

UTILIZAÇÃO DE PALHA DE CAFÉ PRÉ-TRATADA PARA LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES POR VIA ENZIMÁTICA

Erick Fonseca de Oliveira, Leoni Silva Barreto, Mariana Grillo Vetorazi, Joel Camilo Souza Carneiro, Jussara Moreira Coelho

Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Engenharia de Alimentos, Alto Universitário - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, erickfoliveira@hotmail.com

Resumo

A palha de café, resíduo gerado no processamento de café, possui grande potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos. Na produção de etanol de segunda geração, a biomassa vegetal é submetida a modificações físicas e químicas, permitindo o acesso à celulose e sua conversão em açúcares fermentescíveis. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o potencial de utilização das palhas de cafés Arábica e Conilon submetidas a diferentes concentrações de ácido sulfúrico e proporções entre a massa de palha de café e solução ácida para obtenção de açúcares fermentescíveis. Todas as amostras foram caracterizadas quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento com solução de ácido sulfúrico a 5% (v/v), na proporção de 1:5, apresentou maiores porcentagens de exposição da celulose e de remoção de hemicelulose, para ambas as espécies de café. Os melhores resultados em açúcares fermentescíveis foram obtidos após 96 horas de hidrólise enzimática para conilon e arábica, 13,5 g/L e 14,8 g/L, respectivamente.

Palavras-chave: Açúcares redutores. Hidrólise enzimática. Material lignocelulósico. Pré-tratamento ácido.

Área do Conhecimento: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Introdução

A queima de combustíveis fósseis é um grande problema ambiental. Durante esse processo, ocorre a liberação de gases de efeito estufa, sendo o principal o dióxido de carbono. Com isso, faz-se necessário a utilização de fontes alternativas de combustíveis, reduzindo os impactos ambientais (Alvira *et al.*, 2010). O etanol tornou-se uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, com crescente expansão dos métodos de produção, principalmente pela utilização de materiais lignocelulósicos (Himmel *et al.*, 2007; Brethauer; Wyman, 2010). Na produção de etanol de segunda geração, a biomassa vegetal é submetida a modificações físicas, químicas e enzimáticas, para permitir o acesso à celulose e sua conversão em açúcares fermentescíveis (Asgher *et al.*, 2013; Khunnonkwao *et al.*, 2024).

O beneficiamento do café gera um dos principais resíduos agrícolas do Brasil, ainda pouco aproveitado na indústria. A palha de café, composta pela casca e pergaminho, é constituída majoritariamente por carboidratos, até 72,3%, sendo mais de 90% material lignocelulósico (Durán *et al.*, 2017). Entre os usos mais comuns da palha de café, estão a alimentação animal, a queima em secadores de café e o descarte na própria lavoura. Entretanto, este resíduo possui grande potencial para ser utilizado em processos biotecnológicos, como na produção de biocombustíveis (Durán *et al.*, 2017; Harsono *et al.*, 2015).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, sendo hidratos de carbono fortemente ligados, dificultando o acesso à celulose. Assim, torna-se necessário a aplicação de pré-tratamentos físicos (secagem, moagem e peneiragem) e químicos, como o uso de soluções ácidas ou básicas combinadas com tratamento térmico ou tecnologias verdes (micro-ondas, ultrassom, entre outros) (Asgher *et al.*, 2013; Hassana; Williams; Jaiswala, 2018). O pré-tratamento adequado permite a deslignificação e a remoção da hemicelulose da fração líquida, permitindo que a celulose seja convertida em açúcares fermentescíveis, sendo o método mais promissor a hidrólise enzimática (Khunnonkwao *et al.*, 2024). Nesse sentido, objetivou-se neste estudo

avaliar o potencial de utilização das palhas de cafés Arábica e Conilon na obtenção de açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol de segunda geração.

Metodologia

Coleta e preparo da matéria prima

Os resíduos do beneficiamento dos cafés (casca e pergaminho) eram das espécies Arábica, variedade Catuai, e Conilon, variedade Emcaper 8151, provenientes de Boa Vista, distrito de Cachoeiro de Itapemirim, ES, Brasil. As palhas de café secas foram moídas em moinho de facas tipo willey (SOLAB, Brasil) e peneiradas para obtenção de partículas menores que 4,25 mm de espessura. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas a 4°C para as análises.

Pré tratamento da palha de café

A palha de café seca e moída foi pré-tratada em erlenmeyer de 250 mL com soluções de ácido sulfúrico (200 mL) em diferentes concentrações, variando-se a proporção sólido:líquido (Tabela 1). As amostras eram submetidas ao tratamento térmico, em autoclave, a 121 °C por 30 min (Alvira *et al.*, 2010; Freitas, 2016). Após o pré-tratamento, as misturas foram filtradas a vácuo, em funil de Buchner, utilizando-se papel de filtro qualitativo. Foram realizadas lavagens com água destilada aquecida na proporção de 50 mL.g⁻¹ (Pereira, 2013). A palha de café pré-tratada foi seca em estufa a 40°C por 24 horas e armazenada a 4°C para as análises.

Tabela 1 - Pré-tratamentos das palhas de café Arábica e Conilon com soluções de ácido sulfúrico em diferentes concentrações e proporções sólido:líquido.

Pré-tratamento	Concentração de H ₂ SO ₄ (%v/v)	Proporção sólido:líquido (m/v)
1	0	1:5
2	1	1:5
3	5	1:5
4	0	1:10
5	1	1:10
6	5	1:10

Fonte: os autores.

Caracterização da palha de café in natura e pré-tratada

A palha de café, *in natura* e pré-tratada, foi caracterizada em relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, segundo metodologia de Moraes, Rosa e Marconcini (2010).

Hidrólise enzimática da casca de café

A palha de café, *in natura* e pré-tratada, foi hidrolisada utilizando um complexo de celulasas liofilizado, Powercell®, fornecido pela empresa Prozyn (200 FPU/g), segundo a metodologia de Pereira (2013). Foi utilizado 0,2 g de complexo enzimático por grama de palha de café. Aliquotas de 1,5 mL do sobrenadante foram coletadas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas e armazenadas a -18 °C. A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Uma curva padrão foi preparada usando glicose (0,1 a 1,0 g.L⁻¹).

Delineamento experimental

Os experimentos foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em fatorial 3x2, totalizando seis unidades experimentais por espécie de café (Arábica e Conilon). Foram avaliadas três concentrações de solução de ácido sulfúrico (0%, 1% e 5%) e duas proporções da fração sólida (palha de café) e líquida (solução de ácido sulfúrico), 1:5 e 1:10 (m/v), em triplicata. A concentração de açúcares redutores foi avaliada em quatro tempos (24, 48, 72 e 96 h), nas amostras *in natura* e pré-tratadas, em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey. A comparação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina das palhas *in natura* das espécies de café (Arábica e Conilon) foi submetida ao teste t de Student. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Resultados

Antes do pré-tratamento ácido, a palha de café foi caracterizada em relação ao seu material lignocelulósico. As palhas de cafés Arábica e Conilon *in natura* não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) entre os teores de celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 2).

Tabela 2 - Teores de celulose, hemicelulose e lignina (em base seca) de palhas de café *in natura*.

Espécie	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Arábica	36,65a	12,34a	18,87a
Conilon	36,78a	13,21a	19,87a

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

A concentração de ácido sulfúrico e a proporção de palha de café utilizadas no pré-tratamento deste estudo, apresentaram interação significativa ($p<0,05$) para os teores de hemicelulose e lignina da palha de café Arábica. Para a palha de café Conilon, a interação foi significativa ($p<0,05$) para os teores de hemicelulose e celulose (Tabela 3).

Tabela 3 - Teores de hemicelulose e lignina (em base seca) para a palha de café Arábica e de hemicelulose e celulose (em base seca) para palha de café Conilon, após diferentes condições de pré-tratamento.

Espécie	Fração de estudo	Pré-tratamento		
		Concentração de H_2SO_4 (%)	Proporção sólido:líquido	
			1:5	1:10
Arábica	Hemicelulose (%) [*]	0	14,78Aa	12,98Ba
		1	11,87Ab	11,87Aa
		5	5,87Ac	6,98Ab
	Lignina (%) [*]	0	18,21Ab	17,76Ab
		1	17,78Ab	15,67Bc
		5	19,98Ba	21,78Aa
Conilon	Hemicelulose (%) [*]	0	13,42Aa	12,23Ba
		1	10,98Ab	9,21Bb
		5	4,28Bc	6,32Ac
	Celulose (%) [*]	0	38,91Ac	37,78Ac
		1	41,98Ab	42,57Ab
		5	50,79Aa	46,45Ba

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal para a mesma espécie, não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

A interação entre os fatores estudados durante o pré-tratamento ácido para os teores de celulose no café Arábica e lignina no café Conilon não foram significativos ($p>0,05$). Assim, essas frações lignocelulósicas foram submetidas, separadamente, ao teste Tukey ($p<0,05$) para concentração de ácido sulfúrico e proporção de palha de café (Tabela 4).

Tabela 4 - Teores de celulose (em base seca) para a palha de café Arábica e de lignina (em base seca) para palha de café Conilon, após diferentes condições de pré-tratamento.

Espécie	Fração de estudo	Pré-tratamento			
		Concentração de H ₂ SO ₄ (%)	*	Proporção sólido:líquido	**
Arábica	Celulose (%)	0	37,76c	1:5	42,54a
		1	40,24b	1:10	41,37b
		5	47,88a		
Conilon	Lignina (%)	0	19,60a	1:5	12,22a
		1	17,35b	1:10	19,29a
		5	20,83a		

* média das duas proporções. ** média das três concentrações. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na vertical para a mesma espécie, não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5%.

A hidrólise enzimática das palhas de café (Arábica e Conilon) foi realizada nas amostras pré-tratadas que apresentaram maior exposição da celulose. Assim, foi escolhido o pré-tratamento com solução de ácido sulfúrico à 5% e proporção sólido:líquido de 1:5 para comparação com as palhas de café *in natura* (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de glicose (g/L) de acordo com o tempo de hidrólise da palha de café Arábica e Conilon durante 96 horas.

Espécie	Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	
		<i>In natura</i>	Pré-tratado
Arábica	24	0,9c	2,3c
	48	1,4bc	4,0c
	72	2,4ab	9,0b
	96	2,9a	14,8a
Conilon	24	0.8d	1.9d
	48	1.1c	4.2c
	72	1.9b	9.3b
	96	2.5a	13.5a

Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra na vertical para a mesma espécie, não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

Discussão

A caracterização lignocelulósica das palhas de café (Arábica e Conilon) *in natura* demonstrou não haver uma espécie que apresente maior concentração de celulose antes do pré-tratamento ácido ($p>0,05$). Após o pré-tratamento, foi observado maior exposição da celulose na concentração de 5% de ácido sulfúrico e na proporção de 1:5 (m/v) de palha para ambas as espécies de café. A exposição da celulose é desejável para que na etapa de hidrólise enzimática ocorra a quebra da celulose em açúcares fermentescíveis (Khunnonkwao *et al.*, 2024).

Na espécie arábica, o teor de hemicelulose da palha de café diminuiu à medida que a concentração de ácido sulfúrico aumentou ($p<0,05$). Entretanto, as proporções de palha de café apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) para hemicelulose apenas quando tratada com água destilada (0% de H₂SO₄). Além disso, o teor de lignina aumentou ($p<0,05$) nos tratamentos com ácido sulfúrico (1% e 5%) para as duas proporções de palha de café Arábica avaliadas. Os estudos de Pan *et al.* (2005), indicam que durante o pré-tratamento em autoclave pode ocorrer hidrólise parcial e redistribuição dos componentes lignocelulósicos no material pré-tratado, conforme observado para o teor de lignina no presente estudo. Por outro lado, o teor de celulose da espécie Arábica aumentou ($p<0,05$) quando

tratada com maiores concentrações de ácido sulfúrico, sendo superior na proporção 1:5 (m/v) de palha de café.

Na espécie Conilon, o teor de hemicelulose diminuiu e o teor de celulose aumentou quando a concentração de ácido sulfúrico aumentou para as duas proporções palha de café avaliadas ($p < 0,05$). Durante o pré-tratamento, são esperadas rupturas do complexo hemicelulose-lignina, com maior exposição da celulose (Khunnonkwao *et al.*, 2024). A proporção 1:10 (m/v) de palha de café Conilon apresentou maior redução ($p < 0,05$) do teor de hemicelulose em menores concentrações de ácido sulfúrico (0% e 1%). Entretanto, na maior concentração do ácido (5% de H_2SO_4) foi observada maior redução de hemicelulose ($p < 0,05$) na proporção de 1:5 (m/v). A maior exposição da celulose da palha de café Conilon ocorreu no pré-tratamento com maior proporção de palha (1:5, m/v) e a maior concentração de ácido sulfúrico (5%). Por outro lado, o teor de lignina da espécie Conilon, assim como ocorrido na espécie Arábica, não apresentou reduções significativas ($p > 0,05$) nos pré-tratamentos avaliados. Esses resultados indicam que a lignina possui elevada resistência à degradação química, ocorrendo redistribuição deste componente no material pré-tratado (Taherazdeh; Karini, 2008).

Para ambas as espécies de café (Tabela 5) houve aumento da concentração de glicose (g/L) em função do tempo da hidrólise enzimática ($p < 0,05$). Logo, a maior concentração de açúcares fermentescíveis foi obtida no tempo de 96 h. Além disso, a concentração de glicose obtida da palha de café Arábica pré-tratada foi 5,1 vezes maior em relação à amostra *in natura*, enquanto para a palha de café Conilon foi de 5,4 para as mesmas 96 h de hidrólise enzimática. A baixa obtenção de glicose nos tratamentos *in natura* pode ser explicada pela maior presença de lignina e hemicelulose no material hidrolisado. A presença destes compostos dificulta o acesso das enzimas ao substrato, levando a uma adsorção improdutiva e impedindo sua atuação sobre a celulose (Pan *et al.*, 2005). Assim, o pré-tratamento ácido avaliado foi favorável à hidrólise enzimática, permitindo a maior exposição da celulose e sua conversão em açúcares fermentescíveis.

Conclusão

As palhas de café Arábica e Conilon submetidas a pré-tratamento ácido associado a autoclave possuem potencial para aplicação na produção de bioetanol. Ambas as espécies apresentaram melhores resultados com o pré-tratamento com solução de ácido sulfúrico a 5% (v/v), na proporção de 1:5, com maior exposição da celulose e de remoção de hemicelulose. Ainda, a maior concentração de açúcares fermentescíveis foi obtida após 96 horas de hidrólise enzimática para conilon e arábica, 13,5 g/L e 14,8 g/L, respectivamente. Para obter resultados ainda mais promissores, recomenda-se estudos futuros para melhorar a extração de lignina, a fim de obter concentrações mais elevadas de glicose. Além disso, torna-se necessário mais estudos para verificar a viabilidade da produção de etanol utilizando casca de café Conilon e Arábica pré-tratadas.

Referências

- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 488– 495, 2013.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4862–4874, 2010.
- DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F.; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.1, p. 107-134, 2017.
- FREITAS, A. S.; PEREIRA, O. V.; CARVALHO, R. V.; COELHO, J. M. Viabilidade de utilização da palha de cana-de-açúcar na produção de etanol. Monografia (Graduação em Engenharia de

Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

HASSANA, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWALA, A. K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 234, p. 123-132, 2018.

HARSONO, S. S.; SALAHUDDIN; FAUZI, M.; PURWONO, G. S.; SOEMARNO, D.; KISSINGER. Second Generation Bioethanol from Arabica Coffee Waste Processing at Smallholder Plantation in Ijen Plateau Region of East Java. *Procedia Chemistry*. v. 14, p. 408-413, 2015.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, v. 315, p. 804-807, 2007.

KHUNNONKWAO, P; THITIPRASERT, S; JAIAUE, P; KHUMRANGSEE, K; CHEIRSILP, B; THONGCHUL, N. The outlooks and key challenges in renewable biomass feedstock utilization for value-added platform chemical via bioprocesses. *Heliyon*, v. 10, n. 10, 2024.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31(3), p. 426–428, 1959.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. 1 ed., Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2010. 54p

PEREIRA, D. G. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos e demais responsáveis pelos laboratórios do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da UFES, que colaboraram para realização deste trabalho e aos produtores de café da região de Alegre-ES pela doação das palhas de café.