



## **Valorização da Borra de Café através da Produção de Etanol**

**VÍTOR MARTINS NOGUEIRA**

novembro de 2022



# Valorização da Borra de Café através da Produção de Bioetanol

Outubro de 2022

## **AUTOR**

Vitor Martins Nogueira

## **ORIENTAÇÃO**

Doutora Nídia de Sá Caetano

**Mestrado em Biorrecursos**



## **Agradecimentos**

Desejo exprimir os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que colaboraram, direta ou indiretamente, em todos os aspetos, para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, quero agradecer a minha orientadora, Professora Doutora Nídia de Sá Caetano, pela dedicação, auxílio e troca de ideias, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Quero ainda agradecer às técnicas do Laboratório de Tecnologia do ISEP, que nunca mediram esforços para me auxiliar nos procedimentos laboratoriais e com quem tive o prazer de estar na companhia na maior parte do tempo deste trabalho.

Agradeço também os colegas do CIETI, a Priscila, pela companhia em longos dias de laboratório, o Felipe, por toda a assistência no HPLC e troca de ideias e, em especial, ao Doutor Wilson Júnior, pela partilha de conhecimentos e experiência, que foi definitivamente fundamental neste trabalho.

Especial agradecimentos a parceria dos meus pais que, mesmo estando a um oceano de distância, sempre acreditaram em mim, e sempre foram e sempre serão a minha principal fonte de motivação e inspiração.

Por último, e de igual importância, meus sinceros agradecimentos a minha família de vida, minha namorada e meus amigos, que sempre estiveram presentes, me apoiando em todos os momentos.

A Prof. Nídia Caetano, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado por: LA/P/0045/2020 (ALiCE), UIDB/00511/2020 e UIDP/00511/2020 (LEPABE), financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).



## Resumo

O café, uma das bebidas mais populares do mundo, carrega consigo um enorme encargo ambiental e económico na forma de seus resíduos, gerados ao longo do seu processo de produção, tais como a borra de café, a fração inutilizada do café gerada após a sua infusão. Tradicionalmente, a borra de café é subaproveitada ou descartada e, devido a sua elevada carga orgânica, se torna tóxica ao ambiente. Devido ao seu alto valor biológico, esta corrente de resíduo apresenta um enorme potencial de valorização para a conversão em bioprodutos de valor agregado. Portanto, com vista à minimização desta problemática, numa perspectiva de economia circular, este trabalho propõe a valorização da borra de café através da produção de bioetanol.

Este trabalho visou a otimização do processo de produção do bioetanol, o qual se resume em três etapas: i) pré-tratamento, ii) hidrólise enzimática e iii) fermentação. Na primeira etapa de sacarificação, isto é, de libertação dos açúcares da biomassa de borra de café, nomeadamente o pré-tratamento e hidrólise enzimática, foram estudados os efeitos dos parâmetros operatórios concentração de ácido sulfúrico ( $c \text{ H}_2\text{SO}_4 = 1, 3 \text{ e } 5\% \text{ v/v}$ ), tempo de reação ( $t = 4, 6 \text{ e } 8 \text{ horas}$ ), temperatura ( $T = 60 \text{ e } 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e razão de líquido/sólido ( $R \text{ L/S} = 6 - 25$ ) no pré-tratamento, e a utilização de distintos complexos enzimáticos, *Accellerase*<sup>®</sup> 1500 (Genencor International, B.V.), *GC 151* (Genencor International, B.V.) *Viscamyl Flow* (DuPont Industrial Biosciences), e respetivas proporções de dosagens (*Accellerase*; GC:VIS  $\mu\text{L/g}$ ), na hidrólise enzimática. Na etapa final de fermentação, avaliou-se o rendimento da produção de etanol quando foram usadas as leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis*.

A melhor combinação dos parâmetros originou um rendimento médio em açúcares totais no hidrolisado de 38,5 g/100 g, sendo que são 0,92 g/100 g de celobiose, 5,38 g/100 g de glicose, 29,84 g/100 g de xilose e 3,13 g/100 g de arabinose, com geração de 0,08 g/L de ácido acético e não foram detetados compostos inibidores da fermentação (furfural e hidroximetilfurfural). As condições deste ensaio otimizado foram de:  $c \text{ H}_2\text{SO}_4 = 3\% \text{ v/v}$ ,  $t = 8 \text{ horas}$ ,  $T = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $R \text{ L/S} = 15$  e  $\text{GC:VIS} = 40:10 \mu\text{L/g}$ . Nestas condições operatórias, foi obtida uma concentração de 4,51 g/L de etanol, em 36 horas, para a *Saccharomyces cerevisiae* e uma concentração de 2,09 g/L, em 24 horas, para a *Pichia stipitis*.

Os resultados deste trabalho, estimulam o desenvolvimento da investigação acerca da valorização da borra de café, explorando-a como uma matéria-prima para a produção de produtos de valor, e não apenas de bioetanol, contribuindo assim para o avanço da bioeconomia circular e do desenvolvimento sustentável.

Palavras-chave: Valorização de biorresíduos; economia circular, hidrólise enzimática, fermentação, *Pichia stipitis*.



## Abstract

Coffee, one of the most popular beverages in the world, carries with it an enormous economical and environmental burden, in the form of its residues, which are generated throughout its production process, such as spent coffee grounds (SCG), the fraction of coffee beans left after brewing. Traditionally, SCG are underexploited or disposed of but, due to their high organic load, they are toxic to the environment. Due to their significant biological value, this biowaste presents a huge potential of valorization through conversion to valued-added bioproducts. Therefore, aiming the minimization of this problem, in the perspective of a circular economy, this project proposes the valorization of SCG through bioethanol production.

This project aimed the optimization of bioethanol production process, which can be summarized in three steps: i) pretreatment, ii) enzymatic hydrolysis and iii) fermentation. At the first step of saccharification, this is, of sugars release from SCG biomass, namely pretreatment and enzymatic hydrolysis, the variation of the following operation parameters were studied: sulfuric acid concentration ( $c H_2SO_4 = 1, 3$  and  $5\%$  v/v), reaction time ( $t = 4, 6$  and  $8$  hours), temperature ( $T = 60$  and  $85$  °C) and liquid/solid ratio ( $R L/S = 6 - 25$ ) in the pretreatment and the use of distinct enzymatic complexes, *Accellerase® 1500* (Genencor International, B.V.), *GC 151* (Genencor International, B.V) and *Viscamyl Flow* (DuPont Industrial Biosciences), and respective dosage ratios (*Accellerase*; GC:VIS  $\mu L/g$ ), in the enzymatic hydrolysis. At the final step of fermentation, the yield of ethanol production was assessed for two yeasts: *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*.

The best combination of parameters originated an average yield of total sugars of  $38.5$  g/100 g, which is made of  $0.92$  g/100 g cellobiose,  $5.38$  g/100 g glucose,  $29.84$  g/100 g xylose and  $3.13$  g/100 g arabinose, with generation of  $0.08$  g/L of acetic acid and no concentration of inhibiting compounds (furfural and hydroxymethylfurfural). The conditions of this assay were:  $c H_2SO_4 = 3\%$  v/v,  $t = 8$  hours,  $T = 85$  °C,  $R L/S = 15$  and GC:VIS =  $40:10$   $\mu L/g$ . Under these conditions, it was obtained a concentration of  $4.51$  g/L of ethanol, in 36 hours, using *Saccharomyces cerevisiae* and a concentration of  $2.09$  g/L of ethanol, in 24 hours, using *Pichia stipitis*.

The results of this project may stimulate the development of research on the valorization of SCG, thus exploiting it as a feedstock for the production of value-added products, and not only bioethanol, contributing to the progress of circular bioeconomy and sustainable development.

Keywords: Biowaste valorization, circular economy, enzymatic hydrolysis, fermentation, *Pichia stipitis*.





# Índice Geral

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Enquadramento do trabalho.....	1
1.2. Objetivo do trabalho.....	2
1.3. Organização do relatório.....	2
<b>2. Estado da arte.....</b>	<b>3</b>
2.1. O café.....	3
2.2. O café no mundo e seus resíduos.....	3
2.3. Valorização da borra de café.....	4
2.3.1. Caracterização físico-química da borra de café.....	4
2.3.2. Biorrefinaria de borra de café.....	8
2.3.3. Produção de bioetanol.....	10
2.3.3.1. Pré-tratamento.....	11
2.3.3.2. Hidrólise enzimática.....	13
2.3.3.3. Fermentação.....	15
2.3.3.4. Produção de bioetanol a partir da borra de café.....	16
<b>3. Descrição experimental.....</b>	<b>19</b>
3.1. Caracterização da borra de café.....	19
3.1.1. Determinação do teor de humidade.....	19
3.1.2. Determinação do teor de cinzas.....	19
3.1.3. Determinação do teor de matéria gorda.....	20
3.1.4. Determinação do teor de celulose bruta.....	20
3.1.5. Determinação do teor de lignina.....	20
3.2. Produção de bioetanol.....	21
3.2.1. Pré-tratamento.....	22
3.2.2. Hidrólise enzimática.....	22
3.2.3. Codificação dos ensaios.....	23
3.2.4. Determinação do teor de açúcares, compostos inibidores e etanol.....	25
3.2.5. Fermentação.....	26
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>29</b>
4.1. Caracterização química.....	29
4.2. Pré-tratamento e hidrólise enzimática - Concentração de açúcares e compostos inibidores.....	32

4.2.1. Conjunto de ensaios 1 (CE#1) – Planeamento experimental e tratamento estatístico.....	32
4.2.2. Conjunto de ensaios 2 (CE#2) – Estudo da concentração de ácido, tempo de pré-tratamento e dosagem das enzimas na hidrólise enzimática.....	36
4.2.3. Conjunto de ensaios 3 (CE#3) – Estudo do tempo de pré-tratamento e dosagem das enzimas na hidrólise enzimática.....	38
4.2.4. Conjunto de ensaios 4 (CE#4) – Estudo da razão líquido/sólido (R L/S) .....	41
4.3. Fermentação - Conjunto de ensaios 5 (CE#5) .....	41
4.4. Análise comparativa .....	43
<b>5. Conclusões e sugestões .....</b>	<b>47</b>
<b>Referências .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
Anexo A – Procedimento Experimental.....	53
A.1. Determinação do teor de humidade .....	53
A.2. Determinação do teor de cinzas.....	53
A.3. Determinação do teor de matéria gorda.....	54
A.4. Determinação do teor de celulose bruta.....	55
A.5. Determinação do teor de lignina total.....	56
A.6. Pré-tratamento da borra de café.....	58
A.7. Hidrólise enzimática .....	58
A.7.1. Hidrólise enzimática – Procedimento.....	58
A.8. Curvas de calibração e equações das retas para a quantificação dos açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e ácido acético.....	59
Anexo B – Resultados .....	63
B.1. Conjunto de ensaios 1 (CE#1) – Planeamento experimental e tratamento estatístico – Dados experimentais .....	63
B.2. Ensaios em autoclave e ensaios exploratórios – Dados experimentais.....	64
B.3. Conjunto de ensaios 2 (CE#2) – Dados experimentais.....	64
B.4. Conjunto de ensaios 3 (CE#3) – Dados experimentais.....	65
B.5. Conjunto de ensaios 4 (CE#4) – Dados experimentais.....	66

## Índice de figuras

Figura 2.1. Os subprodutos da baga de café. Adaptado de Campos-Vega et al., 2015. ....	4
Figura 2.2. Esquema de um modelo integrado de biorrefinaria para a valorização da borra de café. Adaptado de Kourmentza et al., 2018. ....	9
Figura 2.3. Esquema de um potencial modelo de biorrefinaria integrada para a valorização da borra de café. Adaptado de Massaya et al., 2019. ....	9
Figura 2.4. Representação de uma estrutura lignocelulósica, que mostra as frações celulósicas, hemicelulósicas e de lignina. Adaptado de Mussatto & Teixeira, 2010. ....	11
Figura 2.5. Representação esquemática da atividade das enzimas celulasas sobre a estrutura da celulose. Adaptado de Mussatto & Teixeira, 2010. ....	14
Figura 2.6. Conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono (Cassanego et al., 2008). ....	15
Figura 3.1. Esquema experimental do estudo da otimização do processo de produção de bioetanol a partir da borra de café. ....	22
Figura 4.1. Teor de humidade da borra de café determinado neste trabalho em comparação com os valores encontrado na literatura. ....	29
Figura 4.2. Teor de cinzas da borra de café determinado neste trabalho em comparação com os valores encontrado na literatura, em % m/m, em base seca. ....	30
Figura 4.3. Teor de celulose bruta da borra de café determinado neste trabalho, em comparação com outros valores existentes na literatura, expresso em % m/m, em base seca. ....	31
Figura 4.4. Teor de lignina insolúvel, solúvel e total, determinados neste trabalho, em comparação com outros valores existentes na literatura, em % m/m, em base seca. ....	31
Figura 4.5. Rendimentos médio em açúcares (glicose, xilose e arabinose) determinados no hidrolisado da borra de café neste trabalho e em outros estudos, expressos em g/100 g, em base seca. ....	44
Figura 4.6. Rendimentos médio em açúcares totais determinados no hidrolisado da borra de café neste trabalho e em outros estudos, expressos em g/100 g, em base seca. ....	44
Figura 4.7. Composição média dos açúcares fermentescíveis no hidrolisado da borra de café, para os ensaios sob condições otimizadas, em % m/m. ....	45

## Índice de tabelas

Tabela 2.1. Composição química da borra de café, expressa em m/m % (Massaya et al., 2019; Mussatto, Carneiro, et al., 2011). .....	5
Tabela 2.2. Composição dos lipídios e compostos insaponificáveis da borra de café (Massaya et al., 2019; Mussatto, Carneiro, et al., 2011). .....	6
Tabela 2.3. Composição de fenólicos totais, flavonoides e ácidos clorogênicos totais da borra de café (Panusa et al., 2013). .....	7
Tabela 2.4. Composição mineral da borra de café (Mussatto, Machado, et al., 2011a). .....	7
Tabela 2.5. Composição de celulose, hemicelulose e lignina de certos resíduos lignocelulósicos (Bernardes Costa et al., 2021). .....	10
Tabela 2.6. Tabela comparativa de diferentes métodos de pré-tratamento (Aggarwal et al., 2022). ....	12
Tabela 2.7. Resultados de estudos descritos na literatura, relativamente à obtenção de açúcares fermentescíveis e bioetanol, a partir da borra de café. ....	17
Tabela 3.1. Descrição dos tipos de enzimas presentes nos complexos enzimáticos utilizados e as suas respetivas atividades enzimáticas e gama de pH ótimo de atividade. ....	22
Tabela 3.2. Planeamento experimental $2^3$ dos ensaios de pré-tratamento em banho termostático (CE#1), com razão líquido/sólido (R L/S = 15) constante. ....	23
Tabela 3.3. Ensaios de pré-tratamento realizados em autoclave (A, B e C) e ensaios exortatórios (SH e SP). .....	24
Tabela 3.4. Ensaios com valores de concentração de $H_2SO_4$ e tempo variados no pré-tratamento, variadas dosagens de enzimas na hidrólise enzimática e com temperatura de reação ( $T = 85\text{ }^\circ\text{C}$ ) e razão líquido/sólido (R L/S = 15) constantes no pré-tratamento (CE#2). .....	24
Tabela 3.5. Ensaios com valores de tempo variados no pré-tratamento, variadas dosagens de enzimas na hidrólise enzimática e com temperatura de reação ( $T = 85\text{ }^\circ\text{C}$ ), razão líquido/sólido (R L/S = 15) e concentração de $H_2SO_4$ (C = 3%) constantes no pré-tratamento (CE#3). .....	25
Tabela 3.6. Ensaios com variados valores de R L/S e com valores fixos de dosagem de enzimas (VIS:GC 40:10), temperatura de reação ( $T = 85\text{ }^\circ\text{C}$ ), concentração de $H_2SO_4$ (C = 3%) e tempo c ( $t = 8\text{ h}$ ) no pré-tratamento (CE#4) .....	25
Tabela 3.7 Conjunto de ensaios 5 (CE#5), realizado sob condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática conforme ensaio R0 e submetidos a fermentação. Cada ensaio foi realizado em triplicado. ....	26
Tabela 4.1. Resultados experimentais da caracterização química da borra de café, em base seca % m/m, com exceção do teor de humidade. ....	29
Tabela 4.2. Rendimento médio em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no primeiro conjunto de ensaios (CE#1) de pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática com Accellerase® 1500. ....	33
Tabela 4.3. Tratamento estatístico dos dados do planeamento experimental (CE#1). Valores de F calculado para cada parâmetro e o respetivo efeito, para um nível de confiança de $p = 0,05$ (5%). .....	34

Tabela 4.4. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios de pré-tratamento em autoclave seguido de hidrólise enzimática com Accellerase® 1500 (A,B e C) e nos ensaios em banho termostaticado sem hidrólise enzimática (SH) e sem pré-tratamento (SP) .....	35
Tabela 4.5. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios 2 (CE#2), de pré-tratamento em banho termostaticado seguido de hidrólise enzimática com Viscamyl Flow e GC 151 .....	36
Tabela 4.6. Aumento de açúcares (glicose, em g/100 g, pentoses e totais, em %) na hidrólise enzimática, relativamente ao pré-tratamento, no conjunto de ensaios número 2 (CE#2). .....	37
Tabela 4.7. Rendimento de hidrólise em glicose, relativamente ao teor de celulose bruta determinada da borra de café, expresso em % m/m. ....	38
Tabela 4.8. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios 3 (CE#3), de pré-tratamento em banho termostaticado seguido de hidrólise enzimática com Viscamyl Flow e GC 151 .....	39
Tabela 4.9. Aumento dos açúcares (glicose, em g/100 g, pentoses e totais, em %) na hidrólise enzimática, relativamente ao pré-tratamento, no conjunto de ensaios número 3 (CE#3). .....	40
Tabela 4.10. Rendimento de hidrólise em termos de glicose, relativamente ao teor de celulose bruta determinada da borra de café, expresso em % m/m. ....	40
Tabela 4.11. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios 4 (CE#4), de pré-tratamento em banho termostaticado seguido de hidrólise enzimática com Viscamyl Flow e GC 151 .....	41
Tabela 4.12. Resultados obtidos para o conjunto de ensaios CE#5, referente aos rendimentos em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose), concentração de ácido acético e concentração de etanol obtida na fermentação dos hidrolisados.....	42
Tabela B.1. Dados experimentais do conjunto de ensaios 1 (CE#1) e respetivos resultados.....	63
Tabela B.2. Dados experimentais do conjunto de ensaios em autoclave e ensaios exploratórios.....	64
Tabela B.3. Dados experimentais do conjunto de ensaio 2 (CE#2) e respetivos resultados. ....	64
Tabela B.4. Dados experimentais do conjunto de ensaio 3 (CE#3) e respetivos resultados. ....	65
Tabela B.5. Dados experimentais do conjunto de ensaio 4 (CE#4) e respetivos resultados. ....	66

# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento do trabalho

O recente crescimento da conscientização ambiental juntamente com a criação de leis mais rígidas para a promoção do desenvolvimento sustentável e a adoção da economia circular em diversos setores da sociedade, à nível mundial, têm estimulado os esforços na pesquisa e investigação do desenvolvimento de biorrefinarias sustentáveis. Nestas são utilizados materiais que até então eram tratados como resíduos, como substratos que servem como fontes para a produção/recuperação de compostos de valor agregado (Kourmentza et al., 2018). O café é uma das bebidas mais populares no mundo, sendo a segunda mercadoria mais comercializada depois do petróleo e, portanto, a indústria do café é responsável pela geração de uma quantidade imensa de resíduos, os quais são produzidos ao longo de toda a cadeia de produção do café (Mussatto, Machado, et al., 2011a; Rajesh Banu et al., 2020).

Dentre estes resíduos, a película prateada (*silverskin*, em inglês) e a borra de café, que são produzidos após a torrefação e infusão do café, respetivamente, são os mais relevantes do ponto de vista da valorização biotecnológica (Mussatto, Machado, et al., 2011a).

Aproximadamente 5.817.500 toneladas de borra de café são geradas todos os anos ao redor do mundo como um resíduo sólido urbano, criando assim uma imensa corrente deste resíduo, que é convencionalmente descartado em águas e aterros, causando lixiviação dos solos com compostos bioativos (Massaya et al., 2019).

Neste sentido, a borra de café se apresenta como um substrato ideal para a bioeconomia, com um imenso potencial de valorização em esquemas de biorrefinarias sustentáveis (Kourmentza et al., 2018).

Devido à sua composição físico-química, a borra de café pode ser utilizada para extração e isolamento de diversos açúcares, lipídios, proteínas e compostos bioativos de elevado valor. Ademais, ao ser submetida a transformações químicas, termoquímicas e/ou biotecnológicas, através de tecnologias de conversão, pode se obter produtos de elevado valor, como combustíveis, bioplásticos e outros materiais funcionais (Massaya et al., 2019).

Uma vez que aproximadamente 50% do peso da borra de café seca corresponde a carboidratos, sendo a sua maioria (açúcares) hexoses, presentes na fração hemicelulósica do material, esta se torna atrativa para a produção de bioetanol, constituindo adicionalmente uma vantagem em relação a outros materiais lignocelulósicos, dado que grande parte dos açúcares facilmente fermentescíveis podem ser liberados do material utilizando pré-tratamentos leves, tal como a hidrólise ácida com ácido diluído (Mussatto et al., 2010).

A produção de bioetanol a partir da borra de café consiste em três etapas: i) pré-tratamento, o qual é comumente realizado por via ácida ou alcalina, ii) hidrólise, a qual pode ser realizada por via enzimática ou ácida e iii) fermentação dos açúcares (Mussatto et al., 2010).

Neste trabalho, pretendeu-se estudar o efeito das condições operatórias do pré-tratamento da borra de café, nomeadamente a concentração do ácido, tempo e temperatura de reação, e a razão líquido/sólido (R L/S), isto é, a proporção volume de solução ácida / massa de borra de café utilizada e, analisar como estas variáveis influenciam o rendimento em açúcares disponíveis para a etapa subsequente de hidrólise enzimática. Adicionalmente, pretendeu-se estudar a hidrólise enzimática relativamente ao tipo de complexo enzimático e a sua respetiva dosagem aplicada na solução de borra de café pré-tratada e, analisar o rendimento em açúcares que serão posteriormente fermentados para a produção de bioetanol.

## **1.2. Objetivo do trabalho**

O objetivo deste trabalho consistiu na otimização das condições operatórias do processo de produção do bioetanol a partir da borra de café, através do estudo das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, na perspectiva de maximizar o rendimento em açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol.

## **1.3. Organização do relatório**

O presente relatório está estruturado em 5 capítulos essenciais.

No capítulo 1, realiza-se uma introdução ao tema do trabalho, referindo-se ao seu objetivo central e como a dissertação está organizada.

No capítulo 2, apresenta-se o estado da arte da valorização da borra de café, no que concerne os potenciais de sua valorização em vias de desenvolvimento e a sua utilização como matéria-prima na produção de bioetanol.

No capítulo 3, está descrita a parte experimental do trabalho, nomeadamente os materiais e métodos de caracterização utilizados, os procedimentos experimentais de pré-tratamento e hidrólise enzimática e os parâmetros aplicados na produção de bioetanol.

No capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos, discutindo-os e comparando-os com os obtidos em outros trabalhos relacionados.

No capítulo 5 é realizada uma conclusão acerca dos resultados obtidos, bem como são feitas sugestões para trabalhos futuros.

Adicionalmente, encontra-se disponível a lista de referências bibliográficas utilizadas como suporte para o desenvolvimento da dissertação e uma seção onde se encontram disponíveis os anexos, nos quais se demonstram detalhadamente os métodos utilizados, assim como os resultados pormenorizados que foram relevantes para a elaboração deste trabalho.



## 2. Estado da arte

### 2.1. O café

Os grãos de café que são torrados, triturados e infundidos para produzir a bebida popularmente conhecida em todo mundo são, na verdade, sementes retidas em frutos do cafeeiro, uma planta originária das florestas tropicais na Etiópia, conhecida há mais de 1000 anos. (Farah & dos Santos, 2015; Mussatto, Machado, et al., 2011a).

A planta do café, o cafeeiro, é um arbusto que pertence à família *Rubiaceae*, do gênero *Coffea* L., da qual são conhecidas mais de 100 espécies. Entretanto, atualmente somente duas destas espécies são amplamente exploradas comercialmente: *Coffea arabica* (Arabica), considerada a mais relevante de todas, caracterizada por um sabor aromático e suave, que representa cerca de 60% da produção mundial; e *Coffea canephora* (Robusta), caracterizada pelo seu sabor amargo e maior resistência a pragas, que representa cerca de 40% da produção mundial (Mussatto, Machado, et al., 2011b).

Existem alguns fatores edafoclimáticos que condicionam a qualidade dos grãos de café, nomeadamente a terra, clima, espaço de cultivo e presença de pragas. Por exemplo, a *C. Arabica* cresce em altitudes elevadas (600 – 2.000 m) e temperaturas amenas, podendo alcançar até 6 metros de altura, enquanto a *C. Canephora* cresce em altitudes abaixo de 600 m e com temperaturas mais quentes, podendo alcançar 10 metros de altura (Farah & dos Santos, 2015).

O café passa por alguns processos desde o seu estado *in natura* até se transformar na bebida que é conhecida. As bagas de café são os frutos *in natura* do café, que são colhidos após cerca de 5 anos de cultivo do cafeeiro, quando se atinge o seu amadurecimento, estado este reconhecido pela mudança de cor verde para vermelho (Mussatto, Machado, et al., 2011a).

O processamento do café *in natura* inicia com a remoção da polpa dos grãos, utilizando um método seco ou húmido, sendo estes utilizados para o café Robusta e Arabica, respetivamente, obtendo assim grãos verdes de café. Em seguida, estes grãos são submetidos à torrefação, etapa esta crucial para o desenvolvimento das características organolépticas do café. Após a torrefação, os grãos podem ser embalados e comercializados como grãos inteiros ou triturados, embalados a vácuo e comercializados como café em pó (Mussatto, Machado, et al., 2011a).

### 2.2. O café no mundo e seus resíduos

O café é uma das bebidas mais populares do mundo e a segunda mercadoria de maior valor de mercado depois do petróleo, com um valor global de mercado de 90,15 mil milhões de euros. O consumo do café tem crescido a cada ano e consequentemente aumentado a sua produção, a nível mundial (Rajesh Banu et al., 2020). Em 2020/2021, 170 milhões de sacas de 60 kg de café foram produzidas, o que representa um aumento de 0,5% relativamente ao ano anterior, sendo o Brasil o maior produtor (63 milhões), seguido do Vietnã (29 milhões), Colômbia (14 milhões) e Indonésia (11 milhões) (International Coffee Organization (ICO), 2021b). No ano de 2020/2021 foram consumidas 166 milhões de sacas de 60 kg de café em todo o mundo, caracterizado por uma taxa de crescimento anual de 1,0% desde 2017/2018 (International Coffee Organization (ICO), 2021a).

Com esta elevada e crescente taxa de consumo, são geradas quantidades enormes de resíduos sólidos na indústria do café. Estes resíduos, também considerados subprodutos, são gerados ao longo de toda a cadeia de produção do café, desde a colheita à infusão do café. Os resíduos vêm em forma de mucilagem, filme prateado (*silverskin*, em inglês), cascas de café e borra de café, os quais são convencionalmente limitados a aplicações como fertilizante, comida animal, compostagem, etc (Campos-Vega et al., 2015).

Estes subprodutos (Figura 2.1) consistem em cerca de 50% da massa do fruto do café e também são considerados potenciais ingredientes funcionais para a indústria alimentar, assim como recursos valiosos para diversas aplicações, como por exemplo a extração de cafeína e polifenóis.

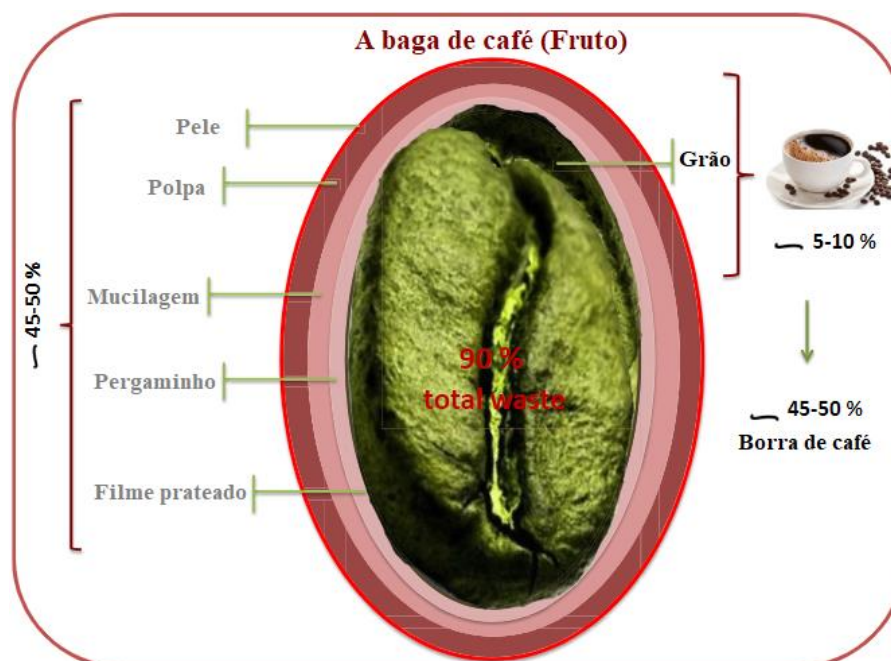


Figura 2.1. Os subprodutos da baga de café. Adaptado de Campos-Vega et al., 2015.

Dentre estes, a borra de café é um resíduo insolúvel gerado após a moagem e infusão do grão de café. Cerca de 90% do café infundido vira borra de café. Estimativas indicam que 650 kg de borra de café são gerados a partir de 1 tonelada de café cru e 2 kg de borra de café húmida são obtidos a partir de 1 kg de café solúvel. Somente as cafeterias e a preparação de café solúvel nas indústrias, contribuem para a geração de 50% de toda borra de café, sendo o restante gerado pelo uso doméstico (Rajesh Banu et al., 2020).

A borra de café é caracterizada pelo seu tamanho de partícula fino, alta humidade, carga orgânica e acidez, o que a torna tóxica ao ambiente e com elevado poder de contaminação quando descartada ao ambiente. Devido a mesma razão, mais investigações têm sido direcionadas à borra de café, de forma a explorar o seu potencial tecnológico e desenvolver plataformas eficazes de valorização (Kourmentza et al., 2018).

## 2.3. Valorização da borra de café

### 2.3.1. Caracterização físico-química da borra de café

A borra de café é caracterizada por um valor alto biológico, sendo considerado um material composto natural, devido a presença de fibras cruas (lignina, hemicelulose, celulose, poli-, oligo- e monossacarídeos), lipídios (triacilglicerídeos, ácidos gordos livres e esteróis), compostos nitrogenados (proteínas, peptídeos livres, aminoácidos, melanoidinas) e minerais. Contém também pequenas quantidades de compostos biologicamente ativos, nomeadamente alcalóides (cafeína e trigonelina), diterpenos (cafestol e kahweol), polifenóis (ácidos clorogénicos, taninos, tocoferóis e antocianinas), os quais são responsáveis pela atividade antioxidante, antimicrobiana e anticarcinogénica observadas na borra de café (Massaya et al., 2019; Mussatto, Machado, et al., 2011a).

A composição química da borra de café varia de acordo com fatores associados à cadeia de produção do café, tais como as condições associadas à colheita (clima, qualidade do solo, espécie, variedade, maturação à colheita, etc.), ao pós-colheita (armazenamento e outros), torrefação

(temperatura, tempo, etc.) e método de infusão aplicado ao café, que irão determinar a identidade e quantidade de compostos presentes no café. Por fim, os métodos de extração e caracterização utilizados para isolar e identificar os constituintes do café terá também influência na determinação do seu perfil químico (Massaya et al., 2019).

Dada a sua valiosa composição química (Tabela 2.1), tem-se visto um crescente interesse no seu potencial de valorização biotecnológico.

Tabela 2.1. Composição química da borra de café, expressa em m/m % (Massaya et al., 2019; Mussatto, Carneiro, et al., 2011).

<b>Componente</b>	<b>Borra de café (% m/m)</b>
Proteína	10 - 18
Celulose	7 - 19
Hemicelulose	32 - 42
Lipídios	2 - 24
Cinza	1 - 2
Lignina	0 - 39
Cafeína	0 - 0,4
Ácidos clorogénicos	1 - 3
Humidade	50 - 60
Açúcares totais	7 - 14
Fibras dietéticas totais	21 - 59
Razão C/N	17*
Poder calorífico	26,9**

\*Valor obtido de Rajesh Banu et al., 2020.

\*\* Valor obtido de Rajesh Banu et al., 2020, expresso em MJ/kg.

Grande parte dos polissacarídeos presentes no fruto do café permanecem na borra de café na forma de material insolúvel. Os açúcares se encontram na forma polimerizada, na estrutura de celulose e hemicelulose, consistindo em aproximadamente metade da composição da borra de café (40 - 55% m/m, peso seco) (Mussatto, Carneiro, et al., 2011).

Tal como dito anteriormente, a composição química pode variar de acordo com a espécie de café, fatores edafoclimáticos associados ao cultivo do café e processos utilizados na torrefação e extração da bebida do café. Além disso, o café pode também conter pequenas quantidades de produtos resultantes da quebra de açúcares, nomeadamente o hidroximetilfurfural (HMF), furfural (F), ácido acético (AA) e ácido levulínico (AL) (Mussatto, Carneiro, et al., 2011).

Os lipídios presentes na borra de café consistem em mono-, di- e triglicerídeos, ácidos gordos livres e compostos insaponificáveis, nomeadamente diterpenos, esteróis e tocoferóis (Tabela 2.2) (Massaya et al., 2019). Glicerídeos e ácidos gordos constituem aproximadamente 80 - 90% da composição dos lipídios presentes na borra de café. Estes diterpenos (kahweol e cafestol) ocorrem esterificados nos ácidos gordos, sendo apenas uma pequena quantidade presente na forma livre, em concentrações de até 1,3% m/m. Os esteróis (beta-sitosterol, estigmasterol e campesterol) podem chegar a concentrações de 15,6% (Massaya et al., 2019).

Técnicas de extração verde são geralmente aplicadas na extração destes compostos, nomeadamente a extração utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico e co-solventes, de forma a ser compatível com aplicações medicinais, nutracêuticas, cosméticas, entre outras (Massaya et al., 2019).

As proteínas da borra de café possuem níveis similares ou superiores de aminoácidos essenciais, tais como leucina, valina, fenilalanina e isoleucina, comparativamente a produtos alimentares convencionais, como a soja. Os aminoácidos essenciais consistem em aproximadamente metade (49%) dos aminoácidos totais presentes na borra de café, sendo a leucina presente em maior quantidade (13 – 21%) (Campos-Vega et al., 2015; Massaya et al., 2019).

Tabela 2.2. Composição dos lípidios e compostos insaponificáveis da borra de café (Massaya et al., 2019; Mussatto, Carneiro, et al., 2011).

<b>Lipídios</b>	<b>Composição (% m/m)</b>
Ácido linoleico	40 – 50
Ácido palmítico	30 – 40
Ácido oleico	6 – 10
Ácido esteárico	7 – 9
Ácido araquídico	1 – 4
Ácido linolénico	0,5 – 2
<b>Compostos insaponificáveis</b>	<b>Composição (% m/m)</b>
Cafestol	0,47
Kahweol	0,21
Beta-sitosterol	3,48 – 7,12
Estigmasterol	2,90 – 6,04
Campesterol	1,19 – 2,44
β-tocoferol	0,84 – 2,09
α-tocoferol	0,06 – 0,28

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, em inglês), nomeadamente a leucina, valina e isoleucina e os aminoácidos aromáticos (AAA), nomeadamente a fenilalanina e tirosina, estão presentes nas proteínas em relativamente altas e baixas quantidades (5,12 – 21% e 0,9 – 1,51% de proteína total, respetivamente) (Massaya et al., 2019).

A razão de Fischer (BCAA/AAA) na borra de café é de 3,4 – 24,1. Proteínas com razão de Fischer superior a 20 e teor de AAA inferior a 2% são utilizados no tratamento de pacientes com encefalopatia hepática, o que indica a aplicabilidade das proteínas derivadas da borra de café em alimentos funcionais (Campos-Vega et al., 2015).

Os compostos fenólicos na borra de café são constituídos principalmente por ácido clorogénico (ACG), ácido protocatecuico (APC), melanoidinas e taninos, tais como o ácido gálico (Tabela 2.3). Juntamente com compostos nitrogenados, nomeadamente a cafeína e trigonelina, estes compostos presentes em menores quantidades têm alto potencial farmacológico devido a demonstrados efeitos fisiológicos (Campos-Vega et al., 2015).

A maioria dos ACGs presentes na borra de café são ácidos quínicos, com uma fração de ácido ferúlico (AF) e até duas frações de ácido cafeoilquínico (ACQ). Os ACGs também contêm pequenas quantidades de ácidos  $\rho$ -coumarolquínico e feruloilquínico (Campos-Vega et al., 2015).

Os ACQs consistem em aproximadamente 80% de todo o teor em ACG, sendo que o 3-ACQ (ácido 3-cafeoilquínico) corresponde a 60%. Por esta razão, o ACG é normalmente referido por 3-ACQ, e é largamente utilizado como um padrão analítico na quantificação de ACG (Panusa et al., 2013).

Além disso, as fibras da borra de café apresentam propriedades antioxidantes, com 2,4 mmol trolox/100 g em peso seco, valor similar a compostos antioxidantes reconhecidos encontrados no vinho tinto e no pêssego (Massaya et al., 2019).

*Tabela 2.3. Composição de fenólicos totais, flavonoides e ácidos clorogénicos totais da borra de café (Panusa et al., 2013).*

Material	Compostos fenólicos totais (mg GAE/g)	Flavonoides (mg QE/g)	Ácidos clorogénicos totais (mg ACQ/g)
Borra de café	6,3 – 28,3	17,0 – 65,0	1,6 – 6,1

Adicionalmente, a fração inorgânica da borra de café contém microelementos em abundância tais como potássio, fósforo, magnésio, entre outros (Tabela 2.4).

*Tabela 2.4. Composição mineral da borra de café (Mussatto, Machado, et al., 2011a).*

Minerais	Composição (mg/kg)
Potássio	3.549,0
Fósforo	1.475,1
Magnésio	1.293,3
Cálcio	777,4
Alumínio	279,3
Ferro	118,7
Manganês	40,1
Cobre	32,3
Zinco	15,1

Do ponto de vista da biorrefinaria, a borra de café é uma matéria-prima essencialmente lignocelulósica (Mussatto, Carneiro, et al., 2011).

A elevada quantidade de compostos químicos bioativos presentes na borra de café, bem como a ecotoxicidade associada a esta, se apresentam como motivação para a pesquisa e investigação na recuperação e valorização deste resíduo para aplicações nas indústrias da química fina, alimentar, cosméticas, nutracêuticas, entre outras (Massaya et al., 2019).

No âmbito da sustentabilidade socioambiental, atividades de investigação têm dirigido esforços na transformação desta biomassa em uma variedade de produtos de valor agregado, produtos energéticos e produtos químicos, através do desenvolvimento de tecnologias integradas para o fracionamento da borra de café, isolando compostos bioativos de alto valor e/ou moléculas precursoras. Neste sentido, é necessário analisar as classes de compostos presentes na borra de café, conhecer suas propriedades inerentes e o seu potencial de geração de valor.

A partir da transformação química, termoquímica e/ou biotecnológica da borra de café, através de tecnologias de conversão conhecidas, tais como extrações, transesterificações, hidrólise, fermentação e pirólise, é possível a transformação da borra de café em biocombustíveis, nomeadamente o biogás, bioetanol, bio-óleo, biodiesel, hidratos de carbono e produtos de valor agregado, tais como adsorventes, compostos bioativos, biochar, adubo, polihidroxialcanoatos (PHA), para além dos produtos primários, com uma redução significativa de resíduos (Rajesh Banu et al., 2020).

Dado o potencial de valorização da borra de café, diversos estudos têm implementado métodos de biorrefinaria com abordagens integradas, que maximizam o valor dos produtos obtidos a partir da biomassa residual.

### **2.3.2. Biorrefinaria de borra de café**

A biorrefinaria é um processo sustentável de conversão de biomassa em combustíveis, energia e produtos químicos de valor agregado, que utilizada diversas tecnologias de conversão e métodos de tratamento, com o objetivo de maximizar o valor gerado a partir da biomassa, através da co-produção e isolamento de produtos de alto, médio e/ou baixo valor. As características e disponibilidade do resíduo, assim como o interesse económico dos produtos a serem produzidos são os principais fatores a serem considerados na implementação e desenvolvimento de um processo de biorrefinaria (Rajesh Banu et al., 2020).

Este conceito de abordagem de valorização da borra de café, em processos faseados e integrados, é ainda emergente. Diversos estudos têm sido publicados recentemente com propostas de modelos de estruturas de biorrefinaria, tendo a borra de café como matéria-prima. A análise da disponibilidade tecnológica, viabilidade económica, impacte ambiental e da conceptibilidade destes processos em larga escala deve ser realizada, de forma a dar credibilidade ao conceito de biorrefinaria baseada na borra de café (Rajesh Banu et al., 2020).

Um esquema de biorrefinaria integrada (Figura 2.2) pode ter diversas estruturas, a depender do objetivo de produção - se somente um ou mais tipos de produtos - e das tecnologias a serem utilizadas (Kourmentza et al., 2018).

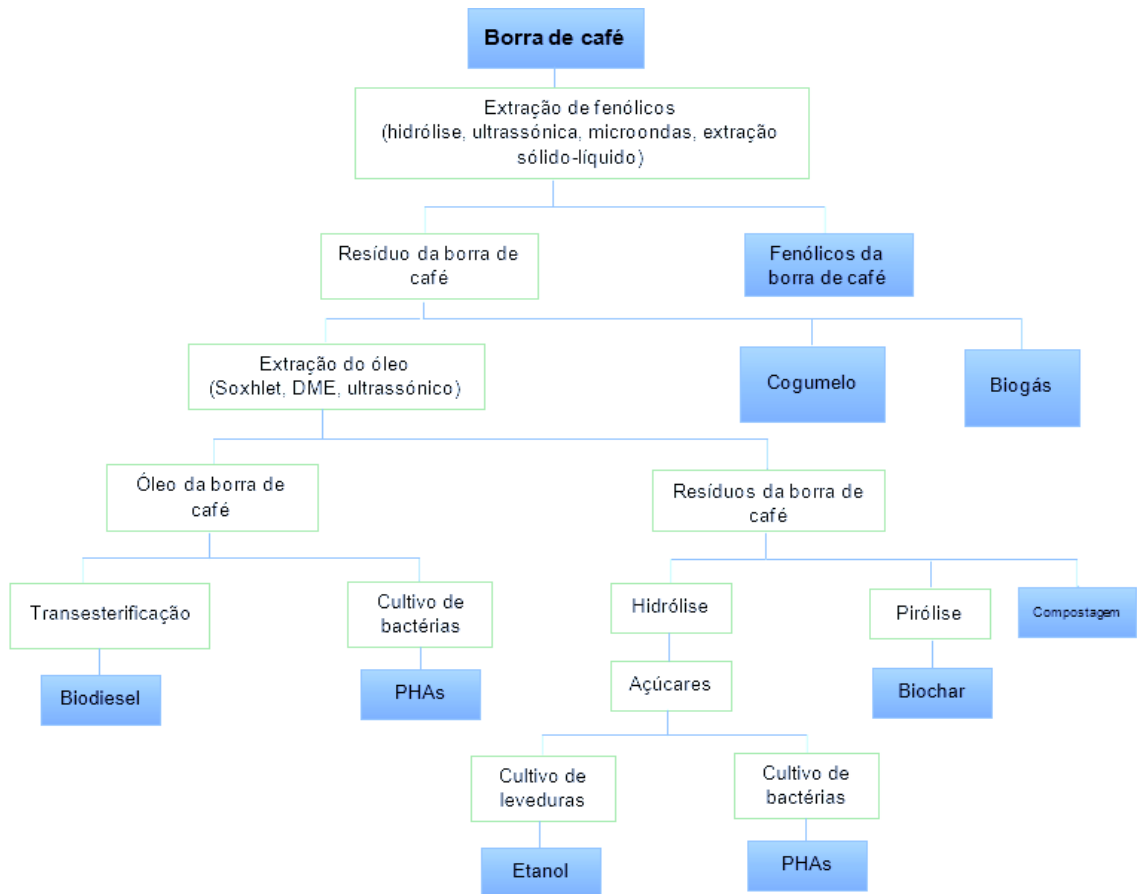


Figura 2.2. Esquema de um modelo integrado de biorrefinaria para a valorização da borra de café. Adaptado de Kourmentza et al., 2018.

Alguns estudos propõem a separação da biomassa inicial em duas correntes, por extrações polares/aquosas de bioativos e/ou carboidratos e por uma extração não polar (Figura 2.3).

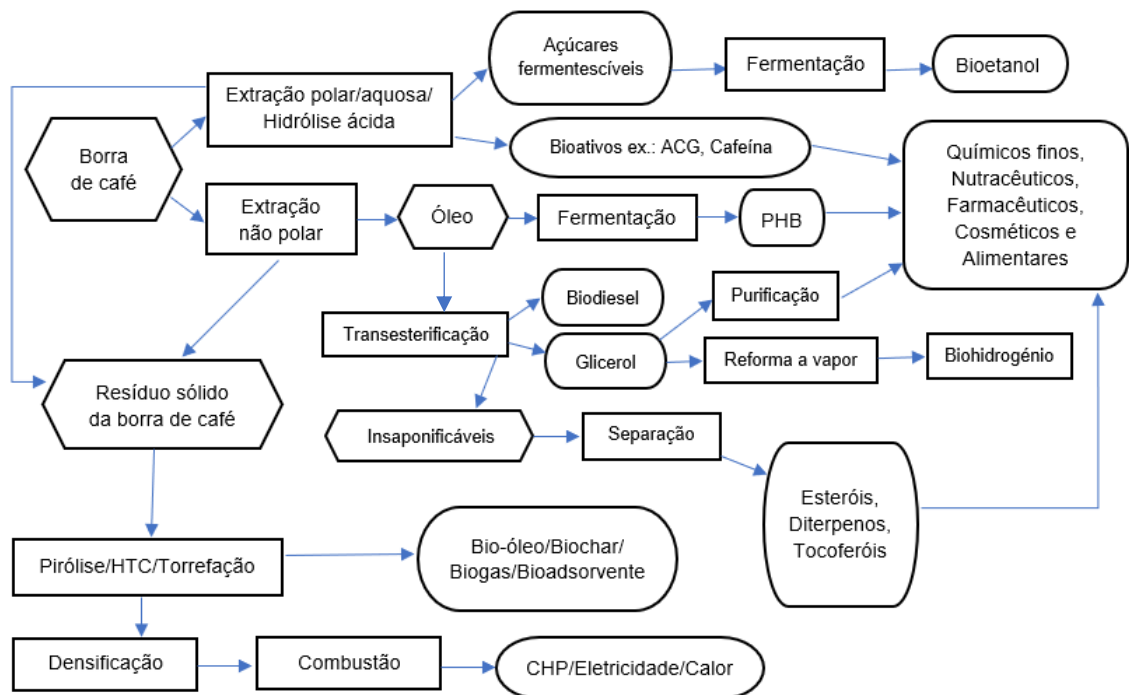


Figura 2.3. Esquema de um potencial modelo de biorrefinaria integrada para a valorização da borra de café. Adaptado de Massaya et al., 2019.

Na corrente dos óleos, estes podem ser utilizados para a coprodução de biodiesel e glicerol (Caetano et al., 2014, 2017), ou serem convertidos em polihidroxialcanoatos (PHA). O glicerol pode ser subsequentemente convertido em biohidrogénio e os resíduos sólidos de ambas as correntes, assim como a borra de café crua, podem ser convertidos em combustíveis líquidos, gasosos e sólidos, energia e materiais compósitos, ou serem utilizados como substrato para cultivo de cogumelos, digestões microbianas aeróbicas e anaeróbicas (Freitas et al., 2018; Haile, 2014).

Na corrente aquosa, os açúcares fermentáveis podem ser convertidos em bioetanol, ácido láctico e outras moléculas precursoras, através de digestões anaeróbicas e aeróbicas (Massaya et al., 2019).

### 2.3.3. Produção de bioetanol

O esgotamento de matérias-primas fósseis, juntamente com a problemática das elevadas emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e segurança energética, têm feito crescer o interesse no desenvolvimento de fontes de energia alternativas e renováveis. Hoje em dia, a biomassa é o único recurso renovável capaz de satisfazer essa necessidade de produção de combustíveis alternativos, tais como o bioetanol e biodiesel, pois contém grandes quantidades de polímeros de açúcares, nomeadamente a celulose e as hemiceluloses (Alvira et al., 2010; Xiros et al., 2013).

O bioetanol é tradicionalmente produzido a partir de culturas açucareiras e alimentares, como a cana de açúcar, milho e beterraba, sendo assim chamado de combustível de primeira geração. Entretanto, diversos estudos indicam que o uso exclusivo destas matérias-primas para a produção de biocombustível causa diversos danos ambientais a longo prazo, além de competir com culturas alimentares, fazendo aumentar o preço dos alimentos (Aggarwal et al., 2022).

Neste contexto, a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, chamado assim de etanol de segunda geração, surge como uma alternativa, uma vez que as matérias-primas lignocelulósicas não competem com culturas alimentares, são mais baratas do que matérias-primas agrícolas convencionais, contribuindo para a sustentabilidade ambiental e socioeconómica, pois incrementam a renda do produtor agrícola e desenvolvem as regiões onde há elevada disponibilidade do material (Aditya et al., 2016; Aggarwal et al., 2022).

A biomassa lignocelulósica provém de resíduos agrícolas, industriais e urbanos (a grande maioria é oriunda do setor agrícola e florestal), os quais são importantes fontes de matéria-prima renovável. Estes materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, e podem apresentar composição variável (Tabela 2.5) (Bernardes Costa et al., 2021).

*Tabela 2.5. Composição de celulose, hemicelulose e lignina de certos resíduos lignocelulósicos (Bernardes Costa et al., 2021).*

<b>Material lignocelulósico</b>	<b>Celulose %</b>	<b>Hemicelulose %</b>	<b>Lignina %</b>
Palha de cana de açúcar	40 – 44	30 – 32	22 - 25
Bagaço de cana de açúcar	32 – 48	19 – 24	23 - 32
Espiga de milho	45	35	15
Palha de trigo	30	50	15
Borra de café	7 – 19	32 – 42	0 - 39

A celulose e hemiceluloses presentes na biomassa lignocelulósica, quando submetidas a hidrólise, são convertidas em glicose e outros açúcares fermentescíveis que, por sua vez, podem ser convertidos em combustíveis líquidos, como o etanol. O processo de produção do etanol lignocelulósico, portanto, envolve três etapas fundamentais: i) pré-tratamento, ii) hidrólise (ácida ou enzimática) e iii) fermentação (Aggarwal et al., 2022; Alvira et al., 2010; Xiros et al., 2013).



A hidrólise, também chamada de sacarificação, é o principal entrave na consolidação da produção de etanol a partir de material lignocelulósico. A hidrólise de material lignocelulósico torna-se difícil devido a fatores físico-químicos e estruturais do material. As fortes ligações glicosídicas da celulose, juntamente com a sua respetiva estrutura cristalina, requer condições físico-químicas agressivas ou a utilização de um consórcio de diferentes complexos enzimáticos. Tais requisitos são os principais fatores que encarecem a construção de reatores de sacarificação e os processamentos *downstream*. Devido a estas características estruturais, a etapa de pré-tratamento é fundamental para a obtenção de açúcares potencialmente fermentáveis (Banerjee et al., 2010; Bernardes Costa et al., 2021).

Existe uma extensa pesquisa acerca das tecnologias de pré-tratamento atualmente, visando identificar, avaliar, desenvolver e demonstrar ótimas abordagens que serviram de apoio à etapa subsequente de hidrólise enzimática, de forma a reduzir as dosagens de enzima e o tempo de conversão (Aggarwal et al., 2022).

Uma vez que os materiais lignocelulósicos possuem características físico-químicas distintas, é necessário adotar tecnologias de pré-tratamento adaptadas, baseado nas propriedades da biomassa lignocelulósica de cada material. Além disso, a escolha de dada tecnologia de pré-tratamento a ser empregada, terá impacto considerável em todas as etapas subsequentes, no esquema de conversão geral em termos de digestibilidade da celulose, na geração de compostos tóxicos potencialmente inibidores para a levedura, na exigência de potência de agitação, no consumo energético nos processos *downstream* e no tratamento das águas residuais (Aggarwal et al., 2022; Alvira et al., 2010).

### 2.3.3.1. Pré-tratamento

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por fibras de celulose envolvidas numa matriz de hemicelulose e lignina, que agem como uma proteção natural, tornando-os assim estruturalmente rígidos e pouco reativos (Figura 2.4) (Mussatto & Teixeira, 2010).

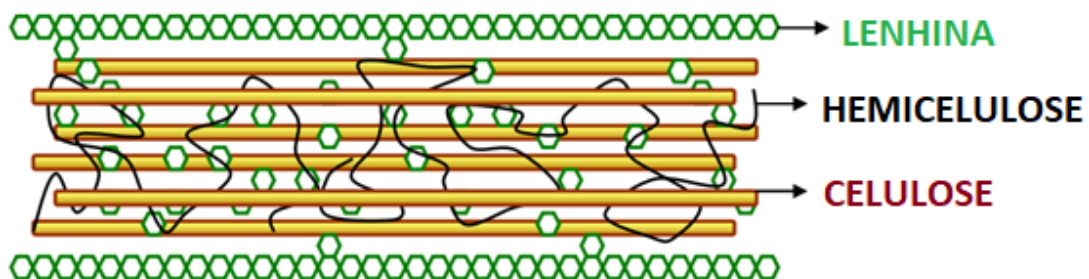


Figura 2.4. Representação de uma estrutura lignocelulósica, que mostra as frações celulósicas, hemicelulósicas e de lignina. Adaptado de Mussatto & Teixeira, 2010.

Um dos principais aspectos a considerar relativamente à produção de bioetanol é a recalcitrância da biomassa, a qual reduz a acessibilidade aos carboidratos e, portanto, limita a liberação de açúcares fermentáveis (Aggarwal et al., 2022). Por esta razão, o objetivo do pré-tratamento é quebrar a estrutura da lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, aumentando a sua área superficial e facilitando o acesso das enzimas aos polissacarídeos nas etapas subsequentes de hidrólise enzimática (Mussatto et al., 2010).

A complexa estrutura de materiais lignocelulósicos torna-os resistentes à hidrólise enzimática, dificultando a conversão da biomassa em biocombustível. Desta forma, ao desorganizar a estrutura da lignina e quebrar a biomassa lignocelulósica em seus constituintes, o pré-tratamento auxilia na resolução do problema da recalcitrância inerente aos materiais lignocelulósicos. O pré-tratamento aumenta a acessibilidade das enzimas hidrolíticas às celulosas e hemicelulosas presentes na biomassa, resultando

na produção de açúcares hexoses e pentoses, os quais são posteriormente fermentados para produzir biocombustíveis (Aggarwal et al., 2022).

Um pré-tratamento de baixo custo e eficaz deve satisfazer diversos requisitos:

- i) aumentar a formação de açúcares e/ou a capacidade de formação de açúcares através da etapa subsequente de hidrólise;
- ii) evitar perda ou degradação de açúcares;
- iii) evitar a formação de subprodutos inibidores aos processos subsequentes de hidrólise e/ou fermentação (Aditya et al., 2016; Alvira et al., 2010).

Existem outros fatores importantes, tais como a capacidade de operar em reatores de custo e tamanho moderado, não produzir resíduos sólidos, ser eficaz para materiais com baixo teor de humidade, ser capaz de recuperar a lignina e ter o mínimo possível de consumo de calor e energia (Alvira et al., 2010).

Para este efeito, diversas abordagens tecnológicas têm sido desenvolvidas, as quais podem ser classificadas como processos químicos, físicos, físico-químicos e biológicos (Tabela 2.6), sendo estas caracterizadas de acordo com as suas propriedades.

*Tabela 2.6. Tabela comparativa de diferentes métodos de pré-tratamento (Aggarwal et al., 2022).*

<b>Método</b>	<b>Tipo de processo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Químicos	Ácido	Hidrólise da hemicelulose em monómeros e auxílio na remoção da lignina	Altos custos devido à corrosão nos equipamentos e liberação de compostos tóxicos
	Alcalino	Remoção de uma grande parte da lignina e expansão da biomassa e aumento da área superficial disponível para as enzimas	Desenvolvem-se sais irrecuperáveis que são absorvidos pela biomassa, necessitando de um longo tempo de retenção
	Líquidos iónicos	Condições operacionais amenas para deslignificação	Altos custos de solvente e necessidade de recuperar e reciclar solvente
	Tratamento com ozono	Redução do teor de lignina eficiente e inibidores não são gerados	Necessita-se enorme quantidade de ozono
Físico	Moinho de bolas; Moinho de martelo	Redução do tamanho da partícula e deslignificação da celulose	Elevado consumo de energia
Físico-químico	Água quente líquida	Hemicelulose é dissolvida ao máximo	Altas temperaturas e pressão
	Explosão a vapor	Gera maiores frações de hemicelulose, auxilia na hidrólise da lignina e tem bom custo-benefício	Não funciona com madeira e gera compostos inibidores
	Explosão de CO <sub>2</sub>	Não gera síntese de compostos inibidores	Não ocorre quebra da lignina e hemicelulose
	Expansão da fibra com amónia (AFEX)	Considerável remoção de lignina e hemicelulose e aumento da área superficial disponível para enzimas	Necessita-se de recuperação da amónia e não é adequado para materiais com alto teor em lignina
Biológico	Fungos; Actinomyces	Consome menos ou quase nada de energia e químicos; ecológico	Lento, baixa taxa de conversão

Os pré-tratamentos químicos são tradicionalmente os processos mais típicos na sacarificação de celulose. A utilização de ácidos concentrados, tais como o ácido sulfúrico e ácido hidrocloreídrico se demonstraram ser os mais eficazes dentre os pré-tratamentos químicos, resultando em melhor hidrólise enzimática de açúcares fermentescíveis. É reconhecido que o ambiente ácido é altamente eficaz na degradação da hemicelulose e lignina, melhorando significativamente a hidrólise da celulose, credibilizando assim o uso de pré-tratamentos químicos de vários tipos de biomassas (Aggarwal et al., 2022).

Entretanto, a utilização de ácidos concentrados no pré-tratamento da biomassa apresenta desvantagens devido à sua elevada toxicidade e corrosividade, o que faz com que seja essencial a recuperação do ácido para a viabilidade do processo. Por outro lado, a hidrólise com ácido diluído demonstra eficiência no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, atingindo elevadas taxas de reação e melhorando significativamente a hidrólise da celulose (Sun & Cheng, 2002). Além disso, ácidos diluídos mitigam as desvantagens de ácidos concentrados, nomeadamente a degradação dos equipamentos e o desenvolvimento de compostos inibidores (Aggarwal et al., 2022).

Ácidos diluídos a 1 – 4% m/m, a temperaturas moderadas (abaixo de 160 °C), têm sido um dos métodos mais utilizados para a hidrólise da lignina e hemicelulose, promovendo elevadas taxas de decomposição dos polissacarídeos (Mussatto et al., 2010; Sun & Cheng, 2002). O ácido mais usualmente utilizado para o pré-tratamento de diversas biomassas lignocelulósicas é o ácido sulfúrico diluído. O  $H_2SO_4$  é o ácido mais eficaz para o pré-tratamento entre outras soluções ácidas (Aggarwal et al., 2022) (Mussatto & Teixeira, 2010).

No entanto, há algumas condições operatórias que influenciam diretamente a eficiência do processo, nomeadamente a concentração do ácido utilizado, a temperatura e tempo de reação e a razão de líquido/sólido (R L/S) utilizada no processo.

#### **2.3.3.2. Hidrólise enzimática**

O processo de hidrólise enzimática é a reprodução do processo natural de degradação da celulose em açúcares simples, realizado por enzimas celulolíticas, as quais são produzidas ou excretadas por fungos e bactérias. Esta técnica faz com que o processo possa ser executado em condições mais amenas (pH = 4 – 8; T = 45 – 50 °C) do que a hidrólise ácida, por exemplo. Além disso, a hidrólise por enzimas não promove a corrosão dos reatores e produz baixa quantidade de subprodutos, enquanto apresenta rendimentos em açúcares mais elevados e com baixa degradação dos açúcares (Sun & Cheng, 2002).

Após o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, realiza-se uma hidrólise enzimática com o objetivo de quebrar a celulose e, quando necessário, a hemicelulose, nos seus respetivos monómeros de açúcares C6 e C5. Portanto, a otimização da hidrólise enzimática é uma etapa essencial na produção de bioetanol. A dosagem da enzima, tempo de hidrólise e as propriedades físico-químicas do substrato pré-tratado tem grande efeito nas quantidades e taxas de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos (Aggarwal et al., 2022).

O grau de polimerização, cristalinidade, área superficial acessível e a disponibilidade de hemicelulose e lignina são os principais fatores que influenciam a hidrólise enzimática (Aggarwal et al., 2022). Adicionalmente, as condições da hidrólise enzimática estão diretamente dependentes do resultado do pré-tratamento. Quanto mais bem-sucedido for o pré-tratamento, menos limitações haverá na hidrólise enzimática e mais eficiente será o processo, uma vez que um pré-tratamento adequado conduz a uma maior acessibilidade das enzimas à celulose (Mussatto et al., 2010).

O teor de lignina é um dos principais fatores que afetam a taxa de reação da hidrólise enzimática da celulose. Em materiais com elevado teor de lignina, se faz necessário a realização de um pré-tratamento para se obter rendimentos satisfatórios de açúcares (Banerjee et al., 2017).

A lignina é uma macromolécula composta por diversos grupos funcionais, incluso os compostos fenólicos, compostos alifáticos, metoxilos, carbonilos e sulfonatos, sendo que o ácido clorogénico e cumárico são os principais componentes da lignina no café (Caetano et al., 2014). É normal que a sua composição e estrutura variem entre materiais (espécies), pois o perfil químico de um material é determinado por diversos fatores ao longo do cultivo e processamento, que normalmente se dá de forma singular.

A hidrólise enzimática ou sacarificação, da celulose e hemicelulose da matéria-prima pré-tratada é a etapa mais importante do processo de produção de bioetanol, e pode afetar significativamente a economia do processo de conversão. A sacarificação enzimática é considerada um método mais eficiente, viável, específico e ecológico do que métodos não-enzimáticos. Ademais, o uso de enzimas na digestão da biomassa celulósica não produz compostos inibidores (Aggarwal et al., 2022; Bernardes Costa et al., 2021).

As celulasas são as enzimas empregadas na hidrólise enzimática da celulose, cujo processo catalítico se dá, resumidamente, através da adsorção das celulasas na superfície do substrato, seguido de quebra das ligações. Desta forma, a acessibilidade da enzima aos sítios ativos de adsorção na estrutura cristalina da celulose é o principal fator associado à taxa de hidrólise (Bernardes Costa et al., 2021).

As enzimas celulasas correspondem a uma mistura de pelo menos três enzimas, que são produzidas principalmente por fungos: i) endoglucanase ou  $\beta$ -1-4-endoglucanase, as quais atacam regiões de baixa cristalinidade na fibra da celulose, gerando ramificações de carboidratos de menor tamanho (processo de clivagem); ii)  $\beta$ -1-4-exoglucanase ou celobiohidrolase, as quais atacam as terminações de cadeia livre mais curtas e removem as unidades de celobiose; iii)  $\beta$ -glucosidase, as quais hidrolisam a celobiose e outros oligómeros e libertam unidades de glicose (Aggarwal et al., 2022; Bernardes Costa et al., 2021; Mussatto & Teixeira, 2010). Uma representação esquemática da atividade das enzimas celulase na celulose é ilustrada na Figura 2.5.

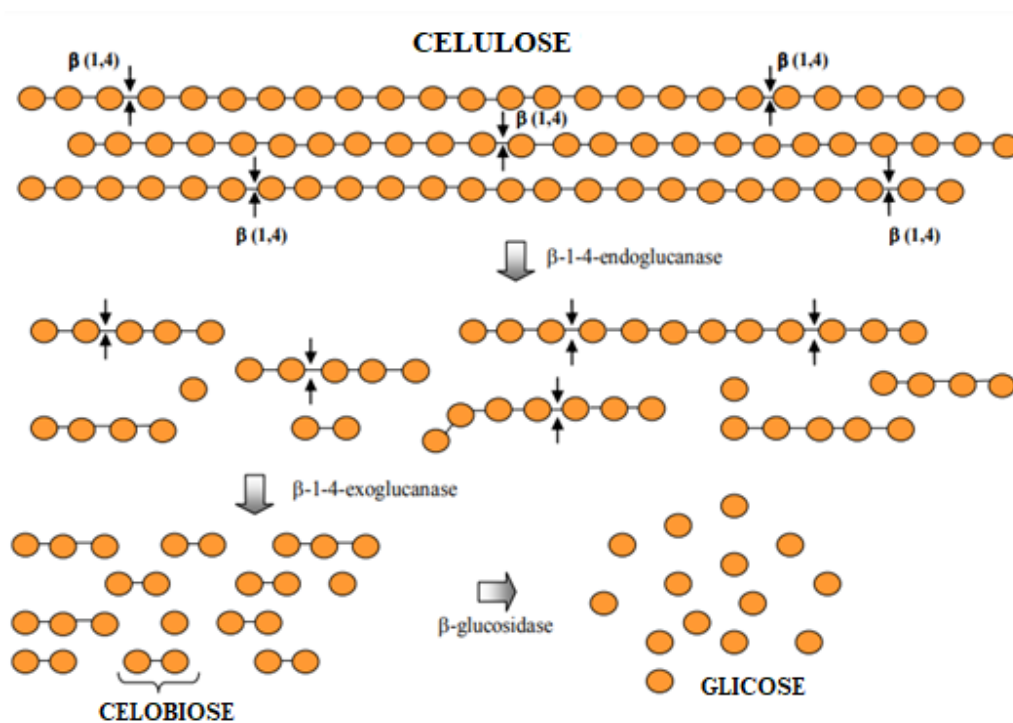


Figura 2.5. Representação esquemática da atividade das enzimas celulasas sobre a estrutura da celulose. Adaptado de Mussatto & Teixeira, 2010.

Existem também enzimas específicas para hemiceluloses (hemicelulases), que são também produzidas por diversos tipos de bactérias e fungos, assim como plantas, tais como as enzimas de cadeia principal (mananase, xilanase, xilosidase e manosidase) e enzimas de cadeias laterais (esterases e -L-arabinofuranosidase). Entretanto, uma vez que a estrutura da hemicelulose é amorfa e menos curta do que a estrutura da celulose, a sua hidrólise ocorre mais facilmente, não sendo necessárias condições tão severas para se obter rendimentos significativos de açúcares da hemicelulose (Aggarwal et al., 2022; Mussatto & Teixeira, 2010).

A otimização da hidrólise enzimática é dependente de alguns fatores: i) temperatura, que quanto maior for, maior será a velocidade de reação, por outro lado, esta não pode ser muito elevada pois pode promover o crescimento de outros microrganismos, causando contaminação e/ou a desnaturação da enzima; ii) agitação, que promove o contato entre o substrato e as enzimas, resultando em rendimentos mais elevados, quando em níveis adequados e iii) quantidade de polissacarídeos a serem hidrolisados, que implicará a quantidade de enzimas a serem utilizadas (Mussatto et al., 2010; Sun & Cheng, 2002).

### 2.3.3.3. Fermentação

Os açúcares simples obtidos a partir da hidrólise enzimática podem ser convertidos em etanol, recorrendo a microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras. Neste processo bioquímico que é a fermentação, os microrganismos utilizam os açúcares presentes no hidrolisado como substrato, metabolizando-os a etanol e CO<sub>2</sub> (Figura 2.6).

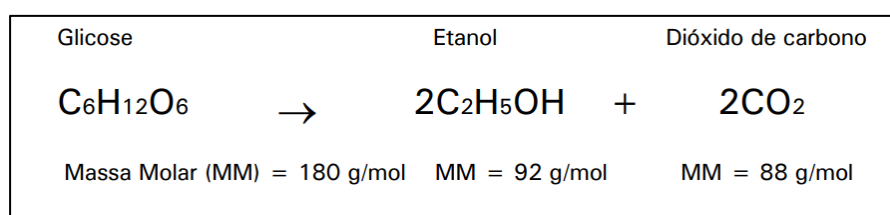


Figura 2.6. Conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono (Cassanego et al., 2008)

Idealmente, o microrganismo a escolher deve satisfazer alguns requisitos, tais como (Banerjee et al., 2010):

- i) Ser capaz de consumir açúcares hexoses e pentoses;
- ii) Gerar um alto rendimento e alta produtividade em etanol;
- iii) Gerar uma mínima produção de subprodutos;
- iv) Apresentar alta tolerância a etanol e outros inibidores produzidos nas etapas anteriores.

Do ponto de vista económico, o consumo completo do substrato e a produção específica de etanol são também fatores de extrema importância (Banerjee et al., 2010).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é geralmente a primeira escolha para a produção industrial de bioetanol a partir de matérias-primas açucareiras e amiláceas, pois apresenta elevada capacidade fermentativa, rendimentos estequiométricos, tolerância ao etanol e outros compostos inibidores (produzidos durante o pré-tratamento da matéria-prima ou durante a fermentação) e capacidade de crescer rapidamente sob condições anaeróbicas estabelecidas em reatores de fermentação em larga escala (Mussatto et al., 2010; Sun & Cheng, 2002).

As hexoses são facilmente metabolizadas e convertidas em etanol pela *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, esta não é capaz de metabolizar açúcares pentoses, como a xilose, que é o principal componente da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos, podendo chegar até 42%

m/m, como no caso da borra de café, sendo assim interessante a utilização de microorganismos capazes de o fazer, como as leveduras do género *Candida* e *Pichia*, ou até mesmo a *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (Mussatto et al., 2010). Ainda assim, estes microrganismos que são naturalmente capazes de consumir pentoses são extremamente sensíveis a altas concentrações de etanol, à presença de compostos inibidores, requerem condições microaerófilas e não apresentam capacidade fermentativa de pentoses a baixo pH (Banerjee et al., 2010).

As leveduras exigem que certos fatores, como o pH, concentração de etanol e compostos inibidores, temperatura, nutrientes e arejamento do meio, se encontrem em condições adequadas para que o seu desempenho seja máximo no desenvolvimento do processo de fermentação.

Habitualmente utiliza-se pH baixo (4,5 – 5,5), de forma a reduzir possíveis contaminações por outros organismos. A concentração de etanol no meio reativo não deve ultrapassar 5,5% (m/v), valor tolerado pela maioria das leveduras. A *Saccharomyces cerevisiae* apresenta maior eficiência no processo com temperaturas em torno de 30 °C, sendo que a partir dos 37 °C o rendimento sofre regressão. O oxigénio é igualmente um fator inibitório para o processo, uma vez que a maioria dos microrganismos se desenvolvem em anaerobiose, podendo causar inibição do consumo de substrato devido a produção de subprodutos (Sun & Cheng, 2002).

O processo de fermentação pode ser efetuado de forma descontínua (*batch*), semi-contínua ou contínua. No processo em *batch*, são controlados o volume do meio reativo, pH e agitação. Introduce-se o substrato e o agente fermentativo (inóculo) em quantidades adequadas, logo há um crescimento do agente fermentativo, com o consumo de uma parte do açúcar e redução do oxigénio, dando-se início à produção de etanol. No decorrer do processo, os açúcares vão sendo consumido pela levedura, resultando na produção alcoólica (Mussatto et al., 2010).

#### **2.3.3.4. Produção de bioetanol a partir da borra de café**

Embora encontra-se mais facilmente na literatura estudos acerca da valorização da fração lipídica da borra de café, através da produção de biodiesel, por exemplo, existem alguns estudos que exploram a utilização dos açúcares extraídos da borra de café para a produção de bioetanol.

Neste caso, os açúcares são extraídos da borra de café através de uma hidrólise ácida e/ou enzimática, como referido nos capítulos anteriores e, subsequentemente, o hidrolisado é submetido a fermentação. A grande maioria dos métodos de produção de bioetanol a partir da borra de café, descritos na literatura, utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a conversão dos açúcares em bioetanol (McNutt & He, 2019).

Na Tabela 2.7, encontram-se apresentados os resultados obtidos de diversos estudos do pré-tratamento/hidrólise enzimática e conversão da borra de café em bioetanol.

Os valores de rendimento em etanol e produtividade de etanol, a partir do hidrolisado da borra de café, encontrados na literatura, são comparáveis e em alguns casos melhores que resultados encontrados para hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir de outras matérias-primas. Por exemplo, o rendimento em etanol do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cerveja (BSG, em inglês), utilizando *P. stipitis*, foi de  $Y_{p/s} = 0,34$  g/g. A conversão do hidrolisado da casca de semente de girassol a etanol, também com a utilização de *P. stipitis*, originaram rendimento de  $Y_{p/s} = 0,32$  g/g e produtividade de  $Q_p = 0,065$  g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>. Por fim, a fermentação de um hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, recorrendo a uma levedura consumidora de pentoses (*Scheffersomyces stipitis*), originou um rendimento em  $Y_{p/s} = 0,19$  g/g e  $Q_p = 0,13$  g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> (Mussatto et al., 2012).

Desta forma, ao se comparar com os resultados obtidos a partir destas outras matérias-primas, pode-se concluir que o hidrolisado da borra de café tem um grande potencial para ser utilizado como um meio de fermentação para a produção de etanol. Adicionalmente, como refere Mussatto et al. (2012), existem relativamente poucos estudos referentes ao uso do hidrolisado da borra de café para a produção

de etanol, pelo que a otimização das condições operatórias do processo, pode melhorar significativamente os resultados obtidos.

Tabela 2.7. Resultados de estudos descritos na literatura, relativamente à obtenção de açúcares fermentescíveis e bioetanol, a partir da borra de café.

Método	Condições	Rendimento	Referência
<b>Pré-tratamento ácido</b>	c (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 100 mg ácido/g; R L/S = 10 g/g; 163 °C; 45 mins  Fermentação – <i>S. Cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i>	<b>Açúcares totais:</b> 50 g/L  <b>Bioetanol:</b> <b>Y<sub>p</sub>/s (g/g)</b> = 0,26 (p/ ambas as leveduras) <b>Q<sub>p</sub> (g/L/h)</b> = 0,49 e 0,35 <b>η</b> = 50,2 e 51,9%	Mussatto et al., 2012
<b>Pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática</b>	c (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 3 % v/v; T = 85 °C; t = 4,5 h; R L/S = 20 mL/g  Enzima <i>Viscozyme L.</i> ;	<b>Açúcares totais:</b> 16,4 g/100 g	Gomes, 2016
<b>Pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática</b>	c (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 3 % v/v; T = 85 °C; t = 6 h; R L/S = 20 mL/g  Enzima <i>Viscozyme L.</i> (100 µL/g)	<b>Açúcares totais:</b> 12,89 g/100 g	V. Silva, 2011
<b>Pré-tratamento ácido</b>	c (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 4 % v/v; T = 95 °C; t = 2 h; R L/S = 10 mL/g	<b>Açúcares totais:</b> 31,00 g/100 g	Go et al., 2016
<b>Pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática</b>	c (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 1%; R L/S = 7; 121 °C; 1 h.  Enzimas celulases; 24 h  Fermentação – <i>S. Cerevisiae</i> ; 40 h	<b>Açúcares totais:</b> 50 g/L  <b>Bioetanol:</b> 50 g/L  <b>Y<sub>p</sub>/s (g/g)</b> = 0,46	Kwon et al., 2013
<b>Pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática</b>	c (HNO <sub>3</sub> ) = 3%; R L/S = 8; 85 °C; 3 h  Enzimas celulases; 24 h; 20 µL/g;  Fermentação – <i>S. cerevisiae</i> ; 1 semana	<b>Açúcares totais:</b> 29,6 g/L  <b>Bioetanol:</b> 9,34 mL  <b>Y<sub>p</sub>/s (g/g)</b> = 0,07	Lamas, 2019
<b>Hidrólise ácida de borra de café deslipidada</b>	c (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) = 0,8 N; autoclave 15 mins; 121 °C	<b>Glicose:</b> 38 g/L – 0,19 g/g  <b>Bioetanol:</b> c = 18,9 g/L <b>Y<sub>p</sub>/s (g/g glicose)</b> = 0,50 <b>Q<sub>p</sub> (g/L/h)</b> = 1,90	Rocha et al., 2014





### 3. Descrição experimental

Neste capítulo encontram-se descritos os métodos experimentais utilizados na realização deste trabalho, nomeadamente a caracterização da borra de café (teor de humidade, cinzas, matéria gorda, celulose bruta e lignina total), assim como as etapas do processo de produção de bioetanol, nomeadamente o pré-tratamento ácido, a hidrólise enzimática e a fermentação. Encontra-se igualmente descrito o método de quantificação dos açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e compostos inibidores (ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (F)) em estudo, após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática de cada ensaio, assim como a quantificação de etanol ao longo da fermentação.

#### 3.1. Caracterização da borra de café

A borra de café é um material que apresenta composição química muito variada, devido a vários fatores, tais como a origem, cultivo e processamento dos grãos de café. Desta forma, faz-se necessário caracterizar a borra de café, de forma a conhecer a composição química da matéria-prima utilizada.

A borra de café utilizada neste trabalho foi obtida na cantina do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP). O café é da marca DELTA® tipo PLATINUM, sendo este uma mistura de cafés arábicas e robustas, em proporções desconhecidas.

Nos subcapítulos seguintes encontram-se apresentados, de forma resumida, os métodos utilizados para determinar os teores de humidade, cinzas e lignina total da borra de café.

##### 3.1.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado através de método direto, colocando uma quantidade de amostra (1 g) na estufa a  $105 \pm 3$  °C (*WTB Binder*), sujeitando-a a ciclos repetidos de secagem, arrefecimento e pesagem, até o momento em que o peso da amostra esteja constante. O teor de humidade da borra de café foi determinado previamente à realização de cada conjunto de ensaio.

A descrição detalhada do método encontra-se apresentada no Anexo A.1. O teor de humidade é calculado através da equação 1.

$$H (\%) = \frac{m_{amostra} - m_{amostra\ seca}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

$m_{amostra}$  – Massa de amostra de borra de café (g);

$m_{amostra\ seca}$  – Massa de amostra de borra de café seca à 105 °C (g).

##### 3.1.2. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado através do método descrito no *Codex Alimentarius International Food Standards - Recommended Methods of Analysis and Sampling (AOAC 923.03)*, o qual consiste em calcinar uma certa quantidade de amostra (~ 5 g) em mufla (*Vulcan A-550*) a 550 °C, durante 1 hora, seguido de arrefecimento e pesagem até peso constante.

A descrição detalhada do método encontra-se apresentada no Anexo A.2. O teor de cinzas é calculado através da equação 2.

$$Cinzas (\%) = \frac{m_{cinzas}}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \quad (2)$$

Onde,

$m_{cinzas}$  – Massa de cinzas após calcinação (g);

$m_{amostra\ seca}$  – Massa de amostra inicial (seca em estufa), previamente à calcinação (g).

### 3.1.3. Determinação do teor de matéria gorda

A determinação do teor de matéria gorda da borra de café foi realizada de acordo com o procedimento descrito na norma NP 856.

A descrição detalhada do procedimento encontra-se disponível no Anexo A.3. O teor de matéria gorda é calculado através da equação 3.

$$G (\%) = \text{Teor de matéria gorda} = \frac{m_{\acute{o}leo}}{m_{amostra\ seca}} \times 100 \quad (3)$$

Onde,

$m_{\acute{o}leo}$  – Massa de óleo recuperada após evaporação do solvente (g);

$m_{amostra\ seca}$  – Massa de amostra de borra de café seca a 105 °C utilizada na extração (g).

### 3.1.4. Determinação do teor de celulose bruta

O teor de celulose bruta da borra de café foi determinado de acordo com o procedimento descrito na norma NP 1005:1974.

A descrição detalhada do procedimento encontra-se disponível no Anexo A.3. O teor de celulose bruta é calculado através da equação 4.

$$\text{Teor de celulose bruta} = \frac{(m1 - m2) \times [100 - (H + G)]}{2} \quad (4)$$

Onde,

$m1$  – Massa de borra de café (seca em estufa) prévia à calcinação (g);

$m2$  – Massa de cinzas após calcinação (g);

$H$  – Teor de humidade (%);

$G$  – Teor de matéria gorda (%).

### 3.1.5. Determinação do teor de lignina

O teor de lignina total, que corresponde ao teor de lignina solúvel e insolúvel, também designado de lignina Klason, foi determinado através do método descrito na norma TAPPI T222om-02. Este método consiste na reação de uma determinada massa de amostra (~ 1 g) com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 72% v/v em banho termostático, a 20 °C por 2 horas, sob agitação constante. Ao fim desta etapa de reação, 575 mL de água desionizada é adicionada à mistura, sujeitando-a à ebulição por 4 horas.

Posteriormente, filtra-se a solução a vácuo e o resíduo é lavado com água desionizada até pH neutro. Este resíduo é então colocado na estufa até atingir peso constante, obtendo-se assim a massa de lignina Klason.

O teor de lignina Klason é determinado utilizado a equação 5.

$$\text{Lenhina Klason (\%)} = \frac{m_{\text{lignina}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (5)$$

Onde,

$m_{\text{lignina}}$  – Massa de lignina (g);

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa de amostra de borra de café seca a 105 °C (g).

O filtrado obtido na etapa anterior é submetido a análise em espectrofotômetro UV-vis (*Shimadzu, UV-160 A*), sendo assim quantificada a lignina solúvel, através da leitura da absorvância, a um comprimento de onda de 205 nm. O teor de lignina solúvel é determinado através da equação 6.

$$\text{Lenhina solúvel (\%)} = \frac{A_{205 \text{ nm}} \times V_{\text{filtrado}} \times f}{\epsilon \times m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde,

$A_{205 \text{ nm}}$  – Absorvância da amostra lida no espectrofotômetro UV-VIS em um comprimento de onda de 205 nm;

$V_{\text{filtrado}}$  – Volume do filtrado (mL);

$f$  – Fator de diluição;

$\epsilon$  – Fator de conversão = 110 dm<sup>3</sup>/g.cm;

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa de amostra de borra de café seca a 105 °C (g).

O teor de lignina total é dado pela soma da lignina Klason e da lignina solúvel (equação 7).

$$\text{Lignina Total (\%)} = \text{Lignina Klason (\%)} + \text{Lignina Solúvel (\%)} \quad (7)$$

A descrição detalhada do procedimento de determinação da lignina total encontra-se apresentada no Anexo A.5.

### 3.2. Produção de bioetanol

Neste trabalho, o processo de produção do bioetanol a partir da borra de café se dá através de três etapas realizadas separadamente: i) pré-tratamento ácido, ii) hidrólise enzimática e iii) fermentação, sendo que, como o objetivo do trabalho é a otimização do processo, mais especificamente das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, foram conduzidos diversos ensaios de pré-tratamento e hidrólise enzimática antes da fermentação.

No primeiro conjunto de ensaios (ver Tabela 3.2), as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram otimizadas em conjunto, sendo a quantificação de açúcares e compostos inibidores (ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (F)) realizada somente ao fim da hidrólise enzimática. Nos conjuntos de ensaios seguintes, as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram otimizadas em separado, sendo a quantificação de açúcares e compostos inibidores realizada no fim de cada etapa (Figura 3.1).

Somente após a obtenção do hidrolisado nas condições ótimas, isto é, o hidrolisado com a maior concentração de açúcares fermentescíveis possível, dentro do que foi estudado, é que foi realizada a fermentação e a subsequente determinação do teor de etanol na solução fermentada.

Os procedimentos experimentais de cada etapa, assim como a codificação dos ensaios conduzidos, estão descritos nos subcapítulos seguintes.

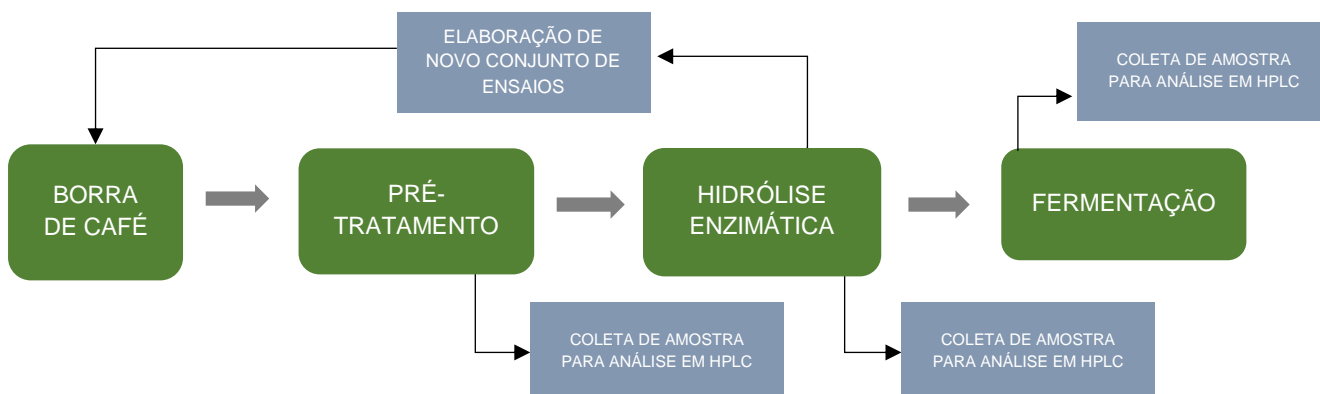


Figura 3.1. Esquema experimental do estudo da otimização do processo de produção de bioetanol a partir da borra de café.

### 3.2.1. Pré-tratamento

De maneira a otimizar a etapa do pré-tratamento da borra de café para a produção de bioetanol, pretendeu-se estudar alguns fatores influentes nesta etapa do processo, tais como a concentração de ácido sulfúrico ( $\text{C H}_2\text{SO}_4$ ) (1, 3 e 5% v/v), tempo (4, 6 e 8 horas), temperatura de reação (60 e 85 °C) e a razão líquido/sólido (R L/S mL/g) (6 - 25) e, analisar como estes fatores influenciam o rendimento em açúcares disponíveis, para a etapa subsequente de hidrólise enzimática.

Para tal, pesou-se uma amostra de 10 g de borra de café húmida para frascos de vidro de 250 mL e adicionou-se 150 mL de ácido sulfúrico (95-97% v/v) em concentrações de 1, 3 e 5% v/v. A reação se deu em banho termostático (*Selecta, Ultrasonic OR-C*), sob temperaturas de 60 e 85 °C, durante períodos de 4, 6 e 8 horas, com agitação constante de 50 rpm.

Adicionalmente, foram realizados ensaios de pré-tratamento em autoclave (*Uniclave 88*), com  $\text{c H}_2\text{SO}_4 = 5\%$  v/v, sob pressão de 2 bar, durante 20 minutos, sem agitação e com variáveis valores de R L/S: 5, 10 e 15.

Ao fim da reação, foram coletadas amostras de 2 mL para quantificação de açúcares e compostos inibidores em HPLC e o restante da solução foi submetida à hidrólise enzimática.

A codificação dos ensaios está descrita no capítulo 3.2.3 e a descrição detalhada do procedimento de preparação do pré-tratamento encontra-se apresentada no Anexo A.6.

### 3.2.2. Hidrólise enzimática

Os parâmetros do procedimento da hidrólise enzimática, nomeadamente o tempo, temperatura e agitação em banho termostático, mantiveram-se sempre constantes, sendo variados, para efeitos de estudo, somente o tipo de complexo enzimático - *Accellerase® 1500*, *Viscamyl™ Flow* (VIS) e *GC 151* (Tabela 3.1) e suas respetivas dosagens.

Tabela 3.1. Descrição dos tipos de enzimas presentes nos complexos enzimáticos utilizados e as suas respetivas atividades enzimáticas e gama de pH ótimo de atividade.

Complexo enzimático	Enzima	Atividade enzimática (U/g)	pH ótimo
<i>Accellerase® 1500</i>	Endoglucanase e $\beta$ -glicosidase	2200 – 2800; 450 - 775	4,6 – 5,0
<i>GC 151</i>	$\beta$ -glicosidase	5400 - 6600	4,25 - 4,75
<i>Viscamyl™ Flow</i>	Celulases	6200 - 7580	4,6 - 5,0

No conjunto de ensaios do planeamento experimental (ver capítulo 3.2.3) e dos pré-tratamentos em autoclave, utilizou-se a enzima *Accellerase® 1500* a 100  $\mu\text{L/g}$  borra de café húmida. Nos ensaios

subsequentes, utilizou-se as enzimas *Viscamyl<sup>TM</sup> Flow* (VIS) e *GC 151* (GC), em variadas dosagens, uma vez que o complexo enzimático *Accellerase® 1500* se esgotou.

Após pré-tratamento, as soluções tiveram os seus pHs ajustados com hidróxido de sódio (NaOH), a pH = 4,5 - 5,0, valores a dependerem do pH adequado para cada complexo enzimático.

Em seguida, adicionou-se o complexo enzimático respectivo para cada ensaio nas respectivas dosagens.

Posteriormente, as soluções foram colocadas em banho termostático (*Selecta, Ultrasonic OR-C*), à temperatura de 50 °C, durante 2 horas, sob agitação constante de 50 rpm. Após a hidrólise enzimática, a solução foi filtrada a vácuo (*Neuberger*) utilizando filtro de papel. Mediu-se o volume dos filtrados e amostras de 2 mL foram coletadas para posterior análise de açúcares e inibidores em HPLC.

A descrição do procedimento da preparação da hidrólise enzimática está apresentada no Anexo A.7.1.

### 3.2.3. Codificação dos ensaios

Inicialmente, foi realizado um conjunto de ensaios (CE#1), resultante de um planeamento experimental 2<sup>3</sup> para os ensaios de pré-tratamento em banho termostático, com uma réplica nos vértices e com 3 ensaios no centro, seguido de uma hidrólise enzimática (T = 50 °C; t = 2 h; agitação = 50 rpm; Enzima = *Accellerase® 1500* a 100 µL/g borra de café (Tabela 3.2). Nestes ensaios, os açúcares e compostos inibidores foram quantificados somente após a hidrólise enzimática.

Todos os ensaios conduzidos neste trabalho foram realizados com agitação de 50 rpm, com exceção dos ensaios em autoclave (sem agitação).

Tabela 3.2. Planeamento experimental 2<sup>3</sup> dos ensaios de pré-tratamento em banho termostático (CE#1), com razão líquido/sólido (R L/S = 15) constante.

Condições	C H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	-1 (3)	-1 (4)	-1 (60)
2	+1 (5)	-1 (4)	-1 (60)
3	-1 (3)	+1 (8)	-1 (60)
4	+1 (5)	+1 (8)	-1 (60)
5	-1 (3)	-1 (4)	+1 (85)
6	+1 (5)	-1 (4)	+1 (85)
7	-1 (3)	+1 (8)	+1 (85)
8	+1 (5)	+1 (8)	+1 (85)
17	0 (4)	0 (6)	0 (72,5)
18	0 (4)	0 (6)	0 (72,5)
19	0 (4)	0 (6)	0 (72,5)

Para além destes, também foram realizados ensaios de pré-tratamento em autoclave com ácido sulfúrico a 5% v/v, a temperatura de 121 °C, sob pressão de 2 bar, durante 20 minutos, sem agitação e em variáveis razões de líquido/sólido (R L/S): 5, 15 e 25, seguido de hidrólise enzimática (T = 50 °C; t = 2 h; agitação = 50 rpm; Enzima = *Accellerase® 1500* a 100 µL/g borra de café). Estes ensaios foram feitos em duplicata.

Adicionalmente, foram também conduzidos dois ensaios exploratórios em banho termostático: um ensaio sem a etapa de hidrólise enzimática (ensaio SH) e um ensaio sem a etapa de pré-tratamento (ensaio SP), somente com hidrólise enzimática, de forma a analisar o efeito destas etapas no rendimento em açúcares fermentescíveis (Tabela 3.3). O ensaio SP foi realizado em triplicata e o ensaio SH foi realizado somente uma vez.

Tabela 3.3. Ensaios de pré-tratamento realizados em autoclave (A, B e C) e ensaios exporatórios (SH e SP).

Ensaio	Razão L/S	C H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
A	5	5	0,3	121
B	15			
C	25			
SH	15	4	6	72,5
SP	Hidrólise enzimática (T=50 °C; tempo=2 h; agitação=50 rpm; Accellerase® 100 µL/g)			

Após a realização dos ensaios, os açúcares foram quantificados em HPLC. Após analisar o rendimento de cada ensaio, foi elaborado um novo conjunto de ensaios (CE#2), no qual se manteve constante a temperatura (85 °C) e estudou-se o efeito da concentração de ácido sulfúrico (3 e 1% v/v) e do tempo de reação (4 e 8 h) no pré-tratamento, seguido do efeito das dosagens dos complexos enzimáticos (VIS:GC 50:10 µL/g e VIS:GC 30:20 µL/g) na hidrólise enzimática (Tabela 3.4).

Neste conjunto de ensaios e nos conjuntos a seguir, os açúcares e compostos inibidores foram quantificados antes e depois da hidrólise enzimática, de forma a analisar em que momento estes compostos são formados e, também, analisar o rendimento da hidrólise enzimática.

Tabela 3.4. Ensaios com valores de concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e tempo variados no pré-tratamento, variadas dosagens de enzimas na hidrólise enzimática e com temperatura de reação (T = 85 °C) e razão líquido/sólido (R L/S = 15) constantes no pré-tratamento (CE#2).

Ensaio	C H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	Tempo (h)	Dose de Enzimas (µL/g amostra)
A1	3	8	50 – Viscamyl 10 – GC 151
A2	3	8	30 – Viscamyl 20 – GC151
B1	3	4	50 – Viscamyl 10 – GC 151
B2	3	4	30 – Viscamyl 20 – GC151
C1	1	8	50 – Viscamyl 10 – GC 151
C2	1	8	30 – Viscamyl 20 – GC151
D1	1	4	50 – Viscamyl 10 – GC 151
D2	1	4	30 – Viscamyl 20 – GC151

Em seguida, foi elaborado um novo conjunto de ensaios (CE#3), no qual se manteve constante a temperatura (85 °C) e a concentração de ácido (3% v/v), e foi estudado o efeito do tempo de reação (4, 6 e 8 h) no pré-tratamento, seguido do efeito de distintas dosagens dos complexos enzimáticos (VIS:GC 30:20, VIS:GC 40:10 e VIS:GC 25:25) na hidrólise enzimática (Tabela 3.5).

Tabela 3.5. Ensaios com valores de tempo variados no pré-tratamento, variadas dosagens de enzimas na hidrólise enzimática e com temperatura de reação ( $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), razão líquido/sólido ( $R\ L/S = 15$ ) e concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $C = 3\%$ ) constantes no pré-tratamento (CE#3).

Ensaio	Tempo (h)	Dose de Enzimas GC 151:Viscamyl ( $\mu\text{L/g}$ )
E1	4	30:20
E2	4	40:10
E3	4	25:25
E4	6	30:20
E5	6	40:10
E6	6	25:25
E7	8	30:20
E8	8	40:10
E9	8	25:25

Posteriormente, foi elaborado um conjunto de ensaios (CE#4), com o objetivo de estudar a variação de razão líquido/sólido, no qual se manteve constante a dosagem de enzimas (VIS:GC 40:10) na hidrólise enzimática, a temperatura ( $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a concentração de ácido ( $3\% \text{ v/v}$ ) e o tempo de reação (8 h) no pré-tratamento e, variou-se a razão L/S no pré-tratamento.

Tabela 3.6. Ensaios com variados valores de R L/S e com valores fixos de dosagem de enzimas (VIS:GC 40:10), temperatura de reação ( $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $C = 3\%$ ) e tempo c ( $t = 8\text{ h}$ ) no pré-tratamento (CE#4)

Ensaios	R L/S
R0	15
R1	10
R2	7,5
R3	6

### 3.2.4. Determinação do teor de açúcares, compostos inibidores e etanol

Os açúcares fermentescíveis (celobiose, glicose, xilose e arabinose), os compostos inibidores (ácido acético, HMF e furfural), presentes nas amostras de licor da borra de café pré-tratadas e hidrolisadas, assim como o etanol resultante da fermentação, foram quantificados por HPLC (*Agilent-1260 Infinity*), o qual é composto por um injetor de amostras com loop de amostragem de  $20\ \mu\text{L}$ , acoplado a um detetor de índice de refração (*RID 20-A, Shimadzu*), utilizando uma coluna de fase reversa (*CTO-40S, Shimadzu*). As amostras de borra de café hidrolisada foram eluídas em solução de ácido sulfúrico a  $5\text{ mM}$ , que foi utilizada como fase móvel a um caudal de  $0,6\text{ mL/min}$  e  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Os açúcares, compostos inibidores e etanol foram identificados no cromatograma com base nos tempos de retenção das soluções padrão de cada composto, os quais tiveram suas concentrações determinadas através das curvas de calibração que, por sua vez, foram traçadas a partir das áreas dos picos no cromatograma.

As curvas de calibração para cada composto em estudo foram previamente definidas e estão apresentadas no Anexo A.6.

Adicionalmente, o rendimento de cada ensaio (Y) foi determinado baseado no cálculo da quantidade de açúcares obtidos por cada 100 gramas de amostra de borra de café seca (equação 8).

$$Y \text{ (g açúcar/100 g borra de café)} = \left( C \times \left( \frac{V}{m_{\text{amostra seca}}} \right) \right) \times 100 \quad (8)$$

Onde,

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa de amostra de borra de café seca a 105 °C (g).

V – Volume do filtrado obtido após hidrólise enzimática ou volume da solução em pré-tratamento (L);

C – Concentração do açúcar determinado em HPLC (g/L).

Adicionalmente, de forma a avaliar o rendimento da hidrólise enzimática, referente à recuperação da glicose, recorreu-se à equação 9 (Gonçalves et al., 2016).

$$\text{Rendimento da hidrólise em glicose (\%)} = \frac{[\text{glicose}] + 1,053 \times [\text{celobiose}]}{1,111f \times [\text{biomassa}]} \times 100 \quad (9)$$

Onde,

[glicose] – concentração de glicose prévia à hidrólise (g/L);

[celobiose] – concentração de celobiose prévia à hidrólise (g/L);

[biomassa] – concentração de biomassa seca inicial, prévia à hidrólise (g/L);

f = composição em celulose bruta da biomassa seca (g/g);

1,111 = fator de conversão equivalente da celulose em glicose;

1,053 = fator de conversão equivalente da celobiose em glicose.

### 3.2.5. Fermentação

#### Condições fermentativas

As condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática dos ensaios submetidos a fermentação foram as mesmas do ensaio R0 (c = 3% v/v; t = 8 h; T = 85 °C; R L/S = 15; GC:VIS 40:10).

O processo de fermentação se deu em banho termostático, a 30 °C, com rotação de 70 rpm, por um período de 36 horas para a *S. cerevisiae* e 24 horas para a *P. stipitis*. Todos os ensaios foram realizados com 40% v/v de inóculo. O hidrolisado da borra de café foi esterilizado em autoclave previamente à inoculação das leveduras. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada levedura, resultando num total de 6 ensaios (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 Conjunto de ensaios 5 (CE#5), realizado sob condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática conforme ensaio R0 e submetidos a fermentação. Cada ensaio foi realizado em triplicado.

Ensaio	Levedura
FS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FP	<i>Pichia stipitis</i>

Os açúcares foram quantificados após o pré-tratamento, após a hidrólise enzimática e após a esterilização. Durante a fermentação, as amostras foram coletadas periodicamente para se quantificar o consumo de açúcar e a produção de etanol, através do HPLC.

O rendimento em etanol,  $Y_{p/s}$  (g/g), foi calculado através da equação 10.

$$Y_{p/s} \text{ (g/g)} = \frac{\text{concentração de etanol}}{\text{concentração de substrato}} \quad (10)$$



Onde,

Concentração de etanol – Concentração de etanol obtida em dado momento (g/L);

Concentração de substrato – Concentração de glicose (para *S. cerevisiae*) e concentração de glicose + xilose (para *P. stipitis*) (g/L).

A produtividade de etanol, Q (g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>), foi calculada através da equação 11.

$$Q \text{ (g. L}^{-1}\text{. h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{concentração de etanol}}{\text{tempo de fermentação}} \quad (11)$$

Onde,

Concentração de etanol – Concentração de etanol obtida em dado momento (g/L);

Tempo de fermentação – Tempo de fermentação decorrido em dado momento (h).

A eficiência da fermentação,  $\eta$  (%), foi calculada através da equação 12 (McMillan, 1993).

$$\eta \text{ (\%)} = \frac{Y_{p/s}}{0,51} \times 100 \quad (12)$$

Onde,

$Y_{p/s}$  – Rendimento em etanol (g/g);

0,51 – Fator de conversão de glicose e xilose em etanol (g/g).

### **Preparação das culturas de levedura para a fermentação**

Para se converter os açúcares resultantes do pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da borra de café em etanol, duas leveduras distintas foram utilizadas: *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 192 e *Pichia stipitis* NCYC 1542, ambas adquiridas da Coleção Nacional de Culturas de Leveduras (NCYC, em inglês) do Reino Unido.

Primeiramente, foi realizado um pré-inóculo a partir das leveduras liofilizadas, para se aclimatarem. Para tal, foram preparados meios YPD (Levedura, Peptona e Dextrose) líquidos, com 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de glicose. Nesta etapa, as leveduras liofilizadas foram aclimatadas em frascos de 50 mL, em triplicado.

Em seguida, estes pré-inóculos foram repicados em meios de cultura líquidos e sólidos, os quais foram preparados utilizando o meio de cultura YPD.

Na preparação do meio líquido, foi dissolvido 3,9 g de extrato de levedura, 20 g de peptona e 20 g de glicose (xilose para o meio de cultura da *P. Stipitis*) em 1 L de água. Na preparação do meio sólido, foi dissolvido 3,9 de extrato de levedura, 2,0 g de peptona, 3,9 g de glicose (xilose para o meio de cultura da *P. Stipitis*) e 4,1 g de ágar em 200 mL de água. Ambos os meios foram incubados a 30 °C por 5 dias, sem agitação. Todo o material utilizado na preparação dos meios de culturas e inóculo foram autoclavados a 121 °C, por 20 minutos, assim como a inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar.



## 4. Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos no presente trabalho.

Primeiramente, estão os resultados referentes à caracterização química da borra de café, nomeadamente o teor de humidade, cinzas, matéria gorda, celulose bruta, lignina insolúvel, lignina solúvel e lignina total.

Em segundo lugar, estão os resultados referentes às concentrações de açúcares e compostos inibidores, as quais foram determinadas após o pré-tratamento e após a hidrólise enzimática, em todos os conjuntos de ensaios e, por fim, estão as concentrações de etanol obtidas ao longo da fermentação.

### 4.1. Caracterização química

Na caracterização química da borra de café foram avaliados cinco parâmetros, tais como o teor de humidade, teor de cinzas, teor de matéria gorda, teor de celulose bruta e teor de lignina total (lignina insolúvel e solúvel). Os resultados experimentais obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados experimentais da caracterização química da borra de café, em base seca % m/m, com exceção do teor de humidade.

Humidade %	Cinzas %	Matéria gorda %	Celulose bruta %	Lignina insolúvel %	Lignina solúvel %	Lignina total %
62,56 – 65,59*	1,73 ± 0,13	10,24 ± 1,03	18,04 ± 0,34	28,87 ± 1,06	7,21 ± 0,81	36,09 ± 1,77

\*Teor de humidade foi determinado em diferentes momentos, previamente a realização de cada conjunto de ensaios de pré-tratamento.

Observou-se que os valores determinados encontram-se dentro do expectável de acordo com a literatura existente. Entretanto, existe uma discrepância entre os valores encontrados na literatura e também ao comparar com este trabalho, para todos os parâmetros (Caetano et al., 2017; Gomes, 2016; Mussatto, Carneiro, et al., 2011). Como já referido anteriormente, esta discrepância sempre existirá, uma vez que as características físico-químicas da borra de café são muito variáveis, pois é um resultado de diversos fatores presentes ao longo de toda a cadeia de produção do café.

Na Figura 4.1. encontra-se ilustrado o teor de humidade da borra de café determinado, comparando-se com alguns valores encontrados na literatura.

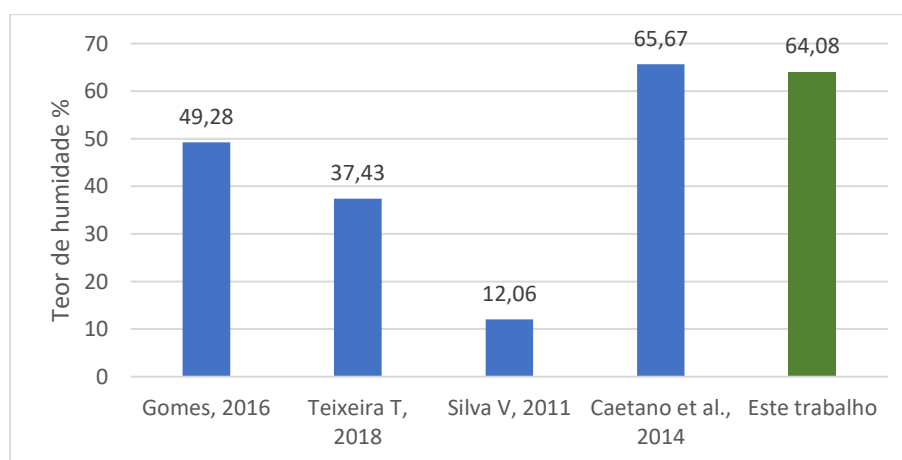


Figura 4.1. Teor de humidade da borra de café determinado neste trabalho em comparação com os valores encontrado na literatura.

Como se pode observar, não há um padrão nos valores de teor de humidade, não havendo tampouco uniformidade nos valores na literatura. É expectável que a borra de café tenha um elevado teor de humidade, acima de 80% (Mussatto, Machado, et al., 2011a). Tal variabilidade, pode ser explicada devido às diferentes condições de preparação do café e à diferença dos tempos decorridos entre a coleta da amostra de borra de café e o início da realização do ensaio, podendo entretanto, haver mais ou menos perda de água.

Na Figura 4.2. encontra-se ilustrado o valor do teor de cinzas da borra de café determinado neste trabalho, em comparação com os valores encontrados na literatura.

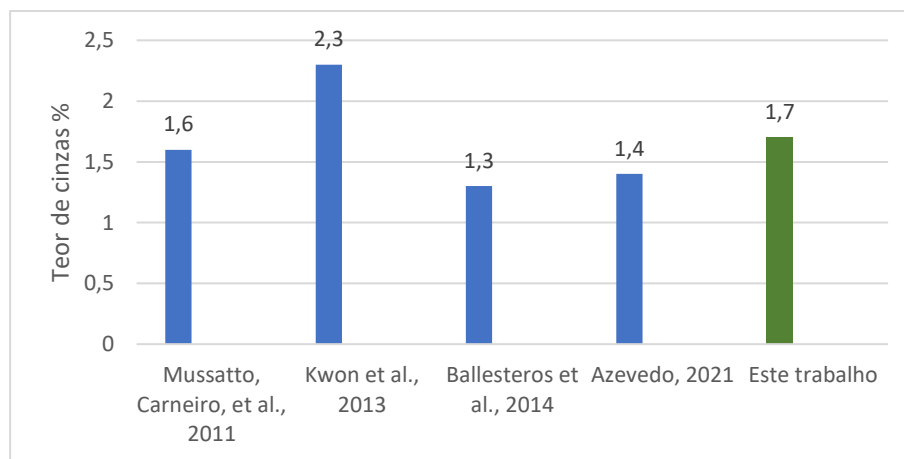


Figura 4.2. Teor de cinzas da borra de café determinado neste trabalho em comparação com os valores encontrado na literatura, em % m/m, em base seca.

Ao analisar a Figura 4.2, constata-se que os valores do teor de cinzas da borra de café apresenta uma relativamente baixa variabilidade, ao se comparar os valores encontrados na literatura com o valor determinado neste trabalho, sendo portanto um parâmetro de valor mais uniforme, ao se comparar por exemplo, com o teor de humidade. Desta forma, pode-se dizer que a borra de café, embora tenha presente uma relevante quantidade de minerais, é predominantemente constituída por matéria orgânica, sendo-lhe atribuída uma carga inorgânica relativamente baixa, ao se comparar com outros resíduos vegetais tais como a casca de arroz (24%) (Morais et al., 2011), o arroz (15 – 20%) (Marie Garay et al., 2009), o bagaço de cana (11%) (Vieira, 2012) e a casca de amendoim (8%) (Oliveira et al., 2002).

Quanto maior o teor de cinzas de um material, menor será o seu poder calorífico, isto é, a sua capacidade de produzir calor, devido a elevada presença de carga inerte (minerais), que não produz calor (Soares et al., 2015). Por isso, devido ao baixo teor de cinzas da borra de café, esta é considerada uma boa fonte de energia, com poder calorífico próximo ao do carvão e superior ao da madeira, sendo superior a diversos outros resíduos vegetais (Gomes, 2016), tais como os mencionados acima.

Na Figura 4.3, encontra-se apresentado o valor determinado para o teor de celulose bruta.

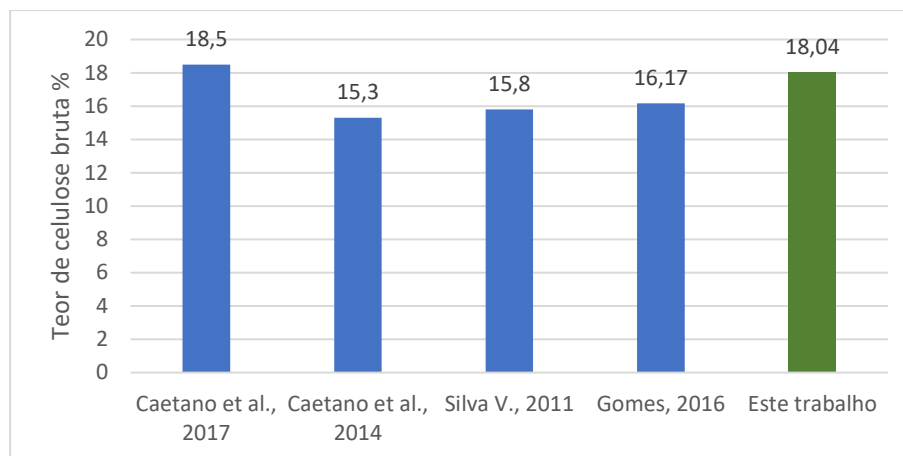


Figura 4.3. Teor de celulose bruta da borra de café determinado neste trabalho, em comparação com outros valores existentes na literatura, expresso em % m/m, em base seca.

O teor de celulose bruta determinado neste trabalho (18,04%) é similar aos valores descritos na literatura, sendo que estes valores de teor de celulose bruta de cerca 18% m/m, são os valores máximos encontrados na borra de café, de acordo com determinações de diversos tipos de borra de café (Caetano et al., 2014, 2017; Massaya et al., 2019).

O teor de celulose bruta da borra de café é consideravelmente inferior a outros materiais lignocelulósicos, tais como o bagaço de cana-de-açúcar (42 – 48%), espiga de milho (42 – 45%), palha de trigo (33 – 38%) e palha de arroz (28 – 36%), pelo que a concentração de açúcares hexoses, tais como a glicose, obtidas a partir desde resíduo, poderá ser igualmente inferior, o que minimiza a obtenção de elevadas concentrações de bioetanol.

Na Figura 4.4, encontram-se apresentados os valores determinados para os teores de lignina insolúvel (lignina Klason), lignina solúvel e lignina total.

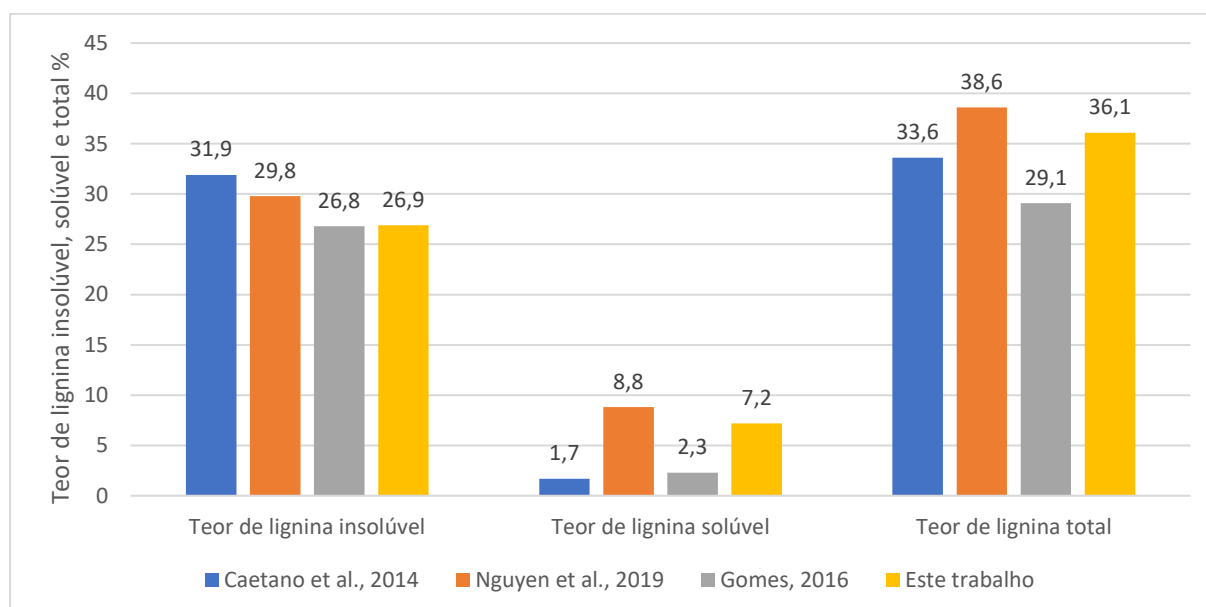


Figura 4.4. Teor de lignina insolúvel, solúvel e total, determinados neste trabalho, em comparação com outros valores existentes na literatura, em % m/m, em base seca.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, referente ao teor de lignina total da borra de café (36,1%) e os valores presentes na literatura (29,1 – 38,6%), constata-se que o teor de lignina

presente na borra de café em estudo encontra-se dentro do que está presente na literatura. Este é superior ao teor de lignina de diversas outras biomassas lignocelulósicas, tais como a palha de trigo (17 – 19%), a palha de arroz (12 – 14%), a palha de cevada (14 – 19%) e a espiga de milho (7 – 19%).

#### **4.2. Pré-tratamento e hidrólise enzimática - Concentração de açúcares e compostos inibidores**

Os resultados referentes às concentrações dos açúcares estão expressos em ‘g/L’ e em ‘g açúcar/100 g borra de café seca’ – rendimento em celobiose ( $Y_c$ ), rendimento em glicose ( $Y_g$ ), rendimento em xilose ( $Y_x$ ) e rendimento em arabinose ( $Y_a$ ) - este último deve-se ao fato da necessidade de se definir um critério de avaliação do rendimento de cada ensaio, uma vez que são variados os valores da massa inicial da amostra de borra de café e do volume da solução resultante do pré-tratamento e da hidrólise enzimática.

Referente aos compostos inibidores, somente o ácido acético foi detetado, sendo que o HMF e furfural não foram detetados em nenhum ensaio.

##### **4.2.1. Conjunto de ensaios 1 (CE#1) – Planeamento experimental e tratamento estatístico**

Os resultados do conjunto de ensaio do planeamento experimental (CE#1) encontram-se apresentados na Tabela 4.2. Neste conjunto de ensaios, os açúcares e inibidores foram quantificados somente após a hidrólise enzimática.

Os valores referentes aos rendimentos dos açúcares totais no hidrolisado ( $Y_s$  total g/100 g borra) abrangem somente os açúcares fermentescíveis, não abrangendo assim, a celobiose, uma vez que esta não pode ser consumida diretamente pela levedura *S. Cerevisiae*.

Os valores das massas de borra de café utilizadas e volume da solução de cada ensaio, assim como as concentrações das réplicas dos ensaios nos vértices, estão apresentadas no Anexo B.1.

Neste conjunto de ensaio, a xilose é o açúcar presente em maior concentração no hidrolisado (0,16 - 39,38 g/100 g), seguido da arabinose (1,77 - 5,10 g/100 g), celobiose (0,03 – 4,28 g/100 g) e glicose (0,36 – 3,46 g/100g). A presença de celobiose indica uma hidrólise incompleta da biomassa, sendo que a sua presença no hidrolisado não é desejada, uma vez que este açúcar, teoricamente, não pode ser consumido pela levedura *S. Cerevisiae*, mas pode o ser consumido pela *P. Stipitis*. O baixo teor de glicose indica que as enzimas e/ou as dosagens utilizadas na hidrólise não são capazes de hidrolisar completamente a celulose e as celobioses. Entretanto, o maior rendimento da hidrólise em termos de recuperação de glicose foi de 37% (Ensaio 6; ver Tabela 4.2). De acordo com a literatura, o rendimento máximo da hidrólise em recuperação de glicose de materias lignocelulósicos é de aproximadamente 75%, para os materiais mais celulósicos disponíveis (Mabee et al., 2011).

Através do tratamento estatístico de dados do planeamento experimental, foi realizada uma análise da variância e significância dos dados, e da influência dos parâmetros no rendimento dos açúcares fermentescíveis. (Tabela 4.3).

Verificou-se que para todos os açúcares fermentescíveis (glicose, xilose e arabinose), o modelo tem significância estatística, isto é, existe correlação de algum(ns) fator(es) no rendimento, uma vez que o F calculado > F tabelado, para um intervalo de confiança de 5%.

Para a glicose, observou-se que o tempo (fator B), a temperatura (fator C), as interações de concentração de ácido e tempo (fator AB) e concentração de ácido, tempo e temperatura (fator ABC), têm correlação estatística com o rendimento em glicose, para um intervalo de confiança de 5%, uma vez que o valor  $p < 5\%$  e  $t\text{-stat} \neq 0$ . A correlação mais forte é observada na temperatura, seguida do tempo, sendo que as interações AB e ABC apresentam efeitos negativos nas respostas.

Tabela 4.2. Rendimento médio em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no primeiro conjunto de ensaios (CE#1) de pré-tratamento ácido seguido de hidrólise enzimática com Accellerase® 1500.

Condições	Celobiose (g/L)	Yc (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Yg (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Yx (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ya (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
1	0,06	0,29	0,07	0,36	0,06	0,28	0,37	1,77	0,07	0,56	<b>2,41</b>
2	0,04	0,21	0,06	0,33	0,03	0,16	0,37	2,05	0,08	0,50	2,54
3	0,62	3,22	0,21	1,08	0,19	0,98	0,73	3,79	0,09	1,75	5,84
4	0,63	3,74	0,20	1,19	0,17	0,99	0,60	3,55	0,07	1,60	5,73
5	0,56	3,50	0,29	1,81	4,16	25,70	0,69	4,29	0,08	5,71	31,80
6	0,72	4,28	0,49	2,95	5,17	30,90	0,80	4,78	0,10	7,17	38,63
7	0,58	3,15	0,64	<b>3,46</b>	6,52	35,21	0,90	4,84	0,11	8,64	43,50
8	0,03	<b>0,17</b>	0,36	2,05	6,90	<b>39,38</b>	0,89	<b>5,10</b>	0,11	8,18	<b>46,54</b>
17	0,96	4,92	0,46	2,37	1,96	10,02	0,66	3,37	0,08	3,08	15,76
18	0,79	4,16	0,16	0,82	1,54	8,09	0,58	3,03	0,08	2,27	11,93
19	0,68	3,38	0,27	1,36	1,24	6,18	0,47	2,33	0,04	1,98	9,87

Na xilose, verificou-se que somente a temperatura (fator C) apresenta correlação estatística com o rendimento em xilose (valor  $p = 0,00\%$ ;  $t\text{-stat} = 14,18188$ ), para um intervalo de confiança de 5%, sendo ainda a correlação mais forte observada dentre todos os fatores para todos os açúcares analisados. Realizou-se uma redução do modelo para a xilose, considerando o fator tempo (B), pois estava próximo ao limiar do intervalo de confiança (valor  $p = 5,7\%$ ), entretanto, este apresentou um valor- $p = 5,2\%$  no novo modelo, pelo que não se verificou correlação com a resposta, para o intervalo de confiança estipulado.

Relativamente à arabinose, o tempo (fator B) e a temperatura (fator C) apresentaram correlação estatística com o rendimento em arabinose, para um intervalo de confiança de 5%, sendo a temperatura o fator com a mais forte correlação (valor  $p = 0,00\%$ ;  $t\text{-stat} = 6,020175$ ).

Ademais, verificou-se que a concentração de ácido (fator A) não apresentou influência no rendimento para nenhum açúcar, dentro das condições estudadas, igualmente como se verificou em Rocha et al., 2014.

Relativamente ao ácido acético, as concentrações determinadas nestes ensaios (0,07 – 0,11 g/L) não produzem qualquer efeito inibitório na produção de etanol através da fermentação, tanto no metabolismo da *S. cerevisiae* quanto no da *P. stipitis* (Abud et al., 2017; Palmqvist et al., 1999). Ademais, no caso do metabolismo da *S. Cerevisiae*, concentrações de ácido acético até 10 g/L, na ausência de HMF e furfural, aumentam a produtividade de etanol (Palmqvist et al., 1999). No caso da *P. stipitis*, a inibição provocada pelo ácido acético é dependente diretamente do pH do meio, sendo que o valor mínimo para que ocorra 50% de inibição da produção de etanol é de 0,80 g/L e 13,8 g/L, para pH = 5,01 e 6,5, respectivamente (van Zyi et al., 1991).

Observou-se também que a concentração de ácido acético é proporcional à concentração de pentoses no hidrolisado, o que é coerente com a literatura, uma vez que o ácido acético é gerado a partir da hidrólise dos grupos acetil da hemicelulose (Lorencini, 2013).

O ensaio 8 apresentou o maior rendimento em açúcares totais (46,54 g/100 g), em xilose (39,38 g/100 g) e arabinose (5,10 g/100 g) e o ensaio 7 apresentou o maior rendimento em glicose (3,46 g/100 g).

Tabela 4.3. Tratamento estatístico dos dados do planejamento experimental (CE#1). Valores de F calculado para cada parâmetro e o respectivo efeito, para um nível de confiança de  $p = 0,05$  (5%).

<b>GLICOSE</b>			
<b>Fatores</b>	<b>t-stat</b>	<b>valor-P</b>	<b>F tabelado</b>
A	-0,17663	86,3%	3,01
<b>B</b>	<b>2,359727</b>	<b>3,8%</b>	
<b>C</b>	<b>7,602261</b>	<b>0,0%</b>	<b>F calculado</b>
<b>AB</b>	<b>-2,48937</b>	<b>3,0%</b>	11,20
AC	-0,35856	72,7%	
BC	-0,92372	37,5%	<b>R</b>
<b>ABC</b>	<b>-2,80306</b>	<b>1,7%</b>	0,8657
<b>XILOSE</b>			
<b>Fatores</b>	<b>t-stat</b>	<b>valor-P</b>	<b>F tabelado</b>
A	1,048163	31,7%	3,01
B	2,126508	5,7%	
<b>C</b>	<b>14,48188</b>	<b>0,0%</b>	<b>F calculado</b>
<b>AB</b>	<b>-0,10123</b>	<b>92,1%</b>	31,38
AC	1,067166	30,9%	
BC	1,782178	10,2%	<b>R</b>
<b>ABC</b>	<b>-0,13228</b>	<b>89,7%</b>	0,9523
<b>ARABINOSE</b>			
<b>Fatores</b>	<b>t-stat</b>	<b>valor-P</b>	<b>F tabelado</b>
A	0,629732	54,2%	3,01
<b>B</b>	<b>3,274868</b>	<b>0,7%</b>	
<b>C</b>	<b>6,020175</b>	<b>0,0%</b>	<b>F calculado</b>
<b>AB</b>	<b>-0,54115</b>	<b>59,9%</b>	7,47
AC	0,529768	60,7%	
BC	-2,08238	6,1%	<b>R</b>
<b>ABC</b>	<b>0,189803</b>	<b>85,3%</b>	0,8262

Verificou-se também que o ensaio 8 apresentou o mais baixo rendimento em celobiose (0,17 g/100 g), o que indica uma conversão superior de celobiose em glicose. Neste mesmo sentido, o ensaio 7 apresentou um rendimento em celobiose significativamente superior (3,15 g/100 g) ao ensaio 8, o que implica que, para as condições do ensaio 7, ainda há potencial de se obter maior quantidade de glicose, ao se alterar algum parâmetro operatório do pré-tratamento e/ou da hidrólise.

O que diferencia o ensaio 7 do ensaio do ensaio 8 é a concentração do ácido no pré-tratamento, que foi de 3 e 5%, respectivamente. Dado isto, definiu-se o ensaio 7 como o que obteve um melhor rendimento geral, pois embora tenha obtido menor concentração de açúcares totais (- 6,5%), este obteve maior rendimento em glicose (+ 59,2%), o qual é mais desejável do ponto de vista da fermentação a etanol e, além disso, com 40% menos concentração de ácido sulfúrico, o que pode contribuir



significativamente para o balanço energético positivo do processo, principalmente quando implementado em grande escala.

Dado isto, no sentido de otimizar os parâmetros operatórios do pré-tratamento e hidrólise enzimática da borra de café para a produção de bioetanol, descartou-se a utilização de ácido sulfúrico a 5% v/v e, no conjunto de ensaios seguinte, foi testada a utilização de ácido sulfúrico a 1% v/v.

Como a quantificação dos açúcares foi realizada somente ao fim da hidrólise enzimática, não se pôde perceber em que momento estes açúcares foram libertados, pelo que dificulta a análise do efeito dos parâmetros do pré-tratamento e, por este motivo, nos conjuntos de ensaios subsequentes, os açúcares foram quantificados antes e depois da hidrólise enzimática

Relativamente aos ensaios em autoclave (Tabela 4.4), o ensaio com razão líquido/sólido mais elevada R L/S = 25 (ensaio C), originou o maior rendimento em açúcares totais (47,68 g/100 g) e em glicose (5,04 g/100 g) de todos os ensaios.

Os valores da massa de borra de café utilizada e volume da solução de cada ensaio, assim como as concentrações das réplicas estão apresentadas no Anexo B.2.

*Tabela 4.4. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios de pré-tratamento em autoclave seguido de hidrólise enzimática com Accellerase® 1500 (A,B e C) e nos ensaios em banho termostatizado sem hidrólise enzimática (SH) e sem pré-tratamento (SP).*

Ensaio	Celobiose (g/L)	Yc (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Yg (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Yx (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ya (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
A	1,09	6,78	0,53	3,27	0,31	1,88	0,73	4,41	0,09	2,65	9,56
B	1,05	3,05	1,49	4,59	6,03	19,54	1,45	4,41	0,20	10,01	28,53
C	0,01	0,12	0,58	<b>5,04</b>	4,41	38,53	0,47	4,11	0,06	5,46	<b>47,68</b>
SH	0,71	4,03	0	<b>0</b>	1,99	11,28	0,67	3,78	0,08	0,36	14,84
SP	0,07	0,29	0,03	0,14	0,01	0,06	0,01	0,06	0,03	0,06	<b>0,36</b>

O ensaio B, o qual é homólogo ao ensaio 8 realizado em banho termostático, embora tenha originado um rendimento significativamente superior em glicose (+ 124%), originou um rendimento em açúcares totais inferior (- 39%), devido ao baixo rendimento em pentoses, mais precisamente da xilose. As condições mais agressivas de temperatura poderão ter degradado a xilose, o que também explicaria a elevada concentração de ácido acético (82% superior ao ensaio homólogo em banho termostático). O rendimento em todos os açúcares individualmente e totais foram proporcionalmente superiores ao aumento da razão líquido/sólido.

A elevada temperatura (121 °C) do pré-tratamento em autoclave pode contribuir para uma melhor hidrólise das celuloses, resultando em um maior rendimento em glicose, o que converge com o que se encontra na literatura (Banerjee et al., 2010; Mabee et al., 2011).

Entretanto, apesar de se dar em um tempo significativamente inferior ao pré-tratamento em banho termostático (20 minutos), a operação em alta temperatura (121 °C) e pressão (2 bar) da autoclave pode afetar negativamente o balanço energético do processo. Embora o ensaio C tenha obtido concentrações superiores de glicose e açúcares totais, neste foi utilizado um maior volume de solução de ácido sulfúrico (250 mL) e, como referido anteriormente, uma maior concentração de ácido sulfúrico, além de um volume de ácido consideravelmente superior, pode contribuir negativamente para o balanço energético do processo, tornando-o inviável para a produção de bioetanol, sendo necessário um estudo neste sentido, com o objetivo de analisar a viabilidade do processo.

O ensaio sem pré-tratamento (SP) originou o menor rendimento em açúcares totais (0,36 g/100 g), o que demonstra a extrema necessidade de se realizar o pré-tratamento para facilitar o acesso das enzimas aos polissacarídeos e assim se obter maiores concentrações de açúcares.

O ensaio sem hidrólise enzimática (SH) originou um rendimento em açúcares totais com valor dentre as determinadas nos ensaios com mesmas condições de pré-tratamento (ensaios 17 – 19). Constata-se que a hidrólise enzimática nas condições estipuladas não influenciou o rendimento em açúcares totais, entretanto, não apresentou concentração de glicose (0 g/100 g), indicando a necessidade de sua realização para se obter açúcares glicose. Portanto, quanto aos ensaios exploratórios, apenas o pré-tratamento permite hidrolisar pelo menos parcialmente as hemiceluloses, com liberação de xilose e arabinose, e conversão de celulose em celobiose.

#### 4.2.2. Conjunto de ensaios 2 (CE#2) – Estudo da concentração de ácido, tempo de pré-tratamento e dosagem das enzimas na hidrólise enzimática

No conjunto de ensaios número 2 (CE#2), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.5. Os valores da massa de borra de café utilizada e volume da solução de cada ensaio estão no Anexo B.3.

Tabela 4.5. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios 2 (CE#2), de pré-tratamento em banho termostático seguido de hidrólise enzimática com Viscamyl Flow e GC 151.

Ensaio	Celobiose (g/L)	Yc (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Yg (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Yx (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ya (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
A1P	0,71	2,94	0,13	0,55	7,65	<b>31,91</b>	0,41	1,70	0,09	8,19	<b>34,17</b>
A1H	0,36	1,74	1,28	6,21	5,92	28,86	0,90	4,40	0,07	8,10	39,46
A2P	0,70	2,89	0,14	<b>0,59</b>	7,66	31,65	0,44	1,80	0,08	8,24	34,04
A2H	0,37	1,85	1,10	5,42	6,41	31,62	0,76	3,75	0,07	8,27	<b>40,77</b>
B1P	0,69	3,02	0,04	0,17	6,06	26,38	1,13	4,93	0,10	7,24	31,48
B1H	0,21	1,11	0,95	4,93	4,72	24,50	0,71	3,69	0,06	6,39	33,11
B2P	0,68	2,94	0,02	0,09	6,23	27,09	1,02	4,43	0,09	7,27	31,61
B2H	0,34	1,74	1,03	5,33	5,03	26,10	0,56	2,90	0,07	6,62	34,32
C1P	0,49	1,99	0,05	0,21	4,86	19,71	0,24	0,96	0,07	5,15	20,88
C1H	0,16	0,66	0,97	4,03	4,49	18,66	0,88	3,66	0,07	6,35	26,33
C2P	0,44	1,83	0,04	0,17	4,12	17,91	0,21	0,88	0,06	4,37	18,06
C2H	0,16	0,70	0,76	3,25	4,15	17,81	0,57	2,43	0,08	5,48	23,48
D1P	0,65	2,76	0,00	0,00	1,03	4,35	0,86	3,63	0,08	1,89	7,98
D1H	1,14	4,98	0,93	4,06	1,00	4,38	0,83	3,63	0,07	2,76	12,06
D2P	0,84	3,64	0,00	0,00	1,29	5,55	1,23	<b>5,28</b>	0,13	2,51	10,83
D2H	0,23	1,05	1,21	5,55	1,57	7,18	0,63	2,89	0,13	3,41	15,61

\*Ensaio P – Quantificação após pré-tratamento. \*Ensaio H – Quantificação após hidrólise enzimática.

A nível de pré-tratamento, os ensaios com concentração de ácido a 3% v/v (A e B) apresentaram rendimentos em açúcares totais significativamente superiores aos ensaios a 1% v/v (C e D), sendo que essa superioridade se deu maioritariamente através da xilose. Os ensaios com tempo de 8 h (A e C) apresentaram rendimentos superiores em glicose aos ensaios com tempo de 4 h (B e D).

No pré-tratamento, os ensaios que apresentaram um melhor rendimento em açúcares totais, açúcares glicose e xilose foram os ensaios A, com valores médios de 34,11 g/100 g, 0,57 g/100 g e 31,78 g/100 g, respetivamente, os quais foram realizados com  $C H_2SO_4 = 3\%$  v/v, durante 8 horas. Por outro lado, os ensaios B apresentaram o melhor rendimento em açúcares arabinose, com valor médio de 4,68 g/100 g, sendo ligeiramente inferior aos ensaios D (4,46 g/100 g).

De forma geral, observou-se que, no pré-tratamento, neste conjunto de ensaios, uma maior concentração de ácido e um maior tempo de reação favorece a libertação de xilose, assim como um maior tempo de reação favorece a libertação de glicose, independentemente da concentração de ácido e, por fim, um menor tempo de reação favorece a libertação de arabinose, independentemente da concentração de ácido.

À nível de hidrólise enzimática, todos os ensaios apresentaram aumento da concentração de açúcares (5 – 51%), sendo que para a glicose, este aumento foi significativamente superior (3,08 – 5,66 g/100 g), indicando assim, portanto, que a hidrólise enzimática é uma etapa crucial para a obtenção de glicose (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Aumento de açúcares (glicose, em g/100 g, pentoses e totais, em %) na hidrólise enzimática, relativamente ao pré-tratamento, no conjunto de ensaios número 2 (CE#2).

Ensaio	Aumento glicose (g/100 g)	Aumento pentoses (%)	Aumento açúcares totais (%)
A1	5,66	-1	15
A2	4,83	6	20
B1	4,76	-10	5
B2	5,24	-8	9
C1	3,82	8	26
C2	3,08	13	30
D1	4,06	0	51
D2	5,55	-7	44

Em contrapartida, a evolução da concentração de xilose pela hidrólise enzimática foi variada, diminuindo nos ensaios onde se originou altas concentrações no pré-tratamento e aumentando nos ensaios onde se originou baixas concentração no pré-tratamento. O mesmo se deu com a arabinose. Esta diminuição da concentração das pentoses, principalmente nos ensaios onde apresentou elevadas concentrações, indica que, possivelmente, a hidrólise das hemiceluloses já devia estar completa e, com a etapa da hidrólise enzimática, esta causou degradação dos açúcares.

Observou-se também que, uma maior quantidade do complexo enzimático *GC 151*, favoreceu o aumento de açúcares totais na hidrólise enzimática em todos os ensaios (exceto no ensaio D), possivelmente devido à especificidade da enzima da  $\beta$ -glicosidase presente no complexo, pelo que foi utilizado uma maior proporção deste complexo enzimático nos ensaios de otimização subsequentes.

Por fim, o ensaio A2 originou a maior concentração de açúcares fermentescíveis (40,77 g/100 g) e o ensaio D1 apresentou a maior recuperação de glicose (44,79%) (Tabela 4.7), relativamente ao teor de celulose bruta da borra de café. Esta observação indica mais uma vez que, a libertação de glicose no hidrolisado é mais dependente da hidrólise enzimática do que do pré-tratamento, pois o ensaio D2, mesmo estando sob as condições mais amenas de pré-tratamento, originou rendimentos consideráveis em glicose.

Tabela 4.7. Rendimento de hidrólise em glicose, relativamente ao teor de celulose bruta determinada da borra de café, expresso em % m/m.

Ensaio	Rendimento de hidrólise %
<b>A1</b>	<b>34,40</b>
<b>A2</b>	30,80
<b>B1</b>	25,54
<b>B2</b>	30,00
<b>C1</b>	23,03
<b>C2</b>	19,20
<b>D1</b>	<b>44,79</b>
<b>D2</b>	31,26

Entretanto, o ensaio D1 foi o único ensaio que apresentou aumento de celobiose após a hidrólise enzimática, constituindo, portanto, uma relativamente elevada fração das hexoses finais (55%), a celobiose, que não é fermentável. É de se referir também que, embora o ensaio D2 tenha originado um dos mais baixos rendimentos em xilose (7,18 g/100 g), este apresentou um rendimento relativamente alto de hidrólise (31,26%), com uma fração maioritária de glicose (84%) (ver Tabela 4.5).

O ensaio A1 apresentou o maior rendimento de hidrólise (34,40%) com uma fração maioritária de glicose (ver Tabela 4.6). Para este ensaio, a fração de glicose representou 78% das hexoses, sendo que a fração de celobiose tem potencial de ser convertida em glicose, ao alterar alguma condição operatória da hidrólise enzimática, como por exemplo, a dosagem de enzimas e, assim, gerar um maior rendimento em glicose.

#### **4.2.3. Conjunto de ensaios 3 (CE#3) – Estudo do tempo de pré-tratamento e dosagem das enzimas na hidrólise enzimática**

No conjunto de ensaios número 3 (CE#3), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.8. Os valores da massa de borra de café utilizada e volume da solução de cada ensaio estão disponíveis no Anexo B.4.

No pré-tratamento, os ensaios de  $t = 6$  h (ensaios 4, 5 e 6) originaram os maiores rendimentos médios em açúcares totais (26,62 g/100 g), glicose (0,12 g/100 g) e xilose (24,26 g/100 g). A concentração média mais alta de arabinose se verificou nos ensaios de  $t = 8$  h (3,74 g/100 g).

Comparado ao conjunto de ensaio CE#2, o rendimento em todos os açúcares no pré-tratamento foram inferiores, embora tenham sido realizados em condições equivalentes, exceto a arabinose, o qual apresentou rendimentos superiores neste conjunto de ensaios.

Vale ressaltar que, de forma geral, quanto maior o tempo de pré-tratamento, maior é o rendimento final em açúcares totais prontos para serem fermentados, independente das dosagens de cada complexo enzimático. Esta lógica se verifica para as pentoses, especialmente a xilose, o qual constitui a maioritária fração dos açúcares extraídos da borra de café em estudo (~ 75 – 80%). No caso da glicose, este está mais dependente da hidrólise enzimática, etapa na qual é libertada quase a totalidade de glicose encontrada no hidrolisado final.

Após hidrólise enzimática, o maior rendimento em glicose (6,99 g/100 g), xilose (30,38 g/100 g) e açúcares totais (39,72 g/100 g) se verificaram no ensaio 8 (ensaio de  $t = 8$  h).

Verificou-se também que a aplicação de uma dosagem de enzima com uma maior proporção do complexo GC 151 (GC:VIS 40:10) – ensaios E2, E5 e E8 - originaram um maior aumento médio de açúcares totais (44%) e um maior rendimento final em glicose, demonstrando que, como verificado no conjunto de ensaios anterior, uma maior dosagem deste complexo favorece a libertação de açúcares totais, especialmente de glicose (Tabela 4.9).

Tabela 4.8. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios 3 (CE#3), de pré-tratamento em banho termostático seguido de hidrólise enzimática com Viscamyl Flow e GC 151.

Ensaio	Celobiose (g/L)	Yc (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Yg (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Yx (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ya (g/100g borra)	Ác. Acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
E1P	0,14	0,54	0,00	0,00	4,92	19,72	0,19	0,78	0,07	5,12	20,50
E1H	0,03	0,20	0,68	4,24	3,02	18,83	0,29	1,82	0,04	3,99	24,89
E2P	0,12	0,46	0,00	0,00	4,60	18,23	0,90	3,58	0,06	5,50	21,80
E2H	0,08	0,43	0,93	4,84	4,03	20,91	0,33	1,70	0,05	5,29	27,44
E3P	0,74	2,97	0,00	0,00	4,83	19,37	1,08	4,34	0,06	5,91	23,70
E3H	0,27	1,43	0,84	4,42	3,77	19,79	0,46	2,40	0,05	5,06	26,61
E4P	0,71	2,86	0,03	0,12	5,18	20,86	1,05	4,22	0,07	6,26	25,20
E4H	0,29	1,65	0,91	5,21	4,00	22,90	0,41	2,33	0,05	5,31	30,43
E5P	0,73	3,17	0,05	<b>0,23</b>	6,03	<b>26,06</b>	0,26	1,14	0,08	6,34	<b>27,42</b>
E5H	0,37	2,21	1,15	6,92	4,61	27,63	0,36	2,15	0,05	6,12	36,70
E6P	0,14	0,59	0,00	0,00	6,08	25,85	0,32	1,38	0,08	6,41	27,23
E6H	0,33	1,92	1,09	6,36	4,75	27,71	0,57	3,35	0,06	6,41	37,42
E7P	0,09	0,38	0,00	0,00	4,79	20,52	0,92	3,95	0,06	5,71	24,47
E7H	0,38	2,06	0,89	4,87	4,78	26,18	0,46	2,51	0,05	6,13	33,56
E8P	0,10	0,44	0,00	0,00	4,61	19,84	0,77	3,32	0,05	5,38	23,16
E8H	0,11	0,61	1,27	<b>6,99</b>	5,52	30,38	0,43	2,35	0,08	7,22	<b>39,72</b>
E9P	0,77	3,15	0,00	0,00	5,65	23,13	0,96	3,94	0,07	6,61	27,07
E9H	0,31	1,63	0,95	4,94	5,16	26,79	0,58	2,99	0,06	6,68	34,72

\*Ensaio P – Quantificação após pré-tratamento.

\*Ensaio H – Quantificação após hidrólise enzimática.

Embora os ensaios de pré-tratamento de  $t = 6$  h tenham apresentado melhores rendimentos em açúcares após pré-tratamento (ver Tabela 4.7), a hidrólise dos ensaios de pré-tratamento de 8 h apresentou um maior aumento médio de açúcares na hidrólise enzimática (45%).

Isto mostra que o pré-tratamento condiciona a eficácia da hidrólise enzimática e converge com o que está descrito na literatura, isto é, o seu papel em quebrar as estruturas da lignina e hemicelulose e, desta forma, facilitar o acesso das enzimas à celulose, libertando assim os monossacarídeos fermentescíveis. Logo, mesmo que os açúcares presentes na biomassa não sejam libertados na etapa do pré-tratamento, estes se tornam mais suscetíveis de serem libertados após a hidrólise enzimática.

Acrescenta-se ainda que, os ensaios de pré-tratamento de  $t = 8$  h, originaram cerca de 8 – 10% mais açúcares totais finais do que os ensaios de pré-tratamento de  $t = 6$  h, sendo que o açúcar maioritário desta diferença é a xilose. Para fins de implementação do processo em maiores escalas, deve-se analisar o seu balanço energético para determinar a sua viabilidade, no qual o tempo de processo despendido confere um fator importante. Adicionalmente, a xilose não é tão facilmente fermentável quanto a glicose

e apresenta menores rendimentos teóricos em etanol e, portanto, neste caso, o processo poderia ser implementado com fins de obtenção de outros bioprodutos, tais como o xilitol, um adoçante natural.

Tabela 4.9. Aumento dos açúcares (glicose, em g/100 g, pentoses e totais, em %) na hidrólise enzimática, relativamente ao pré-tratamento, no conjunto de ensaios número 3 (CE#3).

Ensaio	Aumento glicose (g/100 g)	Aumento pentoses (%)	Aumento açúcares totais (%)
<b>E1</b>	4,24	1	21
<b>E2</b>	4,84	4	<b>26</b>
<b>E3</b>	4,42	-6	12
<b>E4</b>	5,09	1	21
<b>E5</b>	6,69	10	<b>34</b>
<b>E6</b>	6,36	14	37
<b>E7</b>	4,87	17	<b>37</b>
<b>E8</b>	<b>6,99</b>	<b>41</b>	<b>72</b>
<b>E9</b>	4,94	10	<b>26</b>

O ensaio E5 apresentou o maior rendimento de hidrólise (33,25%) (Tabela 4.10).

Entretanto, como verificado no ensaio D1 (ver capítulo 4.2.2), este ensaio originou uma fração relativamente alta de celobiose nas hexoses (24%).

O ensaio E8 originou o maior rendimento de hidrólise (29,81%) com uma fração elevada de glicose (92%).

De forma geral, ao se avaliar a eficiência do processo através da análise do rendimento da hidrólise, deve-se analisar a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática em conjunto, assim como a fração de glicose e celobiose.

Genericamente, observou-se que, os ensaios com pré-tratamento de t = 6 h (E4, E5 e E6) apresentaram um valor médio de rendimento de hidrólise enzimática (29,36%) superior aos ensaios com pré-tratamento de t = 8 h (E7, E8 e E9) (27,82%), mas com uma fração média de glicose inferior (76%). Os ensaios E7, E8 e E9 apresentaram uma fração média de glicose de 79% nas hexoses final. Observou-se também que, os ensaios com dosagens de enzima com maior proporção do complexo enzimático GC 151 (E8, E5 e E2), originaram uma fração média de glicose e uma recuperação de hexoses final superiores.

Tabela 4.10. Rendimento de hidrólise em termos de glicose, relativamente ao teor de celulose bruta determinada da borra de café, expresso em % m/m.

Ensaio	Rendimento de hidrólise %
<b>E1</b>	14,28
<b>E2</b>	20,14
<b>E3</b>	22,54
<b>E4</b>	24,34
<b>E5</b>	<b>33,25</b>
<b>E6</b>	30,48
<b>E7</b>	27,48
<b>E8</b>	<b>29,81</b>
<b>E9</b>	26,17

#### 4.2.4. Conjunto de ensaios 4 (CE#4) – Estudo da razão líquido/sólido (R L/S)

No conjunto de ensaios número 4 (CE#4), foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.11. Os valores de massa de borra de café utilizada e volume de solução de cada ensaio estão disponíveis no Anexo B.5.

Tabela 4.11. Rendimento em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose) e concentração de ácido acético, no conjunto de ensaios 4 (CE#4), de pré-tratamento em banho termostático seguido de hidrólise enzimática com Viscamyl Flow e GC 151.

Ensaio	Celobiose (g/L)	Yc (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Yg (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Yx (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ya (g/100g borra)	Ác. Acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
R0P	0,77	3,48	0,08	0,35	5,68	25,79	1,28	5,81	0,08	7,04	31,96
R0H	0,23	1,23	0,71	3,77	5,54	29,30	0,74	3,90	0,07	6,99	36,97
R1P	0,84	2,61	0,10	0,30	7,45	23,13	1,73	5,38	0,12	9,28	28,82
R1H	0,66	2,35	0,67	2,40	8,20	29,37	0,85	3,06	0,11	9,73	34,83
R2P	0,64	1,51	0,11	0,26	7,76	18,43	1,84	4,36	0,16	9,70	23,05
R2H	0,29	0,76	1,48	3,84	10,49	27,22	1,30	3,38	0,15	13,27	34,44
R3P	0,77	1,49	0,12	0,24	8,20	15,92	1,95	3,78	0,15	10,27	19,94
R3H	0,26	0,57	1,33	2,86	11,55	24,95	1,53	3,30	0,20	14,40	31,11

\*Ensaio P – Quantificação após pré-tratamento.

\*Ensaio H – Quantificação após hidrólise enzimática.

O ensaio R0, com R L/S = 15, apresentou o maior rendimento em açúcares totais após pré-tratamento (31,96 g/100g) e após hidrólise enzimática (36,97 g/100 g).

A diminuição da razão líquido/sólido se mostrou proporcional à diminuição do rendimento em açúcares totais, indicando que um maior valor para R L/S favorece a obtenção dos açúcares fermentescíveis, assim como também se verificou nos ensaios em autoclave.

#### 4.3. Fermentação - Conjunto de ensaios 5 (CE#5)

No conjunto de ensaios CE#5, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.12. Os valores apresentados correspondem ao valor médio das réplicas. Os resultados para cada ensaio estão apresentados no Anexo B.6.

Primeiramente, deve-se referir que houve um erro experimental na inoculação das leveduras. As leveduras foram inoculadas ao hidrolisado juntamente com o meio de cultura (composto por glicose e xilose, para a *S. cerevisiae* e *P. stipitis*, respetivamente) e, além disso, não foi realizada a quantificação dos açúcares e etanol, em t = 0 (início da fermentação), pelo que não se pôde saber a concentração destes açúcares e de etanol ao início da fermentação, tornando-se impossível saber precisamente a evolução do consumo destes açúcares e a evolução da produção de etanol no primeiro instante de tempo.

Entretanto, observou-se que, para o ensaio de fermentação com a levedura *S. cerevisiae* (FS), ocorreu o consumo de 100% da glicose do hidrolisado, ao fim de 12 horas. Adicionalmente, verificou-se uma significativa diminuição de xilose, indicando um possível consumo deste açúcar, ao contrário do que se encontra descrito na literatura, sendo que ao fim de 12 horas, houve uma diminuição de aproximadamente 100% da xilose. Observou-se também uma diminuição da concentração de arabinose,



em uma taxa inferior à xilose, que poderia estar sendo consumido de forma latente ou ter se degradado a furfural durante a fermentação, cujo composto não foi quantificado neste conjunto de ensaios.

Tabela 4.12. Resultados obtidos para o conjunto de ensaios CE#5, referente aos rendimentos em açúcares (celobiose, glicose, xilose, arabinose), concentração de ácido acético e concentração de etanol obtida na fermentação dos hidrolisados.

Ensaio	Yc (g/100 g borra)	Yg (g/100g borra)	Yx (g/100g borra)	Ya (g/100g borra)	Ác. Acético (g/L)	Ys total (g/100g borra)	Conc. Etanol (g/L)
<b>FS (P)</b>	1,92	0,21	23,33	4,60	0,06	30,02	-
<b>FS (H)</b>	1,53	8,64	25,42	2,69	0,02	38,28	
<b>FS (E)</b>	1,90	9,29	26,22	2,60	0,04	40,00	
<b>t = 12 h</b>	0,61	0	0,32	3,68	0,26	4,60	4,35
<b>t = 36 h</b>	0,40	0,79	0,44	1,00	0,14	2,57	4,51
<b>FP (P)</b>	1,89	0,12	13,77	2,76	0,04	18,55	-
<b>FP (H)</b>	0,31	4,89	14,54	1,09	0,02	20,82	
<b>FP (E)</b>	0,88	5,46	15,99	1,25	0,03	23,59	
<b>t = 6 h</b>	0,29	2,10	57,53	5,51	0,17	65,42	1,26
<b>t = 24 h</b>	0	0	42,06	6,48	0,20	48,53	2,09

\*Ensaio P – Quantificação após pré-tratamento.

\*Ensaio H – Quantificação após hidrólise enzimática.

\*Ensaio E – Quantificação após esterilização do hidrolisado.

\*Ensaio FP - Realizado com borra de café previamente seca.

Observou-se também que, inicialmente (t = 12 h), ocorreu uma diminuição da celobiose, que pode ter sido hidrolisada em glicose em simultâneo à fermentação ou esta variação se deu por erro de amostragem. Ao fim de 36 horas, houve um aumento do teor de celobiose e glicose, as quais poderiam estar sendo libertadas da matriz da biomassa simultaneamente à fermentação.

Adicionalmente, o aumento da concentração de etanol foi proporcional à diminuição dos açúcares totais, sendo que a produtividade máxima (Q<sub>máx</sub>) do etanol pode ter sido obtida a t = 12 h, entretanto, esta afirmação pode estar incorreta, devido ao desconhecimento da evolução da fermentação no primeiro instante de tempo (entre t = 0 e t = 12) (Tabela 4.13).

Para se avaliar a eficiência da fermentação, é necessário conhecer o rendimento em etanol (Y<sub>p/s</sub>, expresso em g de etanol final/g de açúcar em t = 0) (equação 10), para então se determinar a eficiência da fermentação (η, expressa em rendimento em etanol obtido (g/g)/rendimento em etanol teórico (g/g)) (equação 12), assim como para se determinar a produtividade de etanol (Q<sub>máx</sub>, expresso em concentração de etanol (g/L)/tempo de fermentação (h)) (equação 11), é necessário saber a concentração de etanol em t = 0, que a princípio seria igual a zero.

No caso da *S. cerevisiae*, para o cálculo do rendimento em etanol, considera-se somente a glicose como substrato e, para a *P. stipitis*, considera-se a glicose, xilose e arabinose como substrato, uma vez que esta é capaz de metabolizar os três açúcares. Desta forma, é imprescindível a quantificação dos açúcares e etanol em t = 0, para se avaliar a eficiência da fermentação.

Possivelmente já se havia produzido etanol no meio de cultura, uma vez que se reunia as condições para tal, como a concentração de açúcares e a presença de levedura, pelo que a concentração de etanol obtida ao final da fermentação não foi toda produzida ao longo desta e, por não se ter a quantificação de açúcares e etanol no início da fermentação (t = 0), se tornou impossível saber a real evolução da concentração destes compostos.

Além disso, apesar dos erros experimentais, observou-se uma diminuição de aproximadamente 100% da concentração de xilose em um período de 12 horas, que pode ter ou se degradado a furfural ou



ter sido consumida pela levedura e, no entanto, o cálculo da eficiência da fermentação com a *S. cerevisiae* considera somente a estequiometria de conversão de glicose em etanol, pelo que deveria ser feito ensaios adicionais para se verificar a que de fato deve a diminuição da concentração de xilose.

Portanto, as informações fiáveis que se podem obter a partir dos resultados dos ensaios FS, é que toda a glicose foi consumida pela *S. cerevisiae* e, com base nos rendimentos teóricos (Figura 2.6), originaria 0,70 g/L de etanol a partir de 1,36 g/L de glicose inicial, para 100% de eficiência da fermentação, se somente a glicose fosse consumida pela levedura. Adicionalmente, no ensaio FS, houve uma diminuição de 95% dos açúcares totais ao fim de 36 horas, principalmente de glicose (consumida pela levedura) e xilose (degradada ou consumida), assim como houve uma diminuição da concentração de arabinose, a uma taxa inferior aos outros açúcares, pelo que pode ter sido consumida ou degradada, uma vez que também houve um aumento da concentração de ácido acético.

Por fim, pode-se dizer que houve metabolização dos açúcares presentes no hidrolisado da borra de café pela *S. cerevisiae*, logo, assumindo 100% de eficiência da fermentação e um rendimento em etanol teórico, a concentração de etanol final obtida, com base na concentração de glicose inicial (1,36 g/L), seria de 0,70 g/L, cuja concentração é inferior às concentrações obtidas a partir de hidrolisados de outras biomassas lignocelulósicas (Mabee et al., 2011; Sun & Cheng, 2002; Xiros et al., 2013).

Relativamente aos ensaios de fermentação com a *P. stipitis* (FP), não houve saturação do substrato durante o tempo de fermentação definido. Verificou-se que a *P. stipitis*, além de ser apta a metabolizar xilose, apresenta também uma taxa de consumo de glicose satisfatória, embora inferior à *S. cerevisiae*. Observou-se que houve um consumo de 100% da glicose em 24 horas, de 27% da xilose e de 26% dos açúcares totais em 18 horas (Tabela 4.12). A arabinose não foi consumida dentro do tempo de fermentação estipulado, como expectável (National Collection of Yeast Cultures, 1984). A concentração de etanol aumentou consoante o tempo de fermentação, indicando o consumo de açúcares.

Devido ao erro experimental de inoculação das leveduras, não se pôde saber precisamente a taxa de consumo da xilose, uma vez que este era o principal composto do substrato no meio de cultura da *P. stipitis*.

Pode-se afirmar que a produtividade da *P. stipitis* é inferior à da *S. cerevisiae*, devido ao metabolismo mais lento dos açúcares (Gonçalves et al., 2016; Silva et al., 2011). Por outro lado, uma vez que a *P. stipitis* pode consumir glicose e xilose, se se submeter o hidrolisado do ensaio FP, com a composição do ensaio FS, à fermentação com *P. stipitis*, poderia ser produzido aproximadamente 4,5 g/L de etanol, considerando 100% de eficiência de fermentação, o que é cerca de 600% superior ao que teoricamente poderia ser obtido com a *S. cerevisiae*, consistindo em um rendimento em etanol ( $Y_p/s$ ) de aproximadamente 0,85, o que é relativamente elevado, ao se comparar com os valores apresentados por outras biomassas lignocelulósicas (Mabee et al., 2011).

#### **4.4. Análise comparativa**

Na Figura 4.5, encontra-se apresentada uma comparação dos resultados obtidos neste trabalho com outros trabalhos presentes na literatura, referente aos rendimentos em glicose, xilose e arabinose no hidrolisado da borra de café. Ambos os trabalhos em comparação realizaram pré-tratamento com ácido diluído (2 – 5% v/v), seguido de hidrólise enzimática, em condições variadas.

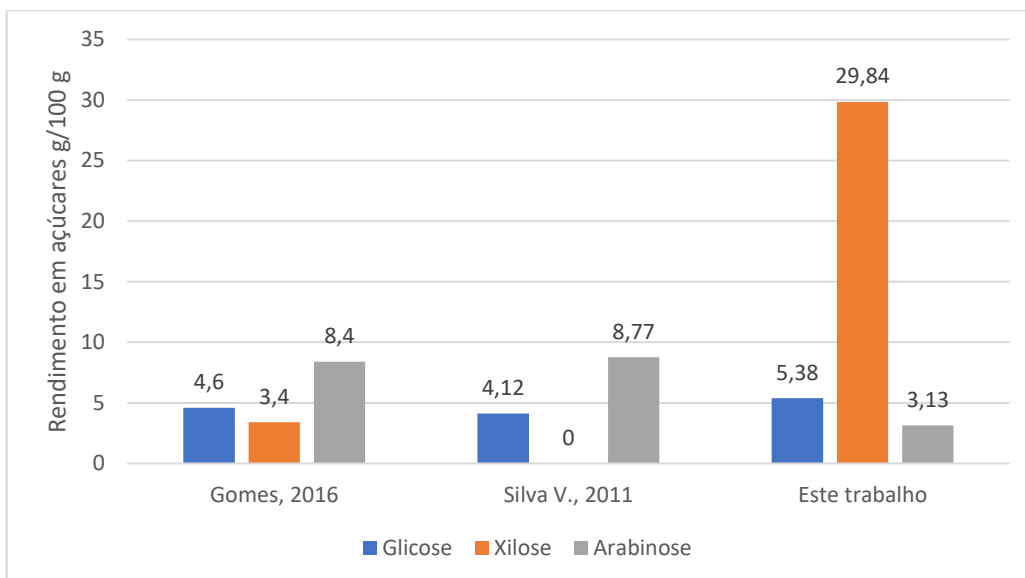


Figura 4.5. Rendimentos médio em açúcares (glicose, xilose e arabinose) determinados no hidrolisado da borra de café neste trabalho e em outros estudos, expressos em g/100 g, em base seca.

Verificou-se que o rendimento em glicose não oscilou significativamente, enquanto o rendimento em xilose determinado neste trabalho é consideravelmente superior, e o rendimento em arabinose é inferior.

É de referir que, a maioria das quantificações dos açúcares simples no hidrolisado da borra de café, disponíveis na literatura, estão apresentadas em açúcares simples totais. Ainda, quando se é apresentada por cada açúcar individualmente, verifica-se que os açúcares presentes em maior concentração são manoses e galactoses, estando a xilose e glicose presentes em concentrações relativamente baixas.

Em termos de açúcares totais, o rendimento em açúcares totais determinado nos ensaios otimizados (R0 e E8) é relativamente elevado, como se pode verificar na Figura 4.6.

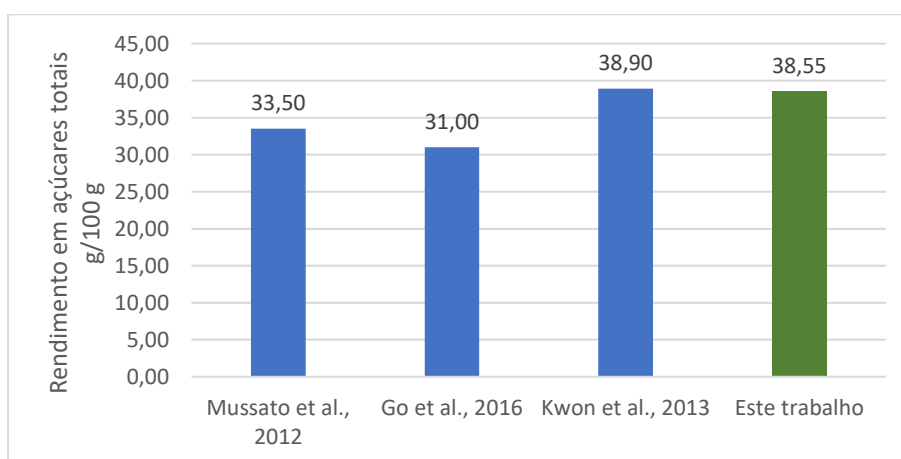


Figura 4.6. Rendimentos médio em açúcares totais determinados no hidrolisado da borra de café neste trabalho e em outros estudos, expressos em g/100 g, em base seca.

Neste trabalho, os açúcares totais compreendem somente os açúcares quantificados (celobiose, glicose, xilose e arabinose), ao contrário dos outros trabalhos apresentados, que consideram açúcares totais todos os açúcares presentes no hidrolisado, uma vez que o método de quantificação utilizados nestes não é específico para cada açúcar, com exceção de *Mussato et al., 2012*, que utiliza o mesmo método utilizado neste trabalho (HPLC).

Estima-se que a borra de café é composta de aproximadamente 50% (base seca) de açúcares totais (hexoses e pentoses) (McNutt & He, 2019; Mussatto, Machado, et al., 2011a), pelo que a média dos açúcares totais determinados nos ensaios R0 e E8 corresponde em 77% deste valor. O teor de celulose bruta da borra de café em estudo é de 18,04%, sendo que é sabido que o rendimento máximo em glicose é de cerca de 75% e, como para os ensaios otimizados obteve-se aproximadamente 30% de rendimento em glicose, estima-se que a fração restante a ser extraída da borra de café é constituída principalmente de glicose.

Avalia-se também que, neste trabalho, foi alcançada a saturação da extração de arabinose, uma vez que se observou uma diminuição da sua concentração entre o pré-tratamento e a hidrólise enzimática na maioria dos ensaios, indicando uma saturação da extração e, por consequência, uma degradação dos açúcares.

Adicionalmente, observou-se que, quanto maior a concentração de glicose final, menor será a concentração de xilose final e vice-versa. No entanto, na etapa de hidrólise enzimática, onde é libertada a maioria dos açúcares glicose, quanto maior for a sua eficiência em termos de glicose, menor será em termos de xilose. Por exemplo, o ensaio que originou o maior rendimento em xilose, de 41,50 g/100 g (Ensaio 16 – Anexo B.1), originou um rendimento relativamente baixo em glicose (1,46 g/100 g), entretanto, estima-se que havia potencial de extração da glicose restantes, mas exigiria um tratamento extra para tal e, com isso, haveria a diminuição da concentração de xilose, como se verificou em outros ensaios. Contudo, uma vez que a hidrólise da xilose ocorre mais facilmente, como verificado neste trabalho e descrito na literatura, pode ser mais fácil alcançar a saturação da borra de café em termos de pentoses, se se pretender obter um hidrolisado rico em xilose, o que implicaria um menor consumo energético.

Relativamente à composição de açúcares fermentescíveis no hidrolisado, considerando a média dos ensaios sob condições otimizadas (R0 (ver Tabela 4.9) e E8 (ver Tabela 4.7)), a composição média de xilose, glicose e arabinose foi de 77,88%, 13,90% e 8,23%, respetivamente (Figura 4.7).

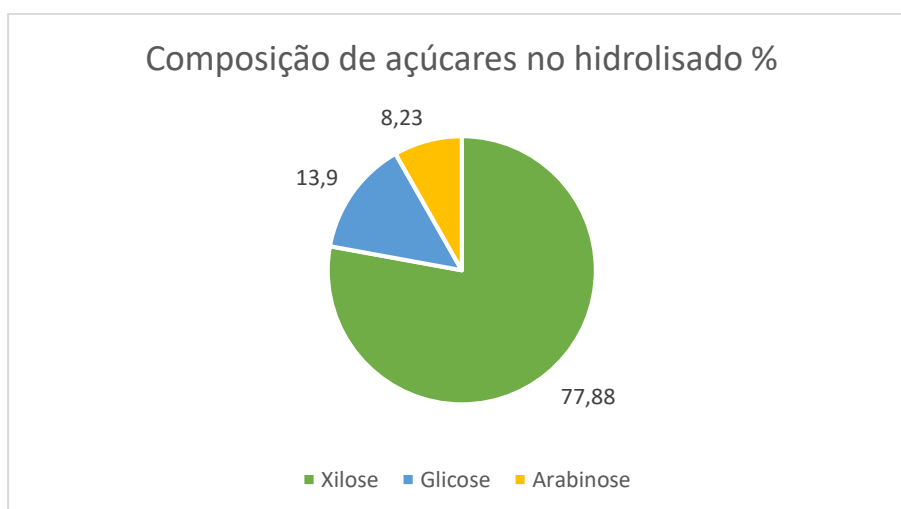


Figura 4.7. Composição média dos açúcares fermentescíveis no hidrolisado da borra de café, para os ensaios sob condições otimizadas, em % m/m.

Constata-se que o hidrolisado da borra de café obtido em condições otimizadas, é constituído maioritariamente por pentoses (86,11%), como verifica-se em toda a literatura e que já era expectável, por se tratar de uma biomassa composta maioritariamente por hemiceluloses (Kovalcik et al., 2018; McNutt & He, 2019; Mussatto, Machado, et al., 2011a).



## 5. Conclusões e sugestões

O objetivo deste trabalho consistiu em otimizar as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática do processo de produção de bioetanol a partir da borra de café, com vista à obtenção de açúcares simples fermentescíveis, visando a sua valorização. Diversas condições operatórias de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram testadas experimentalmente e avaliadas relativamente ao rendimento em açúcares fermentescíveis originados e, em seguida, o ensaio ótimo final foi submetido a fermentação para a obtenção do bioetanol.

Para este efeito, inicialmente foi realizada uma caracterização química da biomassa. Destaca-se o elevado teor de lignina total (36,09%) para um material lignocelulósico, o que caracteriza a biomassa como um material essencialmente lenhoso, justificando a necessidade da etapa de pré-tratamento para uma maior eficiência na libertação dos açúcares simples, e o teor de celulose (18,04%), cujo valor é relativamente baixo para uma biomassa energética. O teor médio de humidade obtido foi de 64,19%, sendo este valor elevado expectável, por se tratar de um resíduo resultante da extração, com água quente pressurizada, de materiais solúveis. O baixo teor de cinzas (1,73%) indica que a borra de café é uma biomassa essencialmente orgânica. O teor de matéria gorda determinado foi de (10,24%).

Relativamente à otimização do processo de produção do bioetanol, foram testadas variadas condições operatórias, nomeadamente a concentração de ácido sulfúrico (1, 3 e 5% v/v), tempo (4, 6 e 8 horas) e temperatura (60 e 85 °C) no pré-tratamento e variadas dosagens de enzimas de três complexos enzimáticos (*Accellerase@1500*, *GC 151* e *Viscamyl Flow*).

Verificou-se que é extremamente necessário a realização da etapa de pré-tratamento, para se obter rendimentos significativos em açúcares simples, uma vez que o ensaio sem pré-tratamento (SP) originou rendimentos irrisórios em açúcares simples totais (0,36 g/100 g), assim como é necessário a realização da etapa de hidrólise enzimática, para a obtenção de glicose, uma vez que o ensaio sem hidrólise enzimática (SH) não apresentou qualquer concentração de glicose (0 g/100 g).

Os ensaios de pré-tratamento em autoclave apresentaram rendimentos em açúcares totais significativos (ensaio C = 47,68 g/100 g), principalmente em glicose (ensaio C = 5,05 g/100 g), possivelmente devido às condições mais agressivas de temperatura (121 °C) empregadas. Verificou-se também que, nestes ensaios, uma maior razão líquido/sólido favorece a libertação de açúcares totais. Embora os ensaios com pré-tratamento em autoclave tenham apresentado rendimentos consideráveis em açúcares totais e em glicose, o que é desejável visando a produção de bioetanol, e em um tempo inferior (20 minutos) ao pré-tratamento em banho termostático (8 horas), os elevados valores de temperatura e pressão (2 bar) podem aumentar significativamente o consumo energético do processo. Portanto, propõe-se um estudo do balanço energético do processo de produção de bioetanol a partir da borra de café, com o pré-tratamento em autoclave, de forma a avaliar a sua viabilidade.

No que tange às condições ótimas do processo, através do tratamento estatístico dos dados obtidos a partir do planeamento experimental (CE#1), verificou-se que a temperatura do pré-tratamento é o fator com maior influência no rendimento em todos os açúcares simples (glicose, xilose e arabinose), para todos os açúcares, sendo que um valor superior de temperatura (85 °C) favorece a libertação destes açúcares simples.

O fator tempo se mostrou influente no rendimento em glicose e arabinose, com um efeito positivo superior na arabinose, enquanto para a xilose o fator tempo não apresentou nenhuma significância estatística de efeito no rendimento.

O fator concentração de ácido não apresentou significância estatística para nenhum açúcar, dentro das condições estudadas, sendo que para os ensaios com concentração de ácido a 3 e 5% v/v, os rendimentos em açúcares simples foram similares.

A partir da análise dos resultados dos conjuntos de ensaios subsequentes, relativamente aos rendimentos em açúcares totais e individuais e o rendimento da hidrólise enzimática, as condições

operatórias ótimas definidas foram de:  $c\ H_2SO_4 = 3\%$  v/v, tempo = 8 horas, temperatura = 85 °C, R L/S = 15 e dosagem de enzimas *GC 151:Viscamyl* 40:10 µL/g borra de café húmida. Estas condições originaram os maiores rendimentos em açúcares totais finais.

Ao se analisar individualmente os rendimentos dos açúcares, observou-se que a libertação da glicose é favorecida por condições mais agressivas de tempo e temperatura no pré-tratamento e pela hidrólise enzimática, pelo que o emprego das enzimas β-glicosidasas é imprescindível para a obtenção de concentrações significativas de glicose.

As pentoses se mostraram mais sensíveis às condições impostas e foram mais facilmente libertadas. A maioria das pentoses encontradas no hidrolisado final foram libertadas no pré-tratamento, especialmente a arabinose. Houve ensaios que apresentaram uma diminuição da concentração de pentoses após a hidrólise enzimática, possivelmente devido à ocorrência de uma hidrólise completa e subsequente degradação.

No pré-tratamento, a libertação da xilose foi favorecida pelas condições mais agressivas de concentração de ácido, temperatura e tempo, enquanto a arabinose foi o açúcar que mais apresentou variabilidade nas respostas, podendo este açúcar ser mais influenciado pela interação dos fatores concentração de ácido, tempo e temperatura, entretanto, de forma geral, pôde se observar um padrão de que a libertação da arabinose é favorecida por condições mais amenas e pré-tratamento.

Relativamente à hidrólise enzimática, uma maior proporção do complexo enzimático *GC 151* (GC:VIS 40:10 µL/g) apresentou rendimentos em açúcares totais superiores, para todas as condições de pré-tratamento, especialmente em glicose. Apresentou também o maior aumento médio do rendimento em açúcares totais na hidrólise enzimática e o maior rendimento médio da hidrólise enzimática em termos de glicose. Para trabalhos futuros, sugere-se uma investigação mais profunda acerca da hidrólise enzimática, relativamente às dosagens e tipos de complexos enzimáticos, com o objetivo de maximizar o rendimento do açúcar que se pretende obter, seja a glicose ou a xilose.

Relativamente à fermentação, pôde-se concluir que a levedura *P. stipitis* apresenta um maior potencial para a obtenção de maiores concentrações de etanol a partir do hidrolisado da borra de café em estudo, uma vez que este é composto maioritariamente por xilose, apesar da inferior produtividade, esta é capaz de consumir glicose e xilose, mas apresenta um metabolismo mais lento. Estudos indicam que a *P. stipitis* apresentam uma baixa tolerância ao etanol, o que não se pôde observar neste estudo, devido ao tempo insuficiente de fermentação conduzido.

Uma vez que este estudo não pôde explorar a eficiência da fermentação de forma precisa, sugere-se a exploração neste sentido, para trabalhos futuros.

À nível de procedimentos experimentais para o estudo de pré-tratamentos e hidrólise enzimática da borra de café, sugere-se a utilização da borra de café fresca (húmida), pois a secagem prévia pode ocasionar a libertação/degradação de parte dos açúcares e, além disso, o armazenamento da amostra congelada total em frações, consoante ao conjunto de ensaios, de forma a evitar o manuseio e descongelamento constante da amostra total, que pode gerar alterações nas suas propriedades.

Sugere-se também, a padronização de certos procedimentos, tais como a filtração a vácuo após a hidrólise enzimática, para garantir a homogeneização do frasco ao filtrar e lavar o bolo filtrado, de forma a evitar perdas, e a amostragem, para garantir a homogeneização dos frascos ao se coletar as amostras e não induzir a um erro nas determinações.

## Referências

- Abud, A. K. de S., da Silva, A. de S., & de Oliveira Junior, A. M. (2017). Efeito de inibidores na produção de etanol por *Pichia stipitis* em um meio de cultura complexo. *Acta Scientiarum - Technology*, 39(2), 223–229. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i2.29719>
- Aditya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Aggarwal, N. K., Kumar, N., & Mittal, M. (2022). *Green Chemistry and Sustainable Technology Bioethanol Production Past and Present*. Springer. <https://link.springer.com/bookseries/11661>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Banerjee, S., Gautam, R. K., Gautam, P. K., Jaiswal, A., & Chattopadhyaya, M. C. (2017). Recent trends and advancement in nanotechnology for water and wastewater treatment: Nanotechnological approach for water purification. Em *Materials Science and Engineering: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications* (Vols. 3–3, Issue January). <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-1798-6.ch072>
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. A. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: Technology bottlenecks and possible remedies. Em *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Vol. 4, Issue 1, pp. 77–93). <https://doi.org/10.1002/bbb.188>
- Bernardes Costa, B. E., da Cruz, R. S., Rangel, F. C., & Plentz Meneghetti, S. M. (2021). Comparison between chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production: A review. Em *Revista Virtual de Química* (Vol. 13, Issue 1, pp. 242–259). Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200140>
- Caetano, N. S., Caldeira, D., Martins, A. A., & Mata, T. M. (2017). Valorisation of Spent Coffee Grounds: Production of Biodiesel via Enzymatic Catalysis with Ethanol and a Co-solvent. *Waste and Biomass Valorization*, 8(6), 1981–1994. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9790-z>
- Caetano, N. S., Silva, V. F. M., Melo, A. C., Martins, A. A., & Mata, T. M. (2014). Spent coffee grounds for biodiesel production and other applications. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 16(7), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10098-014-0773-0>
- Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H. A., & Dave Oomah, B. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. Em *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 45, Issue 1, pp. 24–36). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.012>
- Codex Alimentarius International Food Standards - Recommended Methods of Analysis and Sampling* (AOAC 923.03).
- Determinação do teor em celulose bruta. NP 1005-1974. Portaria nº 16/74, de 1974/01/10.
- Farah, A., & dos Santos, T. F. (2015). The Coffee Plant and Beans: An Introduction. *Coffee in Health and Disease Prevention*, 5–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2>
- Freitas, A. C., Antunes, M. B., Rodrigues, D., Sousa, S., Amorim, M., Barroso, M. F., Carvalho, A., Ferrador, S. M., & Gomes, A. M. (2018). Use of coffee by-products for the cultivation of *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus salmoneo-stramineus* and its impact on biological properties of extracts thereof. *International Journal of Food Science & Technology*, 53, 1914–1924.
- Go, A. W., Conag, A. T., & Cuizon, D. E. S. (2016). Recovery of Sugars and Lipids from Spent Coffee Grounds: A New Approach. *Waste and Biomass Valorization*, 7(5), 1047–1053. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9527-z>

- Gomes, D. S. de J. (2016). *Estudo do Pré-Tratamento Ácido e Hidrólise Enzimática da Borra de Café Visando a Produção de Bioetanol* [Dissertação de mestrado]. Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).
- Gonçalves, F. A., Ruiz, H. A., Silvino dos Santos, E., Teixeira, J. A., & de Macedo, G. R. (2016). Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*, *94*, 353–365. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.045>
- Haile, M. (2014). Integrated valorization of spent coffee grounds to biofuels. *Biofuel Research Journal*, *2*, 65–69.
- International Coffee Organization (ICO). (2021a, Maio). *World Coffee Consumption - ICO*. International Coffee Organization. <https://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>
- International Coffee Organization (ICO). (2021b, Maio). *World Coffee Production - ICO*. International Coffee Organization. <https://www.ico.org/prices/po-production.pdf>
- Kourmentza, C., Economou, C. N., Tsafarakidou, P., & Kornaros, M. (2018). Spent coffee grounds make much more than waste: Exploring recent advances and future exploitation strategies for the valorization of an emerging food waste stream. *Journal of Cleaner Production*, *172*, 980–992. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.088>
- Kovalcik, A., Obruca, S., & Marova, I. (2018). Valorization of spent coffee grounds: A review. Em *Food and Bioproducts Processing* (Vol. 110, pp. 104–119). Institution of Chemical Engineers. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.002>
- Kwon, E. E., Yi, H., & Jeon, Y. J. (2013). Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, *136*, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.052>
- Lamas, C. (2019). *Estudo da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono da borra de café com vista à produção de bioetanol*. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- Lorencini, P. (2013). *Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio* [Dissertação de Mestrado]. Universidade de São Paulo (USP).
- Mabee, W. E., McFarlane, P. N., & Saddler, J. N. (2011). Biomass availability for lignocellulosic ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, *35*(11), 4519–4529. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.026>
- Marie Garay, R. M., Rallo de la, M. B., Carmona, R. C., & Araya, J. C. (2009). Characterization of Anatomical, Chemical, and Biodegradable Properties of Fibers from Corn, Wheat and Rice Residues. *CHILEAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*, *69*(3), 406–415.
- Massaya, J., Prates Pereira, A., Mills-Lampthey, B., Benjamin, J., & Chuck, C. J. (2019). Conceptualization of a spent coffee grounds biorefinery: A review of existing valorisation approaches. *Food and Bioproducts Processing*, *118*, 149–166. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.08.010>
- McMillan, J. D. (1993). *Xylose Fermentation to Ethanol: A Review*.
- McNutt, J., & He, Q. (Sophia). (2019). Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *71*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.11.054>
- Morais, M. R., Seye, O., de Freitas, K. T., Rodrigues, M., dos Santos, E. C. S., & Souza, R. C. R. (2011). *Obtenção de Briquetes de Carvão Vegetal de Cascas de Arroz Utilizando Baixa Pressão de Compactação*.
- Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.063>



- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., & Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Carneiro, L. M., & Teixeira, J. A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, 92, 763–768. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.020>
- Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011a). Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 661–672. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z>
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). *Lignocellulose as raw material in fermentation processes*. National Collection of Yeast Cultures. (1984). *National Collection of Yeast Cultures*. <https://www.ncyc.co.uk/catalogue/scheffersomyces-stipitis-1542>
- Oliveira, V. R., Freire, F. M., Regis Venturin, :, Osmar, :, Carrijo, A., & Macarenhas, M. H. T. (2002). *Caracterização química de substratos para produção de hortaliças*.
- Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q., Rbel, B., & Gerdal, H.-H. (1999). Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and p-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts. *Em & Sons, Inc. Biotechnol Bioeng* (Vol. 63).
- Panusa, A., Zorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(17), 4162–4168. <https://doi.org/10.1021/jf4005719>
- Rajesh Banu, J., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Dinesh Kumar, M., Preethi, Atabani, A. E., & Kumar, G. (2020). Biorefinery of spent coffee grounds waste: Viable pathway towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 302. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122821>
- Rocha, M. V. P., de Matos, L. J. B. L., Lima, L. P. de, Figueiredo, P. M. da S., Lucena, I. L., Fernandes, F. A. N., & Gonçalves, L. R. B. (2014). Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, 167, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.032>
- Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011). ETHANOL PRODUCTION FROM XYLOSE BY *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 IN A STIRRED TANK BIOREACTOR. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(01), 151–156. [www.abeq.org.br/bjche](http://www.abeq.org.br/bjche)
- Silva, V. (2011). *Valorização de Cápsulas de Café e Produção de Biocombustíveis* [Tese de Mestrado]. Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).
- Soares, L. de S., Moris, V. A. da S., Yamaji, F. M., & Paiva, J. M. F. de. (2015). Use of waste coffee grounds and sawdust in briquettes molding and evaluation of properties. *Revista Materia*, 20(2), 550–560. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150002.0055>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review q*. TAPPI. T 222 om-02. *Acid-insoluble lignin in wood and pulp*. 2002c, 5 p.
- van Zyi, C., Prior, B. A., & du Preez, J. C. (1991). *Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by Pichia stipitis*.
- Vieira, A. C. (2012). *Caracterização da Biomassa Proveniente de Resíduos Agrícolas* [Dissertação de Pós-graduação]. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
- Xiros, C., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2013, Novembro 1). Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, 2(6), 633–654. <https://doi.org/10.1002/wene.49>



## ANEXOS

### Anexo A – Procedimento Experimental

Neste capítulo encontram-se apresentados, de forma detalhada, os procedimentos experimentais conduzidos neste trabalho, referentes à caracterização da borra de café, nomeadamente os teores de humidade, cinzas e lignina total, as etapas do processo de produção do bioetanol, nomeadamente o pré-tratamento ácido, hidrólise enzimática e fermentação e, por fim, a quantificação dos açúcares nos hidrolisados e a quantificação de etanol após a fermentação.

#### A.1. Determinação do teor de humidade

O material e reagentes/soluções necessários, assim como o procedimento utilizado para a determinação do teor de humidade estão descritos em seguida.

##### Materiais:

- Balança analítica (*Kern ALJ 220-4*);
- Cadinho de porcelana;
- Estufa a  $105 \pm 5$  °C (*WTB Binder*);
- Exsicador.

##### Reagentes:

- Borra de café.

##### Procedimento:

- Pesar o cadinho de porcelana, previamente seco na estufa a  $105 \pm 5$  °C;
- Após tarar, pesar rigorosamente  $10 \pm 0,001$  g de amostra de café;
- Colocar na estufa a  $105 \pm 5$  °C durante cerca de 2 horas;
- Arrefecer no exsicador até estabilização da temperatura;
- Pesar a amostra;
- Repetir os ciclos de secagem na estufa e arrefecimento no exsicador até manutenção do peso.

#### A.2. Determinação do teor de cinzas

O material e reagentes/soluções necessários, assim como o procedimento utilizado (*AOC 923.03*) para a determinação do teor de cinzas da borra de café estão descritos em seguida.

##### Materiais:

- Cadinho de porcelana;
- Mufla (*Nabertherm*);
- Balança analítica (*Kern ALJ 220-4*);
- Exsicador.
-

## Reagentes

- Borra de café.

## Procedimento:

- Pesar o cadinho de porcelana, após a sua calcinação na mufla a  $550 \pm 5$  °C e arrefecimento no exsicador;
- Após tarar, pesar  $5 \pm 0,0001$  g de amostra seca de café;
- Calcinar na mufla durante 1 hora a  $550 \pm 5$  °C;
- Retirar o cadinho, cuidadosamente, para o exsicador e deixar arrefecer durante cerca de 30 minutos;
- Pesar o cadinho que contém a amostra, rigorosamente;
- Repetir os ciclos de calcinação, arrefecimento e pesagem até estabilização do peso.

### A.3. Determinação do teor de matéria gorda

Os materiais e reagentes necessários para a determinação do teor de matéria gorda da borra de café, assim como o procedimento utilizado (norma NP 856), encontram-se apresentados em seguida.

## Materiais:

- Balança analítica (*METTLER AE 200*);
- Cartucho de celulose;
- Algodão;
- Suporte universal;
- Proveta de 250 mL;
- Balão de aquecimento de 250 mL;
- Balão de aquecimento de 500 mL;
- Manta de aquecimento (*Nahita*);
- Pipeta de 1 mL;
- Refratómetro de ABBE (*Atago 1T*);
- Extrator Soxhlet;
- Condensador de refluxo;
- Rotavapor (*BUCHI*);
- Bomba de vácuo (*Vacuum Pump V-700*).

## Reagentes/Soluções:

- Solução de Hexano;
- Amostra de borra.

## Procedimento - Etapa 1 – Extração do óleo da borra de café:

- Secar a amostra em estufa a  $105 \pm 5$  °C;
- Pesar cerca de  $10 \pm 0,001$  g de amostra seca numa balança analítica;

- Colocar a amostra dentro do cartucho de celulose, previamente seco, dispondo algodão para evitar o arrastamento da amostra;
- Colocar o cartucho na coluna de extração Soxhlet;
- Pesar um balão de aquecimento de 250 mL, previamente seco e vazio;
- Colocar cerca de 200 mL de solvente hexano no balão de aquecimento;
- Colocar o balão na manta de aquecimento à temperatura de 65-70 °C, seguindo-se a união do Soxhlet ao balão e do condensador ao Soxhlet;
- Retirar uma amostra de cerca de 1 mL de líquido que envolve o cartucho, com o auxílio de uma pipeta, antes da finalização de cada contato, para determinação do índice de refração no refratômetro de Abbe. Como critério de paragem: estabilização do índice de refração entre contactos, anotando a temperatura do banho termostatizado e o número de contactos, respetivamente

#### **Procedimento - Etapa 2 – Recuperação do óleo (Destilação sob vácuo):**

- Colocar a mistura de óleo/hexano num balão de aquecimento de 500 mL, corretamente posicionado;
- Montar o equipamento, unindo o balão ao evaporador e o balão recetor ao condensador acoplado no equipamento;
- Ligar sistema de refrigeração do condensador e sistema de vácuo, definindo a temperatura do banho de aquecimento (65 °C);
- Efetuar ensaio até vaporização do solvente;
- Pesar o balão de aquecimento com o óleo.

#### **A.4. Determinação do teor de celulose bruta**

Os materiais e reagentes necessários para a determinação do teor de celulose bruta da borra de café, assim como o procedimento utilizado (norma NP 1005:1974), encontram-se apresentados em seguida.

##### **Materiais:**

- Cadinho de porcelana;
- Provetas;
- Balão de aquecimento de 500 mL;
- Balança analítica (*METTLER AE 200*);
- Manta de aquecimento (*Selecta*);
- Esferas de vidro;
- Condensador de refluxo;
- Bomba de vácuo (*Neuberger Knf*);.
- Membrana de fibra de vidro;
- Mufla (*Nabertherm B1500*);
- Estufa (*WTB Binder*).

##### **Reagentes/Soluções:**

- Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,1 N;

- Solução de NaOH a 0,1 N;
- Álcool etílico a 95%;
- Água destilada;
- Amostra de borra.

### **Procedimento:**

Após a extração da gordura:

1. Pesar  $2 \pm 0,0001$  g de amostra e introduzi-la num balão de aquecimento;
2. Adicionar cerca de 200 mL de uma solução de  $H_2SO_4$  a 0,1 N aquecida à ebulição, colocando algumas esferas de vidro para evitar uma ebulição excessiva;
3. Efetuar a ligação do balão a um condensador de refluxo e proceder ao seu aquecimento numa manta de aquecimento, tendo em atenção a regulação da temperatura de forma a proporcionar a ebulição da mistura ao fim de um minuto;
4. Manter a ebulição durante 30 minutos;
5. Proceder de seguida à decantação do líquido, fazendo-o passar por um sistema de filtração por vácuo com uma membrana de fibra de vidro;
6. Lavar o bolo de filtração com 50 mL de água desionizada em ebulição até pH neutro, caso tenha passado algum resíduo para o dispositivo de filtração efetuar os pontos 7 a 14, senão passar para o ponto 12.
7. Transferir todo o resíduo para o balão com a ajuda de 200 mL de uma solução de NaOH a 0,1 N em ebulição;
8. Ligar novamente o balão ao condensador e levar à ebulição por 30 minutos;
9. Efetuar filtração a vácuo, lavando o bolo de filtração com água em ebulição até pH neutro;
10. Lavar agora com 50 mL de álcool etílico a 95%;
11. Transferir o resíduo para um cadinho previamente calcinado e tarado;
12. Efetuar a secagem do resíduo numa estufa, a  $103 \pm 2$  °C, até peso constante;
13. Calcinar o resíduo, durante 30 minutos a  $600 \pm 25$  °C. E, após arrefecimento em exsiccador, efetuar a pesagem final.

### **A.5. Determinação do teor de lignina total**

Os materiais e reagentes/soluções necessários, assim como o procedimento utilizado (*TAPPI T222 om-02*) para a determinação do teor de lignina total da borra de café estão descritos em seguida.

#### **Etapa 1 – Determinação do teor de lignina Klason:**

##### **Materiais:**

- Vidro de relógio;
- Balança analítica (*Kern ALJ 220-4*);
- Gobelés;
- Pipeta volumétrica de 15 mL;
- Banho termostaticado com agitação (*Selecta Unitronic OR-C*);
- Provetas;
- Placa de aquecimento (*Raypa*);

- Bomba de vácuo (*Neuberger*);
- Filtros de membrana de vidro;
- Estufa a  $105 \pm 5$  °C (*WTB Binder*);
- Cadinho de porcelana;
- Exsicador.

**Reagentes/Soluções:**

- Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%;
- Água desionizada;
- Borra de café.

**Procedimento:**

- Pesar  $1 \pm 0,0001$  g de amostra seca para o vidro de relógio;
- Colocar num gobelé e adicionar lentamente 15,00 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%, com agitação constante;
- Manter o gobelé num banho a  $2 \pm 1$  °C durante a dispersão do material;
- Após a dispersão da amostra, tapar o gobelé com vidro de relógio e levar a um banho termostaticado a  $20 \pm 1$  °C com agitação constante, durante 2 horas;
- Findo este período, adicionar 575 mL de água desionizada e levar à ebulição durante 4 horas. Ter em atenção em manter o volume da solução igual ao inicial, adicionando água desionizada em ebulição;
- Após esse tempo, aguardar a deposição de todas as partículas;
- Filtrar a solução num sistema de filtração a vácuo, utilizando membrana de fibra de vidro previamente seca e pesada;
- Efetuar a lavagem do resíduo com a água desionizada em ebulição;
- Colocar o resíduo num cadinho de porcelana, previamente seco na estufa, e levar à estufa a  $105 \pm 5$  °C (*WTB Binder*);
- Após arrefecimento num exsicador pesar e repetir o ciclo de secagem e arrefecimento até obtenção de peso constante.

**Etapa 2 – Determinação do teor de lignina solúvel:**

**Materiais:**

- Espectrofotómetro UV-Vis (*Shimadzu, UV-160 A*),  $\lambda = 205$  nm;
- Cuvetes de quartzo;
- Pipeta de Pasteur.

**Reagentes/Soluções:**

- Filtrado do procedimento anterior.

**Procedimento:**

- Medir o volume do filtrado obtido na determinação anterior;
- Colocar na cuvete de quartzo e ler a sua absorvância a 205 nm;
- Caso se verifique uma absorvância superior a 1, diluir o filtrado e ler novamente. Repetir este passo até obtenção de absorvância a 205 nm inferior a 1.

**A.6. Pré-tratamento da borra de café**

Os materiais e reagentes/soluções necessários para a realização do pré-tratamento da borra de café, assim como o procedimento utilizado, encontram-se descritos de forma detalhada em seguida.

**Materiais:**

- Balão volumétrico de 1 L;
- Gobelés;
- Provetas de 50,0 e 100,0 mL;
- Funil;
- Frascos de vidro de 250 e 500 mL;
- Balança analítica;
- Banho termostático com agitação (*Selecta Unitronic OR-C*);
- Autoclave (*Uniclave 88*).

**Reagentes:**

- Borra de café;
- Água desionizada;
- Solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 3, 4 e 5% (v/v).

**Procedimento:**

- Pesar cerca de 10,00 g de borra de café para o frasco de vidro;
- Adicionar solução de  $H_2SO_4$  no respetivo volume de cada ensaio;
- Homogeneizar a mistura e tapar os frascos;
  - Colocar os frascos em banho termostático e autoclave nas respetivas condições de tempo e temperatura;
  - Retirar os frascos do banho termostático e autoclave e realizar hidrólise enzimática em seguida.

**A.7. Hidrólise enzimática**

Neste capítulo encontra-se descrita as características dos complexos enzimáticos utilizados neste trabalho, assim como a descrição detalhada do procedimento realizado de hidrólise enzimática.

**A.7.1. Hidrólise enzimática – Procedimento**

Os materiais e reagentes/soluções necessários para a realização da hidrólise enzimática da borra de café pré-tratada, assim como o procedimento utilizado, encontram-se descritos de forma detalhada em seguida.



**Materiais:**

- Gobelés;
- Medidor de pH;
- Micropipeta;
- Pipeta de Pasteur;
- Banho termostático com agitação (*Selecta Unitronic OR-C*);
- Kitassato de 250,0 mL;
- Funil de Buchner;
- Papel de filtro;
- Bomba de vácuo
- Proveta de 250,0 mL;
- Funil;
- Frascos de vidro de 250,0 mL;
- Tubos de ensaio de 2,0 mL.

**Reagentes:**

- Amostras de borra de café pré-tratadas;
- Hidróxido de sódio;
- Complexos de enzimas (Accellerase® 1500, GC 151 e *VISCAMYL<sup>TM</sup> FLOW*);

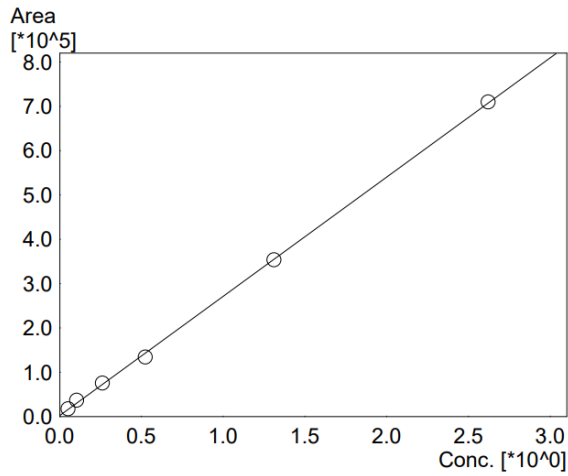
**Procedimento:**

- Ajustar pH da solução pré-tratada para pH adequado às enzimas, ~ pH = 5,0;
- Após ajustar pH, adicionar a respetiva dosagem de enzimas (~ 50 – 100 µL/g borra de café) e colocar frascos em banho termostático à 50 °C, 50 rpm, durante 2 horas.
- Após este tempo, deixar os frascos repousarem e a suspensão sedimentar os sólidos, em temperatura ambiente.
- Filtrar a solução hidrolisada sob vácuo, para remover as partículas de café e analisar a solução líquida resultante em HPLC, para quantificar açúcares e outros compostos inibidores;
- Registrar o volume da solução líquida filtrada e armazenar amostras congeladas para posterior análise em HPLC.

**A.8. Curvas de calibração e equações das retas para a quantificação dos açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e ácido acético.**

Nesta seção encontram-se apresentadas as curvas de calibração realizadas em HPLC e as respetivas equações da reta, para quantificar os açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) e ácido acético no hidrolisado da borra de café.

### Celobiose

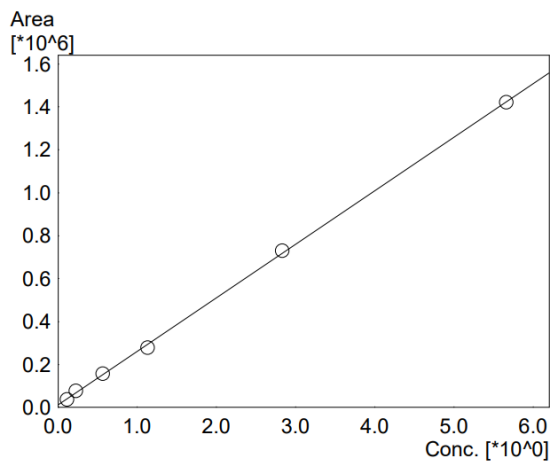


$$R^2 = 0,999$$

$$Y = 269156 * X + 2799,64$$

Y – área do pico no tempo de retenção do composto no cromatograma;  
X – concentração do composto, em g/L.

### Glicose

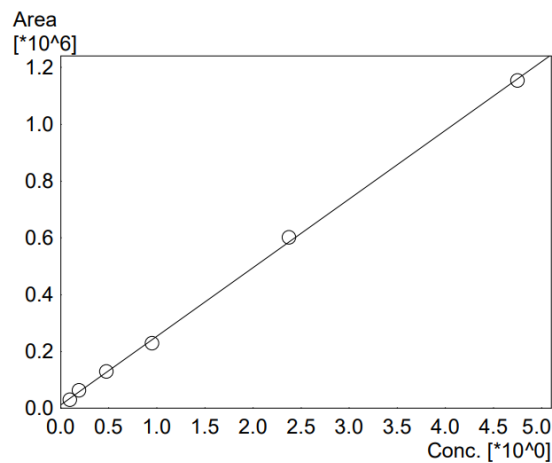


$$R^2 = 0,999$$

$$Y = 249477 * X + 11891,8$$

Y – área do pico no tempo de retenção do composto no cromatograma;  
X – concentração do composto, em g/L.

### Xilose

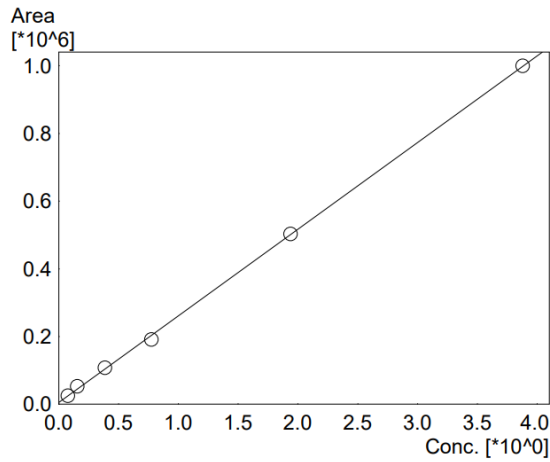


$$R^2 = 0,999$$

$$Y = 241506 * x + 11809,3$$

Y – área do pico no tempo de retenção do composto no cromatograma;  
X – concentração do composto, em g/L.

### Arabinose



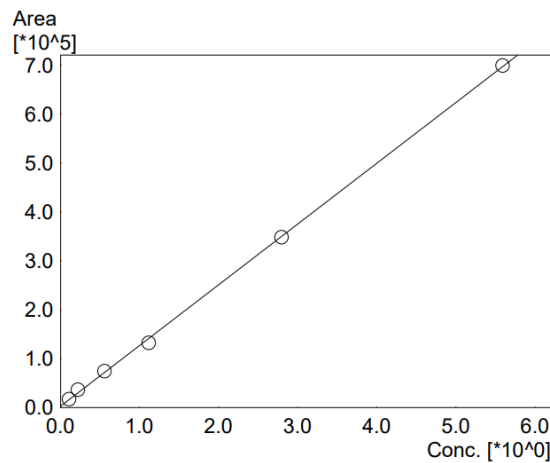
$$R^2 = 0,999$$

$$Y = 255897 * X + 5180,16$$

Y – área do pico no tempo de retenção do composto no cromatograma;

X – concentração do composto, em g/L.

### Ácido acético



$$R^2 = 0,999$$

$$Y = 124100 * X + 2848,53$$

Y – área do pico no tempo de retenção do composto no cromatograma;

X – concentração do composto, em g/L.



## Anexo B – Resultados

Nesta seção encontram-se apresentados os dados obtidos experimentalmente, relativamente à quantificação dos açúcares nos ensaios, que possibilitaram o cálculo final dos resultados, nomeadamente a massa inicial de borra de café, o volume da solução pré-tratada, o teor de humidade da borra de café e os valores de concentração das réplicas dos ensaios, quando aplicável.

### B.1. Conjunto de ensaios 1 (CE#1) – Planeamento experimental e tratamento estatístico – Dados experimentais

Tabela B.1. Dados experimentais do conjunto de ensaios 1 (CE#1) e respetivos resultados.

Ensaio	Massa húmida (g)	Massa seca (g)*	V (L)	Celobiose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
1	10,11	3,68	0,176	0,06	0,27	0,07	0,35	0,05	0,25	0,35	1,69	0,07	0,48	2,29
2	10,11	3,68	0,198	0,04	0,22	0,05	0,27	0,05	0,29	0,51	2,77	0,08	0,62	3,33
3	10,11	3,68	0,18	0,61	2,98	0,26	1,25	0,17	0,81	0,70	3,42	0,08	1,12	5,48
4	10,11	3,68	0,2	0,71	3,84	0,21	1,13	0,20	1,10	0,68	3,70	0,08	1,09	5,93
5	10,11	3,68	0,25	0,52	3,57	0,24	1,60	3,62	24,62	0,62	4,24	0,06	4,48	30,46
6	10,11	3,68	0,22	0,72	4,28	0,56	3,33	4,86	29,09	0,82	4,88	0,09	6,24	37,30
7	10,11	3,68	0,185	0,61	3,07	0,75	3,77	7,07	35,57	0,98	4,95	0,12	8,80	44,29
8	10,11	3,68	0,2	0,01	0,08	0,48	2,63	6,85	37,27	0,84	4,54	0,12	8,17	44,44
9	10,11	3,68	0,18	0,06	0,32	0,08	0,37	0,06	0,30	0,38	1,86	0,07	0,52	2,53
10	10,11	3,68	0,21	0,03	0,19	0,07	0,39	0,01	0,04	0,23	1,33	0,08	0,31	1,76
11	10,11	3,68	0,2	0,64	3,46	0,17	0,91	0,21	1,14	0,76	4,15	0,09	1,14	6,21
12	10,11	3,68	0,24	0,56	3,63	0,19	1,25	0,14	0,89	0,52	3,39	0,07	0,85	5,52
13	10,11	3,68	0,21	0,60	3,43	0,35	2,02	4,69	26,77	0,76	4,35	0,09	5,80	33,14
14	10,11	3,68	0,22	0,72	4,28	0,43	2,57	5,47	32,70	0,78	4,69	0,11	6,68	39,96
15	10,11	3,68	0,215	0,55	3,23	0,54	3,15	5,96	34,84	0,81	4,73	0,10	7,31	42,72
16	10,11	3,68	0,22	0,04	0,27	0,24	1,46	6,94	41,50	0,95	5,67	0,10	8,13	48,63
17	10,11	3,68	0,188	0,96	4,92	0,46	2,37	1,96	10,02	0,66	3,37	0,08	3,08	15,76
18	10,11	3,68	0,193	0,79	4,16	0,16	0,82	1,54	8,09	0,58	3,03	0,08	2,27	11,93
19	10,11	3,68	0,183	0,68	3,38	0,27	1,36	1,24	6,18	0,47	2,33	0,04	1,98	9,87

\* Teor de humidade = 63,62%.

## B.2. Ensaios em autoclave e ensaios exploratórios – Dados experimentais

Tabela B.2. Dados experimentais do conjunto de ensaios em autoclave e ensaios exploratórios.

Ensaio	Massa húmida (g)	Massa seca (g)*	V (L)	Celobiose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
A1	10,11	3,68	0,104	1,67	4,73	1,18	3,35	0,63	1,77	1,49	4,20	0,19	3,30	9,32
A2	10,11	3,68	0,120	0,42	1,37	1,79	5,83	11,43	37,30	1,41	4,62	0,20	14,63	47,74
B1	10,11	3,68	0,282	0,86	6,59	0,38	2,92	0,21	1,65	0,47	3,60	0,06	1,07	8,17
B2	10,11	3,68	0,195	1,31	6,96	0,68	3,63	0,40	2,11	0,98	5,22	0,12	2,07	10,96
C1	10,11	3,68	0,321	0,01	0,12	0,52	4,56	4,2	36,80	0,44	3,86	0,05	5,18	45,23
C2	10,11	3,68	0,322	0,00	0,00	0,63	5,51	4,60	40,26	0,50	4,36	0,08	5,73	50,13
SH	10,11	3,68	0,153	0,71	4,03	0	0	1,99	11,28	0,67	3,78	0,08	0,36	14,84
SP	10,11	3,68	0,208	0,07	0,29	0,03	0,14	0,01	0,06	0,01	0,06	0,03	0,06	0,36

\* Teor de humidade = 63,62%.

## B.3. Conjunto de ensaios 2 (CE#2) – Dados experimentais

Tabela B.3. Dados experimentais do conjunto de ensaio 2 (CE#2) e respetivos resultados.

Ensaio	Massa húmida (g)	Massa seca (g)*	V (L)	Celobiose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
A1P	10,00	3,74	0,157	0,71	2,94	0,13	0,55	7,65	31,91	0,41	1,70	0,09	8,19	34,17
A1H	9,87	3,70	0,180	0,36	1,74	1,28	6,21	5,92	28,86	0,90	4,40	0,07	8,10	39,46
A2P	10,10	3,78	0,156	0,70	2,89	0,14	0,59	7,66	31,65	0,44	1,80	0,08	8,24	34,04
A2H	9,97	3,73	0,184	0,37	1,85	1,10	5,42	6,41	31,62	0,76	3,75	0,07	8,27	40,77
B1P	10,00	3,60	0,156	0,69	3,02	0,04	0,17	6,06	26,38	1,13	4,93	0,10	7,24	31,48
B1H	9,87	3,55	0,184	0,21	1,11	0,95	4,93	4,72	24,50	0,71	3,69	0,06	6,39	33,11
B2P	10,00	3,60	0,156	0,68	2,94	0,02	0,09	6,23	27,09	1,02	4,43	0,09	7,27	31,61
B2H	9,87	3,55	0,184	0,34	1,74	1,03	5,33	5,03	26,10	0,56	2,90	0,07	6,62	34,32
C1P	10,30	3,86	0,156	0,49	1,99	0,05	0,21	4,86	19,71	0,24	0,96	0,07	5,15	20,88
C1H	10,17	3,81	0,158	0,16	0,66	0,97	4,03	4,49	18,66	0,88	3,66	0,07	6,35	26,33
C2P	10,10	3,78	0,156	0,44	1,83	0,04	0,17	4,12	17,91	0,21	0,88	0,06	4,37	18,06
C2H	9,97	3,73	0,160	0,16	0,70	0,76	3,25	4,15	17,81	0,57	2,43	0,08	5,48	23,48
D1P	10,30	3,70	0,157	0,65	2,76	0,00	0,00	1,03	4,35	0,86	3,63	0,08	1,89	7,98
D1H	10,17	3,66	0,160	1,14	4,98	0,93	4,06	1,00	4,38	0,83	3,63	0,07	2,76	12,06

Ensaio	Massa húmida (g)	Massa seca (g)*	V (L)	Celobiose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Ác. acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
D2P	10,10	3,63	0,156	0,84	3,64	0,00	0,00	1,29	5,55	1,23	5,28	0,13	2,51	10,83
D2H	9,97	3,59	0,164	0,23	1,05	1,21	5,55	1,57	7,18	0,63	2,89	0,13	3,41	15,61

\* Teor de humidade (Ensaio A e C) = 62,56%.

\* Teor de humidade (Ensaio B e D) = 64,04%.

#### B.4. Conjunto de ensaios 3 (CE#3) – Dados experimentais

Tabela B.4. Dados experimentais do conjunto de ensaio 3 (CE#3) e respetivos resultados.

Ensaio	Massa húmida (g)	Massa seca (g)*	V (L)	Celobiose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Ác. Acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
E1P	10,43	3,90	0,157	0,14	0,54	0,00	0,00	4,92	19,72	0,19	0,78	0,07	5,12	20,50
E1H	10,30	3,54	0,221	0,03	0,20	0,68	4,24	3,02	18,83	0,29	1,82	0,04	3,99	24,89
E2P	10,55	3,95	0,157	0,12	0,46	0,00	0,00	4,60	18,23	0,90	3,58	0,06	5,50	21,80
E2H	10,42	3,58	0,186	0,08	0,43	0,93	4,84	4,03	20,91	0,33	1,70	0,05	5,29	27,44
E3P	10,42	3,90	0,157	0,74	2,97	0,00	0,00	4,83	19,37	1,08	4,34	0,06	5,91	23,70
E3H	10,29	3,54	0,186	0,27	1,43	0,84	4,42	3,77	19,79	0,46	2,40	0,05	5,06	26,61
E4P	10,38	3,89	0,156	0,71	2,86	0,03	0,12	5,18	20,86	1,05	4,22	0,07	6,26	25,20
E4H	10,25	3,53	0,202	0,29	1,65	0,91	5,21	4,00	22,90	0,41	2,33	0,05	5,31	30,43
E5P	10,06	3,62	0,156	0,73	3,17	0,05	0,23	6,03	26,06	0,26	1,14	0,08	6,34	27,42
E5H	9,93	3,42	0,205	0,37	2,21	1,15	6,92	4,61	27,63	0,36	2,15	0,05	6,12	36,70
E6P	10,24	3,68	0,157	0,14	0,59	0,00	0,00	6,08	25,85	0,32	1,38	0,08	6,41	27,23
E6H	10,11	3,48	0,203	0,33	1,92	1,09	6,36	4,75	27,71	0,57	3,35	0,06	6,41	37,42
E7P	10,16	3,65	0,157	0,09	0,38	0,00	0,00	4,79	20,52	0,92	3,95	0,06	5,71	24,47
E7H	10,03	3,45	0,189	0,38	2,06	0,89	4,87	4,78	26,18	0,46	2,51	0,05	6,13	33,56
E8P	10,11	3,64	0,156	0,10	0,44	0,00	0,00	4,61	19,84	0,77	3,32	0,05	5,38	23,16
E8H	9,98	3,43	0,189	0,11	0,61	1,27	6,99	5,52	30,38	0,43	2,35	0,08	7,22	39,72
E9P	10,20	3,82	0,156	0,77	3,15	0,00	0,00	5,65	23,13	0,96	3,94	0,07	6,61	27,07
E9H	10,07	3,46	0,180	0,31	1,63	0,95	4,94	5,16	26,79	0,58	2,99	0,06	6,68	34,72

\* Teor de humidade = 65,59%.

## B.5. Conjunto de ensaios 4 (CE#4) – Dados experimentais

Tabela B.5. Dados experimentais do conjunto de ensaio 4 (CE#4) e respectivos resultados.

Ensaio	Massa húmida (g)	Massa seca (g)*	V (L)	Celobiose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Glicose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Xilose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Arabinose (g/L)	Ys (g/100g borra)	Ác. Acético (g/L)	Açúcares totais (g/L)	Ys total (g/100g borra)
R0P	10,06	3,45	0,157	0,77	3,48	0,08	0,35	5,68	25,79	1,28	5,81	0,08	7,04	31,96
R0H	9,93	3,40	0,180	0,23	1,23	0,71	3,77	5,54	29,30	0,74	3,90	0,07	6,99	36,97
R1P	15,01	5,15	0,160	0,84	2,61	0,10	0,30	7,45	23,13	1,73	5,38	0,12	9,28	28,82
R1H	14,82	5,08	0,182	0,66	2,35	0,67	2,40	8,20	29,37	0,85	3,06	0,11	9,73	34,83
R2P	20,03	6,87	0,163	0,64	1,51	0,11	0,26	7,76	18,43	1,84	4,36	0,16	9,70	23,05
R2H	19,78	6,78	0,176	0,29	0,76	1,48	3,84	10,49	27,22	1,30	3,38	0,15	13,27	34,44
R3P	25,00	8,57	0,166	0,77	1,49	0,12	0,24	8,20	15,92	1,95	3,78	0,15	10,27	19,94
R3H	24,70	8,47	0,183	0,26	0,57	1,33	2,86	11,55	24,95	1,53	3,30	0,20	14,40	31,11

\* Teor de humidade = 65,71%.