20% m/v). A polpa de café e os reagentes alcalinos foram misturados em erlenmeyers de 1 litro e submetidos ao pré-tratamento a 121 °C, durante intervalos de tempo, conforme definido pelo planejamento experimental. A biomassa pré-tratada foi recuperada por filtração e lavada com 750 mL de água quente (70 °C) para remover a lignina e substâncias alcalinas que ainda estavam impregnadas no material, utilizando procedimento semelhante ao de Chen et al. (2007) e Silverstein et al. (2007).

Após a lavagem, o resíduo pré-tratado foi prensado para a retirada do excesso de água presente no material.

O resíduo pré-tratado foi pesado e caracterizado determinando-se o teor de umidade, lignina, celulose e hemiceluloses. O mesmo resíduo de cada tratamento especificado na Tabela 1 foi submetido a uma hidrólise enzimática para liberação de glicose, que foi medida pela determinação de açúcares redutores e pelo kit enzimático (GOD-PAG Laborlab). O objetivo da realização desta hidrólise foi verificar quais dos pré-tratamentos realizados foi mais efetivo em disponibilizar a celulose do resíduo para a ação da celulase, garantindo uma maior facilidade na obtenção de açúcares fermentescíveis.

Para a hidrólise utilizou-se a enzima Celluclast 1.5L (Novozymes), cuja atividade enzimática foi determinada usando metodologia proposta por Ghose (1987), que mede a atividade celulolítica em termos de unidades de papel de filtro (FPU) por mililitro da solução enzimática original. O valor da atividade enzimática foi de 69,106 FPU/mL. Pela atividade enzimática, foi calculada a dosagem de enzima para as hidrólises, considerando que a dosagem de enzima comumente utilizada nas hidrólises está entre 7 e 33 FPU/g substrato (SUN; CHENG, 2002). Utilizando a massa submetida à hidrólise, juntamente com o volume de enzima utilizado e a atividade enzimática, pode-se calcular a concentração de enzima utilizada em FPU/g. Neste trabalho foi utilizada uma carga de 13,82 FPU/g de substrato (2 mL de enzimas), valor dentro do estabelecido pelos autores.

Para a hidrólise empregaram-se erlenmeyers de 250 mL contendo 2 mL de preparado enzimático, 38 mL de tampão citrato 0,05 mol/L⁻¹ (pH=4,8) e 10 g (equivalente a 7% de material seco por 100 mL de solução) de polpa prensada pré-tratada. Os recipientes foram incubados em incubadora rotativa (Nova Ética, modelo 430 RDB), a 50 °C e 150 rpm, durante 72 horas. Ao final da hidrólise, os erlenmeyers foram imersos em gelo e, posteriormente, o material de cada

tratamento foi centrifugado (Fanem, modelo 206), a 5.000 g por 10 minutos, metodologia proposta por Yang e Wyman (2004). O sobrenadante foi removido para a determinação dos açúcares. Foram medidos os teores de açúcares redutores, redutores totais (glicose, maltose, celobiose, entre outros oligossacarídeos) e glicose. Com estes dados calculou-se o rendimento da conversão de celulose em glicose. Além dos pré-tratamentos do DCCR (Tabela 1), também foram realizados mais dois ensaios adicionais, sendo o primeiro a hidrólise da polpa de café sem passar por pré-tratamento térmico e alcalino e o segundo, da polpa de café pré-tratada em autoclave, por 25 minutos, contendo apenas água destilada como solução reacional.

2.4 Métodos analíticos

Todas as análises realizadas para polpa de café triturada e prensada e também para a polpa de café pré-tratada foram realizadas em triplicatas.

2.4.1 Umidade

A umidade foi determinada gravimetricamente, após secagem em estufa, a 65 °C, segundo Association of Official Analytical Chemistry (1990), para a polpa de café triturada e prensada e para polpa de café pré-tratada.

2.4.2 Extrativos

A determinação de extrativos foi baseada na norma NREL nº 10, “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER et al., 2005). Foram pesadas amostras de 4 g de polpa de café previamente moído e seco em cartuchos de extração e colocadas para serem extraídas em um aparelho soxhlet.

Volume de 190 mL de álcool etílico de 99% de pureza foi adicionado a cada balão do extrator, junto com uma quantidade de pérolas de vidro. A extração termina quando o solvente que se encontra ao redor do cartucho de extração torna-se incolor. Em seguida, foram retirados os cartuchos com as amostras do soxhlet, lavados com 100 mL de etanol e secos em estufa, a 105 °C, até massa constante. Os extrativos foram determinados para a polpa de café triturada e prensada. Para o cálculo do extrativo foi utilizada a Equação (1).

$$\text{Extrativos} = \frac{|(m_1 - m_2)|}{m_1} * 100 \quad (1)$$

em que

Extrativos: massa de extrativo/100 g de polpa de café seca;

m_1 : massa da polpa de café seca (g);

m_2 : massa da polpa livre dos extrativos (g).

2.4.3 Cinza

O teor de cinzas foi determinado para a polpa de café triturada e prensada segundo as normas analíticas da Association of Official Analytical Chemistry (2000), obtido por incineração em mufla, a temperaturas de 550-570 °C.

2.4.4 Determinação da composição química por Vans Soest

As análises para os teores de lignina, celulose e hemicelulose foram realizadas para a polpa de café triturada e prensada e para polpa pré-tratada, sendo conduzida no Laboratório Central do Departamento de Ciência dos

Alimentos da Universidade Federal de Lavras, de acordo com as metodologias propostas por Goering e Van Soest (1970); Silva (1998) e Van Soest (1963).

2.4.5 Açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART)

As concentrações de AR e ART foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959) para os hidrolisados. As leituras da absorbância das amostras hidrolisadas foram efetuadas no espectrofotômetro, a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro (Fento 700s), preparou-se um branco em que o volume da amostra foi substituído por água destilada. Para o cálculo de AR e ART, foram feitas curvas de calibração com glicose e sacarose, respectivamente.

2.4.6 Determinação de glicose

Para a quantificação da glicose nos hidrolisados, foram adicionados 10 µL de cada uma das amostras (hidrolisado) em tubos de ensaio e adicionado 1,0 mL do kit enzimático GOD PAP (Laborlab), levados a um banho termostaticado, a 30 °C, durante 10 minutos. A reação foi interrompida retirando-se os tubos do banho e colocando-os em um banho de gelo fundente para terminar a reação. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 500 nm. Para a quantificação do teor de glicose foi construída uma curva padrão com concentrações de glicose conhecida.

2.4.7 Rendimento em massa da polpa de café submetida ao pré-tratamento alcalino

Foi calculado o rendimento mássico do pré-tratamento alcalino, em base úmida, inicialmente pesando-se 100 g de polpa de café prensada. Realizado o pré-tratamento, a polpa de café remanescente foi lavada e prensada. Em seguida, pesou-se a quantidade de massa remanescente e utilizou-se a Equação 2 para se obter o rendimento em massa:

$$Rend_{massa} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

em que

$Rend_{massa}$ = rendimento em massa em base úmida (g de material pré-tratado/ 100 g de polpa de café);

M_f : massa final da polpa após pré-tratamento com solução alcalina (g);

M_i : massa inicial da polpa de café prensada (g).

2.4.8 Porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose remanescente na polpa de café pré-tratada

Os cálculos dos teores de celulose, lignina e hemicelulose remanescentes ou retidos no material pré-tratado, levando em conta a quantidade destes compostos no material inicial, foram realizados utilizando-se a Equação (3).

$$Rx(\%) = \frac{W_f}{W_0} \times 100 \quad (3)$$

sendo Rx as porcentagens de lignina (RL), celulose (RC) e hemicelulose (RH) remanescente na polpa pré-tratada, W_0 a quantidade em g do constituinte na polpa de café seca e W_f a quantidade, em g, do constituinte na polpa de café pré-tratada seca. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para o cálculo da porcentagem perdida do componente durante o pré-tratamento, utilizou-se a Equação 4.

$$Px(\%) = 100 - Rx(\%) \quad (4)$$

2.4.9 Rendimento da hidrólise da celulose no material pré-tratado

O rendimento da hidrólise enzimática foi calculado utilizando-se a Equação 5. Este rendimento considera apenas a celulose presente na polpa de café pré-tratada.

$$\text{convers\~{a}o celulose(\%)} = \frac{(G_f - G_b) \times 0,9}{C_0} \times 100 \quad (5)$$

sendo

G_f : concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (g de glicose/L de meio);

G_b : concentração de glicose no branco (tratamento realizado sem a enzima) (g de glicose/L de meio);

C_0 : concentração de celulose no material pré-tratado (g de celulose/L meio a ser hidrolisado).

2.4.10 Eficiência do pré-tratamento

Para verificar a eficiência do pré-tratamento foi criada uma variável resposta, tendo como objetivo analisar conjuntamente a quantidade remanescente de celulose, lignina e hemicelulose. Os melhores pré-tratamentos, neste caso, são considerados aqueles que, ao final desta etapa, tinham maiores porcentagens remanescentes de celulose e menores de hemicelulose e lignina.

Para esse fim foi utilizada a Equação 6:

$$Ef = RC / (RH + RL) \quad (6)$$

2.5 Análise estatística

Para a otimização dos pré-tratamentos e da hidrólise enzimática foram utilizados dois planejamentos fatoriais completos de ordem 2^k (níveis +1 e -1), dois pontos axiais (níveis $-\alpha$ e $+\alpha$), e três pontos centrais (nível zero), com 3 variáveis independentes (concentração de hidróxido de sódio, concentração de hidróxido de cálcio e tempo de tratamento). O software Statistica 8.0 (STATISTICA ANALYSIS, 2008) foi utilizado para a análise estatística dos resultados, a 5% de significância (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da polpa de café

Na Tabela 2 são mostrados os teores dos constituintes celulares (celulose, lignina e hemicelulose), extrativos e cinzas da polpa de café triturada e prensada obtida por processamento úmido.

Segundo Ulloa (2004), a polpa de café, após a retirada da mucilagem, está restrita aos constituintes da parede celular e alguns compostos, como polifênois, taninos e cafeína.

Tabela 2 Teores dos constituintes da polpa de café, em porcentagem, dados baseados na matéria seca (MS)

	(%)
Umidade	82±2
Celulose	20,6±3,2
Hemicelulose	17,2±1,2
Lignina	15,5±2,5
Cinzas	7,9±1,9
Extrativos	27,5±2,6

A umidade encontrada de 82% está de acordo com os valores encontrados na literatura, entre 80%-85% de umidade (ROUSSOS et al., 1995).

Para a polpa de café, os resultados obtidos para hemicelulose (17,2%) e celulose (20,6%) foram inferiores aos encontrados por Barcelos et al. (2002), que foram de 23,63% e 36,68%. Já o teor de cinzas (7,9%) foi semelhante ao encontrado pelo mesmos autores (8,5%), enquanto os teores de lignina (15,5%) foram maiores que os encontrados por Barcelos et al. (2002), que foi de 11,7%. Elias (1978) encontrou 17,7% de celulose na polpa de café, teor inferior ao obtido nesse trabalho. Ulloa (2004) encontrou concentrações de 28,6% de

celulose, 8% de proteína e 8,9% de cinza, valores próximos aos obtidos no presente trabalho, considerando-se a variabilidade natural da composição da matéria-prima.

Salmones, Mata e Waliszewski (2005) utilizaram a técnica proposta por Van Soest e encontraram concentrações de celulose de 24,5%, de hemicelulose de 17,1% e de lignina, 26%. Essa variação na composição da polpa provavelmente ocorreu devido a diferentes condições de plantio, cultivar, espécie, época de colheita, processamento entre outros.

Os extraíveis são compostos orgânicos que não residem na parede celular da planta, são solúveis em água, solventes orgânicos neutros ou volatilizados a vapor. Devido à presença de grande quantidade de compostos solúveis na polpa de café, o valor dos extrativos foi bastante elevado. Rabelo, Maciel e Costa (2009) encontraram 2,3% para os extrativos da cana-de-açúcar, Quando pré-tratado, o bagaço de cana apresenta menores perdas de massa, o que pode estar relacionado ao baixo teor de extrativos.

A polpa de café tem concentração de hemicelulose e celulose menor que as apresentadas por Martin, Klinke e Thomsen (2007), para bagaço da cana-de-açúcar, que foram de 31,1% de hemicelulose e 43,1% de celulose. Chen et al. (2007), analisando palha de cevada, encontraram 38,58% de celulose, 19,88% de hemicelulose e um total de 27,57% de lignina, incluindo lignina solúvel (2,18%) e lignina insolúvel (25,39%). Silverstein et al. (2007), analisando haste de algodão, encontraram valores de celulose e hemicelulose iguais a 31,1% e 10,7%, respectivamente. Com relação à lignina foi encontrado um total de 30,1%. Em todos os trabalhos citados pode-se notar que os teores de lignina presentes nestas biomassas são maiores que os presentes na polpa de café.

3.2 Pré-tratamento alcalino

Na Tabela 3 são apresentados os resultados de rendimento em massa do pré-tratamento ($\text{Rend}_{\text{massa}}$) e as porcentagens recuperadas de celulose (RC), lignina (RL) e hemicelulose (RH) na polpa de café pré-tratada.

Tabela 3 Rendimento em massa do pré-tratamento ($\text{Rend}_{\text{massa}}$) e as porcentagens de celulose (RC), lignina (RL) e hemicelulose (RH) remanescentes na polpa de café pré-tratada, sendo os resultados expressos em porcentagem e eficiência do pré-tratamento

Ensaio	[NaOH]	[Ca(OH) ₂]	Tempo	$\text{Rend}_{\text{Massa}}^*$ %	RC* %	RH* %	RL* %	Eficiência (Eq 6)
1	+1	+1	+1	20,445	62,43	63,88	23,27	0,716
2	+1	+1	-1	20,25	70,41	50,06	39,92	0,783
3	+1	-1	-1	20,07	73,17	39,42	40,10	0,920
4	+1	-1	+1	20,67	69,031	56,51	29,93	0,799
5	-1	-1	-1	29,25	76,017	74,90	75,11	0,507
6	-1	-1	+1	26,2	77,90	58,39	46,18	0,745
7	-1	+1	-1	27,015	52,58	83,69	30,91	0,459
8	-1	+1	+1	25,965	46,52	70,17	33,85	0,447
9	0	0	+1,6818	22,95	49,41	73,11	28,93	0,484
10	0	0	-1,6818	27,945	78,27	73,31	39,94	0,691
11	0	1,6818	0	20,09	60,09	55,32	34,07	0,672
12	0	-1,6818	0	18,15	69,18	44,15	25,19	0,998
13	1,6818	0	0	18,01	69,44	38,41	19,90	1,191
14	-1,6818	0	0	38,43	59,99	88,99	79,26	0,357
15	0	0	0	22,055	77,83	45,47	38,38	0,928
16	0	0	0	22,045	79,37	45,57	39,34	0,935
17	0	0	0	22,085	78,32	44,23	38,74	0,944

*Teores iniciais iguais a 100%

Para a determinação da região ótima para os parâmetros avaliados é necessária uma análise conjunta de todas as variáveis respostas estudadas (Tabela 3). Como se pode notar, o rendimento em massa para os tratamentos 12 e 13 foram os menores (18,15% e 18,01%, respectivamente), no entanto, antes de concluir que estes tratamentos são piores, é necessário analisar a porcentagem residual em celulose, lignina e hemicelulose, após o pré-tratamento. Com isso, mesmo obtendo menores rendimentos em massa, ao possuir maior porcentagem residual em celulose ao final do pré-tratamento, pode, assim, chegar a valores maiores de massa de celulose, mesmo em uma menor quantidade de massa pré-tratada. O maior valor de rendimento em massa (percentual de recuperação sólida) foi do tratamento 14 (38,43%), quando não se utilizou hidróxido de sódio.

Xu et al. (2010) estudaram o pré-tratamento de gramíneas utilizando temperatura de 121 °C e soluções alcalinas de 2% de hidróxido de sódio, obtendo rendimento em massa (percentual de recuperação sólida) iguais a 48,11% e 46,14%, quando a reação durou 30 minutos e 1 hora, respectivamente.

Fuentes et al. (2011) analisaram a perda de massa do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio (0,4 g de hidróxido/g biomassa), a 90 °C, durante 90 horas e obtiveram uma massa residual de 58,73%. O ensaio 14 (maior rendimento em massa), contendo 0,2 g de hidróxido de cálcio/g de biomassa, utilizando autoclave a 121 °C, obteve massa residual de 38,43% (Tabela 3), resultado este menor que o encontrado pelos autores citados.

Zhang, Xu e Cheng (2011) demonstraram, em estudo no qual foi utilizado bagaço de milho, que a adição de óxido de cálcio (0,11g/g de matéria-prima) ao pré-tratamento com 1% de hidróxido de sódio, a 70 °C, durante 9 horas, proporcionou uma maior porcentagem de recuperação do sólido; quando se utilizou apenas hidróxido de sódio, o valor de recuperação foi de 71,2%, enquanto ao utilizar óxido de cálcio juntamente com hidróxido de sódio este

valor foi de 83,3%. Resultado semelhante foi encontrado neste trabalho, no qual a adição de hidróxido de cálcio favorece o aumento da recuperação da massa (biomassa após o pré-tratamento).

Silverstein et al. (2007) estudaram o pré-tratamento da haste e da casca de algodão com hidróxido de sódio (2%), durante 30 minutos, utilizando autoclave, a 121 °C, e obtiveram um percentual de recuperação de massa sólida de 60,02%. Em comparação com os estudos citados, os valores de recuperação em massa foram piores, mostrando que a recuperação da massa sólida é dependente de cada substrato testado. Uma das possíveis causas da maior perda de massa presente neste trabalho é que a polpa de café apresenta maiores concentrações de extrativos (27,5%) que muitos materiais celulósicos citados na literatura e, quando pré-tratada, promove maior solubilização destes extrativos. Por exemplo, Silverstein et al. (2007) encontraram valores de extrativos iguais a 9% para haste de algodão.

O tratamento que apresentou maior porcentagem de retenção da celulose no material pré-tratado foi o do ponto central, com valor médio de 78,5%, apresentando 21,5% de perda de celulose durante o pré-tratamento (ensaios 15, 16 e 17). Os tratamentos 12 e 13 apresentaram, aproximadamente, 70% de retenção da celulose no material pré-tratado, havendo uma perda de aproximadamente 30%. No entanto, essa perda maior de celulose nos tratamentos 12 e 13 pode ser compensada pela maior facilidade na hidrólise enzimática.

Com relação à porcentagem de hemicelulose remanescente, os menores valores encontrados foram os ensaios 3 e 13 (39,43% e 38,41%), tendo a porcentagem de hemicelulose perdida (solubilizada durante o pré-tratamento) variado de 11,01% (ensaio 14) até 61,59% (ensaio 13). Silverstein et al. (2007) utilizaram hidróxido de sódio para o pré-tratamento de haste e caule de algodão e encontraram valores para a solubilização da xilana (constituente majoritário da

hemicelulose presente na casca e haste do algodão) que variaram de 13,90% (0,5%, 90 minutos, 90 °C) até 40,02% (2%, 90 minutos, 90 °C).

Para a retenção da lignina no material pré-tratado, o tratamento 14 foi o que apresentou maior retenção, com valor de 79,26%, sendo a lignina um fator prejudicial à hidrólise enzimática e o objetivo do pré-tratamento é remover este constituinte. Por sua vez, os tratamentos 1, 12 e 13 apresentaram as maiores perdas de lignina, efeito desejável.

Xu et al. (2010), em seus estudos com gramíneas utilizando concentrações de 0,5% a 2% de hidróxido de sódio, a 121 °C, durante tempos de incubação de 15 minutos, 30 minutos e 1 hora, obtiveram, como máxima remoção de lignina, 85,8% (14,2% de lignina remanescente no material pré-tratado), quando utilizaram 2% de hidróxido de sódio, durante 1 hora. Este resultado é superior ao encontrado no presente trabalho, que foi de 80,1% de remoção da lignina presente.

Silverstein et al. (2007), investigando tratamento químico de hastes e caule de algodão, relataram que, entre os quatro métodos testados (NaOH, H₂SO₄, H₂O₂ e ozônio), o pré-tratamento com NaOH apresentou o maior nível de deslignificação (65,63%, utilizando 2% NaOH, durante 90 minutos, a 121 °C)

No intuito de hidrolisar a celulose presente na biomassa lignocelulósica com enzimas obtendo sucesso, é muito importante o uso de um pré-tratamento adequado para o qual entre outros fatores removem a lignina e a hemicelulose presentes na biomassa, as quais formam uma complexa estrutura em torno da celulose dificultando a hidrólise enzimática (RABELO et al., 2011). Hidróxido de sódio tem sido mostrado como um eficiente removedor de lignina. No entanto, não são necessários tratamentos intensos para se obter elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, portanto, a remoção de lignina não deve ser considerada o único indicador da eficiência do pré-tratamento.

Pelos resultados até agora analisados, considerando as variáveis respostas rendimento em massa do pré-tratamento ($Rend_{massa}$) e as porcentagens de celulose (RC), lignina (RL) e hemicelulose (RH) remanescentes na polpa de café pré-tratada, fica evidente que os tratamentos 12 e 13 são os melhores, considerando a alta quantidade de celulose residual e as baixas quantidades de lignina e hemicelulose. Mesmo com menores massas, após o pré-tratamento, os tratamentos 12 e 13 apresentaram as maiores porcentagens de celulose remanescente, indicando que estes possuem maiores teores de celulose, mesmo apresentando menores rendimentos em massa.

Como se desejam maiores concentrações de celulose e menores concentrações de hemicelulose, foi criada uma variável resposta envolvendo os três componentes. Essa variável foi denominada de eficiência do pré-tratamento (Ef), calculada pela Equação 6.

A análise da eficiência do pré-tratamento demonstra que os tratamentos 12 e 13 realmente apresentaram melhores resultados.

O resultado da análise estatística para os dados experimentais porcentagem de celulose remanescente (Tabela 4), avaliado a 5% de significância, indica que não foram significativos o termo linear e quadrático da concentração de NaOH, o termo quadrático de hidróxido cálcio, o termo linear e quadrático do tempo e as interações entre hidróxido de sódio e tempo e entre hidróxido de cálcio e tempo. Foram significativos o coeficiente linear para o hidróxido de cálcio o qual foi negativo, o que demonstra que, aumentando a sua concentração, ocorre a diminuição da porcentagem remanescente de celulose na polpa de café pré-tratada. O termo linear e quadrático do tempo foi significativo e negativo, mostrando que, inicialmente, o aumento do tempo no pré-tratamento proporciona um aumento na porcentagem de celulose remanescente, até atingir um máximo, quando níveis maiores do tempo proporcionam uma diminuição na porcentagem remanescente de celulose na biomassa pré-tratada.

O resultado da análise estatística para os dados experimentais da porcentagem de lignina remanescente (Tabela 4), analisados a 5% de significância, demonstra que apenas o termo linear da concentração de hidróxido de sódio contribuiu efetivamente para a diminuição do teor residual da lignina no material pré-tratado.

Analisando-se estatisticamente, observa-se que as porcentagens residuais da hemiceluloses apresentaram, a 5% de significância, os termos lineares da concentração de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio, os termos quadráticos para concentração de hidróxido de sódio e o termo quadrático do tempo e a interação entre hidróxido de sódio e tempo. Fica evidente que o fator mais importante neste caso é o hidróxido de sódio, pois apresenta efeito negativo, mostrando que o aumento na concentração de NaOH diminui o teor residual de hemiceluloses presentes no material pré-tratado. Por outro lado, tem-se um efeito positivo do parâmetro linear da concentração de hidróxido de cálcio sobre o teor residual da hemicelulose, que é indesejável. A interação entre hidróxido de sódio e tempo sendo significativa e positiva demonstra que um aumento na concentração das duas variáveis proporciona diminuição das porcentagens remanescentes de hemicelulose.

Tabela 4 Resultados dos coeficientes da equação para as porcentagens de celulose (RC), de lignina (RL) e de hemiceluloses remanescentes

	RC		RL		RH	
	Coeficiente	pvalor	Coeficiente	pvalor	Coeficiente	pvalor
Média	78,34	0,00	38,68	0,00	45,16	0,00
(1)[NaOH] (L)	2,71NS	0,15	-11,18	0,01	-11,89	0,00
[NaOH] (Q)	-4,3NS	0,05	4,26NS	0,27	6,33	0,001
(2)[Ca(OH) ₂] (L)	-5,89	0,01	-3,55NS	0,31	4,19	0,006
[Ca(OH) ₂] (Q)	-4,33NS	0,05	-2,79NS	0,46	1,39NS	0,28
(3) Tempo (L)	-4,67	0,03	-5,22NS	0,15	0,04NS	0,97
Tempo (Q)	-4,61	0,04	-1,09NS	0,77	9,69	0,00
1Lx2L	5,8	0,03	6,21NS	0,19	-0,32NS	0,83
1Lx3L	-1,11NS	0,62	-0,11NS	0,98	7,62	0,001
2Lx3L	-1,6NS	0,49	3,17NS	0,48	-0,03NS	0,91
R ²	85,4		75,3		97,2	

*NS Não significativo, a 5 % de significância

A análise estatística para a eficiência é apresentada na Tabela 5, na qual se observa que foram significativos os termos lineares para concentração de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio e o termo quadrático do tempo, tendo o termo linear de hidróxido de sódio sido positivo. Portanto, aumentando-se a concentração de hidróxido de sódio aumenta-se a eficiência do pré-tratamento. Já o termo linear da concentração de hidróxido de cálcio foi negativo e, com isso, um aumento no seu valor proporciona uma diminuição na eficiência. O termo quadrático do tempo apresentou coeficiente negativo e, assim, o tempo apresenta um pico de ótimo no qual tempos superiores proporcionam a queda na eficiência do pré-tratamento.

Tabela 5 Resultados dos coeficientes da equação para eficiência do pré-tratamento

	Ef	
	Coeficiente	p-valor
Média	0,939	0,00
(1)[NaOH] (L)	0,180	0,00
[NaOH] (Q)	-0,068NS	0,07
(2)[Ca(OH) ₂] (L)	-0,081	0,03
[Ca(OH) ₂] (Q)	-0,046NS	0,19
(3) Tempo (L)	-0,023NS	0,46
Tempo (Q)	-0,134	0,00
1Lx2L	0,016NS	0,69
1Lx3L	-0,052NS	0,21
2Lx3L	-0,024NS	0,54
R ²	90,7	

*NS: não significativo, a 5% de significância

Como as porcentagens de variação explicadas pelo modelo para teor residual celulose, lignina e hemicelulose foram altas (85,4%; 75,3%; 97,2%), e analisando-se a Tabela 6 que mostra a análise de variância deste ajuste para as variáveis respostas em estudo, verifica-se que os valores de F_{calc} para porcentagem recuperada de celulose e hemicelulose (4,54; 26,8) são maiores do que o F_{tab} (3,68). Portanto, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Como, para lignina, o valor do F_{calc} (2,38) não foi maior que o do F_{tab} (3,68) não pode-se gerar o modelo.

Para a eficiência, a variação explicada pelo modelo foi de 90,7 e analisando-se a Tabela 5, F_{calc} é igual a 7,58 sendo maior que o F_{tab} (3,68). Com isso, o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 6 ANOVA para o teor residual de celulose, hemicelulose, lignina e eficiência do pré-tratamento

Fonte de variação	SQ	g.l.	QM	Fcalc	P
RC – Teor residual de celulose (%)					
Regressão	1587,46	9	176,38	4,57	P<0,05
Resíduos	271,58	7	38,8		
Total	1859,04	16			
RH– Teor residual de hemicelulose (%)					
Regressão	3909,82	9	434,42	26,80	P<0,05
Resíduos	113,46	7	16,21		
Total	4023,28	16			
RL – Teor residual de lignina (%)					
Regressão	3074,12	9	341,57	2,38	P<0,05
Resíduos	1008,64	7	144,09		
Total	4082,76	16			
Ef- Eficiência do pré-tratamento					
Regressão	0,78	9	0,09	7,58	0,01
Resíduos	0,08	7	0,01		
Total	0,86	16			

As equações 7, 8 e 9 para o modelo completo, em função das variáveis codificadas concentrações de NaOH (x_1), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (x_2) e tempo de tratamento (x_3), que representa o teor residual de celulose e hemicelulose e a eficiência do pré-tratamento, respectivamente, como resposta, são:

$$\text{RC}(\%) = 78,34 + 2,71x_1 - 4,3x_1^2 - 5,89x_2 - 4,33x_2^2 - 4,67x_3 - 4,61x_3^2 + 5,8x_1x_2 - 1,1x_1x_3 - 1,6x_2x_3 \quad (7)$$

$$\text{RH}(\%) = 45,16 - 11,89x_1 + 6,33x_1^2 + 4,19x_2 + 1,39x_2^2 + 0,04x_3 + 9,69x_3^3 - 0,32x_1x_2 + 7,62x_1x_3 - 0,03x_2x_3 \quad (8)$$

$$\text{Ef} = 0,94 + 0,18x_1 - 0,068x_1^2 - 0,081x_2 - 0,046x_2^2 - 0,023x_3 - 0,134x_3^3 + 0,016x_1x_2 - 0,052x_1x_3 - 0,024x_2x_3 \quad (9)$$

Na Figura 1 observam-se as curvas de contorno para o teor remanescente de celulose empregando-se o modelo descrito pela equação 7. Na Figura 1a, concentração de Ca(OH)_2 versus concentração de NaOH , o tempo foi fixado no ponto central igual 25 minutos. Na Figura 1b, concentração de NaOH versus tempo e concentração de Ca(OH)_2 foi fixado 4% ($x_2=0$) e, por último, na Figura 1c, concentração de Ca(OH)_2 versus tempo, a concentração de hidróxido de sódio foi fixada em 4% ($x_1=0$). Por meio das curvas de contorno (Figura 1), observa-se que maiores teores de hidróxido de sódio e menores de hidróxido de cálcio melhoram a retenção da celulose no material pré-tratado. Com relação ao tempo, em todos os gráficos da Figura 1 fica evidente que o maior valor da porcentagem remanescente de celulose esta sempre próximo ao ponto central. Ao demonstrar que o efeito da concentração do hidróxido de cálcio foi negativo e que o teor de celulose remanescente diminui com o aumento da concentração de hidróxido de cálcio na solução utilizada para o pré-tratamento, pode-se gerar a curva de contorno (Figura 1d), utilizando-se o menor valor deste elemento, que é 0%. Por meio desta curva de contorno nota-se que condições otimizadas para o pré-tratamento da polpa de café, levando em consideração apenas a teor de celulose remanescente, são próximas ao ponto central, correspondendo a valores próximos a 4% de hidróxido de sódio, 0% de hidróxido de cálcio e 25 minutos. No entanto, para determinar que as melhores condições de pré-tratamento são quantidades menores que 4% é preciso analisar outros resultados.

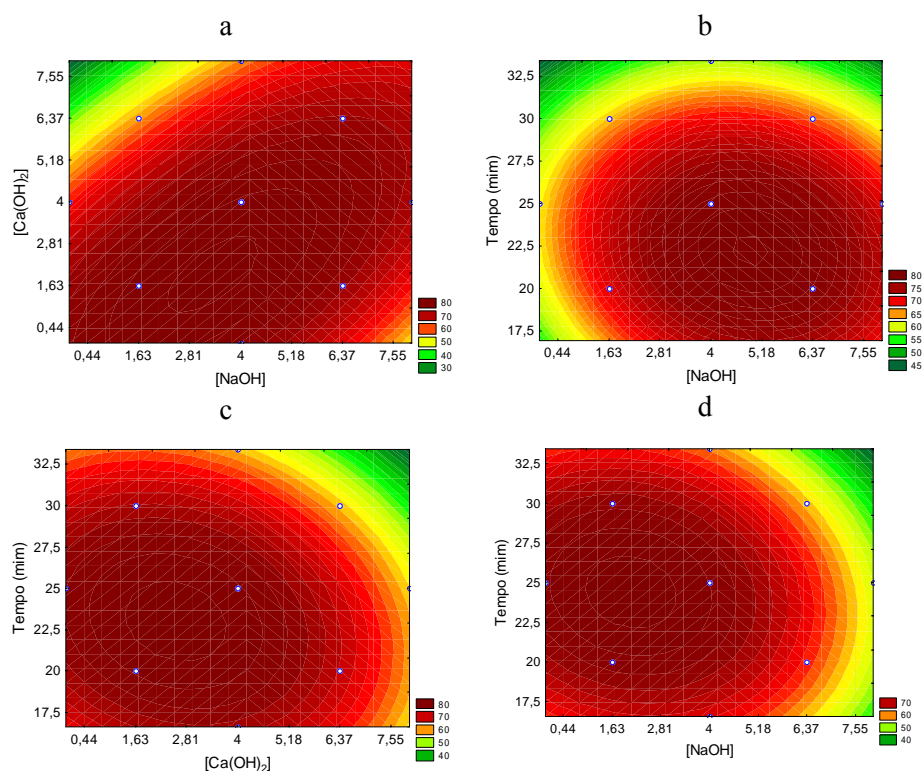


Figura 1 Curvas de contorno para o teor de celulose residual para pré-tratamento da polpa de café:

- curva de contorno $[\text{Na}(\text{OH})]$ versus $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, sendo o tempo fixado no ponto central;
- curva de contorno $[\text{Na}(\text{OH})]$ versus tempo, sendo $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ fixada no ponto central;
- curva de contorno $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ versus tempo, sendo $[\text{NaOH}]$ fixada no ponto central;
- curvas de contorno $[\text{NaOH}]$ versus tempo para o teor de celulose residual para pré-tratamento da polpa de café, considerando 0% de hidróxido de cálcio

Na Figura 2 observam-se os valores experimentais versus previstos pelo modelo para a resposta porcentagem de celulose remanescente no material pré-

tratado. Nesta Figura é mostrado bom ajuste dos dados experimentais à equação prevista pelo modelo.

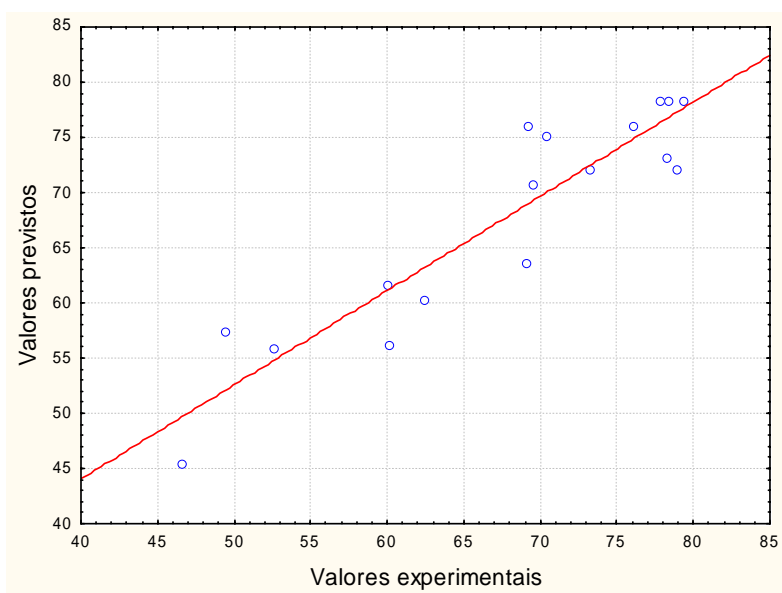


Figura 2 Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta porcentagem de celulose remanescente na polpa de café pré-tratada

As curvas de contorno para a recuperação de hemicelulose no material pré-tratado são apresentadas na Figura 3, sendo, na Figura 3a, concentração de NaOH versus concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, com o tempo fixado no ponto central (25 minutos – $x_3=0$); na Figura 3b, concentração de NaOH versus tempo com a variável $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ fixada em 4% ($x_2=0$) e na Figura 3c, em que plotado a variável concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ versus tempo, sendo a variável concentração de NaOH fixa em 4% ($x_1=0$). Como apenas a celulose é a molécula importante na hidrólise enzimática para a obtenção de glicose quando se utiliza celulases, a presença de hemiceluloses é um fator limitante para que esta hidrólise ocorra.

Segundo Chandra et al. (2007), a remoção da hemicelulose aumenta o tamanho dos poros médio dos substrato e, portanto, aumentam a acessibilidade e a probabilidade da celulose a ser hidrolisada. Portanto, analisando-se os gráficos, é fácil demonstrar que a elevação da concentração de hidróxido de sódio diminui esta porcentagem de hemicelulose na polpa de café pré-tratado.

Com relação à concentração de hidróxido de cálcio, pode-se notar que não influenciou a variável resposta; já para o tempo, fica visível que a menor concentração de hemicelulose residual ocorre nos níveis de tempo inferiores ao do ponto central.

Por proporcionar efeito positivo no teor remanescente de hemicelulose no material pré-tratado, a curva de contorno (Figura 3d) foi gerada desconsiderando a adição de hidróxido de cálcio (0% de hidróxido de cálcio). De acordo com os dados da Figura 3 fica evidente a necessidade de adicionar hidróxido de sódio para que ocorra a dissolução de parte da hemicelulose, mesmo que esta não seja a principal função da solução alcalina.

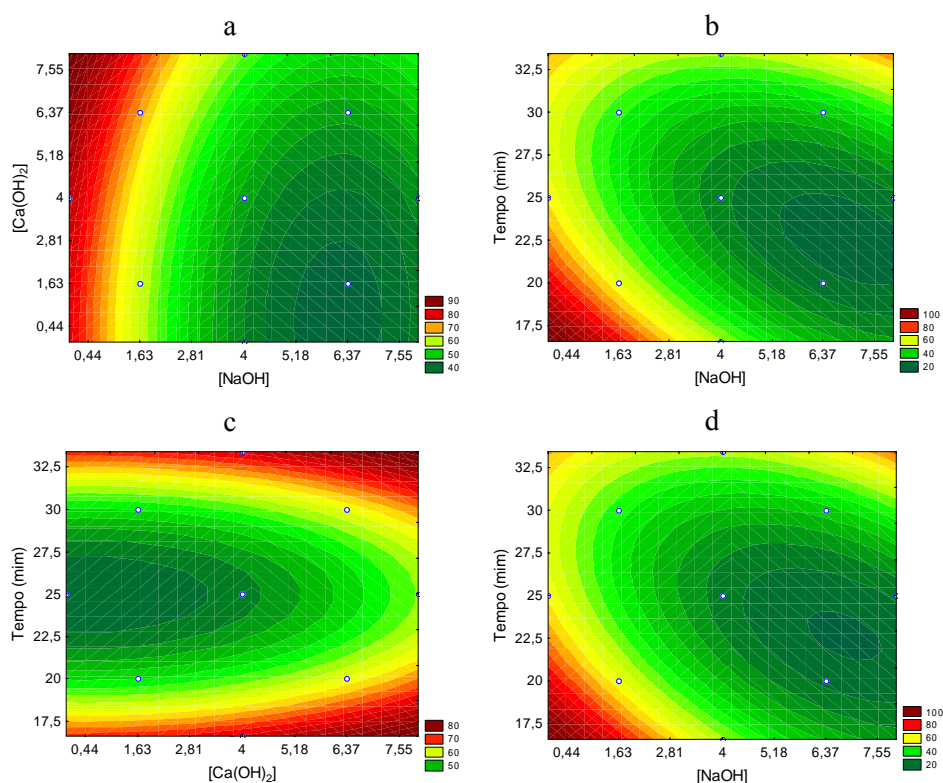


Figura 3 Curvas de contorno para o teor de hemicelulose residual presente na matéria pré-tratada, sendo:

- curva de contorno $\text{Na}(\text{OH})$ versus $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sendo o tempo fixado no ponto central;
- curva de contorno $\text{Na}(\text{OH})$ versus tempo, sendo o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fixado no ponto central;
- curva de contorno $\text{Ca}(\text{OH})_2$ versus tempo, sendo o NaOH fixado no ponto central;
- curvas de contorno para o teor de celulose residual para pré-tratamento da polpa de café, considerando 0% de hidróxido de cálcio.

As curvas de contorno para a eficiência do pré-tratamento é apresentada na Figura 4, sendo, na Figura 4a, concentração de NaOH versus concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, com o tempo fixado no ponto central (25 minutos – $x_3=0$); na Figura

4b, concentração de NaOH versus tempo com a variável $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ fixada em 4% ($x_2=0$) e na Figura 4c, em que é plotado a variável concentração de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ versus tempo, sendo a variável concentração de NaOH fixada em 4% ($x_1=0$). Já na Figura 4d observam-se as variáveis independentes concentração de hidróxido de sódio e tempo, sendo a concentração de hidróxido de cálcio fixada em 0% ($x_2 = -1,6818$). Nas Figuras 4a, 4b e 4c pode-se notar que o ponto de ótimo foi a concentração de hidróxido de sódio igual a 7,28% ($x_1=1,38$), concentração de hidróxido de cálcio de 2,65% ($X_2 = -0,57$) e tempo de 25,5 minutos ($x_3=-0,3$). No entanto, analisando-se a Figura 4d pode-se observar que concentrações menores de hidróxido de sódio no ponto central do tempo são necessárias para conseguir o valor otimizado para eficiência.

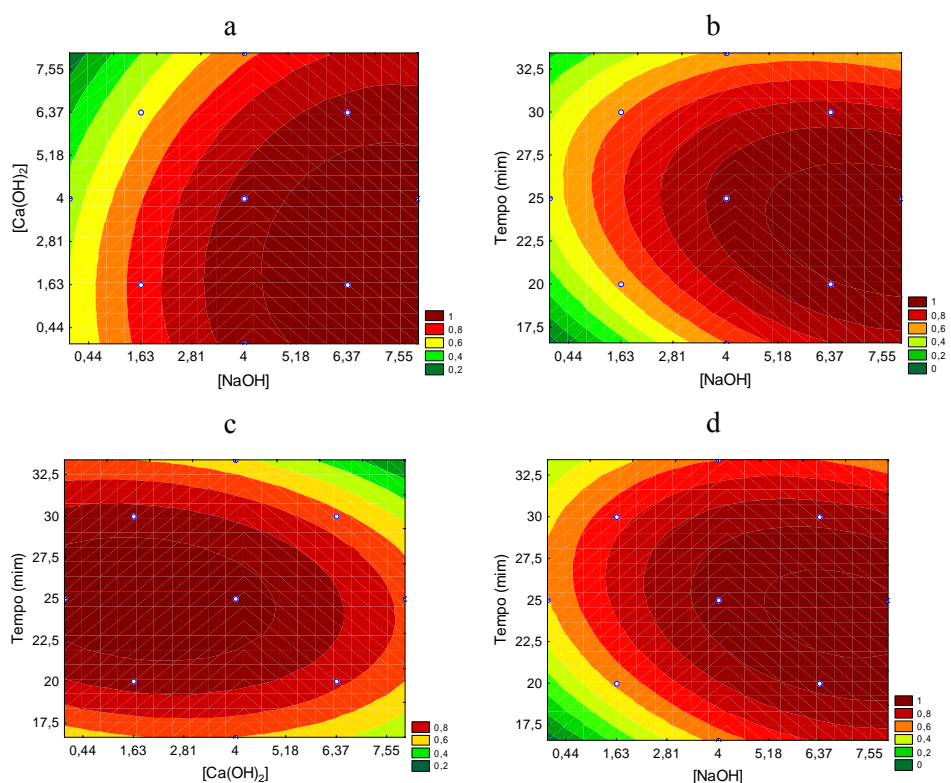


Figura 4 Curva de contorno para o teor eficiência do pré-tratamento alcalino da polpa de café, sendo:

- curva de contorno $\text{Na}(\text{OH})$ versus $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sendo o tempo fixado no ponto central;
- curva de contorno $\text{Na}(\text{OH})$ versus tempo, sendo o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fixado no ponto central;
- curva de contorno $\text{Ca}(\text{OH})_2$ versus tempo, sendo o NaOH fixado no ponto central;
- curvas de contorno para a eficiência do pré-tratamento da polpa de café, considerando 0% de hidróxido de cálcio.

Para comprovar que a celulose presente no material residual está disponível para hidrólise enzimática, foi realizado uma hidrólise padrão para todos os ensaios descritos na Tabela 6 e os resultados desta hidrólise para os teores de açúcares redutores, redutores totais, glicose e rendimento da hidrólise

determinados. Inicialmente, a atividade da celulase (Novozyme Celluclast 1.5L) foi determinada pelo método do papel filtro, como descrito por Ghose (1987), sendo este valor de 69,106 FPU/mL. Rabelo, Maciel e Costa (2009), utilizando a mesma enzima, encontraram atividade de 64,11 FPU/mL.

Para este estudo, foi realizada hidrólise da polpa de café sem passar por um pré-tratamento (ensaio 18) e também utilizando apenas água como solução do meio que foi para autoclave (ensaio 19).

Quanto aos teores de açúcares redutores e redutores totais, observa-se, na Tabela 7, que as maiores concentrações foram as dos ensaios 12 e 13, mostrando que, neles, as moléculas de celulose estão mais disponíveis para a hidrólise enzimática. Verifica-se que, quando não se realiza o pré-tratamento contendo soluções reativas, como o caso dos ensaios 18 e 19, os teores de açúcares finais são menores que nos demais tratamentos, lembrando que esses ensaios não participam do delineamento composto central rotacional (DCCR), o que favorece a conclusão sobre a necessidade de um pré-tratamento do material lignocelulósico.

Tabela 7 Teores de açúcares redutores totais e redutores, glicose e rendimento da hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada segundo planejamento fatorial DCCR, acrescido de dois ensaios (18 e 19).

Ensaio	[NaOH]	[Ca(OH) ₂]	Tempo	ART (g/L)	AR (g/L)	Glicose (g/L)	Conversão celulose (%)
1	+1	+1	+1	49,51	31,88	18,85	49,55
2	+1	+1	-1	48,18	32,88	17,92	40,92
3	+1	-1	-1	47,15	34,11	17,68	38,39
4	+1	-1	+1	50,14	36,82	21,04	51,67
5	-1	-1	-1	46,43	32,66	15,01	43,89
6	-1	-1	+1	45,66	32,75	16,99	44,25
7	-1	+1	-1	42,36	27,17	11,26	39,92
8	-1	+1	+1	40,82	26,11	11,78	46,18
9	0	0	+1,6818	48,16	27,33	13,75	47,30
10	0	0	-1,6818	43,89	30,27	15,25	41,55
11	0	1,6818	0	55,27	33,76	18,604	49,79
12	0	-1,6818	0	66,15	38,13	27,02	60,48
13	1,6818	0	0	62,31	37,97	25,27	50,09
14	-1,6818	0	0	26,72	24,7	9,62	39,58
15	0	0	0	56,1	33,49	19,62	44,99
16	0	0	0	56,83	33,65	18,98	42,37
17	0	0	0	55,8	33,42	18,26	41,05
18				21,2	11,82	5,01	19,25
19				19,55	10,62	5,16	12,73

Observa-se, na Tabela 7, que, depois da hidrólise enzimática, a maior concentração presente, em g/L de açúcares redutores totais, açúcares redutores e glicose, foi no ensaio 12, sendo este o que utilizou 0% de hidróxido de cálcio e 4% de hidróxido de sódio, durante 25 minutos, em autoclave, a 121 °C. Verifica-se também que o maior rendimento na conversão da celulose foi obtido no ensaio 12.

Pelos dados da Tabela 7 nota-se que a concentração de açúcares redutores é maior do que a concentração de glicose, mesmo sendo a glicose o açúcar predominante neste hidrolisado. Este fato é explicado pois alguns autores detectaram quantidade significativa de xilose em hidrolisados, mesmo sem adição de xilanase. A formação de xilose deve-se, provavelmente, à presença de atividade xilanolítica em Celluclast 1,5 L (SAHA et al., 2005).

Martin et al. (2002) estudaram o pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor utilizando temperaturas de 205 °C e 215 °C e obtiveram, após a hidrólise enzimática, concentrações de 23,5 g de glicose/L de meio hidrolisado e 21 g de glicose/L, respectivamente. Este resultado é inferior ao encontrado para o tratamento 12 (27,02 g de glicose/L).

Silverstein et al. (2007) pré-trataram haste e caule de algodão com hidróxido de sódio (2% NaOH, 60 min, 121 °C/1,03 bar) e obtiveram, após a hidrólise enzimática (utilizando 5% de sólidos, 40 FPU/g celulose e adição de 3,82 mL celobiase, 150 rpm e 50 °C), conversão de celulose igual a 60,8%, resultado este muito próximo ao ensaio 12 (60,48%). A diferença na conversão enzimática da celulose durante hidrólise é largamente dependente da diferença na composição de lignina no material pré-tratado. Lignina não é atacada pelas enzimas e, portanto, protege a celulose durante a hidrólise (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

Chen et al. (2007) utilizaram palha de cevada pré-tratada com 2% de hidróxido de sódio, a 121 °C e encontraram 80,44% de conversão de celulose em

glicose durante a hidrólise enzimática, tendo sido adicionados 60 FPU/g de celulose e suplementado com celobiase (Novozyme 188). Este resultado é significativamente melhor que o obtido no ensaio 12, com concentração enzimática de 11,51 FPU/g de substrato (81,34FPU/ g de celulose) que obteve 60,48%, de conversão.

Uma forma de aumentar a conversão de celulose em glicose é pela adição de β -glicosidases. Segundo Sun e Cheng (2002), atividade da celulase é inibida por celobiose e em menor escala por glicose, problemas esses que podem ser resolvidos pela adição da celobiase.

Na hidrólise da biomassa lignocelulósica, celulases atacam a cadeia de celulose formando glicose e celobiose, sendo esta última, então, decomposta em glicose pela β -glicosidase (cellobiase). Assim, a presença de β -glicosidase suficiente é importante na redução da inibição da celulase por celobiose e obtenção de rendimento elevados de açúcar (TENGBORG; GALBE; ZACCHI, 2001).

Os açúcares redutores totais (ART), por apresentarem comportamento semelhante ao dos açúcares redutores (AR), não foram analisados estatisticamente.

Para os teores de açúcares redutores foram significativos os termos lineares da concentração de hidróxido de cálcio e da concentração de hidróxido de sódio e o termo quadrático do tempo (Tabela 8). Apenas o efeito linear da concentração de hidróxido de sódio foi positivo, sendo este o fator que contribui positivamente para o aumento da concentração de açúcar. Hidróxido de cálcio é uma alternativa de reduzir os custos do pré-tratamento alcalino (WYMAN et al., 2005), mas não teve efeito desejável para o pré-tratamento da polpa de café, pois resultou numa diminuição do teor residual de celulose (Tabela 3), teor de açúcares redutores e de glicose (Tabela 7) e aumento do teor residual de hemicelulose e lignina (Tabela 3).

Rabelo et al. (2011), estudando a otimização do pré-tratamento para bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de cálcio, tendo como variáveis independentes tempo, temperatura e concentração de hidróxido de cálcio e como variável resposta a liberação de glicose, constataram que o termo linear da concentração de hidróxido de cálcio é negativo, influenciando de modo a reduzir a liberação de glicose pela hidrólise enzimática.

Resultado similar foi obtido para o teor de glicose, sendo os termos lineares para concentração de hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio e o termo quadrático do tempo significativos (Tabela 8). A concentração de hidróxido de sódio foi a única variável que afetou positivamente a concentração de glicose. Com relação ao efeito quadrático do tempo, por ser negativo, inicialmente, ao elevar-se o tempo, tem-se um aumento da variável resposta, atingindo um máximo, nesta superfície de resposta, próximo ao ponto central (25 minutos). A partir deste ponto, aumento no tempo proporciona queda no teor de glicose liberado durante a hidrólise.

Tabela 8 Resultados dos efeitos e coeficientes da equação sobre o teor de açúcares redutores e teores de glicose

	Coeficiente AR	p-valor	Coeficiente glicose	p-valor
Média	33,53	0,00	19,05	0,00
(1)[NaOH] (L)	2,88	0,00	3,16	0,00
[NaOH] (Q)	-0,8 NS	0,14	-1,24 NS	0,064
(2)[Ca(OH)2] (L)	-1,88	0,003	-1,84	0,009
[Ca(OH)2] (Q)	0,83 NS	0,13	1,03 NS	0,11
(3) Tempo (L)	-0,31 NS	0,50	0,31 NS	0,56
Tempo (Q)	-1,7	0,009	-1,91	0,01
1Lx2L	0,74 NS	0,23	0,88 NS	0,23
1Lx3L	0,33 NS	0,57	0,22 NS	0,75
2Lx3L	-0,61 NS	0,32	-0,49 NS	0,49
R ²	92,66		91,67	

*NS Não significativo, a 5 % de significância

Analisando-se o resultado da análise de variância (Tabela 9) para a resposta teor de açúcares redutores, verifica-se que o F_{calc} (9,33) é maior do que o F_{tab} ($F_{9,7,0,05} = 3,68$) e a porcentagem de variação explicada pelo modelo é boa ($R^2=92,66$). Portanto, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Para o teor de glicose, o F_{calc} (5,44) é maior que o F_{tab} e a porcentagem de variação explicada pelo modelo é elevada ($R^2=91,67$) (Tabela 8), o que demonstra que os dados experimentais ajustam-se bem ao modelo.

Tabela 9 ANOVA para o teor de açúcares redutores e teor de glicose da polpa de café pré-tratado e submetido à hidrólise

Fonte de variação	SQ	g.l.	QM	F_{calc}	P
AR					
Regressão	218,49	9	24,27	9,33	$P < 0,05$
Resíduos	18,22	7	2,60		
Total	248,29	16			
Glicose					
Regressão	279,20	9	31,02	8,54	$P < 0,05$
Resíduos	25,41	7	3,63		
Total	304,61	16			

Os modelos com as variáveis codificadas, NaOH (x_1), Ca(OH)₂ (x_2) e tempo de tratamento (x_3) para as variáveis respostas teor de açúcares redutores e o teor de glicose, são mostrados nas Equações 10 e 11:

$$\begin{aligned} \text{AR(g/L)} = & 33,52 + 2,87X_1 - 0,80X_1^2 - 1,88X_2 + 0,83X_2^2 \\ & - 0,31X_3 - 1,70X_3^2 + 0,74X_1X_2 + 0,33X_1X_3 - 0,61X_2X_3 \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \text{Glicose(g/L)} = & 19,5 + 3,16X_1 - 1,24X_1^2 - 1,84X_2 + 1,03X_2^2 \\ & - 0,31X_3 - 1,91X_3^2 + 0,88X_1X_2 + 0,22X_1X_3 - 0,49X_2X_3 \end{aligned} \quad (11)$$

Por meio das curvas de contorno geradas pelo modelo para AR (Figura 5), observa-se que as melhores condições para se obter uma maior porcentagem de açúcares redutores no resíduo pré-tratado são 6,37% de NaOH ($x_1 = 1,0$), 0% de Ca(OH)₂ ($x_2 = -1,68$) e um tempo de tratamento em torno de 25 minutos ($x_3 = 0$), levando-se em consideração um elevado teor de açúcares redutores e menor consumo de reagentes para o processo. Comparando-se as curvas de contornos entre açúcares redutores e glicose (Figura 6), pode-se notar a semelhança entre estas. Isto ocorreu devido à utilização apenas de enzimas específicas na quebra da celulose.

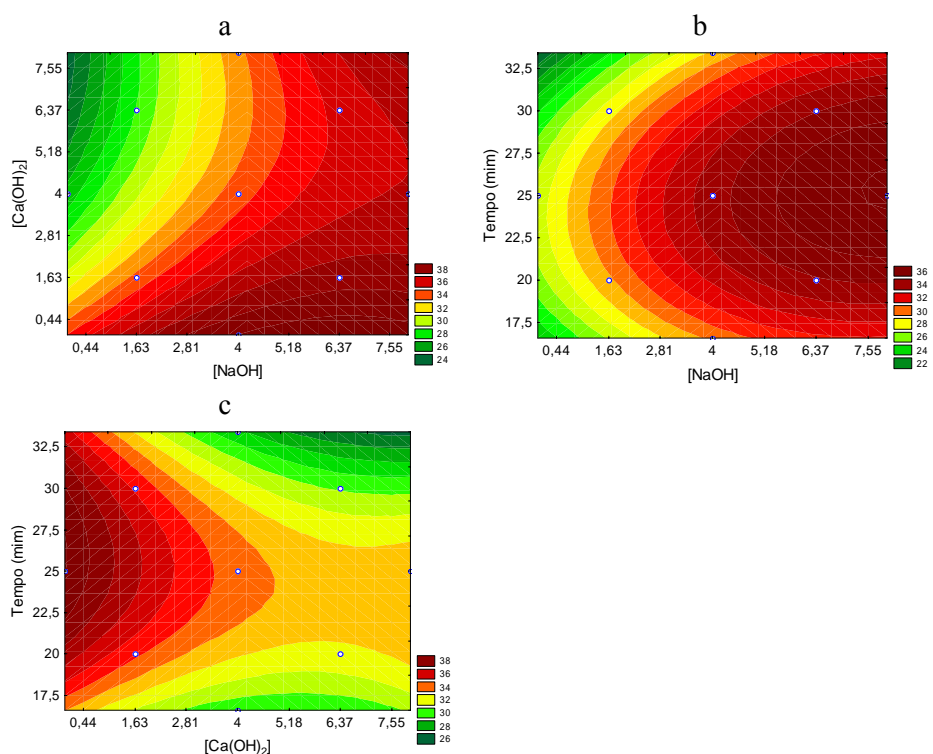


Figura 5 Curvas de contorno para o teor de açúcares redutores (g/L), sendo:

- curva de contorno [Na(OH)] versus [Ca(OH)₂], sendo o tempo fixado no ponto central;
- curva de contorno [Na(OH)] versus tempo, sendo o [Ca(OH)₂] fixado no ponto central;
- curva de contorno [Ca(OH)₂] versus tempo, sendo o [NaOH] fixado no ponto central.

As curvas de contorno para a variável resposta teor de glicose (Figura 6) apresentaram resultados semelhantes às curvas de contorno para teor de açúcares redutores, mostrando que a adição de hidróxido de cálcio para o pré-tratamento prejudica a etapa de hidrólise enzimática da polpa pré-tratada. Observa-se também que as melhores condições para se obter uma maior porcentagem de glicose no resíduo pré-tratado são 6,37% de [NaOH] ($x_1 = 1,0$),

0% de $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ ($x_2=-1,68$) e um tempo de tratamento em torno de 25 minutos ($x_3=0$).

Analisando-se a curva de contorno para glicose considerando 0% de hidróxido de cálcio (Figura 6d), pode-se observar que o ensaio 12, no qual foram utilizados 4% de hidróxido de sódio, 0% de hidróxido de cálcio e tempo de operação de 25 minutos, apresentou melhores resultados quanto à eliminação de hemicelulose e lignina e maiores teores de açúcares redutores e glicose durante a hidrólise enzimática. Além disso, o meio contendo apenas hidróxido de sódio é um meio mais límpido que os demais, pois este é mais solúvel em água que o hidróxido de cálcio.

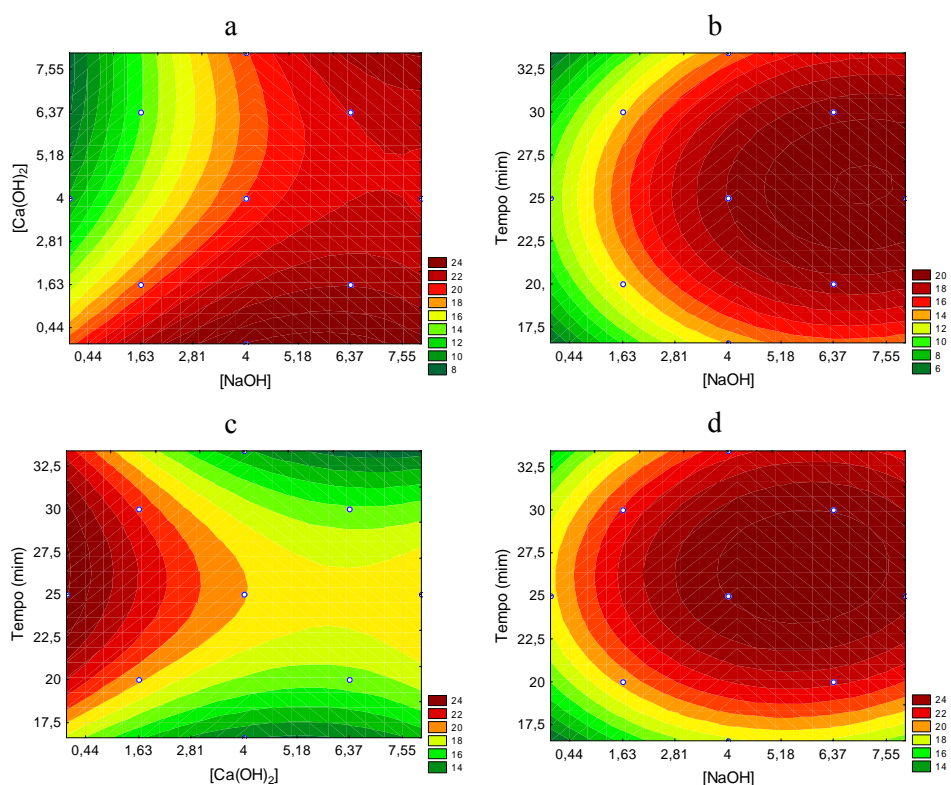


Figura 6 Curvas de contorno para glicose, sendo:

- curva de contorno $\text{Na}(\text{OH})$ versus $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sendo o tempo fixado no ponto central;
- curva de contorno $\text{Na}(\text{OH})$ versus tempo, sendo o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ fixado no ponto central;
- curva de contorno $\text{Ca}(\text{OH})_2$ versus tempo, sendo o NaOH fixado no ponto central;
- curvas de contorno para o glicose no meio hidrolisado, considerando 0% de hidróxido de cálcio.

Sendo assim, com base nos resultados, pode-se mostrar que a adição de hidróxido de cálcio não tem efeito benéfico no pré-tratamento e uma concentração de 4 %m/v de hidróxido de sódio por 25 minutos é suficiente para um bom pré-tratamento da polpa de café.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, conseguiu-se pré-tratar a polpa de café visando à produção de bioetanol, utilizando-se método alcalino. Foram obtidos bons resultados, como alta remoção de lignina e elevada concentração de celulose remanescente no resíduo pré-tratado, além de uma boa conversão da celulose em glicose (60%). As melhores condições para o pré-tratamento da polpa de café foram 4% de NaOH, 0% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e um tempo em torno de 25 minutos, a 121 °C, levando-se em consideração um menor consumo de reagentes para o processo. No entanto, o processo de produção de bioetanol a partir da polpa de café envolve várias etapas, sendo necessário otimizar cada uma delas para torná-lo viável economicamente.

AGRADECIMENTOS

A CNPq e à EPAMIG, pelo financiamento; à Novozymes, por ceder gentilmente as enzimas presentes neste estudo. À fazenda do Carlos Alberto, por fornecer polpa de café.

REFERÊNCIAS

- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, July 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 11. ed. Arlington: AOAC International, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC International, 1990.
- BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Z. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 551-573, Oct. 2008.
- BARCELOS, A. F. et al. Fatores antinutricionais da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 1325-1331, jul./ago. 2001.
- BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros Bromatológicos da casca e polpa desidratada de café em diferentes períodos. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, jul./ago. 2002.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GIRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 67, n. 11, p. 849-864, Nov. 2008.
- CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, Chichester, v. 108, p. 67-93, 2007.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHEN, H. Z.; QIU, W. H. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 5, p. 556-562, 2010.

CHEN, Y. et al. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 142, n. 3, p. 276-290, 2007.

ELIAS, L. G. Composición de la pulpa de café y otros subproductos. In: BRAHAM, J. E.; BRESSANI, R. **Pulpa de café: composición, tecnología y utilización**. Panamá: INCAP, 1978. p. 19-29.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 101, n. 1, p. 41-60, 2002.

FUENTES, L. L. G. et al. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 163, n. 5, p. 612-625, 2011.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 52, n. 3, p. 211-218, May 2002.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Agricultural handbook**. Washington: ARS USDA, 1970.

GRAY, K. A.; ZHAO, L. S.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 141-146, Apr. 2006.

HAHN-HAGERDAL, B. et al. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 549-556, Dec. 2006.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 81, n. 1, p. 33-44, Jan. 2002.

LI, C. L. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4900-4906, July 2010.

LYND, L. R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 5, p. 577-583, Oct. 2005.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, n. 5, p. 804-816, Sept./Oct. 1999.

MARTIN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 3, p. 274-282, Aug. 2002.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 3, p. 426-432, Feb. 2007.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

RABELO, S. C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 2600-2607, July 2011.

RABELO, S. C.; MACIEL, R.; COSTA, A. C. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 153, n. 1-2, p. 139-150, May 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2009.

ROJAS, J. B. U. et al. A. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002.

ROJAS, J. B. U. et al. A. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002.

ROUSSOS, S. et al. Biotechnological management of coffee pulp - isolation, screening characterization, selection of caffeine degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 756-762, Jan. 1995.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, Dec. 2005.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 5, p. 537-544, Mar. 2005.

SCHELL, D. J. et al. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor - Investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 105, n. 1-3, p. 69-85, 2003.

SEWALT, V. J. H.; GLASSER, W. G.; BEAUCHEMIN, K. A. Lignin impact on fiber degradation .3: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 5, p. 1823-1828, May 1997.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 1998.

SILVERSTEIN, R. A. et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 16, p. 3000-3011, Nov. 2007.

SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005.

SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005.

STATISTICA ANALYSIS. Data Analysis Software System 8.0. **Stat-Soft**, Tulsa, 2008.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, Amsterdam, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, Sept. 2008.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, New York, v. 17, n. 1, p. 110-117, Jan./Feb. 2001.

ULLOA, J. B. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. **Waste Management**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 87-97, 2004.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, London, v. 46, n. 5, p.829-835, 1963.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, Dec. 2005.

XU, J. L. et al. Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production. **Energy & Fuels**, Washington, v. 24, n. 3, p. 2113-2119, Mar. 2010.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 86, n. 1, p. 88-95, Apr. 2004.

ZHANG, X. M.; XU, J. L.; CHENG, J. J. Pretreatment of Corn Stover for Sugar Production with Combined Alkaline Reagents. **Energy & Fuels**, Washington, v. 25, n. 10, p. 4796-4802, Oct. 2011.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, London, v. 2, n. 3, p. 51-68, Sept. 2009.

ARTIGO 3

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA POLPA DE CAFÉ PRÉ-TRATADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO

RESUMO

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica no agronegócio brasileiro. Durante o beneficiamento dos grãos, são gerados resíduos, os quais são dispostos de formas inadequadas no meio ambiente. Exemplos desses resíduos são a casca e polpa de café gerados durante o processamento do café por via seca e úmida, respectivamente. Materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca e polpa de café, entre outros, são complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa de planta e consistem, principalmente, de três componentes: celulose, hemiceluloses e lignina. Para o aproveitamento dessa fonte de carbono no intuito de produzir bioetanol é necessário, inicialmente, pré-tratar o material e, posteriormente, submetê-lo a uma hidrólise. Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio (4%), avaliando como resultado a concentração de açúcares redutores totais, redutores e glicose, ao final do processo. Inicialmente, realizou-se uma análise da quantidade máxima de massa possível de ser utilizada na hidrólise enzimática, sem prejudicar o processo. Para a otimização das concentrações enzimáticas utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), variando-se a concentração de Celluclast e β -glicosidase. Ao final da hidrólise, o açúcar fermentescível pode ser fermentado por diversos tipos de microrganismos, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, para a obtenção de etanol. As melhores condições foram 50% de biomassa e as concentrações de celulase igual a 25,78 FPU/g de substrato e de celobiase 28,95 CBU/g de substrato. Neste trabalho, foi possível aumentar a quantidade de açúcares redutores obtidos ao final da hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Polpa de café. Hidrólise enzimática. Glicose. Rendimentos.

ABSTRACT

Coffee is one of the agricultural products of greatest economic importance in Brazilian agribusiness. During grain processing, residues are generated which are disposed in inadequate ways into environment. Examples of those residues are coffee hull and pulp generated during coffee processing by dry and moist via, respectively. Lignocellulosic materials, as sugar cane bagasse, rice hull, coffee hull and pulp, among others, are organic complex of carbon in the form of plant biomass and consist, mainly, of three components: cellulose, hemicelluloses and lignin. For the use of that source of carbon with the purpose of producing bioethanol, it is necessary, at first, to pre-treat the material and, afterwards, to submit it to a hydrolysis. This work was undertaken with the objective of optimizing the enzymatic hydrolysis of the coffee pulp pre-treated with sodium hydroxide (4%), evaluating as result the concentration of total reducing sugars, reducing sugars and glucose, at the end of the process. At first, an analysis of the maximum amount of mass possible of being utilized in the enzymatic hydrolysis, without damaging the process. For the optimization of the enzyme concentrations, a central composite rotational design (DCCR) was utilized), ranging the concentration of both Celluclast and β -glucosidase. At the end of hydrolysis, the fermentable sugar can be fermented by several sorts of microorganisms, including *Saccharomyces cerevisiae*, for the obtaining of ethanol. The best conditions were 50% of biomass and the concentrations of cellulase equal to 25.78 FPU/g of substrate and of cellobiase 28.95 CBU/g of substrate. In this work, it was possible to increase the amount of reducing sugars obtained at the end of the enzyme hydrolysis.

Keywords: coffe pulp. Enzyme hydrolysis. Glucose. Yields.

1 INTRODUÇÃO

O café se destaca como um dos produtos agrícolas de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais.

O cafeeiro é uma planta pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, sendo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* Pierre, conhecidas como café arábica e conilon, respectivamente, as que se destacam, economicamente, em todo o mundo. A produção brasileira de 2011 girou em torno de 43,48 milhões de sacas beneficiadas, sendo 9,6%, ou 4,61 milhões de sacas, inferior ao volume de 48,09 milhões de sacas produzidas na safra anterior. A produção do café arábica representa 74,0% (32,19 milhões de sacas) da produção do país e tem como maior produtor o estado de Minas Gerais, com 21,88 milhões de sacas (68%) de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2010).

O café, depois de colhido, pode ser processado por duas vias diferentes, a via úmida e a via seca. Em ambos os casos, o principal objetivo é secar o café o mais rápido possível, retirando água até níveis seguros para o armazenamento e o beneficiamento. Dependendo do método de processamento de café cereja, ou seja, processo úmido ou seco, os sólidos residuais obtidos têm diferentes terminologias, que são polpa ou casca, respectivamente (PANDEY et al. 2000).

Tradicionalmente, a casca e a polpa de café têm se limitado a apenas aplicações como fertilizantes, alimentação de animais e compostagem, entre outras utilizações mais simples. Nestas aplicações utiliza-se somente uma pequena fração do resíduo gerado durante o processamento do café e não são tecnicamente muito eficientes. O foco atual é em aplicações desse substrato em bioprocessos. Tentativas têm sido feitas para aprimorar as formas de utilização tradicionais e obter novas formas de utilização da polpa e casca do café, como, por exemplo, pela eliminação de compostos tóxicos (compostos fenólicos,

taninos, cafeína) e a utilização na alimentação animal, além do emprego como substrato para a produção de produtos com valor agregado, como cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos e bioaromas, entre outros. Estes subprodutos, por possuírem quantidade elevada de compostos orgânicos, constituem um apropriado substrato para o cultivo de fungos e leveduras (PANDEY et al., 2000).

Outra possibilidade seria a utilização destes resíduos para a produção de bioetanol, devido ao grande teor de material lignocelulósico. Segundo Ulloa (2004), a polpa de café é constituída de 16,5% a 32,2% de celulose, de 1% a 11,6% de hemicelulose e de 12,2% a 20,5% de lignina.

Os polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos incluem celulose (homoglicano linear de β -D-glicopiranosil) e hemicelulose (heteroglicano que contém diferentes tipos de hexoses e pentoses) que podem ser hidrolisados até açúcares monoméricos, como a glicose e a xilose, os quais podem ser utilizados para a produção de etanol, xilitol e ácidos orgânico, entre outros (XIA; SHENG, 2004).

Glicose e xilose produzidos durante a hidrólise podem ser fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*, respectivamente, para produzir bioetanol (RUDOLF et al., 2005).

Nos últimos anos, tem aumentado os esforços para a produção comercial de etanol obtido a partir de matérias-primas renováveis (MOJOVIC et al., 2006).

Biomassas celulósicas são recursos disponíveis naturalmente e que podem aumentar a produção de etanol em uma escala que terá um impacto importante sobre os combustíveis fósseis (YANG; WYMAN, 2008). A conversão de material lignocelulósico em etanol, no entanto, é mais desafiadora do que a conversão do milho e da cana-açúcar (XU et al., 2010).

Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas em escala laboratorial e piloto.

O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, então, submetê-la à hidrólise enzimática (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007) e posteriormente à fermentação, podendo a essa etapa ocorrer ou não juntamente com a hidrólise enzimática.

Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, que incluem a explosão a vapor, tratamento com substâncias ácidas, substâncias alcalis, microrganismos, entre outros tratamentos (Sun e Cheng, 2002; Mosier et al., 2005 e Alvira et al., 2010).

A fim de hidrolisar enzimaticamente a biomassa lignocelulósica com sucesso, é muito importante o uso de um pré-tratamento adequado porque a cristalinidade, o grau de polimerização da celulose (DP), o teor de umidade, a área da superfície disponível e o teor de lignina e hemicelulose são fatores que impedem ou dificultam o ataque enzimático (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

A aplicação de soluções alcalinas leva à remoção da barreira de lignina, ao rompimento de vínculos estruturais entre os três componentes (celulose, lignina e hemicelulose), à redução da cristalinidade e à diminuição do grau de polimerização da celulose (SUN; CHENG, 2000; MOSIER et al., 2005).

Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são adequados para os pré-tratamentos alcalinos. O primeiro (NaOH) provoca inchaço, aumento da superfície interna da celulose e redução do grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca o rompimento estrutura lignina (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). De acordo com estudos anteriores (dados não citados), o pré-tratamento com hidróxido de sódio é mais eficiente que o com hidróxido de cálcio para polpa de café.

A hidrólise da biomassa pode ser realizada de duas maneiras possíveis, a hidrólise ácida e a enzimática. A primeira é eficiente e relativamente barata, mas forma compostos que podem inibir seriamente a posterior fermentação. Por

outro lado, a hidrólise enzimática tem apresentado melhorias, juntamente com o desenvolvimento da biotecnologia e, portanto, existe a possibilidade de melhorias na eficiência e nos custos (WOOLEY et al., 1999). Além do mais, a utilização de enzimas proporciona menores impactos ambientais e menores formações de inibidores da fermentação.

A taxa e a extensão da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica são altamente dependentes de carga de sólidos, da concentração de enzimas, do tempo e da temperatura da hidrólise e das características estruturais dos substratos (ZHU et al., 2008).

A hidrólise enzimática, ou sacarificação, é conduzida por meio de enzimas celulolíticas, que são altamente específicas. Estas são, usualmente, uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidas no processo de hidrólise são endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (SUN; CHENG, 2002). As exo-1,4- β -D-glucanases, ou celobiohidrolases, hidrolisam a cadeia celulósica a partir de suas extremidades, liberando celobioses; as endo-1,4- β -D-glucanases, ou endoglucanases, hidrolisam a cadeia celulósica internamente de maneira aleatória e as 1,4- β -D-glicosidases promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar unidades glicosídicas a partir de celuoligossacarídeos. Coletivamente chamadas de celulasas, atuam em sinergia para hidrolisar a celulose, criando sítios acessíveis umas para as outras e aliviando problemas de inibição pelos produtos (ERIKSSON; KARLSSON; TJERNELD, 2002).

Além de fatores como temperatura, pH, agitação e quantidade das enzimas, um fator importante a se considerar na hidrólise enzimática é a quantidade de sólido presente no meio reacional. Quando se aumenta a concentração de substrato na etapa de hidrólise, também aumenta-se a concentração de açúcares no meio hidrolisado. Entretanto, este aumento de sólidos pode causar uma maior inibição pelo produto final, uma vez que a

concentração dos açúcares aumenta consideravelmente. Outro fator importante é que o aumento do teor dos sólidos pode dificultar a transferência de calor e de massa, devido ao fato de a suspensão estar muito viscosa (RUDOLF et al., 2005).

Uma abordagem promissora para a melhoria na economia do processo envolve a concentração da biomassa crescente nas etapas pré-tratamento e hidrólise enzimática. Maiores concentrações de substrato a partir de biomassa levam a maiores concentrações de produto em toda a produção processo. Isso irá resultar em redução do capital e da produção, dos custos associados com a redução do tamanho do equipamento e do uso de energia para aquecimento, resfriamento e mistura (ROCHA et al., 2009).

Atualmente, os complexos de celulase vendidos contêm níveis baixos de β -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos. Segundo Sun e Cheng (2002), a atividade da celulase é inibida por celobiose e, em menor medida, por glicose. Vários métodos têm sido desenvolvidos para reduzir esta inibição, incluindo o uso de alta concentração de enzimas, a suplementação de β -glicosidases (celobiasas) durante a hidrólise, a remoção de açúcares durante a hidrólise por ultrafiltração ou a simultânea sacarificação e fermentação (SSF).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a concentração de biomassa pré-tratada e a concentração de enzimas na hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada com hidróxido de sódio a 4% m/v, por 25 minutos, em autoclave (121°C). Dessa forma, pretendeu-se demonstrar que, utilizando-se concentrações adequadas de biomassa e de enzima, podem-se alcançar elevadas concentrações de açúcares redutores no meio hidrolisado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substrato e enzimas

Polpa de café foi fornecida por um produtor rural (Lavras, MG, Brasil), safra 2010, café arábica. O material foi armazenado em sacos plásticos, a - 18 °C, em freezer vertical. Antes dos ensaios, a polpa foi triturada em liquidificador e prensada (prensa manual) para remover parte considerável da água. Amostras foram retiradas para análise dos teores de celulose, lignina, hemicelulose, extrativos e umidade.

Foram utilizados as enzimas celulase (Celluclast 1.5L) e celobiase, ou β -glicosidase (Novozyme 188), ambas fornecidas pela Novozymes. Foi determinada a atividade enzimática da celulase, com base na metodologia proposta por Ghose (1987), sendo expressa em unidades de papel filtro (FPU)/mL. A atividade da celobiase (β -glicosidase) foi medida segundo metodologia proposta por Wood e Bhat (1988), utilizando-se uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU)/mL. As atividades enzimáticas (AE) encontradas para as enzimas foram 69,25 FPU/mL e 288 CBU/mL, para Celluclast e β -glicosidase, respectivamente.

2.2 Pré-tratamento alcalino

Após a prensagem da polpa de café, foi realizado o pré-tratamento alcalino para a remoção parcial da lignina e da hemicelulos. Para o pré-tratamento foram utilizados erlenmeyers de 1 litro, contendo 100 g de polpa de café diluídos ao volume de 500 ml com solução de hidróxido de sódio a 4% (20% m/v), sendo submetidos ao aquecimento, a 121 °C (autoclave vertical, Primatec), por 25 minutos. Após o pré-tratamento alcalino, foram efetuadas

cinco lavagens com água destilada quente, para a retirada da lignina e de substâncias alcalinas que ainda estivessem impregnadas no material. A fim de comparar os resultados da hidrólise enzimática obtidos para o pré-tratamento com solução alcalina, foi realizado um pré-tratamento, em que foi utilizada apenas água destilada como meio reacional, possuindo as mesmas condições de operação (121 °C, por 25 minutos).

Foram determinados os teores de lignina, celulose, hemicelulose e umidade da polpa submetida ao pré-tratamento alcalino. A polpa submetida ao pré-tratamento descrito foi empregada na etapa de hidrólise enzimática.

2.3 Estudo da concentração da polpa pré-tratada na hidrólise enzimática

Inicialmente, foram conduzidos testes com concentrações variadas de polpa de café pré-tratada. Esta etapa foi realizada no intuito de encontrar a máxima concentração possível de material pré-tratado, sem que ocorresse inibição na hidrólise enzimática.

Para a realização desses experimentos, foram utilizadas as enzimas Celluclast 1.5L e β -glicosidase e concentrações variadas de polpa de café pré-tratada. A adição de β -glicosidase (celobiase) é importante para evitar a inibição da celulase (Celluclast 1.5L) por celobiose.

Foram realizados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1: 12 g de polpa de café pré-tratada/40 mL solução (30% de biomassa);

Tratamento 2: 18 g de polpa de café pré-tratada/40 mL solução (45% de biomassa);

Tratamento 3: 20 g de polpa de café pré-tratada/40 mL solução (50% de biomassa);

Tratamento 4: 25 g de polpa de café pré-tratado/40 mL solução (62,5% de biomassa)

As porcentagens de biomassa em base seca (descartando o teor de umidade) foram de 8,4%, 12,6%, 14% e 17,5%, presentes no meio reacional, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Em todas as hidrólises foram utilizados tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH de 4,8), 20 FPU/g de substrato da enzima Celluclast 1,5L e 8 CBU/g de substrato da β -glucosidase NS22118. Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL, que foram incubados em incubadora rotativa (Nova Ética, modelo 430 RDB), a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm, durante 72 horas. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

Foram retiradas amostras nos tempos de 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, para a análise de açúcares redutores e glicose. Para cada experimento, oito erlenmeyers foram utilizados, um para cada intervalo de tempo.

2.4 Otimização da hidrólise enzimática

Para a otimização do processo de hidrólise enzimática visando à obtenção de açúcares fermentescíveis, foi empregado o delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^2 com 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 1). Foram avaliadas duas variáveis independentes: concentração da celulase Celluclast 1.5L (FPU/g de substrato) e concentração de β -glicosidase (CBU/g de substrato), cujos valores codificados e reais encontram-se na Tabela 1. As variáveis dependentes foram açúcares redutores totais, açúcares redutores, glicose e rendimento da conversão de celulose em glicose. As concentrações de enzimas utilizadas foram calculadas com base em Chen, Zhao e Xia (2008). Para este trabalho, foi estipulado um valor mínimo de zero para β -glicosidase, uma vez que ela já está presente no

complexo celulolítico comercial Celluclast em pequena concentração, para avaliar o efeito de sua adição.

Tabela 1 Níveis do planejamento experimental para otimização da hidrólise enzimática da polpa de café

Variável	-1,41	-1	0	1	1,41
Celluclast (FPU/g)	1,5	77,6	22,5	37,4	43,5
β -glucosidase(CBU/g)	0	55,8	20	34,2	40

Durante a hidrólise, foram utilizados erlermeyers de 250 mL com 20 g material pré-tratado em 40 mL de enzimas e tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ (pH = 4,8). Os recipientes foram incubados em incubadora rotativa (Nova Ética, modelo 430 RDB), a 50 °C e 150 rpm, durante 72 horas.

2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Umidade

A umidade foi determinada gravimetricamente após secagem em estufa, a 65 °C (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 1990).

2.5.2 Extrativos

A determinação de extrativos foi baseada na norma NREL n° 10 “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER et al., 2005). Pesaram-se amostras de 4 g de polpa previamente moída e seca em cartuchos de extração e que foram colocados para serem extraídos em um aparelho soxhlet. Um volume de 190 mL de álcool etílico de 99% de pureza foi adicionado a cada balão do

extrator junto com uma quantidade de pérolas de vidro. A extração termina quando o solvente que se encontra ao redor do cartucho de extração torna-se incolor. Em seguida, foram retirados os cartuchos com as amostras do soxhlet, lavados com 100 mL de etanol e secos, em estufa, a 105 °C, até massa constante. Para o cálculo do extrativo foi utilizada a Equação (1).

$$EXT = \frac{(m1 - m2)}{m1} * 100 \quad (1)$$

em que

m1: massa da polpa de café seca (g);

m2: massa da polpa sem extrativos (g).

2.5.3 Determinação da composição química por Vans Soest

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias propostas por Goering e Van Soest (1970); Silva (1998) e Van Soest (1963).

2.5.4 Açúcares redutores (AR) e redutores totais (ART)

As concentrações de AR e ART foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959). As leituras da absorbância das amostras hidrolisadas foram efetuadas no espectrofotômetro (Fento, 700s), a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um branco, no qual o volume da amostra foi substituído por água destilada. Para o cálculo de AR e ART foram feitas curvas de calibração com glicose e sacarose, respectivamente. Os resultados dos teores de açúcares redutores são expressos em g AR/L de meio e os de açúcares redutores totais em gART/L de meio.

2.5.5 Determinação de glicose

Para a quantificação da glicose, foram adicionados 10 µL de cada uma das amostras (hidrolisado) em tubos de ensaio e adicionado 1,0 mL do kit enzimático GOD PAP (Laborlab), levando-se a um banho termostático, a 30 °C, durante 10 minutos. A reação foi interrompida retirando-se os tubos do banho e colocando-os em um banho de gelo fundente para terminar a reação. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 500 nm. Para a obtenção dos resultados, foi construída uma curva padrão com concentrações de glicose conhecidas.

2.5.6 Rendimento em massa do pré-tratamento alcalino ($Rend_{massa}$)

Para o cálculo do rendimento em massa em base úmida foram pesados, inicialmente, 100 g de polpa de café e esta foi pré-tratada com 500 mL de solução alcalina (hidróxido de sódio). Realizado o pré-tratamento, a polpa de café remanescente foi lavada e prensada. Por último, pesou-se a quantidade de massa remanescente e utilizou-se a Equação (2) para se obter o rendimento em massa.

$$Rend_{massa} = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

em que

M_f : massa final da polpa após pré-tratamento (g);

M_i : massa inicial da polpa de café pré-tratada (g).

Os resultados são expressos em g de material pré-tratado/100g de polpa de café.

2.5.7 Porcentagem de lignina, celulose e hemicelulose remanescente no pré-tratado

O cálculo dos teores de celulose, lignina e hemicelulose remanescentes ou retidos no material pré-tratado, levando em conta a quantidade destes compostos no material inicial, foi realizado utilizando-se a Equação (3).

$$Rx(\%) = \frac{S_f}{S_0} \times 100 \quad (3)$$

em que Rx é a porcentagem de lignina (RL), celulose (RC) e hemicelulose (RH) remanescente no pré-tratado; S_0 é a massa, em g, do constituinte na polpa de café seca e S_f é a massa, em g, do constituinte a ser analisado na polpa de café pré-tratada seca. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Para a quantidade porcentagem perdida do componente durante o pré-tratamento utilizou-se a Equação (4).

$$Px(\%) = 100 - Rx(\%) \quad (4)$$

2.5.8 Rendimento da hidrólise da celulose do material pré-tratado (rendimento hidrólise)

O rendimento da hidrólise enzimática foi calculado utilizando-se a Equação (5).

$$\text{Sacarificação}(\%) = \frac{(G_f - G_b) \times 0,9}{C_0} \times 100 \quad (5)$$

em que

G_f : concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (g de glicose/L de meio após a hidrólise);

G_b : concentração de glicose no branco (tratamento realizado sem a enzima) (g de glicose/L de meio);

C_0 : concentração de celulose no material pré-tratado (g de celulose/L meio a ser hidrolisado).

2.6 Análise estatística

Para a obtenção dos melhores concentrações de massa da polpa pré-tratada na etapa de hidrólise, foram realizadas análise de variância e teste de média, utilizando-se o teste de Tukey com $p < 0,05$.

Para a otimização da hidrólise enzimática foi utilizado um planejamento fatorial completo de ordem 2^k (níveis +1 e -1), dois pontos axiais (níveis $-\alpha$ e $+\alpha$) e três pontos centrais (nível zero), com duas variáveis independentes. O software Statistica 8.0 (STATISTICA ANALYSIS, 2008) foi utilizado para a análise estatística dos resultados, com nível de significância de 5% (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da polpa de café *in natura* triturada e prensada e após pré-tratamento alcalino

Após a remoção de possíveis interferentes (extrativos), a polpa de café descongelada (*in natura*) triturada e prensada foi caracterizada para a determinação de seus constituintes principais, como celulose e hemicelulose, entre outros. A seguir, foi submetida à etapa de deslignificação com NaOH 4% (m/v), a 121 °C, por 25 minutos, em elermeyers com capacidade de 1.000 mL.

Na Tabela 2 encontram-se os dados de composição química da polpa de café prensada e após deslignificação alcalina.

Tabela 2 Constituintes da polpa de café antes e após pré-tratamento com hidróxido de sódio. Resultados expressos em % da biomassa em base seca

Componentes	Polpa de café prensada*	Polpa de café pré-tratada**	Polpa pré-tratada com água destilada***
Massa (g)	100	18,01	60,25
Extrativos(%)	27,5±2,6	-	-
Celulose (%)	20,6±3,2	50,53±2,45	28,65±1,52
Hemicelulose (%)	17,2±1,2	27,68±1,18	18,25±1,05
Lignina (%)	15,5±2,5	13,83±1,25	23,96±1,11
Cinza (%)	7,9±1,9	2,03±0,25	6,32±0,29

* Umidade da polpa de café *in natura* foi de 82%

** Umidade da polpa de café pré-tratada foi de 72%

*** Umidade da polpa de café pré-tratada com água destilada foi de 80%

A polpa de café *in natura* apresentou elevados teores de extrativos, isso devido à grande quantidade de compostos, como polifenóis e açúcares, entre outras matérias orgânicas. Os extraíveis são compostos orgânicos que não residem na parede celular da planta, são solúveis em água, solventes orgânicos neutros ou volatilizados a vapor. Segundo Pandey et al. (2000), a polpa do café obtida durante a transformação do café cereja pelo processo úmido contém quantidades de cafeína, taninos e materiais orgânicos, o que a torna tóxica em sua natureza, quando descartadas no meio ambiente.

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina encontrados neste trabalho para a polpa de café *in natura*, com exceção do teor de lignina, são próximos aos determinados por Salmones, Mata e Waliszewski (2005), utilizando a técnica proposta por Van Soest. Os pesquisadores encontraram concentrações de celulose de 24,5%, hemicelulose de 17,1% e lignina de 26%.

Rojas et al. (2002) encontraram concentrações de 28,6% de celulose e 8,9% de cinza para a polpa de café. Considerando os desvios obtidos neste trabalho, os resultados estão próximos ao obtidos por aqueles autores.

Ulloa (2004) encontrou, para polpa de café, os seguintes valores: celulose variando entre 16,5% a 32,2%, de 1% a 11,6% de hemicelulose e de 12,2% a 20,5% de lignina.

Comparando-se a composição da polpa de café com a de bagaço de cana-de-açúcar, a primeira possui concentrações de hemicelulose e celulose menores que as de bagaço de cana-de-açúcar. Martin, Klinke e Thomsen (2007) obtiveram 31,1% de hemicelulose e 43,1% de celulose. No entanto, é importante analisar a digestibilidade enzimática antes de afirmar que a polpa de café é pior que o bagaço da cana-de-açúcar.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2 para o tratamento com hidróxido de sódio, pode-se dizer que houve um aumento no teor de, celulose e hemicelulose, no entanto, para uma avaliação precisa é necessário calcular a

fração remanescente de cada constituinte, verificando-se, assim, a eficiência do pré-tratamento (Tabela 3).

Ao realizar o pré-tratamento ocorreu elevada perda de massa da polpa de café, portanto, é necessário calcular a quantidade remanescente de cada constituinte na biomassa pré-tratada. As porcentagens dos constituintes remanescentes são expressas na Tabela 3. Para comparação dos resultados, foi realizado um pré-tratamento, em autoclave, contendo 100 g de polpa de café e 500 mL de água destilada, a 121 °C, durante 24 minutos.

Tabela 3 Rendimento em massa e teores remanescentes de celulose (RC%), lignina(RL%) e hemicelulose (RH%) para os pré-tratamentos envolvendo substâncias alcalinas e contendo apenas água destilada

Componentes (%)	Pré-tratada com solução alcalina	Pré-tratada com água destilada
Rendimento em massa ($Re nd_{massa}$ %)	18,01±1,25	60,25±2,03
Celulose (RC%)	69,18±0,75	93,1±1,2
Hemicelulose (RH%)	44,15±0,19	71,0±2,7
Lignina (RL%)	25,19±1,25	100±0,35

Pelos dados da Tabela 3 fica evidente que quando se utilizou hidróxido de sódio para o pré-tratamento houve uma solubilização dos principais componentes da parede celular. O mesmo não ocorre com o tratamento contendo apenas água destilada, no qual acontece apenas a solubilização de parte da hemicelulose e outros componentes solúveis em água (pectinas, polifenóis e açúcares menores presentes na polpa de café).

Para o tratamento contendo apenas água não ocorreu solubilização da lignina, o que, provavelmente, prejudicará a hidrólise enzimática. Foi demonstrado que a presença de uma grande quantidade de lignina residual reduz

a eficiência da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (CARA et al., 2007). A lignina limita a taxa de hidrólise enzimática, agindo como uma barreira física à hidrólise enzimática (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

Pré-tratamento alcalino refere-se à aplicação de soluções alcalinas para remover lignina e substituir ácido urônico presente na hemicelulose, que reduz a acessibilidade da enzima hidrolítica à hemicelulose e à celulose (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000).

Alguns autores afirmaram que soluções contendo 1% e 3% NaOH promoveram uma dissolução substancial do polissacarídeos hemicelulósico e macromoléculas de lignina (CARDONA; SANCHEZ, 2007).

Chang e Holtzapple (2000) observaram que um processo de pré-tratamento eficaz deve reduzir o teor de lignina para cerca de 10% na biomassa pré-tratada.

Ao comparar o pré-tratamento alcalino com o pré-tratamento contendo apenas água, fica demonstrado o menor efeito da solubilização dos componentes presentes na polpa de café, observando-se a menor perda de massa durante o pré-tratamento apenas com água.

Xu et al. (2010), em estudos com gramíneas, utilizaram concentrações de 0,5% a 2 % de hidróxido de sódio, a 121 °C, durante tempos de incubação de 15 minutos, 30 minutos e 1 hora. Estes autores obtiveram, como máxima remoção de lignina, o valor de 85,8% (14,2% de lignina remanescente no material pré-tratado), quando utilizaram 2% de hidróxido de sódio durante 1 hora. Este resultado é superior ao encontrado no presente trabalho, que foi de 74,81% de remoção da lignina presente.

Neste estudo, Xu et al. (2010) realizaram pré-tratamento com soluções alcalinas de 2% de hidróxido de sódio, obtendo rendimentos em massa (percentual de recuperação sólida) iguais a 48,11% e 46,14%, quando a reação durou 30 minutos e 1 hora, respectivamente. Esses rendimentos são maiores que

os obtidos neste trabalho(18,01%, Tabela 3), quando foram utilizados hidróxido de sódio 4%, 121 °C e 25 minutos.

Quando foi utilizado o meio reacional apenas com água destilada, notou-se que houve uma solubilização da fração de hemicelulose. De acordo com Cardona, Quintero e Paz (2010), o fracionamento e a solubilização de materiais lignocelulósicos por tratamentos térmicos têm melhorado o rendimento de extração de hemiceluloses. A remoção de hemicelulose aumenta o tamanho médio dos poros da biomassa, portanto, aumentam a acessibilidade e a probabilidade da hidrólise da celulose (CHANDRA et al., 2007).

3.2 Estudo da concentração da polpa pré-tratada na hidrólise enzimática

Para testar a influência da quantidade de polpa de café na hidrólise enzimática foram conduzidos quatro diferentes tratamentos (12, 18, 20 e 25 g de polpa de café/ 40mL de solução enzimática), a 50 °C, sob agitação de 150 rpm, durante 72 horas. Açúcares fermentecíveis devem estar presentes nas mais altas concentrações possíveis em sistemas de fermentação para a produção de bioetanol, para a redução de custos (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003). No entanto, alguns problemas, como o excesso de massa e a inibição das enzimas pelos produtos, devem ser contornados.

Os resultados da cinética da hidrólise enzimática dos tratamentos são apresentados na Figura 1. Nota-se a semelhança entre os tratamentos com 20 e 25 g de polpa de café pré-tratada. A hidrólise terminou com 36 horas e, a partir desse momento, não houve acréscimo na quantidade de açúcares redutores.

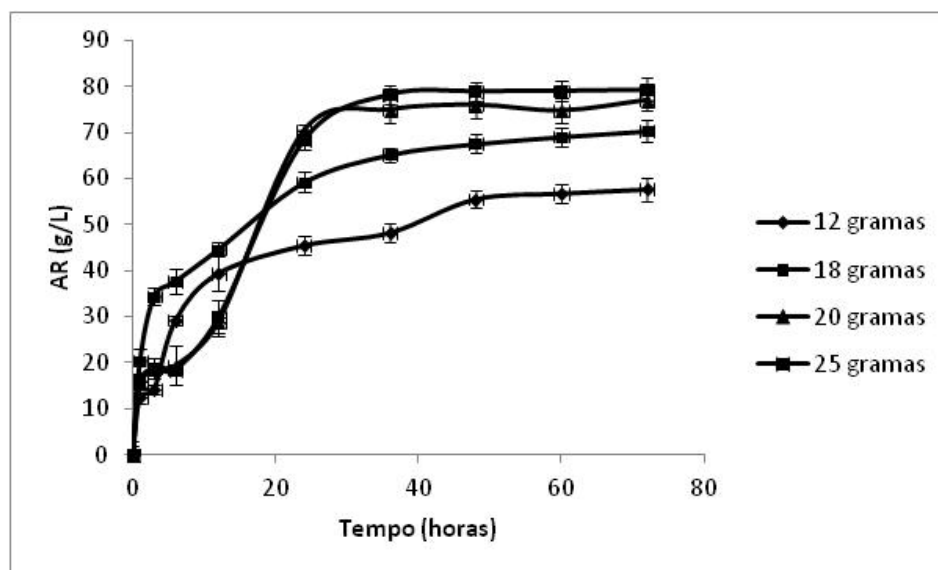


Figura 1 Hidrólise enzimática da polpa de café pré-tratada com diferentes quantidades de massa

Como esperado, o teor de AR aumentou com o tempo, demonstrando que as enzimas estão hidrolisando as moléculas de celulose em açúcares redutores. Fator importante a ser demonstrado é que a hidrólise praticamente estabilizou com 36 horas de incubação. Após 24 horas de hidrólise, a maior parte dos açúcares redutores já tinha sido produzida. Como pode ser visto quando foram utilizados os maiores teores de substrato (20 e 25 g), a velocidade inicial de hidrólise foi mais lenta.

Lu et al. (2010), ao hidrolisarem palha de milho pré-tratada por explosão a vapor (205 °C e 2,0 MPa por 6 minutos) e posteriormente lavada com água, utilizando uma mistura comercial de enzima (20 FPU/g, 50°C a 220rpm), demonstraram que 63,0% da glicose total liberada após 96 horas de hidrólise foi liberada dentro das primeiras 24 horas quando utilizaram concentração do substrato de 10% (massa de substrato em um certo volume). Mas, para níveis mais altos de sólidos, o comportamento foi alterado e o rendimento da hidrólise no início do processo marcadamente reduziu. Por exemplo, quando utilizaram

30% de sólidos durante a hidrólise, apenas 42,9% do total de glicose foram formados nas primeiras 24 horas.

Os resultados da concentração de açúcares redutores após 72 horas de hidrólise foram iguais a 57,7 g/L, 70,3, 77 e 78,2 g/L, para os teores de 8,4%, 12,6%, 14% e 17,5% de sólidos insolúveis (biomassa seca) presentes no meio, respectivamente.

Yang et al. (2010) utilizaram palha de milho pré-tratada (explosão a vapor combinado com posterior pré-tratamento químico utilizando 1% de hidróxido de sódio e 4% de peróxido de hidrogênio, por 24 horas a 150 rpm) seca a 50 °C, celulases de 20 FPU/g de substrato e concentrações de substratos de 6%, 8%, 10%, 12% e 14% de biomassa. Estes autores encontraram, como resultados, concentrações de açúcares redutores de 60, 65, 80, 95 e 85 g/L, respectivamente. Com base nestes resultados fica evidente que há um limite superior ótimo para a concentração de substrato, que leva a uma concentração maior de açúcares redutores.

No tempo de 72 horas foram realizadas as análises dos teores de glicose, as quais são demonstradas na Tabela 4, juntamente com os valores finais de açúcares redutores, redutores totais e rendimento em glicose (Equações 5).

Tabela 4 Açúcares redutores, redutores totais, glicose e rendimento dos tratamentos, após 72 horas de hidrólise enzimática

Massa de biomassa pré-tratada	AR (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	Rendimento (%)
12g	57,66±2,55 ^c	59,25±2,74 ^c	50,03±1,77 ^c	99,21±2,35 ^a
18g	70,32±2,42 ^b	72,14±3,25 ^b	60,25±2,59 ^b	80,57±1,25 ^b
20g	77,02±2,15 ^a	80,15±2,18 ^a	69,23±3,96 ^a	83,96±2,32 ^b
25g	79,25±2,11 ^a	82,25±3,01 ^a	72,80±2,29 ^a	70,79±1,84 ^c

*Médias seguidas das letras iguais na mesma coluna não apresentaram diferenças estatísticas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Como as diferenças entre os tratamentos com 20 g (50% de biomassa ou 14% biomassa em base seca) e 25 g (62,5% biomassa ou 17,5% de biomassa em base seca) não foram significativas a 5% de significância, pode-se afirmar que o tratamento com 20 g de polpa pré-tratada apresenta vantagens devido à menor quantidade de polpa utilizada. Como a umidade das polpas de café é elevada, foi possível a adição de quantidades elevadas de biomassa em cada tratamento. Mesmo assim, o excesso de massa (25 g) dificulta um pouco a transferência de calor e massa devido à alta densidade de fibras presentes no meio reacional.

Ao analisar o rendimento, observou-se que a massa de 18g para 20g não houve diferença significativa na porcentagem de sacarificação e ao aumentar a massa de massa de 20 g para 25 g, ocorreu diminuição do rendimento, mostrando que o tratamento com 20 g apresentou vantagens sobre os demais.

3.3 Otimização da hidrólise enzimática

A polpa de café pré-tratada com solução de hidróxido de sódio 4% (m/v) em autoclave, a 121 °C, durante 25 minutos, foi submetida a um delineamento

composto central rotacional (DCCR) utilizando 20 g, sendo este valor igual a 50% de biomassa (14% de sólidos insolúveis) presente no meio reacional, em 40 mL de meio (tampão+enzimas), variando-se as concentrações das enzimas celulase (Celluclast) e celobiase (β -glicosidase). Os ensaios foram conduzidos em incubadora rotativa (Nova Ética, modelo 430 RDB), à temperatura de 50 °C, sob agitação de 150 rpm, durante 72 horas.

Os resultados das análises dos açúcares redutores, açúcares totais, glicose e rendimento encontram-se na Tabela 5. No ensaio 12 (controle) constante nesta tabela não houve a adição de enzima, tendo sido adicionado apenas o tampão citrato. Os ensaios 13 e 14 representam a hidrólise enzimática de 20 g da polpa de café, sem passar por um pré-tratamento (ensaio 13) e também utilizando apenas água como solução do meio que foi para autoclave (ensaio 14).

Tabela 5 Teores de açúcares redutores totais e redutores, glicose e rendimento da hidrólise dos tratamentos

Trat	Celulase	B-glicosidase	ART (g/L)	AR (g/L)	Glicose (g/L)	Rendimento (%)
1	+1	+1	95,74	97,07	69,33	82,49
2	+1	-1	89,80	82,11	53,9	62,85
3	-1	+1	108,37	107,25	66,82	79,29
4	-1	-1	75,12	74,67	57,21	67,07
5	0	1,41	114,55	110,3	69,62	82,86
6	0	-1,41	84,17	78,92	60,55	71,32
7	1,41	0	96,33	92,6	66,23	78,54
8	-1,41	0	82,38	80,3	55,22	64,53
9	0	0	87,68	90,73	72,89	87,02
10	0	0	100,72	91,78	71,28	84,97
11	0	0	94,34	93,68	73,34	87,59
12	NC	NC	15,22	9,14	4,5	0
13	0	0	21,25	11,15	9,11	5,8
14	0	0	27,22	15,11	10,75	8,2

*NC = Não contém enzima

Analisando-se os resultados quanto ao teor de açúcares redutores, pode-se notar que os ensaios 3 (107,25g/L) e 5 (110,3g/L) apresentaram os maiores valores. Estes tratamentos possuem elevada concentração de celobiase (β -glicosidase) em relação à concentração de celulase (Celluclast). Fica, assim, evidente que a baixa adição de β -glicosidase provoca a queda da produtividade de açúcares redutores durante a hidrólise enzimática. Resultados semelhantes foram observados para os açúcares redutores totais.

Segundo Chen, Zhao e Xia (2008), o acúmulo de celobiose causa grave inibição à celulase. Portanto, melhorar a atividade ou concentração da celobiase no sistema é crucial para elevar o rendimento da hidrólise enzimática. Os mesmos autores mostraram que, para a hidrólise da palha de milho pré-tratada (2%NaOH, durante 1 hora, a 80 °C), utilizando 8% de substrato e concentração de celulase 20 FPU/g substrato (produzida por *Trichoderma reesei* ZU-02 contendo atividades de celulase, celobiase e xilanasa de 146 FPU/mL, 12 CBU/mL e 1.458 U/mL, respectivamente), a qual continha em sua mistura 1,64 CBU/g, após 60 horas de hidrólise, foram encontradas concentração de açúcares redutores igual 52 g/L e elevada quantidade de celobiose. Para diminuir a inibição causada pelo acúmulo de celobiose, celobiase foi complementada ao sistema de hidrólise para melhorar atividade total. Para a dosagem de celulase estudada de 20 FPU/g de substrato, a concentração de açúcares redutores e rendimento de hidrólise aumentou com o aumento da atividade da celobiase até 10 CBU/g de substrato. Ao final da hidrólise, foram encontrados 64,1 g/L de açúcares redutores. Ao testar maiores concentração de enzimas, os autores constataram que o aumento na concentração de enzimas não proporcionou um aumento correspondente na concentração de açúcares, sendo a dosagem ideal de 20 FPU/g substrato de celulase e 10 FPU/g substrato de celobiase.

No caso da glicose liberada, os maiores valores encontrados são os tratamentos do ponto central (valor médio de 72,5 g/L), demonstrando que nos açúcares redutores estão presentes outros componentes que não a glicose.

O tratamento 12, por não apresentar enzimas, apenas liberou os açúcares que se solubilizaram no tampão citrato durante a incubação. Com relação aos ensaios 13 (sem pré-tratamento) e 14 (tratamento com a água a 121 °C), a baixa produção de açúcares redutores totais, redutores e glicose apenas demonstra a necessidade de um pré-tratamento de deslignificação eficiente para a produção de bioetanol.

Chen, Zhao e Xia (2008) estudaram palha de milho pré-tratada com 2% de NaOH a 80 °C, por 1 hora. Para o experimento, usaram o processo de batelada alimentada, visando aumentar a concentração de açúcares ao final do processo de hidrólise. Em uma das condições estudadas, a hidrólise foi iniciada com uma concentração de biomassa pré-tratada igual 8% (m/v) e uma carga enzimática de 20 FPU/g biomassa seca pré-tratada e 10 CBU/g biomassa seca pré-tratada. Após 6 e 12 horas de hidrólise, uma mistura de sólidos e enzimas foi adicionada ao reator, atingindo concentração final de 11% (m/v). Ao final da hidrólise (72 horas), os resultados obtidos foram concentrações de 89,5g/L de açúcares redutores, 56,7 g/L de glicose, 23,6 g/L de xilose e 5,7 g/L de arabinose, com rendimento de hidrólise de 83,3% da conversão da celulose em açúcares redutores.

O maior rendimento na conversão de celulose em glicose foi obtido pelos tratamentos do ponto central (86,52%), sendo estes resultados próximos ao obtidos por alguns autores.

Chen et al. (2007), ao utilizarem palha de cevada pré-tratada com 2% de hidróxido de sódio, a 121 °C, encontraram 80,44% de conversão de celulose em glicose durante a hidrólise enzimática, tendo sido adicionados 60 FPU/g de

celulose e suplementado com celobiase (Novozyme 188), valor menor do que o obtido neste trabalho.

Lu et al. (2010) hidrolisaram palha de milho pré-tratada por explosão a vapor (205 °C, 2,0 MPa, por 6 minutos) e posterior lavagem com água, utilizando, para hidrólise, uma mistura comercial de enzima (20 FPU/g de biomassa seca, 50 °C a 220rpm) sendo que a celulase utilizada possui certa atividade de celobiase (7,86 CBU/g de biomassa seca). Estes autores encontraram valores para conversão de celulose em glicose de 75,6% e 75%, quando utilizaram, respectivamente, 10% e 15% de sólidos durante a hidrólise enzimática.

Pelos dados da Tabela 5 observa-se que os ensaios com os maiores concentrações de enzimas nem sempre obtiveram as maiores concentrações de açúcares fermentescíveis. Uma explicação possível para este fato é a alta afinidade que a lignina tem pela celobiase (HUANG; PENNER, 2002). Sendo assim, grandes concentrações desta enzima levam à alta adsorção desta pela lignina residual, o que causa o recobrimento do material lignocelulósico, diminuindo os sítios disponíveis para os ataques da celulase.

Na análise estatística do planejamento foram avaliados os efeitos lineares, quadráticos e de interação das variáveis respostas analisadas. Pela análise estatística, foram considerados significativos os parâmetros com p valores menores que 5% ($p < 0,05$). Na Tabela 6, em que termos lineares do modelo matemático estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q, estão apresentados os coeficientes da equação para açúcares redutores (AR) como para o rendimento da hidrólise.

Analisando-se os coeficientes dos açúcares redutores de forma geral, a concentração da enzima β -glicosidase afetou mais a concentração final de AR e o rendimento em glicose. Para os açúcares redutores, foram significativos apenas o termo linear da concentração de β -glicosidase e a interação entre as duas

enzimas. Para o rendimento não foram significativos apenas o termo linear da Celluclast e a interação entre as duas variáveis.

Pode-se notar que os coeficientes lineares das duas enzimas foram positivos, indicando que um aumento na sua concentração proporciona um aumento nas quantidades de açúcares redutores e glicose formadas. Os coeficientes quadráticos da celulase e da celobiase para o rendimento da conversão de celulose em glicose foram negativos, mostrando que as concentrações de enzima possuem um valor que proporciona uma maior conversão de celulose em glicose.

Tabela 6 Efeitos e coeficientes da equação sobre o teor de açúcares redutores e rendimento de glicose

	Coefficiente AR	p-valor	Coefficiente rendimento	p-valor
Média	92,06	0,00	86,53	0,00
(1)[Celluclast] (L)	1,83 NS	0,18	2,35NS	0,18
[Celluclast] (Q)	-2,88 NS	0,10	-7,87	0,01
(2)[β-glicosidase] (L)	11,51	0,00	6,03	0,01
[β-glicosidase] (Q)	1,22 NS	0,43	-5,08	0,04
1Lx2L	-4,4	0,05	1,86NS	0,43
R ²	95,62		89,03	

*NS = Não significativo, a 5 % de significância

Analisando-se os dados da análise de variância (Tabela 7) para a resposta teor de açúcares redutores e rendimento, verifica-se que o Fcalc (21,82; 8,12) é maior do que o Ftab (F5;5;0,05 = 5,05) e as porcentagens de variação explicadas pelo modelo são consideradas boas (95,62% e 89,03%). Portanto, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 7 ANOVA para teores de açúcares redutores (AR) e rendimento

Fonte de variação	SQ	g.L	QM	Fcalc	P
AR					
Regressão	1233,19	5,00	246,64	21,82	P<0,05
Resíduos	56,52	5,00	11,30		
Total	1289,71	10,00			
Rendimento					
Regressão	743,00	5,00	148,60	8,12	P<0,05
Resíduos	91,54	5,00	18,31		
Total	834,54	10,00			

Os modelos com as variáveis codificadas que representam o teor de açúcares redutores e rendimento em função das concentrações de celulase (x1) e celobiase (x2) são mostrados nas Equações 6 e 7, respectivamente.

$$\text{AR (g/L)} = 92,06 + 1,83x_1 - 2,88x_1^2 + 11,51x_2 + 1,22x_2^2 - 4,4x_1x_2 \quad (6)$$

$$\text{Rendimento (\%)} = 86,53 + 2,35x_1 - 7,87x_1^2 + 6,03x_2 - 5,08x_2^2 + 1,86x_1x_2 \quad (7)$$

Por meio da curva de contorno gerada pelo modelo para concentração de açúcares redutores mostrada na Figura 2, observa-se que o efeito da concentração de celobiase é muito maior do que o efeito da concentração de celulase, uma vez que as melhores condições, de AR mais elevado, encontram-se na região de altas concentrações de celobiase.

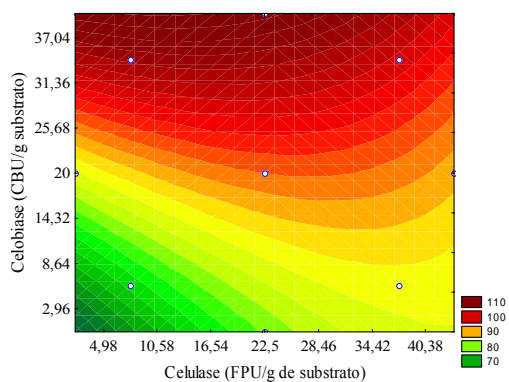


Figura 2 Curva de contorno do hidrolisado, tendo como resposta o teor de açúcares redutores (g/L)

Na Figura 3 está representada a curva de contorno para o rendimento da hidrólise, podendo-se se observar que as melhores condições estão em torno do ponto central, para as duas enzimas. Para o cálculo do rendimento, já está incluído o teor resultante de glicose, por isso, o melhor valor para rendimento será o melhor valor para a produção de glicose. Observa-se que os valores otimizado do rendimento são $x_1=0,22$ e $x_2=0,63$, que representam as concentrações de celulase iguais a 25,78 FPU/g de substrato e de celobiase 28,95 CBU/ g de substrato, obtendo-se, para ambas, rendimentos próximos a 85%.

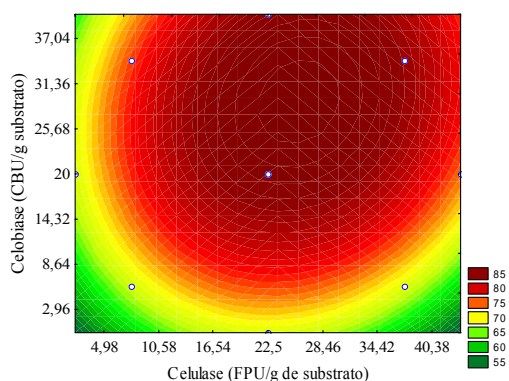


Figura 3 Curva de contorno do hidrolisado, tendo como resposta o rendimento

4 CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho pode-se mostrar que é possível obter altos rendimentos nos teores de açúcares redutores totais, redutores e glicose na hidrólise com celulase e celobiase de polpa de café pré-tratada. O pré-tratamento alcalino da polpa é essencial para bom rendimento da hidrólise enzimática.

Analisando-se a concentração de sólidos, mostrou-se que concentrações maiores que 20 g de biomassa em 40 mL finais de meio (14% de sólidos insolúveis) não aumentaram proporcionalmente as concentrações de açúcares ao final do processo. O efeito da concentração de celobiase foi maior do que o da concentração de celulase sobre o aumento da concentração de açúcares redutores.

Existe uma região ótima do rendimento da conversão de celulose em glicose, que são as concentrações de celulase de 25,78 FPU/g de substrato e de celobiase 28,95 CBU/ g de substrato, apresentando rendimento da hidrólise de 85%. Por meio dos resultados fica evidente a possibilidade de produzir uma boa concentração de açúcares redutores fermentescíveis, como a glicose, a partir da hidrólise enzimática de polpa de café pré-tratada, visando à produção de bioetanol.

AGRADECIMENTOS

A CNPq; à Embrapa; ao Pólo de Excelência do Café, pelo financiamento e à Novozymes, por ceder gentilmente as enzimas.

REFERÊNCIAS

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, July 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC International, 1990.

CARA, C. et al. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 6, p. 1003-1009, June 2007.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, Sept. 2007.

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

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 67-93, May 2007.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. M. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 71, n. 3, p. 411-415, Feb. 2008.

CHEN, Y. et al. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 142, n. 3, p. 276-290, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores agropecuários**. Brasília: Conab, 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2012.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 101, n. 1, p. 41-60, 2002.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Agricultural handbook**. Washington: ARS USDA, 1970.

HUANG, X.; PENNER, H. M. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulose system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 6, p. 1421-1433, Mar. 2002.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

LU, Y. F. et al. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 2, p. 360-369, 2010.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 3, p. 426-432, Feb. 2007.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MOJOVIC, L. et al. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates. **Fuel**, London, v. 85, n. 12-13, p. 1750-1755, Sept. 2006.

MOSIER, N. et al. Features of promizing technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673–686, Apr. 2005.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão, 2009.

ROJAS, J. B. U. et al. A. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002.

RUDOLF, A. et al. A comparison between batcha and fed-batcha simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 2, p. 195-204, July 2005.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 5, p. 537-544, Mar. 2005.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 1998.

SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005.

STATISTICA ANALYSIS. Data Analysis Software System 8.0. **Stat-Soft**, Tulsa, 2008.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, Amsterdam, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, Sept. 2008.

ULLOA, J. B. Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. **Waste Management**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 87-97, 2004.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, London, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, New York, v. 19, n. 4, p. 1109-1117, July/Aug. 2003.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, n. 1, p. 87-116, 1988.

WOOLEY, R. et al. Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, n. 5, p. 794-803, Sept./Oct. 1999.

XIA, L. M.; SHEN, X. L. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, n. 3, p. 259-262, Feb. 2004.

XU, J. L. et al. Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production. **Energy and Fuels**, Washington, v. 24, n. 3, p. 2113-2119, Mar. 2010.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 2, n. 1, p. 26-40, Jan./Feb. 2008.

YANG, M. H. et al. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4884-4888, July 2010.

ZHU, L. et al. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 9, p. 3817-3828, June 2008.

ARTIGO 4

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO HIDROLISADO DA POLPA DE CAFÉ PRÉ-TRATADA

RESUMO

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância no cenário brasileiro. Durante o processamento dos grãos são gerados resíduos, os quais são dispostos de formas inadequadas no meio ambiente. Basicamente, existem duas formas de processamento do café, por via seca e por via úmida. Quando processado por via úmida, o café gera a polpa. Este trabalho foi realizado com o objetivo de pré-tratar a polpa de café utilizando hidróxido de sódio e autoclave, a 121 °C, por 25 minutos. Após esta etapa, procedeu-se à hidrólise enzimática contendo as enzimas celulasas e celobiosas, a 50 °C, durante 72 horas, sendo realizado o processo SHF, cuja hidrólise e fermentação são realizadas separadamente. Na etapa de fermentação foi utilizado um isolado de usina de álcool, *Saccharomyces cerevisiae* CAT1. Durante a fermentação mediram-se açúcares redutores totais, glicose, contagem de células e etanol. Como resultado verificou-se que a utilização de hidrolisado da polpa de café apresentou resultados satisfatórios e semelhantes aos encontrados na literatura quanto ao rendimento em conversão de glicose em etanol.

Palavras-chave: Polpa de café. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática. Fermentação.

ABSTRACT

Coffee is one of the agricultural products of greatest importance in the Brazilian scenario. During grain processing, residues are generated, which are disposed in inadequate forms into environment. Basically, there are two forms of coffee processing, by dry via and by moist via. When processed by moist via, coffee generates the pulp. This work was conducted with the purpose of pre-treating coffee pulp by using sodium hydroxide and autoclave at 121 °C for 25 minutes. After this step, enzymatic hydrolysis was proceeded containing the enzymes cellulases and cellobiases at 50 °C for 72 hours, the SHF process being performed, the hydrolysis and fermentation of which are done separately. In the fermentation step, an alcohol plant isolate, *Saccharomyces cerevisiae* CAT1 was used. During fermentation, total reducing sugars, glucose, cell count and ethanol were measured. As a result, it was found that the use of coffee pulp hydrolysate presented satisfactory results and similar to those found in the literature as to the output in the conversion of glucose into ethanol.

Keywords: Coffee pulp. Pre-treatment. Enzymatic hydrolysis. Fermentation.

1 INTRODUÇÃO

A alta demanda mundial por energia e o esgotamento de combustíveis fósseis, juntamente com a preocupação com as mudanças climáticas globais, estimularam o ressurgimento do interesse pela energia de carboidratos obtidos de fontes renováveis (LYND et al., 2005).

Biomassas lignocelulósicas, como os resíduos de muitas atividades agrícolas e florestais, são fontes promissoras para a bioconversão em etanol. O uso de fontes renováveis, em vez de combustíveis fósseis, é uma das formas mais eficazes para combater tanto a crise energética como problemas ambientais causados pelo acúmulo de resíduos biológicos (GOLDEMBERG, 2007; TILMAN; HILL; LEHMAN, 2006).

O café destaca-se como o produto agrícola de maior relevância para o Brasil e para o estado de Minas Gerais. Segundo Pandey et al. (2000), os métodos de beneficiamento do café podem ser classificados em processo úmido ou seco e os resíduos sólidos (subprodutos) obtidos são denominados de polpa e casca, respectivamente, sendo de natureza orgânica e ricos em nutrientes. Estes resíduos têm sido utilizados como matéria-prima para a produção de cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aroma, alimentação animal e também para a fertilização dos solos. Outra alternativa seria a utilização deste resíduo na produção de bioetanol, utilizando tanto a fração solúvel quanto a fração lignocelulósica.

Na composição da polpa e da casca de café, embora a natureza dos compostos presentes em ambos seja bastante semelhante, a concentração de cada um dos componentes pode ser bastante diferente, dependendo do modo de processamento, das cultivares e dos tipos de solo, entre outros fatores (PANDEY et al., 2000). No entanto, a maior fração dos resíduos do café é constituída dos componentes lignocelulósicos.

Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas, em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, então, submetê-la à hidrólise enzimática (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007) e, posteriormente, à fermentação, podendo esta ocorrer juntamente com a hidrólise enzimática.

Durante a o processo de conversão das biomassas lignocelulósicas em açúcares fermentescíveis, além dos açúcares liberados, outros compostos podem ser formados, como ácido acético, derivados de furano, furfural e 5-hidroximetil-furfural (HMF), entre outros. Estes compostos podem inibir seriamente a posterior fermentação (MARTIN et al., 2002). Alguns autores sugerem realizar a desintoxicação dos hidrolisados, a fim de melhorar a fermentação (LASER et al., 2002). Processos alcalinos, como o utilizado neste trabalho, causam menos degradação do açúcar do que nos processos ácidos (KAAR; HOLTZAPPLE, 2000), diminuindo a necessidade da etapa de desintoxicação do hidrolisado.

Os materiais lignocelulósicos, depois de hidrolisados, disponibilizam fração de açúcares fermentescíveis, que podem ser, então, utilizados pelas leveduras ou outros microrganismos. Existem três modelos principais de operação da sacarificação e fermentação para produção de bioetanol partindo de materiais lignocelulósicos, que são: hidrólise e fermentação separadas (HFS), processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SFS) e processo misto, que é denominado de sacarificação e fermentação semissimultâneas (SFSS).

O primeiro modo de operação é conhecido como hidrólise e fermentação separada (HFS), no qual, primeiramente, realiza-se a hidrólise e, ao final desta, as enzimas são inativadas (por temperatura ou produtos químicos) e, posteriormente, realiza-se a fermentação. O segundo método é a sacarificação e a hidrólise simultâneas (SFS), pelo qual a adição de enzimas (celulases) e de leveduras ocorre simultaneamente. Portanto, o processo de quebra da celulose e

a fermentação ocorrem ao mesmo tempo. O terceiro método é o processo misto, conhecido como semissimultâneo sacarificação e hidrólise (SFSS). Este processo é dividido em duas fases. A primeira é a pré-hidrólise, na qual, inicialmente, são adicionadas apenas enzima ao substrato e incubando-se por um período de tempo a uma temperatura ideal para hidrólise. Posteriormente, a temperatura é abaixada e é adicionada mais enzima e também leveduras, iniciando-se, então, o processo simultâneo de fermentação e sacarificação (SHEN; AGBLEVOR, 2010; PARK et al., 2010). Quando se deseja fermentar a glicose, na maioria das vezes se utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O grande sucesso da *Saccharomyces cerevisiae* na indústria de biotecnologia deve-se à alta capacidade de produzir etanol e dióxido de carbono a partir de açúcares, como glicose e sacarose. Esta levedura tem importantes características, como tolerância a baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, alta competitividade perante contaminação (bacteriana ou por outras leveduras) e alta resistência a inibidores presentes na biomassa hidrolisada (BRANDUARDI; SMERALDI; PORRO, 2008).

Foi verificado, em algumas usinas brasileiras, que as “leveduras de pão” que eram inoculadas para iniciar o processo fermentativo, desapareciam do processo, sendo substituídas por outras leveduras durante o período da safra. Isso ocorria devido às condições estressantes e competitivas presentes na fermentação industrial, como alta concentração de etanol, alta temperatura, estresse osmótico devido à presença de açúcares e sais, acidez e contaminação bacteriana que favoreciam o desenvolvimento de cepas mais resistentes que, no caso, vinham junto com a cana-de-açúcar do campo (BASSO et al., 2008).

Este trabalho foi realizado com os objetivos de pré-tratar a polpa de café utilizando hidróxido de sódio, realizar a hidrólise enzimática do material pré-tratado e, posteriormente, fermentações com *Saccharomyces cerevisiae*, sendo realizado o processo de hidrólise e a fermentação separadamente (SHF).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substrato e enzimas

Polpa de café arábica, safra 2010, foi fornecida por um produtor rural (Lavras, MG, Brasil). O material foi armazenado em sacos plásticos, a - 5 °C, em um freezer vertical. A polpa foi triturada em liquidificador industrial e prensada (prensa manual, Macanuda) para remover parte considerável da água. Amostras da polpa foram coletadas para a determinação do teor de celulose, lignina, hemicelulose, extrativos e umidade.

Foram utilizados as enzimas celulase (Celluclast 1.5L) e β -glicosidase (Novozyme 188), ambas fornecidas pela Novozymes. Foi determinada a atividade enzimática da celulase baseada na metodologia proposta por Ghose (1987), sendo expressa em unidades de papel filtro (FPU)/mL. A atividade da celobiase (β -glucosidase) foi medida segundo metodologia proposta por Wood e Bhat (1988), utilizando-se uma solução de celobiose 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU)/mL. As atividades enzimáticas (AE) encontradas para as enzimas foram iguais a 69,25 FPU/mL e 288 CBU/mL, para as enzimas Celluclast e β -glucosidase, respectivamente.

2.2 Pré-tratamento

Após a prensagem da polpa de café, foi realizado o pré-tratamento da mesma. Para isso foram utilizados erlenmeyers de 1 litro, contendo 20% m/v (100 g de polpa de café) de biomassa e solução hidróxido de sódio 4% m/v, submetidos ao pré-tratamento, a 121 °C, (autoclave vertical, Prismatec), durante 25 minutos. Após os tratamentos, foram efetuadas cinco lavagens com água destilada quente, para a retirada da lignina e substâncias alcalinas que ainda

estavam impregnadas no material. A fim de comparar os resultados obtidos para o pré-tratamento com solução alcalina foi realizado um pré-tratamento em que se utilizou apenas água destilada como meio reacional, possuindo as mesmas condições de operação (121 °C, por 25 minutos).

Da polpa pré-tratada foram determinados os teores de lignina, celulose, hemicelulose e umidade. Após o pré-tratamento, partiu-se para a etapa de hidrólise enzimática.

2.3 Hidrólise enzimática

Para a hidrólise foram utilizados erlenmeyers de 250 mL com 20 g de material pré-tratado em 40 mL de líquido contendo enzimas (concentrações de celulase 22,5 FPU/g de substrato e celobiase 20CBU/g de substrato) e tampão citrato 0,05 mol/L⁻¹ (pH=4,8). Os recipientes foram incubados em incubadora rotativa (Nova Ética, modelo 430 RDB), a 50 °C e 150 rpm, durante 72 horas. Após a hidrólise, os erlenmeyers foram imersos em gelo e, posteriormente, centrifugados (Fanem, Modelo 206), a 5.000 g por 10 minutos, conforme metodologia proposta por YANG e WYMAN (2004), sendo o sobrenadante aproveitado para fermentação.

2.4 Fermentação

2.4.1 Microrganismo

Para a fermentação foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae*, codificado como CAT 1, isolado de usina de álcool (BASSO et al., 2008), pertencente à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do

Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, armazenado sob a forma liofilizada.

2.4.2 Preparo do inóculo

Com o propósito de reativar as células de leveduras e atingir valores iguais a 10^8 células viáveis/mL, foi realizada a reativação utilizando-se 1 g da levedura reidratada em 10 mL de água destilada estéril, a 38 °C, por 30 minutos. Antes da adição do inóculo ao mosto a ser fermentado foram feitas contagens e testes de viabilidades das leveduras.

2.4.3 Fermentação do mosto

O meio de fermentação foi suplementado utilizando-se sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) (0,1 g/L) e sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,2 g/L).

Antes de iniciar a fermentação, os meios foram autoclavados, a 121 °C, durante 20 minutos. Para iniciar a fermentação, foram adicionados 10% do inóculo a cada tratamento. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 1L, contendo 700 mL de meio (hidrolisado), dispostos em incubadora, à temperatura de 30 ± 1 °C, durante 24 horas, sem agitação. Para o estudo cinético, foram retiradas amostras do mosto fermentado nos tempos de 0, 3, 5, 7, 9, 12 e 24 horas. Foram realizadas as análises de açúcares redutores, contagem de células em câmara de Neubauer e em placas, viabilidade, massa seca e teor alcoólico.

2.5 Métodos

2.5.1 Umidade

A umidade foi determinada gravimetricamente após secagem em estufa a 65 °C (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY, 1990).

2.5.2 Extrativos

A determinação de extrativos foi baseada na norma NREL n°10 “Determination of Extractives in Biomass” (SLUITER et al., 2005). Pesaram-se amostras de 4 g de polpa previamente moída e seca em cartuchos de extração e colocadas para serem extraídas em um aparelho soxhlet. Um volume de 190 mL de álcool etílico de 99% de pureza foi adicionado a cada balão do extrator, junto com uma quantidade de pérolas de vidro. A extração termina quando o solvente que se encontra ao redor do cartucho de extração torna-se incolor. Em seguida, foram retirados os cartuchos com as amostras do soxhlet, lavados com 100 mL de etanol e secos, em estufa, a 105 °C, até massa constante. Para o cálculo do extrativo foi utilizada a Equação (1).

$$EXT = \frac{(m1 - m2)}{m1} * 100 \quad (1)$$

em que

m1: massa da polpa de café seca (g);

m2: massa da polpa sem os extrativos (g).

2.5.3 Determinação da composição química por Vans Soest

As análises foram realizadas de acordo com as metodologias propostas por Goering e Van Soest (1970), Silva (1998) e Van Soest (1963).

2.5.4 Açúcares redutores (AR)

As concentrações de AR foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). As leituras da absorbância das amostras hidrolisadas foram efetuadas no espectrofotômetro, a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um branco em que o volume da amostra foi substituído por água destilada. Para o cálculo de AR foram feitas curvas de calibração. Os resultados dos teores de açúcares redutores são expressos em g AR/L de meio.

2.5.5 Determinação de glicose

Para a quantificação da glicose, foram adicionados 10 µL de cada uma das amostras (hidrolisado) em tubos de ensaio e adicionado 1,0 mL do kit enzimático GOD PAP (Laborlab), levados a um banho termostatizado, a 30 °C, durante 10 minutos. A reação foi interrompida retirando-se os tubos do banho e colocando-os em um banho de gelo fundente para terminar a reação. As amostras foram lidas em espectrofotômetro, a 500 nm. Para obter os resultados foi construída uma curva padrão com concentrações de glicose conhecidas.

2.5.6 Rendimento da hidrólise da celulose presente no material pré-tratado (rendimento hidrólise)

O rendimento da hidrólise enzimática foi calculado utilizando-se a Equação 2.

$$\text{hidrólise}(\%) = \frac{(G_f - G_b) \times 0,9}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

em que

G_f : concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática (g de glicose/L de meio após a hidrólise);

G_b : concentração de glicose no branco (tratamento realizado sem a enzima) (g de glicose/L de meio);

C_0 : concentração de celulose no material pré-tratado (g de celulose/L meio a ser hidrolisado).

2.5.7 Contagem e viabilidade de células em câmara de Neubauer

A contagem e a viabilidade foram realizadas em câmara de Neubauer, após diluições adequadas, utilizando-se a coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

2.5.8 Teor alcoólico

Para a análise do teor alcoólico foi utilizado cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG-17A), com coluna capilar Carbowax 20M (30m,0,25mmx0,25 μ m), com gradiente de temperatura, iniciando em 40 °C, por

4 minutos, aquecendo até 220 °C e permanecendo por 2 minutos, utilizando rampa de aquecimento de 25 °C/min. Foi feita injeção automática do tipo *splitless* a cada 0,30 segundos, com temperatura de 250 °C. O detector utilizado foi o de ionização de chama (FID), com temperatura de 300 °C. Como gás de arraste foi utilizado hélio com fluxo linear.

2.5.9 Conversão do substrato em etanol ($Y_{p/s}$) e eficiência fermentativa (E_f)

O fator de conversão do substrato em etanol de foi calculado em gramas de etanol produzido por gramas de glicose totais consumidos (Equação 3).

$$Y_{p/s} = P / (S_0 - S) \quad (3)$$

P = concentração de etanol ao final da fermentação (g etanol/L);

S₀ = concentração de glicose no início da fermentação (g glicose/L);

S = concentração de glicose ao final da fermentação (g glicose/L).

A eficiência fermentativa foi calculada pela relação entre o rendimento do etanol observado no processo e o rendimento teórico (Equação 4). A eficiência fermentativa é a fração do açúcar metabolizado que se converteu em etanol.

$$E_f = (Y_{p/s} / 0,511) * 100 \quad (4)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da polpa de café e pré-tratamento

A polpa *in natura* foi submetida à etapa de deslignificação com NaOH 4% (m/v), a 121 °C, por 25 minutos, em erlenmeyers com capacidade de 1.000 mL.

Na Tabela 1, encontram-se os dados de composição química da polpa de café *in natura* e após deslignificação alcalina.

Tabela 1 Constituintes da polpa de café antes e após pré-tratamento com hidróxido de sódio

Componentes	Polpa de café <i>in natura</i>	Polpa de café pré-tratada
Massa (g)	100	18,01
Extrativos (%)	27,5±2,6	-
Celulose (%)	20,6±3,2	50,53±2,45
Hemicelulose (%)	17,2±1,2	27,68±1,18
Lignina (%)	15,5±2,5	13,83±1,25
Cinza (%)	7,9±1,9	2,03±0,25

* Umidade da polpa de café *in natura* foi de 82%

* Umidade da polpa de café pré-tratada foi de 72%

Com relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina encontrados neste trabalho para a polpa de café *in natura*, com exceção do teor de lignina, os resultados obtidos estão próximos aos apresentados por Salmones, Mata e Waliszewski (2005), que foram de 24,5% para celulose, 17,1% para hemicelulose e 26% para lignina, obtidos pela técnica de Van Soest.

Rojas et al. (2002) encontraram concentrações de 28,6% de celulose e 8,9% de cinza para a polpa de café. Considerando os desvios obtidos neste trabalho, os resultados estão próximos ao obtidos pelos autores anteriores.

Alguns autores indicam que soluções contendo 1% e 3% NaOH promoveram uma dissolução substancial dos polissacarídeos hemicelulósicos e macromoléculas de lignina (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). Chang e Holtzaple (2000) demonstraram que um processo de pré-tratamento eficaz deve reduzir o teor de lignina para cerca de 10% na biomassa pré-tratada, valor próximo ao obtido neste trabalho (13,83%).

3.2 Hidrólise enzimática

A polpa de café pré-tratada com solução de hidróxido de sódio 4% (m/v) em autoclave, a 121 °C, durante 25 minutos, foi submetida a uma hidrólise enzimática utilizando 20 g (sendo este valor igual a 50% de biomassa e 14% de sólidos insolúveis presente no meio reacional) de polpa pré-tratada em 40 mL de meio (tampão+enzimas). Os ensaios foram conduzidos em incubadora rotativa (Nova Ética, modelo 430 RDB), à temperatura de 50 °C, sob agitação de 150 rpm, durante 72 horas. Foram utilizadas quantidades de enzimas iguais a 22,5 FPU/g de substrato e 20 CBU/g de substrato para a celulase e celobiase, respectivamente (Tratamento 1). Uma segunda hidrólise enzimática (Tratamento 2) foi realizada na polpa de café sem passar pelo pré-tratamento alcalino, utilizando-se as mesmas quantidade de enzimas do Tratamento 1.

Os resultados da hidrólise enzimática na Tabela 2 pode-se observar que o hidrolisado apresentou, em sua constituição, quantidades de açúcares que não são glicose, isso devido à diferença entre as concentrações de glicose e açúcares redutores.

Tabela 2 Teores de açúcares redutores, glicose e rendimento da conversão da celulose em glicose

Componentes	AR	Glicose	Conversão
Tratamento 1	92,06±0,75	72,50±1,02	86,52±1,14
Tratamento 2	11,15±0,35	9,11±0,37	5,8±1,25

Comparando-se os resultados dos Tratamentos 1 e 2 da Tabela 2 fica evidente a necessidade de submeter a biomassa a pré-tratamentos, melhorando, assim, o rendimento da hidrólise enzimática.

Os resultados da hidrólise enzimática para a polpa de café mostram-se satisfatórios, se comparados com dados encontrados na literatura.

Chen, Zhao e Xia (2008), estudando palha de milho pré-tratada com 2% de NaOH, a 80 °C, por 1 hora, utilizaram o processo de batelada alimentada, visando aumentar a concentração de açúcares ao final do processo de hidrólise. Em uma das condições estudadas, a hidrólise foi iniciada com uma concentração de 8% (m/v) e uma carga enzimática de 20FPU/g biomassa pré-tratada e 10 CBU/g biomassa seca pré-tratada. Após 6 e 12 horas de hidrólise, uma concentração de sólidos e enzima foi adicionada ao reator, atingindo concentração final de 11% (m/v). Ao final da hidrólise (72 horas), os resultados obtidos foram concentrações de 89,5g/L de açúcares redutores, 56,7 g/L de glicose, 23,6 g/L de xilose e 5,7 g/L de arabinose, apresentando como rendimento de hidrólise 83,3% da conversão da celulose em açúcares redutores.

Chen et al. (2007) utilizaram palha de cevada pré-tratada com 2% de hidróxido de sódio, a 121 °C. Para a hidrólise, foram utilizados 60 FPU/g de celulose e suplementado com celobiase (Novozyme 188), encontrando 80,44% de conversão de celulose em glicose durante a hidrólise enzimática, valor menor do que o obtido neste trabalho.

3.3 Fermentação

3.3.1 Açúcares redutores (AR) e glicose

Durante a fermentação, foram medidos os teores de açúcares redutores (AR) e glicose em tempos pré-determinados (Figura 1). Como se pode notar, a fermentação terminou no tempo de 12 horas. Outro fator importante é que, ao final da fermentação, ainda permaneceram quantidades de açúcares redutores (12,1 g/L), o que demonstra a existência de quantidades de outros monossacarídeos não fermentados pela *Saccharomyces cerevisiae*. No início da fermentação, o teor de AR foi de 87,45 g/L, passando para 12,1 g/L, após 12 horas de fermentação.

A curva de glicose apresentou comportamento semelhante ao da curva de AR, no entanto, ao final da fermentação, os valores de glicose são menores. Para glicose nos tempos 0 e 12 horas, as concentrações foram de 69,25 g/L e 3,65 g/L, respectivamente. Sendo assim, fica evidente a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* em consumir glicose do hidrolisado da polpa de café.

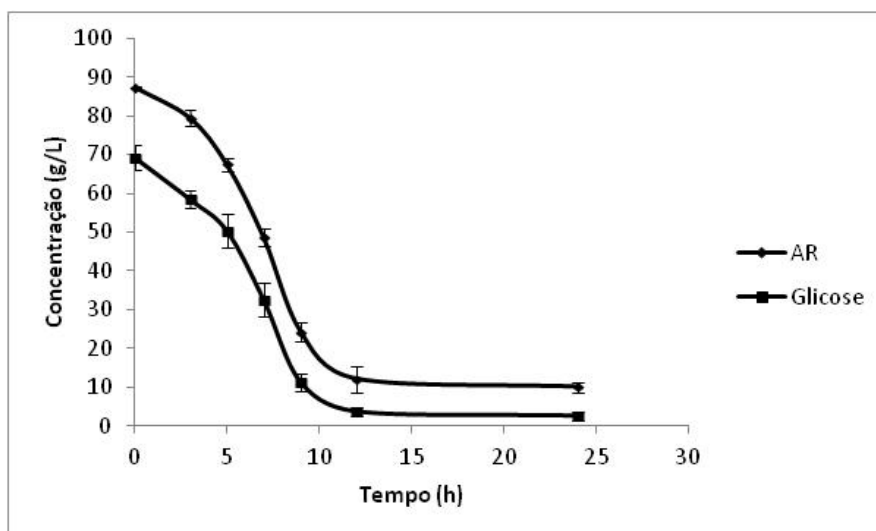


Figura 1 Gráfico de concentrações de açúcares redutores (AR) e glicose durante a fermentação

Lu et al. (2010) estudaram o pré-tratamento do sabugo de milho por explosão a vapor. Posteriormente, ao utilizar 20% de sólidos durante a hidrólise enzimática, obtiveram, inicialmente, 70 g/L de glicose, resultado semelhante ao observado na Figura 1. Ao fermentar este hidrolisado com levedura de panificação, os autores mostraram que a fermentação teve duração de aproximadamente 36 horas, tempo bastante superior ao apresentado na Figura 1.

3.3.2 Etanol e rendimento da conversão de substrato em etanol (Y_p/s), eficiência fermentativa e contagem de células

Os resultados do teor alcoólico, rendimento (Y_p/s) e eficiência fermentativa (E_f) estão apresentados na Tabela 3. Como se pode notar, a fermentação praticamente terminou com 12 horas. Outro fator importante a ser considerado é que, inicialmente, a concentração de etanol e o rendimento em

conversão de glicose em etanol foram baixos, mostrando que o microrganismo gastou certo teor deste açúcar para se adaptar ao meio.

Tabela 3 Resultados dos teores de etanol, rendimento da conversão de glicose em etanol (Yp/s) e eficiência fermentativa (Ef)

Fermentação (horas)	Teor alcoólico (gEt/L amostra)	Yp/s (gEt/gglicose)	Ef (%)	Contagem de células (células/mL)*
0	0	-	-	1,65±0,05
5	6,45±0,25	-	-	2,45±0,06
7	15,35±1,13	-	-	2,35±0,08
12	25,62±0,43	0,39±0,01	76,4±1,8	2,55±0,05
24	25,63±1,48	0,40±0,01	75,6±1,8	2,35±0,02

*Contagem de células está em 10^8

Lu et al. (2010), ao pré-tratarem sabugo de milho por explosão a vapor (após o pré-tratamento as biomassas foram lavadas) e, posteriormente, utilizando 10% e 20% de sólidos pré-tratados durante a hidrólise enzimática (celulase 20 FPU/g de matéria seca), obtiveram, aproximadamente, 40 g/L e 70g/L de glicose, respectivamente, para cada hidrólise. Ao fermentar os hidrolisados com levedura de panificação, os mesmos autores, ao final da fermentação, obtiveram concentrações de etanol de, aproximadamente, 15 g/L e 30 g/L de meio. Comparando-se com os resultados obtidos neste trabalho, nota-se que os valores foram próximos aos encontrados pelos autores. Lu et al. (2010) encontraram valores de conversão de glicose em etanol superiores a 92%, valores superiores ao encontrados neste estudo.

Wang e Cheng (2011), fermentando gramíneas pré-tratadas com hidróxido de cálcio (100 °C, por 15 minutos, com concentrações de cal iguais 0,1 g/g de biomassa seca) e hidrolisadas com enzimas (celulase 20 FPU/g de biomassa; celobiase 10 CBU/g de biomassa seca), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24859), obtiveram fatores de conversão iguais a 0,49 g de

etanol/g de glicose, sendo este valor relativamente alto, mesmo quando se utiliza caldo de cana-de-açúcar para fermentação.

Chen et al. (2007) estudaram palha de cevada pré-tratada com 2% de hidróxido de sódio, a 121 °C, por 60 minutos. O material pré-tratado sofreu hidrólise enzimática (Celluclast 1.5L) a uma concentração de 40 FPU/glicose suplementada com celobiase (Novozyme 188) em relação de 1:1,75 (v/v). O hidrolisado foi inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24859) e incubado, a 30 °C, por 72 horas. Ao final da fermentação, foram obtidos valores de rendimento da conversão de glicose em etanol (Yp/s) iguais a 0,31 glicose/getanol e eficiência fermentativa igual a 60,08, valores estes mais baixos que os encontrados neste estudo, o que pode ser explicado pela diferença de substrato utilizado.

O rendimento do etanol obtido neste estudo é comparável aos encontrados na literatura, embora no extremo inferior da faixa relatada. Estas variações podem ser atribuídas ao fato de que as características das biomassas variam significativamente de acordo com a matéria-prima utilizada. Outro fator interessante a ser considerado é a levedura utilizada durante o processo de fermentação. Além disso, pré-tratamentos químicos podem levar à formação de subprodutos, tais como furfural, HMF e compostos fenólicos de degradação do polímero, assim inibindo a fermentação de açúcares por leveduras.

Com relação ao número de células totais (Tabela 3), fica evidente que houve um aumento nas cinco primeiras horas, ficando praticamente constante a partir deste momento. Já a viabilidade variou de 88% para 75%, ao final da fermentação, indicando que, com o passar do tempo de fermentação, ocorreu perda considerada de viabilidade.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que foi possível a utilização da polpa de café prensada para a produção de etanol, obtendo-se concentrações de 25,63 g etanol/L de meio ao final da fermentação. No entanto, maiores estudos são necessários com outras cepas de leveduras, além da utilização de processos combinados de hidrólise e fermentação. No mesmo trabalho, pode-se notar a necessidade de pré-tratar as matérias-primas para se obter elevadas concentrações de açúcares e, conseqüentemente, maiores teores de etanol ao final da fermentação.

AGRADECIMENTOS

À Novozymes, pelo fornecimento das enzimas e ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, pela disponibilidade das *Saccharomyces cerevisiae* CAT1.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 15. ed. Arlington: AOAC International, 1990.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, Nov. 2008.

BRANDUARDI, P.; SMERALDI, C.; PORRO, D. Metabolically engineered yeasts: 'potential' industrial applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, London, v. 15, n. 1, p. 31-40, Mar. 2008.

CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, Sept. 2007.

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

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84-86, n. 1-9, p. 5-37, 2000.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. M. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 71, n. 3, p. 411-415, Feb. 2008.

CHEN, Y. et al. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 142, n. 3, p. 276-290, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, Feb. 1987.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Agricultural handbook**. Washington: ARS USDA, 1970.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, Oxford, v. 315, n. 5813, p. 808-810, Feb. 2007.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, Oct. 2007.

KAAR, W. E.; HOLTZAPPLE, M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 189-199, 2000.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 81, n. 1, p. 33-44, Jan. 2002.

LEE, S.; ROBINSON, F.; WANG, H. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, New York, n. 11, p. 641-649, 1981.

LU, Y. F. et al. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 2, p. 360-369, 2010.

LYND, L. R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 5, p. 577-583, Oct. 2005.

MARTIN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 3, p. 274-282, Aug. 2002.

MILLER, G. L. Use of dinirosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, Oct. 2000.

PARK, I. et al. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry**, London, v. 45, n. 4, p. 487-492, Apr. 2010.

ROJAS, J. B. U. et al. A. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 1-4, p. 195-204, Aug. 2002.

SALMONES, D.; MATA, G.; WALISZEWSKI, K. N. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 5, p. 537-544, Mar. 2005.

SHEN, J. C.; AGBLEVOR, F. A. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1098-1107, Aug. 2010.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 1998.

SLUITER, A. et al. **Determination of extractives in biomass laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2005.

TILMAN, D.; HILL, J.; LEHMAN, C. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass. **Science**, Oxford, v. 314, n. 5805, p. 1598-1600, Dec. 2006.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, London, v. 46, n. 5, p.829-835, 1963.

WANG, Z. Y.; CHENG, J. J. Lime Pretreatment of Coastal Bermudagrass for Bioethanol Production. **Energy & Fuels**, Washington, v. 25, n. 4, p. 1830-1836, Apr. 2011.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, n. 1, p. 87-116, 1988.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 86, n. 1, p. 88-95, Apr. 2004.