

PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO ASSOCIADO A AUTOCLAVE, MICRO-ONDAS E ULTRASSOM NA SACARIFICAÇÃO DE CASCA DE CAFÉ CONILON

Mariana Grillo Vetorazi, Daiane Xavier Brinatti, Jéssica da Cunha Machado,
Erick Fonseca de Oliveira, Joel Camilo Souza Carneiro, Jussara Moreira
Coelho.

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

Resumo

A utilização da casca de café (biomassa lignocelulósica) na bioconversão em etanol deve ser realizada através da aplicação de pré-tratamentos que promovem a remoção da lignina e hemicelulose, ocorrendo a exposição e hidrólise da celulose para produção de açúcares fermentescíveis. Neste estudo, objetivou-se avaliar a sacarificação enzimática da fração celulósica da casca de café conilon, submetida a um pré-tratamento com hidróxido de sódio associado à autoclave, micro-ondas e ultrassom. Todas as amostras foram caracterizadas quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. O pré-tratamento com a solução de NaOH 1 % (m/v) associado com micro-ondas resultou em maior exposição da celulose e promoveu remoção da lignina, 6,18%, e da hemicelulose, 13,43%. Durante a hidrólise enzimática, foi observado baixo rendimento da concentração de glicose, com valores de 1,09 g/L a 1,67 g/L. A presença de inibidores oriundos do pré-tratamento como fragmentos de hemicelulose e lignina, além da concentração e adsorção no substrato podem ter influenciado nos resultados obtidos neste estudo.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica. Hidrólise. Açúcares redutores.

Área do Conhecimento: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo o estado do Espírito Santo o maior produtor de café conilon do país. Em 2024, o estado foi responsável pela produção de 10,81 milhões de sacas de 60 Kg do grão (CONAB, 2024). Entretanto, apesar dessa importância econômica do café, o beneficiamento dessa matéria-prima gera muitos resíduos, como a casca e o pergaminho, que são pouco aproveitados pela indústria de alimentos. Com isso, uma forma de agregar valor a esses resíduos, além de reduzir a poluição ambiental, é por meio da produção de etanol celulósico (Durán *et al.*, 2017).

O uso de combustíveis fósseis tem sido contestado devido à emissão de gases poluentes na atmosfera, à sua natureza não renovável e ao substancial aumento de preço (Pandiyan *et al.*, 2019). Com isso, o etanol de segunda geração tornou-se uma fonte alternativa a esses combustíveis. A produção de etanol celulósico envolve as etapas de pré-tratamento da biomassa vegetal, hidrólise enzimática da porção celulósica, fermentação e destilação. A conversão de materiais lignocelulósicos em etanol requer um pré-tratamento, cujo objetivo é a exposição das cadeias de celulose, que posteriormente serão hidrolisadas enzimaticamente (Khunnonkwao *et al.*, 2024).

Os pré-tratamentos podem ser classificados em físicos (moagem), químicos (utilização de ácidos, bases, peróxidos ou ozônio), físico-químicos (uso de vapor, micro-ondas ou ultrassom) e biológicos (ação microbiana) (Sun; Cheng, 2002). O uso combinado desses tipos de pré-tratamentos tem sido apontado na literatura como mais eficiente por removerem a lignina sem degradar a cadeia celulósica (Santos *et al.*, 2012). Entretanto, a atuação destes pré-tratamentos sobre os materiais lignocelulósicos possuem efeitos distintos e o melhor pré-tratamento para cada biomassa pode variar de acordo com a composição, densidade e recalcitrância de cada matéria-prima (Taherzadeh; Karimi, 2008).

Após a etapa de pré-tratamento, em que ocorre alteração das estruturas de lignina e hemicelulose, necessita-se de uma etapa de hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis

(Khunnonkwao *et al.*, 2024). Diante do exposto, objetiva-se avaliar a sacarificação enzimática da fração celulósica da casca de café conilon, submetida a um pré-tratamento com hidróxido de sódio associado à autoclave, micro-ondas e ultrassom.

Metodologia

Coleta e preparo das matérias-primas

As cascas de café conilon secas foram obtidas com produtores de café dos municípios vizinhos a Alegre/ES. A matéria-prima foi moída em moinho de facas tipo Wily (SOLAB, Brasil) e peneirada em agitador de peneiras para obtenção de partículas menores que 425 µm de espessura. As cascas de café secas e moídas foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas a 4 °C para as análises.

Pré-tratamento da casca de café

A casca de café conilon seca e moída foi pré-tratada na proporção sólido/líquido 1:10. O pré-tratamento foi dividido em duas etapas iniciais. Inicialmente, foram testadas diferentes concentrações de hidróxido de sódio (0%, 1% e 5%, m/v) em autoclave a 121 °C por 30 minutos (Pereira, 2013). Na segunda etapa, a concentração da solução em que se obteve os melhores resultados em autoclave, foi utilizada para os pré-tratamentos em banho ultrassônico a 25 KHz (Ultrasonic Power Line) por 20 minutos a 30 °C (Mori, 2015) e radiação de micro-ondas a 2.450 MHz por 3 minutos (Roldán, 2014) (Figura 1). Após os pré-tratamentos, as amostras foram filtradas a vácuo, em funil de Buchner, utilizando-se papel de filtro qualitativo, sendo realizadas lavagens com água destilada aquecida na proporção de 50 mL.g⁻¹ (Pereira, 2013). A casca de café pré-tratada foi seca em estufa a 40 °C por 24 horas e, posteriormente, armazenada a 4 °C.

Figura 1 - (a) Casca de café conilon moída e peneirada; (b) autoclave; (c) banho ultrassônico; (d) micro-ondas.



Fonte: os autores.

Caracterização da matéria-prima

As cascas de café *in natura* e pré-tratada foram caracterizadas em relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina empregando os procedimentos para análise lignocelulósica descritos por Moraes, Rosa e Marconcini (2010), sendo obtidos das amostras sem extrativos e com base no teor de cinzas.

Avaliação dos efeitos do pré-tratamento

Os efeitos dos pré-tratamentos na remoção de hemicelulose e lignina da casca de café foram avaliados pela Equação 1.

$$\% \text{ remoção} = \frac{X_i - X_a}{X_i} \cdot 100 \quad (1)$$

onde, X_i é o teor de hemicelulose/lignina da amostra sem tratamento e X_a o teor destes compostos na amostra pré-tratada.

Hidrólise enzimática da casca de café

A casca de café pré-tratada foi hidrolisada por um complexo de celulasas liofilizado, Powercell®, fornecido pela empresa Prozyn, com atividade enzimática declarada de 200 FPU/g. Casca de café pré-tratada (10 g) foram adicionadas em 100 mL de tampão citrato de sódio, pH 5,0. A concentração de

enzima empregada foi de 0,3% em relação à massa da amostra. A hidrólise enzimática foi conduzida com agitação de 150 rpm por 96 horas a 60 °C (Pereira, 2013). Uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante de cada amostra foi coletada nos tempos de 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 (100 a 1000 mg.L⁻¹).

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo todas as análises realizadas em triplicata. Na primeira parte foram avaliadas três concentrações de solução de hidróxido de sódio em associação com autoclave (0%, 1% e 5%). Na segunda parte, foram avaliados os pré-tratamentos de autoclave, micro-ondas e ultrassom em associação com a solução de hidróxido de sódio a 1 (% m/v). A concentração de açúcares redutores foi avaliada em quatro tempos (24, 48, 72 e 96 h). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa GENES.

Resultados

A casca de café conilon, moída e peneirada, *in natura* foi caracterizada quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, apresentando os seguintes resultados, respectivamente, 29,88%, 18,78% e 20,47%. Após a caracterização da matéria-prima foi aplicado o pré-tratamento alcalino associado à autoclave a fim de obter a concentração de NaOH que apresentasse melhores resultados de celulose, hemicelulose e lignina (Tabela 1).

Tabela 1 - Pré-tratamento em autoclave com concentrações de 0 %, 1% e 5% (m/v) de NaOH.

Concentração de NaOH [% m/v]	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
0	52,84a	21,80a	25,84a
1	63,36b	22,16a	28,34b
5	66,56b	16,59b	29,30b

Médias acompanhadas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%
Fonte: os autores.

Os teores de celulose para a casca de café conilon pré-tratada em autoclave, com soluções de NaOH nas concentrações de 0 %, 1% e 5% (m/v), foram superiores ao valor de celulose da casca *in natura*. Ainda, foi possível observar que com o aumento da concentração de hidróxido de sódio (1% e 5%), houve uma maior exposição da celulose.

O teor de celulose obtido no pré-tratamento em autoclave nas concentrações de NaOH de 1 e 5% não diferiram entre si. Diante disso, visando reduzir os custos do processo foi escolhida a solução que necessita de uma menor quantidade de reagente e produz menos resíduos.

Os pré-tratamentos em micro-ondas e em ultrassom apresentaram uma maior exposição da celulose e redução da porcentagem de hemicelulose e lignina quando comparados com o pré-tratamento utilizando autoclave (Tabela 2).

Tabela 2 - Pré-tratamento em autoclave, micro-ondas e ultrassom na concentração de 1% (m/v) de NaOH.

Pré-tratamento	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Autoclave	63,36a	22,16a	28,34a
Micro-ondas	70,52b	16,25b	19,20b
Ultrassom	72,73b	9,22c	24,45c

Médias acompanhadas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%
Fonte: os autores.

A avaliação dos efeitos dos pré-tratamentos feita a partir da porcentagem de remoção de hemicelulose e lignina (Tabela 3), indicou que o pré-tratamento em autoclave não removeu hemicelulose e lignina em relação à amostra *in natura*. Entretanto, o ultrassom foi capaz de remover a hemicelulose, enquanto o micro-ondas promoveu a redução dos teores de hemicelulose e lignina.

Tabela 3 – Porcentagem de remoção de hemicelulose e lignina após pré-tratamento com 1 % de NaOH.

Pré-tratamento	% de remoção de hemicelulose	% de remoção de lignina
Autoclave	-18,05	-38,06
Micro-ondas	13,43	6,18
Ultrassom	50,91	-19,46

Fonte: os autores.

Para avaliar a produção de etanol celulósico, avaliou-se a concentração de açúcares redutores após 24, 48, 72 e 96 horas de hidrólise enzimática, utilizando-se amostras de casca de café submetidas ao pré-tratamento alcalino combinado com micro-ondas (Tabela 4). Os tempos de hidrólise 48h, 72h e 96h apresentaram maior concentração de açúcares redutores quando comparados a 24h, mas não diferiram significativamente entre si ($p>0,05$).

Tabela 4 - Valores médios de açúcares redutores (g.L⁻¹), em relação aos diferentes tempos de hidrólise enzimática do tratamento em micro-ondas.

Tempo (h)	Concentração de açúcares redutores (g.L ⁻¹)
24	1,09a
48	1,48b
72	1,66b
96	1,58b

Médias acompanhadas pela mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%

Fonte: os autores.

Discussão

Os valores obtidos de celulose, hemicelulose e lignina na casca de café *in natura* estão dentro das faixas descritas na literatura. A variação na composição da biomassa lignocelulósica encontrada entre os estudos, ocorre devido a diversos fatores como espécie vegetal, condições de desenvolvimento da cultura, época da colheita, idade da planta e diferentes métodos de análise (Durán *et al*, 2017; Baêta *et al*, 2017; Freitas, 2016). O pré-tratamento alcalino em autoclave promoveu maior exposição da celulose com o aumento da concentração de hidróxido de sódio, sendo uma mudança desejável para etapas posteriores, como a hidrólise enzimática, quando ocorre a quebra da celulose em açúcares redutores (Khunnonkwao *et al.*, 2024). Silva (2019), ao realizar o pré-tratamento da casca de café em autoclave (120 °C por 20 minutos) apenas com água destilada, obteve percentual de celulose inferior ao obtido no presente estudo. Assim, o efeito combinado entre o pré-tratamento alcalino e a autoclave foi mais eficiente para a exposição da celulose em relação ao pré-tratamento apenas com água em autoclave. Contudo, a porcentagem de hemicelulose e lignina foi próxima ao obtido utilizando NaOH, apresentando resistência ao pré-tratamento avaliado.

Avaliando os três diferentes pré-tratamentos realizados com concentração de 1% (m/v) de NaOH (Tabela 3), observa-se que o tratamento com autoclave apresentou percentual de remoção negativo para hemicelulose, ou seja, o pré-tratamento não removeu hemicelulose em relação à amostra *in natura*. Pan *et al.* (2005), observaram que durante o pré-tratamento em autoclave pode ocorrer hidrólise parcial de alguns compostos e redistribuição dos componentes lignocelulósicos no material pré-tratado.

Por outro lado, nos pré-tratamentos em micro-ondas e ultrassom esse percentual foi positivo, o que significa que houve remoção deste componente. Ainda, a remoção de lignina foi negativa nos tratamentos em autoclave e ultrassom. Esses resultados indicam que a lignina possui elevada resistência à degradação química, podendo ocorrer redistribuição deste componente no material pré-tratado (Taherazdeh; Karini, 2008).

No pré-tratamento da casca de café conilon em autoclave, micro-ondas e ultrassom associado com solução de hidróxido de sódio a 1% (m/v) (Tabela 2), observa-se que o micro-ondas e o ultrassom apresentaram os maiores percentuais para celulose, não diferindo estatisticamente entre si. Já para hemicelulose e lignina houve diferença significativa entre os três pré-tratamentos. Durante o pré-tratamento, espera-se que ocorra elevada ruptura do complexo hemicelulose-lignina, com maior exposição da celulose (Khunnonkwao *et al.*, 2024). Nesse sentido, dentre os pré-tratamentos avaliados neste estudo, o micro-ondas associado com a solução de hidróxido de sódio a 1% (m/v) foi considerado o ideal para hidrólise da casca de café. Esse tratamento apresentou boa exposição de celulose, com um teor de 70,52%, e foi o único pré-tratamento que removeu simultaneamente a hemicelulose e a lignina, 13,43% e 6,18%, respectivamente. Portanto, para estudar o melhor tempo de hidrólise utilizou-se a amostra com pré-tratamento alcalino (1% de NaOH) combinado com micro-ondas.

A concentração de glicose do hidrolisado nos tempos 24h, 48h, 72h e 96h ficou entre os valores de 1,09 g.L⁻¹ e 1,67 g.L⁻¹. Freitas (2016), ao submeter a casca de café a um pré-tratamento alcalino seguido por hidrólise enzimática, obteve teor de glicose de 28,24 g.L⁻¹, valor superior ao encontrado neste estudo. Uma hipótese para baixa obtenção de glicose pode ser explicada pela baixa remoção de lignina e hemicelulose durante os pré-tratamentos avaliados (Tabela 3). A presença destes compostos dificulta o acesso das enzimas ao substrato, de modo que a presença de fragmentos da lignina pode se ligar as enzimas pelo módulo de ligação ao carboidrato levando a uma adsorção improdutiva e impedindo sua atuação sobre a celulose (Pan *et al.*, 2005). Além disso, o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), provenientes da degradação da hemicelulose e celulose, respectivamente, e compostos fenólicos, provenientes da degradação da lignina, podem ter sido formados durante o processo, atuando como inibidores de enzimas na hidrólise (Kumar; Sharma, 2017).

As concentrações de açúcar redutor durante 48h, 72h e 96h não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$). Entretanto, foram superiores ao valor obtido durante as primeiras 24 horas de hidrólise. Dessa forma, o tempo de 48h de hidrólise pode ser considerado o ideal nas condições estudadas, uma vez que tempos reacionais mais curtos significam redução de custos e prevenção de contaminação microbiana.

Conclusão

O pré-tratamento com 1% de NaOH associado a micro-ondas foi o mais eficiente na exposição da celulose e na extração de lignina e hemicelulose quando comparado com ultrassom e autoclave com mesma proporção de solução alcalina. Ainda, o tempo ótimo encontrado para a hidrólise foi de 48h, representando um menor tempo reacional. Entretanto, a concentração obtida para glicose foi abaixo do esperado. Diante disso, recomenda-se estudos futuros para avaliar os compostos inibidores de enzimas na hidrólise e formas de potencializar a extração de lignina e hemicelulose, aumentando a produção de açúcares fermentescíveis. Além disso, torna-se necessário verificar a viabilidade do pré-tratamento alcalino associado ao micro-ondas para produção de etanol utilizando a casca de café conilon.

Referências

BAÊTA, B. E. L.; CORDEIRO, P. H. DE M.; PASSOS, F.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. de. Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 6-72, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2024**. Monitoramento Agrícola, segundo levantamento, p. 1-33, 2024.

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

KHUNNONKWAO, P; THITIPRASERT, S; JAI AUE, 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.

KUMAR, A. K; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresour. Bioprocess**, v. 4, n. 7, 2017.

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

PAN, X; XIE, D; GILKES, N; GREGG, D. J; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Appl Biochem Biotechnol**; v. 1069, n. 79, p. 121-124, 2005.

PANDIYAN, K.; SINGH, A.; SINGH, S.; SAXENA, A. K.; NAIN, L. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 132, p. 723-741, 2019.

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.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H. D., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SILVA, C. G. **Estudo de pré-tratamento e hidrólise com ácidos orgânicos no isolamento de fibras de celulose**. 2019. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

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

TAHERZADEH, M. J; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int J Mol Sci.**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

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.