MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PROAMB

AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA CASCA DE CAFÉ NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Nayara Clarisse Soares Silva

Ouro Preto, MG
2019

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB

AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA CASCA DE CAFÉ NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Nayara Clarisse Soares Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de concentração Tecnologias Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta

Coorientador: Leandro Vinícius Alves Gurgel

Ouro Preto, MG
2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Nayara Clarisse Soares .

Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico da casca de café na hidrólise enzimática e produção de Biogás . [manuscrito] / Nayara Clarisse Soares Silva. - 2019.

123 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Café - Cascas. 2. Reaproveitamento (Sobras, refugos, etc.). 3. Biogás. 4. Digestão anaeróbia. 5. Hidrólise - Enzimas. I. Silva, Nayara Clarisse Soares . II. Baêta, Bruno Eduardo Lobo. III. Gurgel, Leandro Vinícius Alves. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 502:004

Bibliotecário(a) Responsável: Maristela Sanches Lima Mesquita - CRB: 1716

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB

AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA CASCA DE CAFÉ NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Autora: Nayara Clarisse Soares Silva

Dissertação defendida e aprovada, em 02 de agosto de 2019, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baeta - Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leandro Vinicius Alves Gurgel - Coorientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Milla Alves Baffi
Universidade Federal de Uberlândia
(Participação por videoconferência)

Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino
Universidade Federal de Ouro Preto

RESUMO

Sabe-se que a biomassa lignocelulósica pode ser utilizada na produção de biocombustíveis como bioetanol e biogás. O Brasil destaca-se mundialmente por sua produção de café, sendo que, durante o beneficiamento dos grãos de café são geradas grandes quantidades de resíduos, como a casca. Entretanto, para um melhor aproveitamento energético desta biomassa lignocelulósica é importante adicionar uma etapa de pré-tratamento para tornar os açúcares fermentescíveis mais disponíveis, destacando-se o pré tratamento hidrotérmico.. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o pré-tratamento hidrotérmico da casca de café, utilizando o planejamento experimental Box-Behnken, a melhor estratégia de utilização da casca de café como matéria prima para uma biorrefinaria lignocelulósica. Foram avaliadas 15 condições experimentais utilizando as variáveis independentes: temperatura (120 a 200°C), tempo (20 a 90 minutos) e razão líquido/sólido (5 a 10 mLg^{-1}). Observou-se que nas condições com temperatura igual a 200 °C se obteve alta remoção de celulose, o que prejudicou o rendimento global do processo em relação à glicose recuperada visando a produção de etanol de segunda geração. Para obter um melhor rendimento no processo na hidrólise enzimática, foi gerada uma condição de desejabilidade visando a produção de etanol. Visando avaliar outras rotas de aproveitamento da biomassa, foram avaliadas a digestão anaeróbia (DA) de três condições de desejabilidade – CDB1 (120 °C, 20 min e 5 mL g^{-1}), CDB2 (189 °C, 90 min e 5 mL g^{-1}), CDB3 (200 °C, 61 min e 5 mL g^{-1}). Além destas condições, realizou-se a DA do hidrolisado gerado na CDE. De maneira geral o pré-tratamento foi eficiente para aumentar a digestibilidade da biomassa. Além disso, vale ressaltar que a elevada concentração de compostos fenólicos interferiu negativamente na produção de metano, inibindo a produção na DA em estado sólido e semissólido da CDB3. A maior produção de metano em relação a DQO de entrada foi para a CDB3 em estado líquido. Por outro lado, a alta demanda energética do pré-tratamento não foi possível recuperar o gasto energético nesta condição. Desta forma, a condição que apresentou melhor rentabilidade econômica (R$ 150,00 ton de casca $bruta^{-1}$) foi a CDE, utilizando a fração sólida para hidrolise enzimática visando a produção de etanol e o hidrolisado para produção de metano, adicionando ao sistema a combustão de 0,125 toneladas de casca bruta para suprir o déficit energético para pré tratar 1 tonelada de cascas destas condições.

Palavras chave: casca de café, pré-tratamento hidrotérmico, hidrólise enzimática, biogás, digestão anaeróbia

ABSTRACT

It is known that lignocellulosic biomass can be used in the production of biofuels such as bioethanol and biogas. Brazil stands out worldwide for its coffee production, and during the processing of coffee beans large amounts of waste such as husk are generated. However, for a better energy use of this lignocellulosic biomass it is important to add a pretreatment step to make fermentable sugars more available, highlighting the hydrothermal pretreatment. Therefore, the aim of this work was to evaluate the hydrothermal pretreatment of coffee husk using Box-Behnken experimental design, the best strategy for using coffee husk as raw material for a lignocellulosic biorefinery. Fifteen experimental conditions were evaluated using the independent variables: temperature (120 to 200 ° C), time (20 to 90 minutes) and liquid / solid ratio (5 to 10 mLg-1). It was observed that under conditions with temperature equal to 200 ° C high cellulose removal was obtained, which impaired the overall process yield in relation to the recovered glucose aiming at the production of second generation ethanol. To obtain a better process yield in enzymatic hydrolysis, a desirable condition was generated aiming at ethanol production. In order to evaluate other biomass utilization routes, anaerobic digestion (DA) of three desirability conditions was evaluated - CDB1 (120 ° C, 20 min and 5 mL g-1), CDB2 (189 ° C, 90 min and 5 mL). g-1), CDB 3 (200 ° C, 61 min and 5 mL g-1). In addition to these conditions, the DA of the hydrolyzate generated in the CDE was performed. Overall, pretreatment was efficient to increase biomass digestibility. Furthermore, it is noteworthy that the high concentration of phenolic compounds negatively interfered with methane production, inhibiting CDB3 solid and semi-solid DA production. The highest methane production over incoming COD was for liquid CDB3. On the other hand, the high energy demand of the pretreatment could not recover the energy expenditure in this condition. Thus, the condition that presented the best economic profitability (R $ 150,00 tons of crude shell-1) was the CDE, using the solid fraction for enzymatic hydrolysis aiming at ethanol production and the hydrolysate for methane production, adding to the system. combustion of 0.125 tonnes of crude bark to fill the energy deficit to pre-treat 1 tonne of bark under these conditions.

Key words: coffee husks, hydrothermal pretreatment, second generation ethanol, bioethanol

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marcelo e Evânia que sempre me apoiaram incondicionalmente em todas as minhas decisões. Sem o apoio e amor de vocês nada disso seria possível. Obrigada pelos valores ensinados e por me mostrarem que sempre alcançamos o que queremos com esforço, persistência e estudo. À minha ‘’rimã’’Marcela pela amizade, por estar sempre presente apoiando e ajudando.

Aos mestres Bruno Baêta e Leandro Gurgel por me orientarem durante estes dois anos, auxiliando nas situações adversas que surgiram ao longo deste percurso. Obrigada pela confiança e paciência, e por todo conhecimento transmitido.

À minha avó Agripina e minha madrinha Marly, pelo amor e orações. Ao meu avô Tonico por todo apoio e carinho sempre. Aos meus avós maternos, Evanilde e Luiz, que sei que, de onde estiverem estão sempre me ajudando e olhando por mim. Ao meu padrinho e a Tina pelo obrigada por estarem sempre comigo mesmo que distante. A todos meus tios e tias, primos, vocês também fazem parte desta conquista.

Aos amigos do laboratório obrigada por toda ajuda, conhecimento transmitidos, conversas (sejam elas sobre trabalho ou não – na sala de estudos ou no bar) e apoio. Com certeza a convivência com vocês tonou o dia a dia na pesquisa mais fácil. Agradeço em especial à Aline pela amizade e contribuição, principalmente na época da qualificação. Ao Adonai, por toda disponibilidade em sempre ajudar. E a Yasmim, pelo auxílio no Statística, nos experimentos e nas cachaças.

Ao André, não sei como descrever o quanto seu apoio e incentivo foram importantes nesta etapa. Obrigada por acreditar em mim, por todas as conversas, por todos os conselhos, cuidado e companheirismo. *“Era para ser só um mestrado...”*.

Ao Ulisses e Maria Helena por todo carinho e pela receptividade. Não tenho palavras para agradecer.

Às meninas da Café com Prosa, em especial Samille, Luiza, Yasmin, Mayara, Ana Alice e Amanda, pelo convívio, conversas, companhia e amizade.

Às amigas Julia e Marina que mesmo longe sempre me apoiaram, torceram por mim e compreenderam os momentos de ausência. À Sarah por toda ajuda, principalmente no início do mestrado.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço sobretudo a Deus por me permitir concluir mais esta etapa.

À UFOP e ao PROAMB pela oportunidade e à CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq e a FAPEMIG pelo financiamento desta pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica. Fonte: Rubin (2008) modificada. 5
Figura 2: Estrutura da glicose, celobiose e celulose. Fonte: Adaptado de Suhas *et al*. (2016). 7
Figura 3: Representação esquemática de um fragmento de cadeia de hemiceluloses. Fonte: própria autora. 8
Figura 5: Esquema da estrutura do fruto do Café. Fonte: Adaptado de Oliveira e Franca (2014). 10
Figura 6: Processamento industrial do Café. Fonte: Adaptado de Soccol (2002). 11
Figura 7: Efeito do pré-tratamento na acessibilidade enzimática da biomassa. Adaptado de Taherzadeh e Karimi, (2008). 17
Figura 8: Representação esquemática da ação catalítica das celulases sobre a celulose. Fonte: Ogeda (2011). 27
Figura 9: Esquema do processo de digestão anaeróbia para biomassas lignocelulósicas. Fonte: adaptado de BAÊTA (2016). 31
Figura 10: Fluxograma do processo considerado para cálculo do rendimento. (A) Processo sem extração alcalina e (B) processo com extração alcalina. 48
Figura 11: Diagrama de Pareto para composição de celulose na casca de café pré-tratada (A) e para remoção de celulose no pré-tratamento hidrotérmico (B). 60
Figura 12: Perda de massa e remoção dos constituintes da casca de café após pré-tratamento hidrotérmico. 62
Figura 13: Diagrama de Pareto para composição de hemiceluloses na casca de café pré-tratada (A) e para remoção de hemiceluloses no pré-tratamento hidrotérmico (B). 63
Figura 14: Diagrama de Pareto para composição de lignina na casca de café pré-tratada (A) e para remoção de lignina no pré-tratamento hidrotérmico (B). 68
Figura 15: Diagrama de Pareto para o rendimento de hidrólise enzimática da casca de café pré-tratata por pré-tratamento hidrotérmico. 70
Figura 16: Imagem de MEV da casca de café bruta (A), casca do PTH na condição 6 (B), casca do PTH na condição 3 (C), casca do PTH na condição 6 + extração alcalina (D) e casca do PTH na condição desejabilidade (E). 74
Figura 17: Perfil dos valores previstos para condição de desejabilidade de acordo com o algoritmo de predição. 76

Figura 18: Cinética enzimática para diferentes cargas de enzima pra CDE.....78
Figura 19: Gráficos de Pareto para as variáveis respostas dos hidrolisados 83
Figura 20: Concentração dos compostos do hidrolisado(a) DQO (B) açúcares redutores, cafeína, fenóis, HMF, FF e fenóis. 84
Figura 21 Concentração dos compostos do hidrolisado (A) açúcares redutores, fenóis. HMF, FF e inibidores e (B) DQO 88
Figura 22: Produção acumulada de CH_4 89
Figura 23: Relação entre a concentração de fenóis e produção de biogás nos testes S e S+L 91
Figura 23: Dados de produção acumulada de metano estimada pelo modelo de Gompertz modificado e experimental durante a digestão anaeróbia da casca de café bruta e das frações sólida (S), sólida + líquida (S+L) e líquida da casca de café pré-tratada 98
Figura 25: Avaliação do perfil de AGV's após os ensaios de PBMBM (g/L) 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da casca de café em base seca. 12
Tabela 2: Trabalhos realizados para aproveitamento de resíduos do café. 13
Tabela 3: Trabalhos que utilizaram o pré-tratamento hidrotérmico sem injeção de vapor de água para fracionamento da biomassa lignocelulósica. 25
Tabela 4: Planejamento experimental do tipo Box-Behnken para ensaios de pré-tratamento hidrotémico. 41
Tabela 5: Condições para produção de etanol 2G obtidas pela ferramenta de desejabilidade. 50
Tabela 6: Condições de desejabilidade visando a produção de biogás. 51
Tabela 7: Condições de pré-tratamento hidrotérmico e composições da casca de café bruta e pré-tratada. 59
Tabela 8: Rendimentos de glicose médios dos ensaios de hidrólise enzimática da casca de café pré-tratada. 69
Tabela 9: Valores das variáveis dependentes para condição de desejabilidade prevista pelo modelo e as obtidas experimentalmente. 77
Tabela 10: Caracterização da fração sólida gerada para as CDB 87
Tabela 11: Caracterização de alguns compostos na entrada dos ensaios de PBM 89
Tabela 12: Parâmetros cinéticos e de ajuste de diferentes modelos usados para avaliar a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da casca de café fração sólida (S), sólida + líquida (S+L) e líquida (L) 97
Tabela 13: Estimativa energética e econômica para os cenários propostos 105

LISTA DE ABREVIATURAS

1G – Primeira geração
2G – Segunda geração
AIC – Critério de informação de Akaike
AGVs – Ácidos graxos voláteis
BBD – Planejamento experimental Box-Behnken
BET – Brunauer-Emmett-Teller
CAP- Carvão ativado em pó
CCPT – Casca de café pré-tratada
CLAE – Cromatografia de fase líquida de alta eficiência
CDE – Condição de desejabilidade para etanol
CDB – Condição de desejabilidade para biogás
COEA – Carga de ozônio especifica aplicada
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
CG – Cromatografia gasosa
CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massas
DA – Digestão anaeróbia
DA-L – Digestão anaeróbia em estado líquido
DA-S – Digestão anaeróbia em estado sólido
DA-S – Digestão anaeróbia em estado semi-sólido
DNS – Ácido 3,5dinitro salicílico
DQO – Demanda química de oxigênio
EA – Extração Alcalina
ETE – Estação de Tratamento de Esgoto
FF – 2-furfuraldeído
g Cel/g CPT – grama de celulose por grama de casca pré-tratada
g Hemi/g CPT – grama de hemicelulose por grama de casca pré-tratada
g Lig/g CPT – grama de lignina por grama de casca pré-tratada
HE – Hidrólise enzimática
HH – Hidrolisado hemicelulósico
HMF – 5-hidroximetil2-furfuraldeído
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
OIC – Organização Internacional de Café

PBM – potencial bioquímico de metano

PTH – Pré-tratamento hidrotérmico

R Cel% – Remoção de celulose

RHE – Rendimento de hidrólise enzimática

R Hemi% - Remoção de hemiceluloses

RG – Rendimento global do processo

R Lig% – Remoção de lignina

RLS – Razão líquido-sólido

RMSE – Erro quadrático médio

NRMSE – Erro quadrático médio normalizado

SHF – Sacarificação seguida de fermentação

SSF – Sacarificação simultânea à fermentação (SSF)

ST – Sólidos Totais

SSV – Sólidos suspensos voláteis

T – Temperatura

t - tempo

SUMÁRIO

RESUMO iv

ABSTRACT v

AGRADECIMENTOS vii

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE TABELAS xi

LISTA DE ABREVIATURAS xii

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 4

2.1. Objetivo geral 4

2.2. Objetivos específicos 4

3. REVISÃO DE LITERATURA 5

3.1. Biomassa lignocelulósica 5

3.1.1. Celulose 6

3.1.2. Hemiceluloses (Polioses) 7

3.1.3. Lignina 8

3.2. O café 9

3.3. Pré-tratamento para biomassa lignocelulósica 16

3.4. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) da biomassa lignocelulósica 21

3.5. Produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica 26

3.6. Produção de biogás a partir da biomassa lignocelulósica 28

3.7. Considerações finais a respeito da revisão e justificativa do projeto 32

4. MATERIAIS E METÓDOS 34

4.1. Obtenção e preparo da casca de café 34

4.2. Caracterização da casca de café 34

4.2.1. Determinação do teor de umidade 34
4.2.2. Determinação do teor de extrativos 34
4.2.3. Determinação do teor de inorgânicos 35
4.2.4. Determinação do teor de lignina solúvel e insolúvel 36
4.2.1. Determinação dos teores de hemiceluloses e celulose 38
4.2.2. Balanço de massa 39
4.2.3. Área superficial e microscopia eletrônica de varredura 39
4.3. Planejamento experimental 40
4.4. Ensaio de pré-tratamento hidrotérmico 41
4.5. Caracterização da fração sólida gerada pelo pré-tratamento 42
4.6. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico (HH) gerado após pré-tratamento da casca de café 43
4.6.1. Determinação dos teores de inibidores 43
4.6.2. Demanda química de oxigênio (DQO): refluxo aberto 43
4.6.3. Determinação de açúcares redutores totais 44
4.6.4. Cafeína 45
4.6.5. Determinação dos teores de fenóis totais no hidrolisado hemicelulósico 45
4.7. Extração alcalina 46
4.8. Hidrólise enzimática 46
4.8.1. Avaliação da melhor caga enzimática 50
4.9. Ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM) 50
4.9.1. Estudo de cinética da digestão anaeróbia 53
4.10. Avaliação da viabilidade do uso do PTH como alternativa para valorização da casca de café 55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 58

5.1. Caracterização da casca de café bruta e pré-tratada e desempenho do pré-tratamento hidrotérmico na hidrólise enzimática 58

5.1.1. Avaliação do PTH na hidrólise enzimática da casca de café pré-tratada 68

5.1.2. Avaliação do efeito da carga enzimática no RHE 78

5.1.3. Conclusões a respeito do desempenho do pré-tratamento hidrotérmico e o efeito do mesmo na hidrólise enzimática 80

5.2. Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no hidrolisado hemicelulósico e produção bioquímica de metano a partir da casca pré-tratada 81

5.2.1. Potencial bioquimico de produção de metano (PBM) da casca de café 86

5.2.2. Avaliação do potencial bioquímico de metano (PBM) do hidrolisado gerado pela condição ótima de PTH para a produção de etanol a partir da fração sólida 101

5.2.3. Estimativa da viabilidade do uso do PTH para valorização da casca de café .. 102

5.2.4. Conclusões a respeito do efeito do pré-tratamento hidrotérmico no HH e da avaliação do PBM 106

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS 107

REFERêNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109

1. INTRODUÇÃO

Grande parte da economia mundial ainda está baseada na utilização de recursos fósseis, o que tem se tornado insustentável por diversas razões (Gravatis e Abolins, 2013), sendo a principal delas a crescente preocupação com as mudanças climáticas causadas pelo uso destes recursos, o que faz com que o interesse pela produção de combustíveis a partir de fontes renováveis venha ganhando atenção em todo o mundo (Galbe e Zacchi, 2012).

O etanol é o combustível mais produzido em todo o mundo a partir de matéria-prima de fonte renovável. Aproximadamente 90% de todo o etanol utilizado é produzido da fermentação da sacarose de cana-de-açúcar e beterraba ou amido de milho, sendo que a maior parte da produção está localizada no Brasil e nos Estados Unidos da América (EUA) (Hamelink *et al*., 2005). Apesar das tecnologias de fermentação para obtenção de etanol estarem bem desenvolvidas, existem alguns aspectos negativos. As culturas que dão origem ao amido (milho) e a sacarose (cana-de-açúcar) para produção de etanol nos EUA e no Brasil, respectivamente, demandam o uso de grandes extensões de terras produtivas para plantação, o que em um futuro, em função do crescimento populacional, pode provocar um conflito entre a produção de alimentos e geração de energia, uma vez que se aumentaria a necessidade da utilização de terras produtivas para produção de alimento (Kim e Dale, 2004, Dias *et al*., 2011; Baêta, 2016).

Os resíduos lignocelulósicos, gerados principalmente pela agroindústria, vêm se destacando como matéria-prima potencial para aumentar a produção de combustíveis renováveis. A partir deles é possível aumentar a capacidade de produção de energia sem a necessidade de elevação de área territorial plantada, fator considerado interessante quando o assunto é o crescimento populacional, demanda alimentícia e energética.

Devido ao seu potencial de produção agrícola, o Brasil é um dos maiores produtores de resíduos na forma de biomassa lignocelulósica (Rambo *et al.*,2015). Dentre esses resíduos podem ser destacados o bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana-de-açúcar, cascas de arroz e café, semente de açaí, serragem de eucalipto, cascas de coco, cascas de soja, hastes e talos de banana, no que se destaca a geração da casca de café, fruto do qual o país é o maior produtor.

Os resíduos agroindustriais são, por natureza, muito heterogêneos em tamanho, composição, estrutura e propriedades. Estes resíduos contêm em sua composição mássica uma grande quantidade de compostos passíveis de serem utilizados por microrganismos fermentativos e anaeróbios, como a celulose e as hemiceluloses, polímeros constituídos por carboidratos de 6 (glicose) e 5 (xilose e arabinose) carbonos, respectivamente. Além disso, tais resíduos possuem em sua matriz uma quantidade considerável de lignina. Em função da complexidade estrutural de tais resíduos, a utilização dos mesmos como matéria-prima para bioprocessos que objetivam à produção de biocombustíveis depende do aumento de sua acessibilidade por parte dos microrganismos e enzimas utilizadas. Um exemplo destes biocombustíveis é o etanol gerado a partir destes resíduos, denominado etanol de segunda geração (2G).

Neste contexto, insere-se a necessidade da inclusão de uma etapa de pré-tratamento, visando aproveitar em sua totalidade o potencial da biomassa lignocelulósica, melhorando, portanto, os rendimentos de produção de etanol e biogás. Contudo, ainda não existe um pré-tratamento consolidado, uma vez que, como as características de cada biomassa variam muito, o melhor pré-tratamento para uma determinada biomassa dependerá das suas propriedades como composição, densidade, recalcitrância, dentre outras (Taherzadeh e Karimi, 2008).

O pré-tratamento hidrotérmico (PTH) sem injeção de vapor tem se destacado como técnica de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas quando se visa o aproveitamento energético da mesma, principalmente a produção de etanol de segunda geração (2G). É considerado uma técnica simples e ambientalmente correta. Suas principais vantagens ao se comparar com outros pré-tratamentos são os baixos custos e não utilização de ácidos, que torna necessário o uso de reatores resistentes à corrosão.

O pré-tratamento hidrotérmico irá atuar na biomassa removendo principalmente a fração de hemiceluloses, deixando assim a celulose mais disponível ao ataque enzimático. Entretanto, para maiores remoções de hemiceluloses são necessárias condições muito severas (elevados tempos e temperaturas), o que aumenta o custo do processo. Como forma de melhorar o balanço de energia do processo, uma forma é a utilização do hidrolisado hemicelulósico para a produção de biogás via digestão anaeróbia (Carvalheiro *et al*., 2008; Baêta *et al*., 2016; Mahmoodi *et al*., 2018).

Dentro deste contexto, este trabalho de dissertação visou avaliar a valorização da casca de café por meio da produção de biogás (CH_4) e/ou bioetanol a partir das frações líquidas e sólidas geradas após o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa. O trabalho realizado possui grande relevância nacional e estadual, uma vez que o Brasil é o maior produtor mundial de café, e Minas Gerais é responsável por aproximadamente dois terços da produção nacional. A produção de café gera grande quantidade de subprodutos que ainda não são aproveitados em todo o seu potencial, que se dispostos incorretamente no meio ambiente podem torna-se um resíduo e causar danos, uma vez que os mesmos possuem compostos tóxicos à microbiota do solo, como fenóis e taninos (Soccol, 2002). Em sua relevância econômica e ambiental, este trabalho visou gerar conhecimentos para subsidiar a eventual valorização de um resíduo agroindustrial produzido em grande quantidade no contexto nacional, e a sua possível utilização como matéria-prima renovável para produção de biocombustíveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial de aproveitamento do resíduo de casca de café submetido ao pré-tratamento hidrotérmico, considerando a produção de etanol de segunda geração e biogás.

2.2. Objetivos específicos

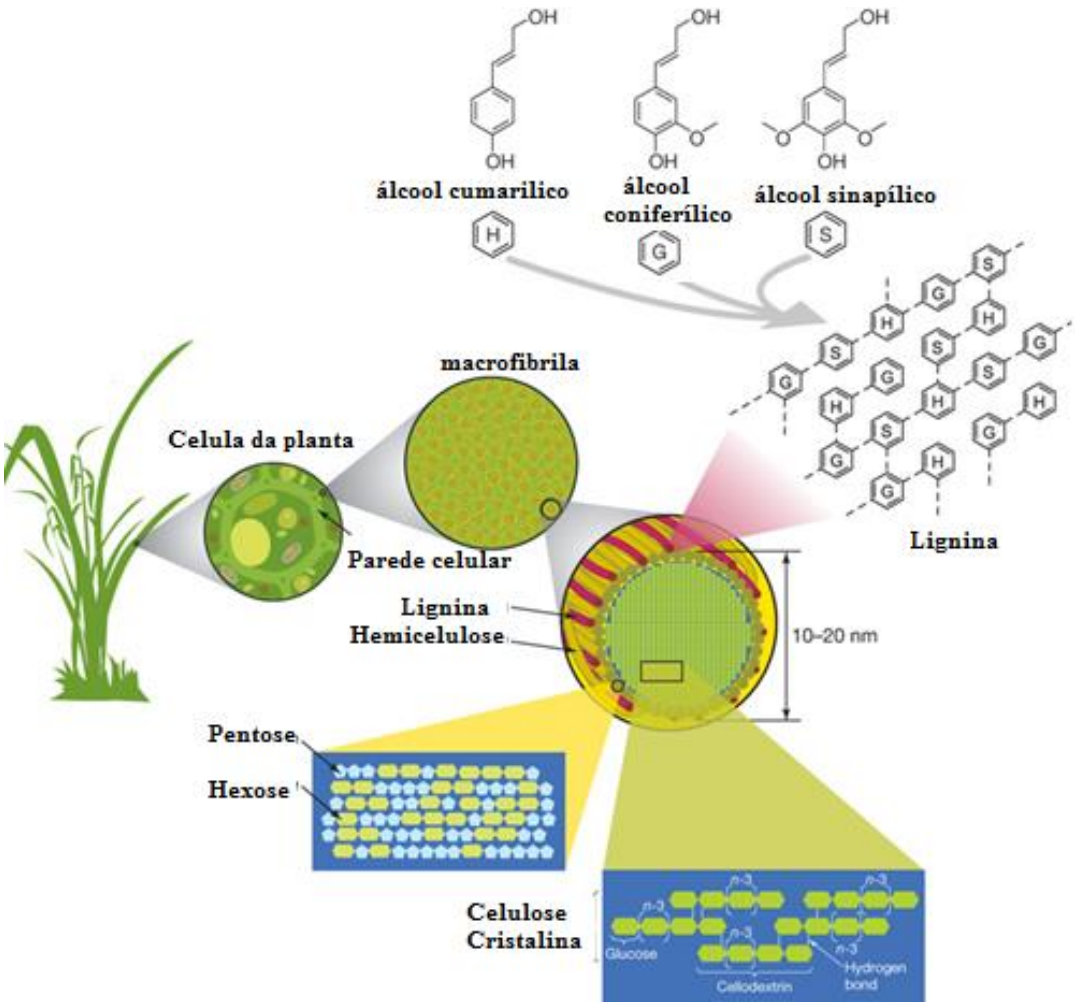
i. Avaliar a influência das variáveis independentes - tempo, temperatura e razão líquido-sólido - no pré-tratamento hidrotérmico da casca de café;
ii. Avaliar o potencial do uso da biomassa pré-tratada hidrotermicamente como substrato para obtenção de etanol de segunda geração por meio de hidrólise enzimática;
iii. Avaliar o efeito da extração alcalina como etapa adicional ao pré-tratamento hidrotérmico, no rendimento da hidrólise enzimática da fração sólida gerada;
iv. Avaliar o potencial do uso da biomassa pré-tratada hidrotermicamente como substrato para digestão anaeróbia visando a obtenção de biogás avaliando a separação e a não separação das frações líquido e sólida;
v. Determinar os parâmetros de cinética da produção de biogás durante a digestão anaeróbia;
vi. Estimar a viabilidade energética do processo por meio de balanço de energia

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um recurso orgânico abundante, sendo grandes quantidades dispostas na forma de resíduos gerados pelas atividades agrícolas, florestais e municipais, sendo constituída principalmente de três componentes majoritários: celulose, hemiceluloses e lignina (Zheng, *et al*., 2014). Além destes compostos, encontram-se na biomassa lignocelulósica, em menor quantidade: extrativos, sais minerais, proteínas e metabólitos secundários, cuja fração de cada constituinte na biomassa varia de acordo com a espécie e idade do vegetal (Gírio *et* al., 2010). A Figura 1 apresenta o esquema simplificado da estrutura de um material lignocelulósico.

Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica. Fonte: Rubin (2008) modificada.



A biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para diversas finalidades, podendo destacar-se a sua utilização para produção de combustíveis alternativos como etanol, biogás e até hidrocarbonetos, cujo processo se dá pela gaseificação da biomassa para formação de gás de síntese seguido por hidrogenação catalítica. Para se otimizar as conversões, rendimento e seletividade para os processos de formação desses combustíveis faz-se necessário compreender a estrutura química da biomassa. Dentre os componentes que compõem a biomassa, a celulose é o principal componente estrutural das paredes celulares das plantas e será o responsável pela geração de açúcar do tipo hexose (glicose) (Monlau *et al*., 2013).

Outro componente de grande importância nos materiais lignocelulósicos são as hemiceluloses, que são homopolímeros compostos por unidades repetidas de monossacarídeos de 5 carbonos, tais como a xilose, no caso das cascas de café, podendo também conter em sua composição alguns outros monossacarídeos como a arabinose, a manose e a galactose. Na estrutura da biomassa as hemiceluloses são responsáveis por ligar as fibras de celulose à lignina, criando uma rede complexa, contribuindo para formação estrutural da biomassa. Por fim, a lignina é uma macromolécula composta de unidades fenólicas, a qual é responsável por conferir resistência à planta. Estes três componentes irão formar as estruturas chamadas microfibrilas, que são organizadas em macrofibrilas, que proporcionarão a estabilidade estrutural na parede celular da planta (Rubin, 2008).

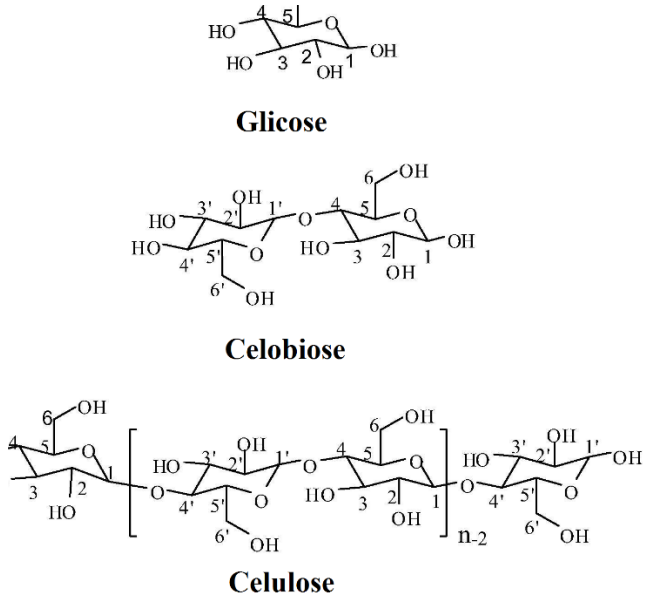
3.1.1. ***Celulose***

A celulose é o polímero mais abundante no planeta Terra e considerada o principal componente estrutural da parede celular vegetal. É um homopolímero linear que consiste em unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo β-(1→4), formando um dímero conhecido como celobiose, o qual é a unidade fundamental da celulose. Estas unidades são apresentadas na Figura 2 (Rubin, 2008; Suhas *et al*. 2016).

As cadeias poliméricas de celulose são ligadas entre si por interações inter- e intramoleculares, tais como as ligações de hidrogênio, o que faz com que a celulose se torne um material resistente e coeso e, por consequência, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos (Mood *et al.*, 2013). Para que seja possível a hidrólise da celulose, normalmente são necessários tratamentos ácidos ou uso de enzimas específicas, que irão clivar as interações existentes entre as cadeias de celulose em monômeros de glicose. Tais monômeros poderão ser

utilizados para produção de biocombustíveis como etanol e aditivos para serem usados em biocombustíveis de aviação (butanol), por meio de processo de fermentação (Wang *et al.*, 2016). Além do etanol, é possível obter por meio da glicose outros insumos como etileno, buteno, propileno, ácido acrílico, glicerol, entre outros (Schuchardt e Ribeiro, 2001).

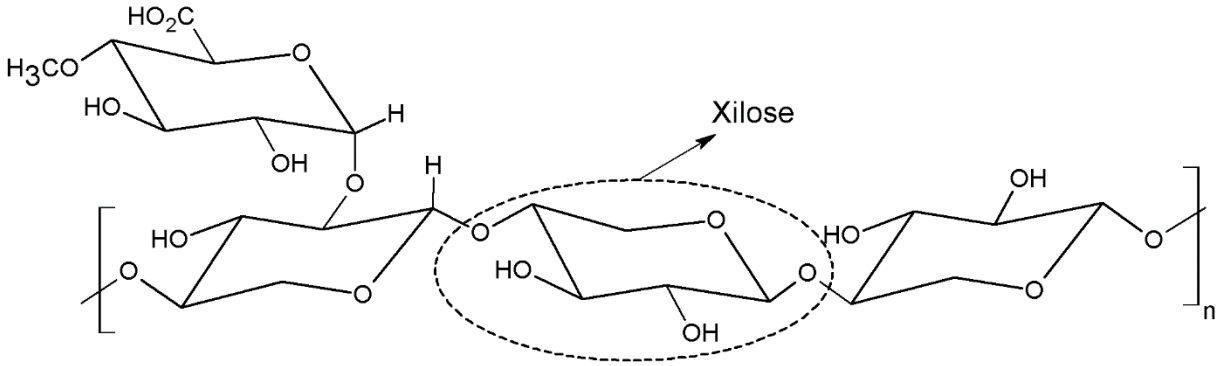
Figura 2: Estrutura da glicose, celobiose e celulose. Fonte: Adaptado de Suhas *et al*. (2016).



3.1.2. *Hemiceluloses (Polioses)*

Diferente da celulose, as hemiceluloses, Figura 3, não são quimicamente homogêneas. As hemiceluloses são compostas por heteropolímeros, podendo conter pentoses (β-D-xilose, α-L-arabinose), hexoses (β-D-manose, β-D-glucose, α-D-galactose) e ácidos urônicos (α-D-glicurônico, α-D-4-O-metilglicurônico, α-D-galacturônico). As xilanas são os principais componentes das hemicelulósicos das paredes celulares secundárias, constituindo de 20 a 30% da estrutura de madeiras nobres e herbáceas (Gírio *et al*., 2010).

Figura 3: Representação esquemática de um fragmento de cadeia de hemiceluloses. Fonte: própria autora.



Em relação à celulose, as hemiceluloses são relativamente fáceis de hidrolisar, pois possuem uma estrutura amorfa e ramificada, além de uma menor massa molar. Assim, quando se tem interesse em aumentar a digestibilidade da celulose, uma alternativa é remover grandes quantidades de hemiceluloses, pois estas recobrem as fibrilas de celulose, limitando a ação do maquinário enzimático durante a hidrólise enzimática. Além disso, vale destacar que as hemiceluloses são sensíveis a condições de pré-tratamento muito severas, desta forma, torna-se importante o controle de parâmetros como tempo e temperatura de reação para minimizar a formação de produtos inibitórios aos microrganismos (Mood *et al.*, 2013).

Os açúcares liberados pela hidrólise das hemiceluloses podem ser usados para produção de outros compostos de valores agregado, tais como metano, butanol, hidrogênio, dentre outros (Amiri e Karimi, 2015; Yang *et al.*, 2015; Shukor *et al.*, 2016). O desenvolvimento de processos viáveis que utilizem essa fração da biomassa pode ser um dos fatores preponderantes para disseminação de biorrefinarias lignocelulósicas sustentáveis.

3.1.3. ***Lignina***

A lignina é uma das substâncias mais abundantes na natureza. É uma macromolécula amorfa e altamente ramificada que encontra-se na parede celular dos vegetais conferindo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência biológica (Perez *et al*., 2002). A estrutura da lignina se difere da estrutura da celulose e das hemiceluloses, pois em sua organização ao invés de açúcares fazem-se presentes diversos grupos aromáticos e alifáticos, com anéis fenilpropânicos (C_6C_3), os quais são ligados entre si por meio de ligações tipo éter ou tipo carbono-carbono, dando origem a essa macromolécula (Freitas, 2016).

As três unidades principais precursoras da lignina são o álcool *p*-cumarílico (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S), como podem ser observados na Figura 1. Tais compostos são responsáveis por formarem a estrutura amorfa da lignina a partir de suas reações de polimerização desidrogenativa (Windeisen *et. al.,* 2012). O teor de lignina em uma biomassa lignocelulósica normalmente varia de 15% a 30% da composição total, podendo chegar em alguns casos a até 40%, sendo que a porcentagem de cada uma das unidades básicas varia muito de acordo com o tipo de botânica do vegetal, por exemplo, madeiras duras tem principalmente unidades de G, enquanto gramíneas incorporam maior quantidades de unidades de H. A lignina contém regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, mas devido ao seu arranjo químico tridimensional, na ocorrência nativa ela é hidrofóbica, o que permite o transporte de água na parede celular dos vegetais (Windeisen *et al.* 2012).

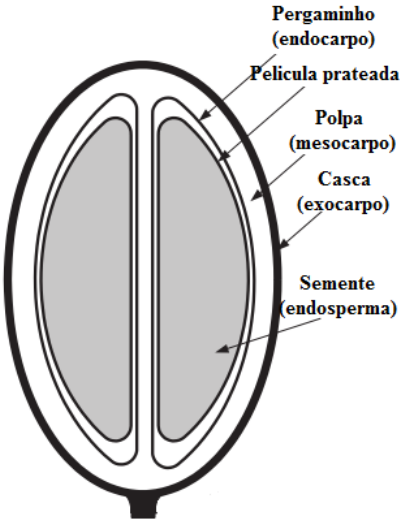
Assim como as hemiceluloses, a lignina também atua como uma barreira física ao ataque enzimático da celulose durante o processo de hidrólise enzimática. A presença de tal molécula é considerada uma das grandes responsáveis pelos baixos valores de rendimento de recuperação de açúcares a partir dos materiais lignocelulósicos. A lignina pode, em muitos casos, adsorver as enzimas hidrolíticas de forma irreversível, reduzindo a quantidade de enzimas disponíveis para o ataque da celulose (Santos *et al.*, 2013).

3.2. O café

Estima-se que a safra mundial de café em 2018/19 seja de 167,47 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, sendo o Brasil o maior produtor mundial do fruto, responsável por 60,1 milhões de sacas, aproximadamente um terço da produção mundial. Em um contexto nacional, o estado de Minas Gerais destaca-se sendo responsável por 59,5% da produção brasileira (CONAB, 2018, IOC, 2019).

O fruto do café é composto por dois grãos, ou sementes, que são envoltos por um pergaminho. Em seguida, os grãos são cobertos por uma polpa e, por fim, por uma casca. Um esquema da estrutura do fruto do café é apresentado na Figura 4.

Figura 4: Esquema da estrutura do fruto do Café. Fonte: Adaptado de Oliveira e Franca (2014).

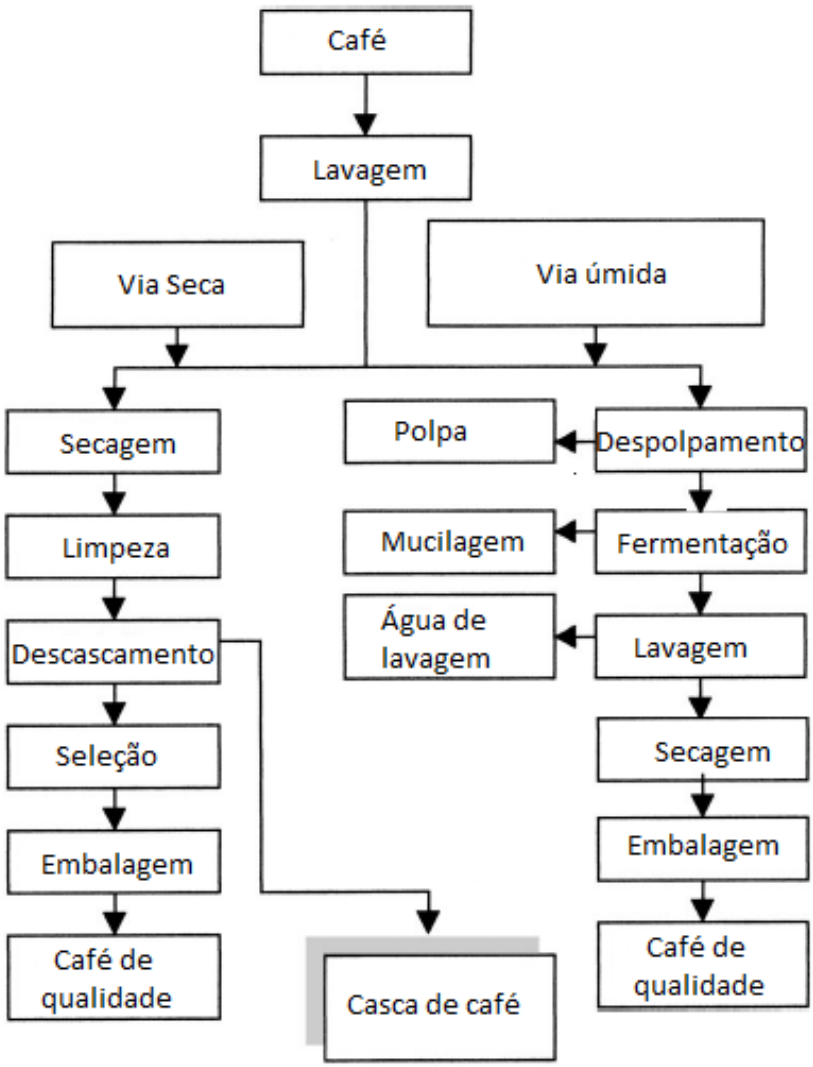


O processamento do grão do café pode ocorrer por duas vias: seca ou úmida, conforme apresentado na Figura 5. No entanto, ambos os processos de beneficiamento são responsáveis por gerarem grandes quantidades de resíduos como casca e polpa, respectivamente (Ulsildo *et al*. 2016). No Brasil, cerca de 80% dos grãos de café são beneficiados pelo método de via seca, o que gera uma grande quantidade de casca de café, que são ricas em matéria orgânica, nutrientes e compostos como cafeína, fenóis e taninos (Pandey *et al.*, 2000).

O processamento do café por via seca consiste em deixar os frutos secarem expostos à luz solar (naturalmente) ou por aquecimento em fornos. Em seguida, os grãos secos são descascados removendo o exocarpo e o mesocarpo, gerando o resíduo que é considerado casca de café (Soccol, 2002; Oliveira e Franca, 2014).

Estima-se que, durante o processamento de café por via seca, a relação obtida de grão beneficiado e casca seja de 1:1, em massa (Badocha *et al*., 2003; Gouvea *et al.*, 2009), o que confere à safra brasileira de café, em 2018/19, potencial para gerar aproximadamente 3 milhões de toneladas de casca de café. Entretanto, ainda não existem tecnologias consolidadas que permitam o melhor aproveitamento desta biomassa em sua totalidade, seja como fonte de energia ou como matéria-prima para produção de bioprodutos de valor agregado.

Figura 5: Processamento industrial do Café. Fonte: Adaptado de Soccol (2002).



A composição da casca de café pode variar de acordo com a espécie do fruto, região de plantio e época do ano (Rossetti, 2007). A Tabela 1 apresenta a composição deste resíduo encontrada por diferentes autores. Percebe-se que não há uma padronização da metodologia de caracterização adotada pelos autores, além de grande variação dos percentuais de cada componente analisado e quantificado

Além dos componentes principais da biomassa lignocelulósica (lignina, celulose e hemiceluloses) a casca de café possui outros componentes como proteínas (8-11%), cafeína (1%), e taninos (5%) (Ayele *et al*., 2010, Blinová *et al*., 2017), sendo que a cafeína e os taninos

podem não ser vantajosos a diversas possibilidades relacionadas ao uso da casca de café como matéria-prima em bioprocessos devido ao seu potencial tóxico (Soccol, 2002).

Tabela 1: Composição da casca de café em base seca.

Composto (%)	Celulose	Hemiceluloses	Lignina	Lipídeos	Fenóis	Cinzas	Extrativos	Balanço
Andrade, 2009	32,15		13,23	4,52	2,36	0,34	34,46	96,83
Gouvea *et a*l., 2009	16	11	9	0,3		5,4	-	41,7
Ayele e; Reinhardt, 2010	24,5	29,7	23,7	-	-	6,2	-	84,1
Silva, 2012	43,80	31,52	24,35	-	-	-	-	99,67
Alnuquerque e Araújo, 2016	24,0		19,0	-	-	6,9	26,0	75,9
Freitas, 2016	24,5	19,86	13,68	-	-	0,36	38,0	96,40
Santos *et al*., 2018	32,5	20,8	27,1	-	-	4,5	22,0	106,9
BaêtaA *et al*., 2017	29,17	28,96	22,35	-	-	4,6	17,67	102,75

Por muito tempo as cascas de café foram utilizadas diretamente no solo como fertilizante. Entretanto, os compostos tóxicos presentes podem causar um desequilíbrio em termos de macro- e micronutrientes do solo, tornando factível o uso da casca de café para outras finalidades. Para tanto faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas tecnológicas capazes de agregar valor a este resíduo (Bekalo e Rheinardt, 2010; Shemekite, 2014). Alguns estudos foram desenvolvidos visando o uso destes resíduos em ração animal, mas o elevado conteúdo de taninos, nitrogênio de proteínas de difícil degradação, cafeína e polifenóis limita essa aplicação (Pandey *et al*., 2000; Pereira, 2003; Blinová *et al.* 2017).

Devido à grande geração deste resíduo e à sua limitação de utilização, têm sido desenvolvidos trabalhos buscando encontrar usos mais nobres para os resíduos gerados durante o beneficiamento do café. A Tabela 2 apresenta uma revisão com alguns trabalhos desenvolvidos visando valorar os resíduos gerados durante a produção e consumo do café.

Alguns usos, porém, ainda pouco explorados para os resíduos (casca e polpa) da produção de café são os bioprocessos para produção de enzimas, ácido cítrico e compostos aromáticos. Lima *et al.* (2013) utilizaram a casca de café para produzir celulases. Após cultivo de 5 dias a 24 ± 2ºC foram obtidas atividades enzimáticas de 0,394 e 0,358 U mL^{-1} utilizando os fungos *Trichoderma pseudokoningii 1052 e Trichoderma reesei 1612*, respectivamente. Leifa *et al* (2001) demonstraram em seu trabalho que a casca e a borra de café têm potencial para servir como substrato para produção de cogumelos comestíveis. Além disso, observou-se

que a produção destes cogumelos nos resíduos reduziu os teores de taninos e cafeína presente nos mesmos, tornando-os menos tóxicos.

Tabela 2: Trabalhos realizados para aproveitamento de resíduos do café.

Resíduo	Objetivo	Considerações	Fonte
Casca de Café	Avaliar gás de combustão	Grande geração de cinzas	(Saenger *et al.*, 2001)
Casca de Café	Produzir bioabsorventes para remoção de metais pesados	Redução na eficiência adsorção ao se aumentar a concentração de íons metálicos de 50 mg/L para 100 mg/L.	(Oliveira *et al.*, 2008)
Borra de Café	Produção de etanol	Produção de 8,49 ± 0,29 g de etanol/100 g de casca de café em base seca	(Gouvea et al., 2009)
Casca de Café	Pirólise da casca de café	Grande geração de cinzas	(Silva, 2012)
Cascas de Café	Produção de etanol e carvão ativado	Aquecimento da casca (95°C e 30 min) aumentou a produção de etanol de 1,1 g h^{-1} kg^{-1} para 2,3 g h^{-1} kg^{-1}.	(Tehrani *et al.*, 2015)
Casca de café e dejetos bovinos	Produção de biogás com casca bruta	Cascas passaram por processo de moagem (5 g de casca moída); Maior rendimento de biogás (3x) quando ocorreu controle de temperatura (37°C).	(Albuquerque e Araújo, 2016)
Casca e borra de Café	Produzir cogumelos comestíveis	Redução dos teores de cafeína e taninos dos resíduos. Borras de café se mostraram mais eficientes em prover nutrientes.	(Leifa *et al.*, 2001)
Casca de café	Celulases	A casca de café foi eficiente ao ser utilizada como substrato para cultivo de *Trichoderma spp* para produção de celulases	(Lima, *et al.*, 2013)
Cascas de café	Biogás	Pré-tratamento biológico aumentou a produção de biogás.	(Jayachandra *et al.* 2011)
Borra de café	Produção de biodiesel	Extração de 13% de óleo da borra de café, o qual continha um teor de ácidos graxos igual a 6,14%. Obteve-se biodiesel com características similares ao diesel comercial bi-hidrogenado	(Phimsen *et al.*, 2016)
Casca de café	Biogás	Avaliou condições mesofílica (produção de 131,67 ± 5,75 $mLCH_4$ $gSSV^{-1}$) e termofílica (124,63 ± 6,7 mL CH_4 $gSSV^{-1}$)	(Ulsido *et al.*2016)
Cascas de café	Biogás e etanol	Uso de pré-tratamento oxidativo - Produção teórica de 36 mg de etanol/g de casca de café para fração sólida; Produção de biogás (metano) de 29 $NmLCH_4$/g casca através da fração líquida	(Santos *et al.*., 2018)
Cascas de café	Biogás	-Pré-tratamento das cascas por explosão a vapor; Produção de 144.96 $NmLCH_4$ $gDQO^{-1}$	(Baêta *et al.*, 2017)
Cascas de Café	Biogás	- Codigestão de casca de café e microalga pré-tratada termicamente; Produção de 196,1 $mLCH_4$/g SSV	(Passos *et al.*., 2018)

Oliveira *et al.* (2008) avaliaram a casca de café como adsorvente de metais tóxicos em águas residuais. A biomassa se mostrou satisfatória principalmente para remoção de metais em soluções aquosas em baixa concentração de 50 mg L^{-1}. A maior remoção ocorreu para Cu(II)

(até 98% de adsorção) ao adicionar-se 1 g de casca em 150 mL de solução aquosa por 72 horas, mostrando que a casca de café tem potencial para atuar como bioadsorvente em águas residuárias contaminadas com metais tóxicos. Por outro lado, os autores não citaram o destino final das cascas após serem usadas como adsorvente, o que pode se tornar um problema ambiental, pois esse é um resíduo que necessitará de um outro tipo de tratamento após a sua utilização.

A utilização da casca de café em rotas térmicas como via de obtenção de energia não apresentou resultado satisfatório até o presente momento, por não aproveitar todo o potencial da casca de café como biomassa lignocelulósica. A combustão da casca de café gerou um gás de baixa densidade energética e com elevado teor de impurezas (Saenger *et al*., 2001). Enquanto isso, na pirólise o carvão produzido tem um elevado poder calorífico (PCS igual a 24,6 MJ kg^{-1} e PCI de 23,16 MJ kg^{-1}), entretanto em função do elevado teor de cinzas o seu uso em diversos processos industriais é dificultado (Silva, 2012).

Por outro lado, a obtenção de biocombustíveis, como diesel, bioetanol e biogás por meio do uso de resíduos de café se mostraram promissoras. O pré-tratamento por cozimento da biomassa de borra de café a 90°C durante 30 minutos aumentou a produção de etanol em 13% em estudo realizado por Tehrani *et al*. (2015). Durante este estudo foram testadas diferentes temperaturas e tempos de fermentação durante o cozimento do substrato para produção de etanol, além disso avaliou-se a possibilidade de produção de carvões ativados preparados por ativação química com ácido fosfórico e por ativação física com vapor. Phimsen *et al*. (2016) utilizaram a borra de café para extração de óleo e posterior produção de biodiesel. O combustível produzido pelos pesquisadores obteve propriedades físico-químicas de acordo com as especificações do diesel comercial bi-hidrogenado.

Gouvea e colaboradores (2009) estudaram o uso da casca de café bruta, casca de café moída e extrato aquoso de casca de café moída para produção de etanol. Os autores encontraram os melhores resultados para casca de café sem passar pelo processo de moagem, encontrando na melhor condição uma produção de 8,49 ± 0,29 g de etanol 100 g^{-1} de casca de café em base seca, o que equivale a 13,6 g de etanol L^{-1} após o processo de fermentação. Para casca de café sem moer, os autores também avaliaram o efeito da temperatura (25, 30 e 35°C) durante a fermentação, e da concentração de leveduras (3, 4 e 5 g L^{-1}), sendo que os melhores resultados

foram obtidos para 30°C e uma concentração de leveduras igual a 3 g L^{-1}. Os resultados foram considerados satisfatórios pelos autores visto que a casca de café bruta apresentou uma produção de etanol próxima à de outras biomassas lignocelulósicas que passaram por hidrólise ou foram suplementadas com açúcares. É destacado ainda a possibilidade de pré-tratar este resíduo visando uma maior produção de etanol.

Jayachandra e colaboradores (2011) pré-trataram a casca de café com fungos termofílicos visando a diminuição do pH e redução da concentração de polifenóis, fatores que inibem a metanização. Em dois meses foram quantificados 25,62 mL de gás dia^{-1} kg^{-1} de biomassa pré-tratada comparados com 23,26 mL de gás dia^{-1} kg^{-1} de biomassa não tratada. Entretanto, os autores não determinaram a composição do gás gerado e não avaliaram se os 15 dias gastos para o pré-tratamento são economicamente viáveis. Já Ulsido *et al*. (2016) visando dar um aproveitamento para a elevada quantidade de cascas de café geradas na Etiópia, avaliaram a produção de metano à partir de cascas de café em duas diferentes faixas de temperatura, mesofílica e termofílica, sendo que a primeira, 37 ± 2ºC, apresentou o melhor rendimento, 131,67 ± 5,75 mL de CH_4 $gSSV^{-1}$.

Santos *et al*. (2018) estudou em seu trabalho a viabilidade de produção de biogás e bioetanol de segunda geração (2G) a partir da casca de café utilizando pré-tratamento oxidativo com ozônio, avaliando a influência das variáveis razão líquido-sólido (*RLS*, mL g^{-1}), pH e carga de ozônio específica aplicada (COEA) (mgO_3 g de $casca^{-1}$). A fração sólida gerada após o pré-tratamento foi usada na etapa de hidrólise enzimática para produção de etanol, enquanto a fração líquida residual rica em lignina e hemiceluloses foi levada para a produção de biogás (metano e hidrogênio). Os autores obtiveram para sua melhor condição (*RLS* de 10 mL g^{-1}, *pH* 11 e *COEA* de 81,0 mg O_3 g $cascas^{-1}$) uma produção estimada de 36 mg de etanol g de casca de $café^{-1}$ para fração sólida e uma produção de biogás (metano), via digestão anaeróbia, de 29 NmL CH_4 g $cascas^{-1}$.

Visando a produção de metano, Baêta *et al.* (2017) pré-trataram a casca de café por explosão a vapor. Após o pré-tratamento realizado em sete diferentes condições, toda a biomassa (frações líquida e sólida) foi levada à digestão anaeróbia para avaliar o potencial de produção de biogás. A maior produção de metano foi obtida para a biomassa pré-tratada por 60 min a 120°C, totalizando 144.96 NmL CH_4 g COD^{-1}. A condição que mais liberou açúcares

fermentescíveis, por outro lado, não foi a que obteve um maior rendimento na produção de metano, possivelmente devido à maior quantidade de inibidores gerados no processo.

Passos *et al.* (2018) pré-trataram a casca de café juntamente com microalgas por explosão a vapor visando aumentar a biodegradabilidade anaeróbia da biomassa. A casca de café sem nenhum pré-tratamento apresentou uma produção de 100 mL CH_4 g SSV^{-1}. Após o pré-tratamento a 120°C por 60 min e 180°C por 15 min, observou-se um aumento na produção de biogás de 37 e 23%, respectivamente. Ao realizar a co-digestão com microalgas, os autores obtiveram uma produção de 172,1 mL CH_4 g SSV^{-1} para a biomassa sem pré-tratamento (casca de café + microalgas), e de 196,1 mL CH_4 g SSV^{-1} para a mesma mistura pré-tratada à 120°C por 15 min.

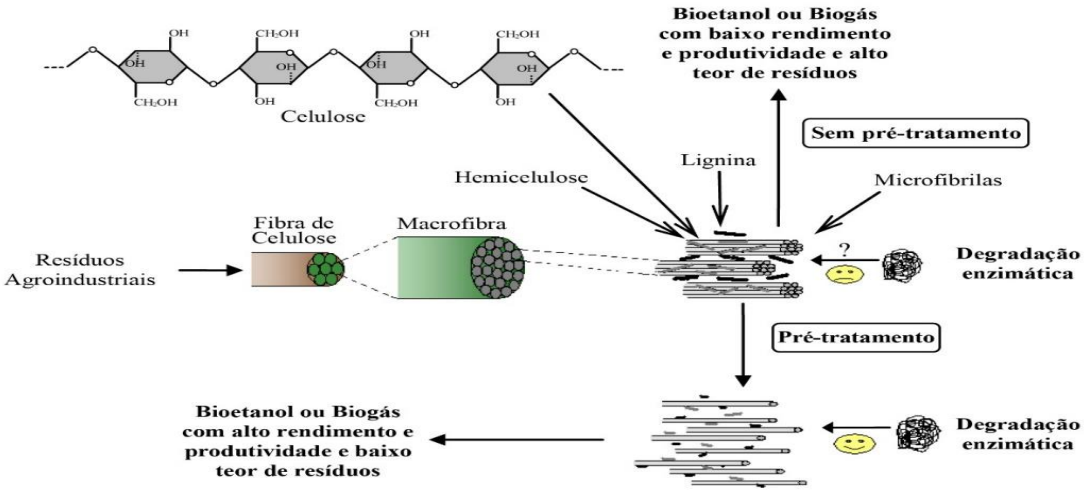
De acordo com o apresentado, torna-se clara a preocupação de se encontrar uma aplicação para os resíduos de café que são gerados durante o processamento dos grãos. Pesquisas têm sido desenvolvidas nos últimos anos visando este aproveitamento, porém ainda não foram desenvolvidos métodos consolidados que permitam aproveitar totalmente as cascas de café, o que abre espaço para realização de estudos como o proposto no presente trabalho.

O aproveitamento energético da casca de café vem se destacando, e como apresentado por alguns autores, como Gouvea *et al.* (2009), Santos *et al* (2018) e Baêta *et al*. (2017), a aplicação de um pré-tratamento na casca de café pode permitir que todas as frações geradas sejam aproveitadas com um maior potencial visando a produção de biocombustíveis como etanol e/ou biogás.

3.3. Pré-tratamento para biomassa lignocelulósica

Devido à complexa estrutura da biomassa lignocelulósica, é essencial adicionar uma etapa de pré-tratamento para alterar as características estruturais dos materiais lignocelulósicos, tornando-os mais acessíveis à ação das enzimas e dos microrganismos permitindo, assim, um melhor aproveitamento da biomassa (Alvira *et al*., 2010). O pré-tratamento pode aumentar a digestibilidade dos materiais de difícil degradabilidade, melhorando o rendimento da produção de biogás e etanol, por exemplo (Behera *et al*., 2014). A Figura 6 representa de forma esquemática o efeito geral do pré-tratamento em uma biomassa lignocelulósica.

Figura 6: Efeito do pré-tratamento na acessibilidade enzimática da biomassa. Adaptado de Taherzadeh e Karimi, (2008).



Segundo Chiaramonti *et al.* (2012) a etapa de pré-tratamento pode ser considerada a mais cara do processo, representando pelo menos 20% do custo total do mesmo. Desta forma, é necessário adequar a melhor tecnologia de acordo com a biomassa a ser tratada e os objetivos esperados. Um pré-tratamento eficiente deve possuir o melhor balanço de energia possível, sendo que para isso deve demandar a menor quantidade de energia, evitar uso de reagentes e materiais caros e possuir uma boa relação custo-benefício, melhorando a formação de açúcares na fase de hidrólise enzimática e reduzindo a formação de inibidores para a seguinte de fermentação (Chiaramonti *et al*., 2012). Além dos açúcares, outros produtos gerados pelos processos de produção de etanol celulósico são: o ácido acético, produzido pela hidrólise de grupos acetila, 2-furfuraldeído (FF), que é gerado pela desidratação de pentoses em meio ácido e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF), originado pela desidratação em meio ácido das hexoses, como a glicose (Mosier *et al*., 2005), por exemplo.

Diferentes pré-tratamentos irão afetar as propriedades da biomassa lignocelulósica de distintas maneiras, mas em geral, todos possuem um efeito importante na área superficial da biomassa (Zheng *et al.*, 2014a). Diversos processos têm sido propostos a fim de aumentar os efeitos do pré-tratamento na produção de etanol celulósico: processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos.

Os pré-tratamentos físicos envolvem principalmente a redução de tamanho da biomassa lignocelulósica, desintegrando ou mesmo moendo, visando aumentar a área superficial da

mesma. Pode ser utilizado apenas o processo de cominuição, ou sua combinação com etapas seguintes, sendo que o tamanho final da partícula desejado depende dos objetivos de uso. Para os pré-tratamentos mecânicos devem ser levados em consideração fatores operacionais como custo de operação e depreciação de equipamentos (Harmsen *et al.,* 2010).

Sindhu e colaboradores (2015) defendem o pré-tratamento biológico como uma tecnologia atraente por ser ambientalmente correto e possuir baixo custo. Neste pré-tratamento, fungos de podridão branca são utilizados para degradar lignina e hemiceluloses. Como desvantagens do método, destaca-se a necessidade de longos tempos de residência para que ocorra uma degradação elevada da biomassa pelos fungos (Wan e Li, 2012).

Os pré-tratamentos químicos referem-se aos que utilizam substâncias químicas, como por exemplo ácidos, bases ou mesmo líquidos iônicos com o objetivo de alterar as características físicas e químicas da biomassa lignocelulósica. Alguns exemplos de pré-tratamentos químicos são os oxidativos, alcalinos e ácidos (Zheng *et al*., 2014).

Os tratamentos oxidativos são utilizados visando a deslignificação da biomassa por meio do uso de um agente oxidante, como peroxido de hidrogênio, ozônio ou O_2, sendo que a eficiência da deslignificação ocorre devido à reatividade dos agentes oxidantes com as unidades aromáticas da lignina, convertendo-as em ácidos carboxílicos insaturados, por exemplo. Neste tratamento, uma parte substancial das hemiceluloses também pode ser removida ou degradada (Harmsen *et al*., 2010).

No conjunto dos pré-tratamentos químicos, o pré-tratamento organossolve (utilização de solventes organicos recuperaveis pare deslignificação) pode fornecer produtos com elevado valor agregado, ainda que seja um processo mais caro que os processos mais conhecidos. Desde a década de 70, a polpação do processo organossolve tem atraído interesse como processo para extrair a lignina de biomassas lignocelulósicas, pois não apresenta problemas como poluição de ar e água quando comparado com os processos Kraft e sulfito. As principais vantagens desse pré-tratamento são a recuperação de solventes orgânicos por destilação e a recuperação química da lignina como um material sólido, isento de enxofre (Zhao *et al*., 2009).

Por outro lado, durante o processo de lavagem da fração sólida pode-se observar a ocorrência de reprecipitação da lignina dissolvida, o que cria a necessidade de um melhor

planejamento quanto a escolha do tipo de solvente a ser usado na lavagem. Além disso, os solventes orgânicos são conhecidos por possuírem elevado custo, o que cria a demanda de inclusão de operações unitárias de recuperação dos mesmos, além de aumento no consumo de energia durante o processo. Portanto, este pré-tratamento ainda é considerado caro para ser amplamente aplicado à biomassas lignocelulósicas (Zhao *et al*., 2009).

Os pré-tratamentos alcalinos consistem em utilizar o meio alcalino para romper a estrutura da lignina e a ligação entre lignina e outras frações de carboidrato da biomassa. Neste tipo de pré-tratamento, grupos acetilas e outras substituições de ácido urônico e ferúlico nas hemiceluloses que reduzem a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose são removidas (Agbor *et al.*, 2011). A principal desvantagem do método é a necessidade de lavagem e/ou neutralização da suspensão gerada após o pré-tratamento, pois sabe-se que a realização da mesma pode evitar a inibição nas etapas posteriores. Além dos problemas no processo, pode-se citar a eminente preocupação com a destinação das correntes residuais líquidas geradas pelo processo (Wan *et al*., 2011).

De maneira similar aos tratamentos alcalinos, os pré-tratamentos ácidos consistem em utilizar meio com pH ácido para alterar a estrutura da biomassa. Durante o pré-tratamento ácido irá ocorrer a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa, aumentando a acessibilidade das enzimas à fração sólida gerada, a qual torna-se rica em celulose e lignina, também chamada de celulignina (Alvira *et al.*, 2010). A principal limitação desse método se deve ao uso de ácidos minerais concentrados que podem ser tóxicos, perigosos, ocasionarem grande geração de inibidores e causarem corrosão, o que torna necessário o uso de reatores construídos em aços especiais resistentes ao ataque químico desses ácidos. Portanto, essas limitações acarretam em um aumento do custo de implementação do processo.

De forma a minimizar tais problemas, tem-se estudado o uso de ácidos minerais diluídos, resultando em condições menos severas e com menor geração de inibidores e corrosão de reatores e equipamentos (Singh *et al*., 2015). Outra desvantagem do método é que, assim como no tratamento alcalino, faz-se necessária a adição de uma etapa de neutralização e/ou recuperação química do ácido utilizado (Kumari e Singh, 2018).

Entre os pré-tratamentos físico-químicos, destacam-se os tratamentos por micro-ondas, ultrassom e os térmicos, como explosão a vapor e a auto-hidrólise, dois exemplos de pré-

tratamento térmico (Alvira *et al*., 2010). O processo de pré-tratamento da biomassa por irradiação por micro-ondas altera a estrutura da celulose e degrada ou remove parcialmente as hemiceluloses e a lignina, aumentando a acessibilidade enzimática (Kumari e Singh, 2018). O pré-tratamento por ultrassom utiliza ondas ultrassônicas que criam diferença de pressão dentro de uma solução em uma frequência além da faixa audível. As ondas percorrem o líquido gerando expansão e contração de bolhas. O processo produz radicais oxidantes que podem levar ao ataque químico da biomassa lignocelulósica (Bussemaker e Zhang, 2013).

A explosão a vapor, catalisada ou não, consiste em expor a biomassa lignocelulósica com vapor saturado de elevada pressão por um curto período de tempo e, em seguida, despressurizar o sistema de forma instantânea, o que faz com que a biomassa sofra uma descompressão explosiva de dentro para fora pela saída de moléculas de água. Neste pré-tratamento as hemiceluloses são hidrolisadas em açúcares e a lignina é parcialmente degradada.

A explosão a vapor é um dos métodos mais utilizados para pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Este pré-tratamento possui uma menor demanda por energia dado seu menor tempo de reação e impactos ambientais menos significativos, mas por outro lado, dependendo da severidade do pré-tratamento, pode gerar degradação excessiva das hemiceluloses e/ou celulose formando compostos que serão inibidores à etapa de fermentação e digestão anaeróbia (Sarkar *et al*., 2012; Zheng *et al*., 2014). O processo de explosão a vapor pode ser acelerado principalmente por amônia, CO_2 ou mesmo por ácidos orgânicos e minerais diluídos (Carvalheiro *et al*., 2008).

Outro processo térmico que se destaca para o pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas é o pré-tratamento hidrotérmico sem injeção de vapor de água, também conhecido como auto-hidrólise ou "pré tratamento com água quente", que consiste em aquecer a biomassa com água a elevadas temperaturas por um tempo determinado, muitas vezes maior do que o tempo usado na explosão a vapor. Durante este processo, a água penetra na estrutura da biomassa, hidratando a celulose e hidrolisando as hemiceluloses, além disso é possível observar uma pequena remoção de lignina (Ruiz *et al*., 2012). O pré-tratamento hidrotérmico é um processo que vem se destacando devido à não utilização de produtos químicos, como por exemplo, ácidos ou bases, o que torna o processo mais ambientalmente correto, além de mais barato, uma vez que não gera custo de recuperação e neutralização destes produtos, além de

reduzir a formação de inibidores e não necessitar de reatores especiais (Taherzadeh e Karimi, 2008; Mahmoodi *et al*., 2018). Desta forma, a auto-hidrólise pode ser considerada uma técnica interessante para o pré-tratamento da casca de café, motivo pelo qual a próxima seção será dedicada a um maior detalhamento desse método de pré-tratamento.

3.4. Pré-tratamento hidrotérmico (PTH) da biomassa lignocelulósica

O PTH sem injeção de vapor de água consiste em utilizar apenas água à elevada temperatura para hidrolisar as hemiceluloses da biomassa lignocelulósica, o que torna esse método de pré-tratamento promissor em relação aos que usam produtos químicos, além de produzir hidrolisados com menor quantidade de inibidores (Zheng *et al.*, 2014b). Neste processo, a água a elevada temperatura atua como solvente e reagente. Em elevadas temperaturas, a auto-ionização da água gera íons hidrônio (H_3O^+) que são capazes de promover uma hidrólise ácida inicial nos grupos acetila das hemiceluloses, gerando como produto o ácido acético, responsável por diminuir o pH do meio e aumentar a velocidade das reações de hidrólise ácida, tornando o processo auto catalítico, isto é, sem adição de ácido orgânico ou mineral. No entanto, a eficiência desse pré-tratamento também está diretamente relacionada ao teor de grupos acetila nas hemiceluloses da biomassa em questão, uma vez que esses grupos serão os principais responsáveis pelo abaixamento de pH do meio reacional, participando diretamente nas reações de hidrólise das hemiceluloses. O PTH provoca um aumento na porosidade e na área superficial da biomassa, o que permite uma maior penetração das enzimas hidrolíticas e um aumento da acessibilidade da celulose, reduzindo também a sua associação com a lignina (Taherzadeh e Karimi, 2008; Cybulska *et al*., 2010).

Baêta (2016) descreve em seu trabalho, de acordo com o proposto por Liu (2010), as etapas que ocorrem durante este tipo de pré-tratamento. De acordo com os autores, em elevada temperatura a constante de acidez da água aumenta, produzindo o íon hidrônio H_3O^+ que irá atuar como um catalisador, proporcionando que a hidrólise das ligações glicosídicas ocorra e, consequentemente, levando a despolimerização das hemiceluloses. Quando ocorre a elevação da temperatura no meio, os oligômeros são mais facilmente difundidos para a fase líquida, o que aumenta o rompimento das ligações glicosídicas, pois essa reação ocorre em fase homogênea, ao contrário da hidrólise das hemiceluloses dentro da matriz lignocelulósica. O rompimento de ligações de grupos substituintes das hemiceluloses como O-acetil e ácido

urônico irá gerar no meio reacional ácidos orgânicos que irão promover uma maior taxa de hidrólise das hemiceluloses, além de solubilizar xilo-oligossacarídeos (XOS) e açúcares monoméricos. Segundo RUIZ *et al*. (2017) após a clivagem das ligações glicosídicas, são gerados no sistema pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), que podem ser degradadas em FF e HMF, respectivamente, por reações de desidratação.

O PTH é mais facilmente entendido quando separado em etapas. Inicialmente ocorre a formação dos íons hidrônios, os quais irão migrar do seio da solução para a superfície da biomassa sólida. Em seguida, irão ocorrer na superfície da biomassa as reações entre o íon H_3O^+ e xilanas, e então os XOS solúveis no meio reacional irão difundir de dentro da célula vegetal e consequentemente migrar para o seio da solução aquosa na forma solúvel. De acordo com Fernández-Cegrí *et al*. (2012) a desvantagem significativa deste pré-tratamento é a formação de furanos (FF e HMF) em elevadas temperaturas, que são indesejáveis, uma vez que derivam dos açúcares fermentescíveis, o que representa uma perda dos compostos de interesse, além de serem considerados inibidores para bactérias e leveduras.

Desta forma, as condições ótimas de operação do processo devem ser determinadas para cada biomassa de maneira a reduzir a formação destes compostos inibitórios e favorecer a preservação dos açúcares fermentescíveis. Ruiz *et al.*, (2017) relatam que os métodos hidrotermais, têm como finalidade modificar a biomassa de acordo com o objetivo proposto a um baixo custo. Para isso, entretanto, devem ser levados em consideração os custos com gasto de água no processo. Desta forma, a *RLS* a ser utilizada no pré-tratamento também deve ser otimizada, visando minimizar os custos com água, mas permitindo que as reações de hidrólise ocorram e os produtos sejam solubilizados no meio reacional.

Perez *et al*. (2007) avaliaram as variáveis do pré-tratamento hidrotérmico da palha de trigo. Os autores descreveram que a temperatura e tempo apresentaram efeito diretamente significativo nas quantidades de xilanas e acetila presentes na fração sólida remanescente após o processo, os quais diminuem significativamente com o aumento destas variáveis, afetando a acessibilidade enzimática da biomassa pré-tratada. As temperaturas comumente utilizadas em processos hidrotérmicos quando se deseja uma degradação seletiva das hemiceluloses estão entre a faixa de 150°C e 230°C, uma vez que praticamente nenhuma reação hidrolítica é

observada em temperaturas inferiores a 100°C, assim como o fato de temperaturas acima de 200°C proporcionarem uma maior degradação da celulose (Garrote *et al*., 1999).

Além da solubilização das hemiceluloses durante o PTH, a lignina também sofre alterações químicas em sua estrutura. Durante o PTH, a lignina é despolimerizada por meio de hidrólise ácida das ligações do tipo α- e β-alquil-aril-éter, o que leva a um aumento na quantidade de grupos hidroxila fenólicos. Essa despolimerização da lignina também leva a geração de fragmentos de baixa massa molar, os quais são solúveis no meio reacional, enquanto aqueles fragmentos de lignina de massa molar mais elevada podem ser repolimerizados ou mesmo precipitados na superfície das fibras do material lignocelulósico, ficando na forma de gotas (droplets) de lignina (Cybulska *et al*., 2010).

Portanto, a lignina residual na fração sólida após o pré-tratamento apresenta diferenças estruturais consideráveis em comparação aquela da fração original. Porém, essa lignina quimicamente modificada apresentam uma menor suscetibilidade a reações posteriores devido a formação de ligações intercruzadas do tipo carbono-carbono durante o PTH, sendo necessário meios de reação oxidativos para promover uma deslignificação efetiva da biomassa pré-tratada. No entanto, parte dessa lignina quimicamente modificada ainda pode ser extraída por meio de lavagem com solução alcalina ou mesmo com solventes orgânicos (Garrote *et al*., 1999), como, por exemplo, demonstrado por Lima (2018) em seu trabalho, em que utilizando uma solução de NaOH 0,1 M em uma razão liquido sólido igual a 10 ml por grama de bagaço em base seca aumentou a deslignificação em 9% do bagaço de cana pré tratado por ozonização.

Os hidrolisados gerados a partir do PTH contêm, além das hemiceluloses hidrolisadas, diferentes tipos de compostos fenólicos derivados da despolimerização da lignina e clivagem de ligações lignina-hemiceluloses, sendo que a concentração e o tipo destes compostos dependem da severidade do tratamento e da biomassa tratada. Entre os principais compostos fenólicos identificados nos hidrolisados encontram-se os álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos benzoicos e ferúlicos (Ruiz *et al.*, 2017).

No PTH, a fração sólida resultante irá conter um maior teor de celulose, a qual estará mais facilmente acessível ao ataque enzimático, podendo ser convertida em hexose (glicose) e, então, levada à fermentação, visando a produção de etanol de segunda geração (2G). Por outro lado, o hidrolisado hemicelulósico é rico em pentoses, as quais podem ser fermentadas a etanol,

requerendo no entanto, organismos geneticamente modificados ou *indigenous species* tolerantes a uma maior concentração de etanol no meio para que a etapa de destilação seja viável economicamente (Fernandes e Murray, 2010). Desta forma, alguns autores, como Baêta *et al.* (2016), apontam como alternativa para aproveitar todas as frações geradas no pré-tratamento, dentro do contexto da biorrefinaria, a produção de biometano à partir da fração líquida rica em pentoses via digestão anaeróbia (DA).

Por meio dos dados apresentados na Tabela 3 é possível observar que as variáveis do PTH sem injeção de vapor (auto-hidrólise) são fatores importantes que podem variar para cada tipo de biomassa e objetivo proposto. As variáveis do PTH são temperatura (faixa encontrada de 140°C a 210°C), tempo (5 a 90 min) e razão líquido sólido (4 a 20 mL g^{-1}). Tais variáveis irão afetar diretamente a viabilidade energética do processo, tonando-se então de extrema importância a otimização das mesmas para cada situação específica. Além disso, a temperatura é um fator importante quando se trata de geração de compostos tóxicos como FF e HMF no hirolisado hemicelulósico, o que pode afetar o rendimento da DA. A *RLS*, por sua vez, afetará a concentração de ácido ácetico no meio, o que influenciará diretamente no PTH do meio reacional e consequentemente na capacidade de solubilização das hemiceluloses presentes na biomassa lignocelulósica.

A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos que utilizaram o PTH como técnica de pré-tratamento para fracionamento de diferentes biomassas lignocelulósicas. É possível observar que esta técnica é bastante utilizada como forma de extrair as hemiceluloses da fração sólida, deixando a fração sólida rica em celulose visando a fermentação à etanol. Algumas pesquisas têm buscado obter produtos de valor agregado, como os XOS por meio do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento. Porém, poucos trabalhos buscaram aproveitar em sua totalidade as frações geradas após o PTH da biomassa lignocelulósica. Não foram encontrados estudos que avaliassem o uso do PTH para valorização da casca de café.

Tabela 3: Trabalhos que utilizaram o pré-tratamento hidrotérmico sem injeção de vapor de água para fracionamento da biomassa lignocelulósica.

Biomassa	Objetivo	Variáveis	Referência
Capim-Bermuda	Etanol	150°C a 170°C; 30 e 60 min; 6 mL g^{-1}	(Lee *et al.*, 2009)
Podas de Oliveira	Etanol	200°C; 4 a 20 mL g^{-1}	(García *et al.*, 2010)
Eucalipto	Produtos derivados de hemiceluloses e fração sólida para biotanol	185°C a 205°C; 30 min e 8 mL g^{-1}	(Romaní *et al.*, 2011)
Bamboo	Xilo-oligossacarídeos	140°C a 200°C; 10 a 120 min; 10 mL g^{-1}	(Xiao *et al*., 2013)
Bagaço de cana, palha de arroz, palha de milho e cacho de palmeira vazio	Melhorar digestibilidade da fração sólida para produção de etanol	160°C a 2-0°C; 5 a 20 min; 10 mL g^{-1}	(Imman *et al*., 2013)
Palha de cana de açúcar	Otimização do pré-tratamento visando produção de etanol	170°C a 210°C; 5 a 15 min; 6,6 a 10 mL g^{-1}	(Santos *et al*., 2014)
Madeira de pinheiro	Acetona, butanol e etanol	180°C; 60 min; 10 mL g^{-1}	(Amiri e Karimi, 2015)
Bagaço de Cana	Açúcares fermentescíveis a etanol	180°C e 190°C; 10 e 20 min; 10 mL g^{-1}	(Aparecida *et al*., 2015)
Bagaço de Cana	Etanol e biogás	160°C a 185°C; 15 a 35 min; 3 a 6 mL g^{-1}	(Baêta et al., 2016)
Podas de videira	Etanol	180°C a 200°C; 10 a 90 min; 8 mL g^{-1}	(Jesus *et al*., 2017)
Bagaço de Agave	Etanol	140°C a 200°C; 15 min	(Rios-gonzález et al., 2017)

Com base no fracionamento que ocorre na biomassa lignocelulósica durante o PTH, isto é, separação da fração de hemiceluloses da fração de celulignina e, visando melhorar o aproveitamento de todas as correntes do processo, as seções a seguir buscam apresentar uma contextualização acerca da produção de etanol a partir da celulignina e da DA como forma de aproveitar o hidrolisado hemicelulósico para produção de biogás e melhorar consequentemente o balanço de energia do processo.

3.5. Produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica

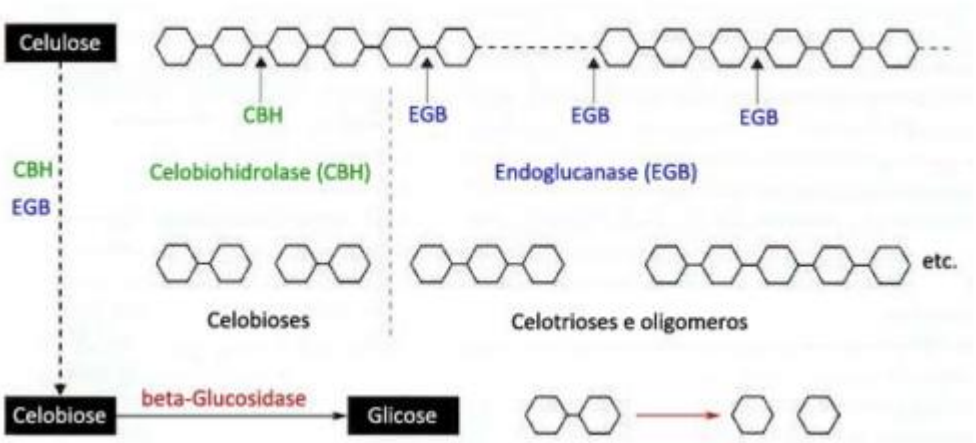
Uma alternativa ao uso de recursos fósseis para produção de energia e produtos químicos tem sido a utilização de biomassa lignocelulósica. Os combustíveis baseados em biomassa são chamados de biocombustíveis, sendo eles de primeira (1G) ou segunda geração (2G). Os de primeira geração são aqueles produzidos a partir de sacarose, amido ou óleo, por meio de tecnologias convencionais com matérias-primas como, por exemplo, a cana-de-açúcar, a beterraba, o milho, dentre outras (Cherubini e Jungmeier, 2010).

Os biocombustíveis de segunda geração são aqueles produzidos de culturas não alimentares como os resíduos lignocelulósicos provenientes da agricultura e silvicultura. Ao contrário dos combustíveis de primeira geração que utilizam apenas uma pequena fração da biomassa, os biocombustíveis de segunda geração podem utilizar estas biomassas em sua totalidade para produção de energia. Os biocombustíveis 2G apresentam como principal vantagem em relação aos 1G a não competição direta com a produção de alimentos (Cherubini, 2010). Por outro lado, a estrutura complexa da matéria lignocelulósica ainda limita a produção de bioetanol 2G. Conforme apresentado, a etapa de pré-tratamento tem como objetivo fracionar essa matéria-prima, tornando a celulose mais disponível.

Após a etapa de pré-tratamento, é necessária a etapa de hidrólise enzimática da fração de celulose, convertendo-a em açúcares fermentescíveis, para que seja possível realizar a fermentação. O complexo enzimático normalmente utilizado para a hidrólise da celulose é conhecido como celulases, que consiste em uma mistura de endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases e β-glicosidases (Sun e Cheng, 2002).

Cada enzima do complexo enzimático das celulases tem uma função na hidrólise da celulose. As endoglicanases irão atuar na fração sólida, realizando uma clivagem das ligações glicosídicas internas da fibra de celulose da biomassa lignocelulósica, reduzindo o grau de polimerização da fibra deixando-a mais exposta. As exoglicanases atuam na região externa da fibra de celulose, hidrolisando as terminações redutoras. Estas enzimas são responsáveis pela ruptura física da fibra de celulose da biomassa, liberando dímeros de celobiose. Por último, as β-glicosidases atuam sobre a biomassa, liberando glicose a partir dos dímeros de celobiose (Sun e Cheng, 2002; Araújo *et al*., 2013). A Figura 7 representa esquematicamente a ação do complexo de celulases sobre a celulose.

Figura 7: Representação esquemática da ação catalítica das celulases sobre a celulose. Fonte: Ogeda (2011).



A hidrólise enzimática deve ser otimizada de forma a apresentar o maior rendimento de conversão a glicose possível. Diversos fatores influenciam nessa conversão, como as características da biomassa lignocelulósica, tipo de pré-tratamento utilizado, presença de estruturas inibidoras, concentração de sólidos no meio, tempo de hidrólise, agitação, temperatura e PTH (Rabelo, 2010).

Mussatto *et al*., (2008) mostraram em seus estudos para resíduos de cervejaria que quanto menor o teor de hemiceluloses e lignina presentes na biomassa lignocelulósica, melhor será a eficiência da hidrólise enzimática, uma vez que estes componentes podem adsorver as celulases, reduzindo a atividade enzimática no meio. Em alguns casos a fração sólida pré-tratada por processo térmico pode conter fragmentos de lignina que se repolimerizam na superfície da fibra, o que dificulta a ação das enzimas (Baêta, 2016).

Como forma de reduzir os impactos causados pela presença de fragmentos de lignina insolúveis na fração sólida a ser usada na hidrólise enzimática, alguns autores têm estudado a inserção de uma etapa de extração alcalina entre o pré-tratamento e a hidrólise enzimática. A lavagem da biomassa com uma solução aquosa de NaOH diluída desprotona os grupos hidroxila fenólicos dos fragmentos de lignina, tornando-os solúveis em solução aquosa, aumentando assim a porosidade da fração sólida, por meio da remoção de lignina, permitindo assim um maior acesso das enzimas à fração de celulose da biomassa e diminuindo a adsorção

improdutiva das celulases na lignina (Yamashita *et a*l., 2010; Castro *et al*., 2013; Keshav *et al*., 2016).

Após a etapa de hidrólise enzimática, o licor contendo glicose oriunda da celulose é convertido em um fermentador contendo leveduras para produção de etanol, sendo esse processo conhecido como sacarificação seguida de fermentação (SHF). O processo de produção de etanol pode ainda ser realizado usando diretamente a fração sólida do pré-tratamento em um processo conhecido como sacarificação simultânea à fermentação (SSF), em que as enzimas e leveduras trabalham em conjunto em um mesmo reator. A SHF é mais indicada, uma vez que na maioria dos casos as faixas de condições de trabalho ótimas das leveduras diferem das faixas consideradas ideais para as enzimas hidrolíticas usadas na etapa de hidrólise enzimática durante a SSF, o que dificulta o desempenho do processo.

Uma vantagem da SSF em comparação com a SHF é que a inibição por produto que ocorre na SHF não ocorre na SSF, uma vez que os açúcares gerados no meio são imediatamente consumidos pelos microrganismos. Ambas as alternativas podem ser operadas em batelada e/ou contínuo, sendo que o processo mais adequado dependerá das propriedades cinéticas dos microrganismos utilizados, características da biomassa, assim como os aspectos econômicos do processo. É importante destacar que o processo de fermentação a etanol irá variar significativamente de acordo com cada tipo de biomassa lignocelulósica, concentração de açúcares, presença e tipo de inibidores e classe de microrganismos utilizados (Zabed *et al*., 2016).

3.6. Produção de biogás a partir da biomassa lignocelulósica

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico de degradação e estabilização da matéria orgânica na ausência de oxigênio. O processo é realizado por um conjunto de microrganismos e possui como um dos seus produtos o biogás (principalmente metano e dióxido de carbono). A DA tem sido um método muito utilizado como tratamento para redução de poluição agrícola e industrial e amplamente utilizada para o tratamento de efluentes e águas residuárias, além de ser uma opção que tem como vantagem a recuperação de energia, haja vista a capacidade de produção de biogás com elevados teores de CH_4, substância com um bom poder calorífico, a qual pode ser usada como combustível alternativo aos combustíveis fósseis (Chen *et al*., 2008; *Ge et al*., 2016).

A DA da matéria orgânica é um processo complexo que ocorre basicamente em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Para que a DA ocorra são necessárias condições anaeróbias estritas, além da atividade coordenada de uma associação microbiana (Appels *et al*. 2008), sendo que, para substratos de estrutura complexa, como os lignocelulósicos, normalmente a etapa de hidrólise é a etapa limitante da velocidade da DA (Val Del Río *et al*., 2014). Em função desta limitação, a cinética do processo de DA usando substratos lignocelulósicos sem pré-tratamento pode ser comprometida em função da complexidade do mesmo. Na Figura 8 são apresentadas de forma esquemática as etapas da DA quando se utiliza como substrato os resíduos lignocelulósicos.

Após o pré-tratamento da biomassa, a matéria orgânica está mais disponível na forma de monossacarídeos, ácidos orgânicos, oligômeros e outros compostos de mais fácil degradação. A primeira etapa da DA é a hidrólise, na qual os compostos orgânicos mais complexos como polissacarídeos na forma de oligômeros, proteínas e lipídeos que possam estar presentes são hidrolisados em substâncias orgânicas mais solúveis. Esta etapa é de extrema importância, uma vez que as bactérias metanogênicas e acidogênicas não são capazes de degradar diretamente estes compostos (Gujer e Zehnder, 1983).

O segundo passo da DA é a acidogênese. Nesta etapa, os componentes gerados na etapa de hidrólise são convertidos em ácidos graxos voláteis (AGVs), álcoois, e outros subprodutos, como NH_3, CO_2 e H_2S, por bactérias acidogênicas e sulfato redutoras. É importante destacar que essa etapa pode ocorrer simultaneamente à etapa de hidrólise, uma vez que os compostos mais simples, que já foram hidrolisados, são utilizados como substratos na etapa acidogênica, enquanto as cadeias orgânicas mais complexas ainda estão passando pela etapa de hidrólise (Monlau *et al*., 2013; Zheng *et al.*, 2014b).

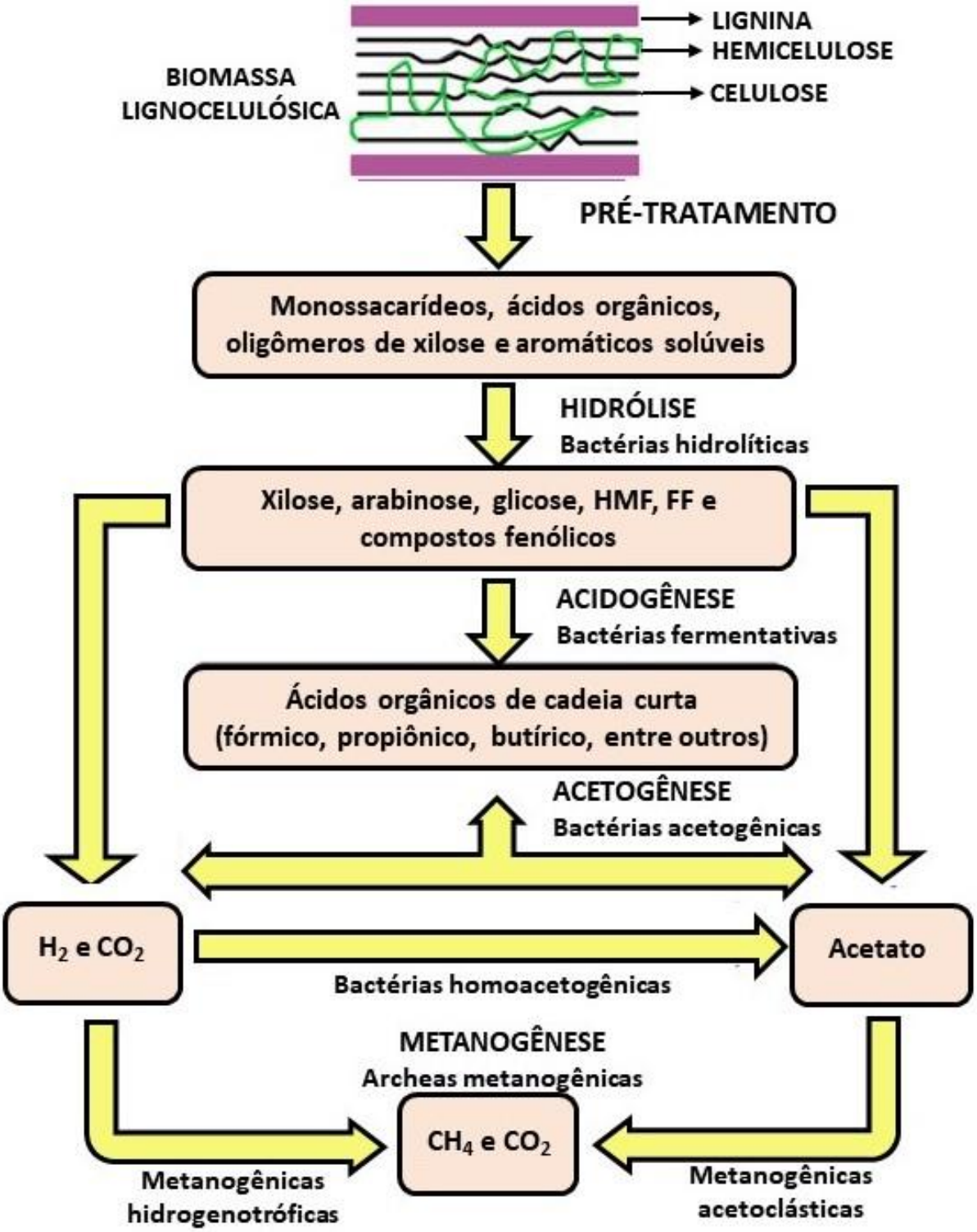
Durante a acetogênese, os ácidos orgânicos produzidos durante a acidogênese são convertidos em ácido acético, CO_2 e H_2 por bactérias acetogênicas. Tal conversão é diretamente controlada pela pressão parcial de H_2 no meio. Na etapa final da DA ocorre a metanogênese, que é a etapa onde ocorre a produção de CH_4. Essa produção se dará por dois grupos diferentes de arqueas metanogênicas, o primeiro que converte o acetato em dióxido de carbono e metano (arqueas metanogênica acetoclásticas) e o segundo grupo, que utilizará hidrogênio como doador

de elétrons e dióxido de carbono como receptor para gerar CH_4 (arqueas metanogênicas hidrogenotróficas) (Appels *et al.*, 2008).

É importante destacar que a DA pode ser classificada com base no teor de sólidos totais (ST) do processo em DA em estado sólido, DA-S (ST ≥ 15%), DA em estado semi-sólido, DA-SS (10 < ST < 15%) e DA em estado liquido, DA-L (ST ≤ 10%) (GE *et al*., 2016). Para resíduos com grande teor de umidade como, por exemplo, efluentes de tratamento de esgoto é indicada a DA-L, enquanto que para resíduos como podas de jardins, resíduos sólidos urbanos e biomassa lignocelulósica, com elevado conteúdo de sólidos totais, é mais adequado a DA-S ou DA-SS.

A DA-S e a DA-SS quando comparadas com a DA-L podem necessitar de um tempo maior de digestão, além de possuir maior tendência de acumular inibidores como ácidos graxos volátéis (AGV's), por outro lado, podem ser aplicadas maiores cargas volumétricas nos reatores (Xu e Li, 2012) . As tecnologias sólidas e semissólidas têm se tornado interessantes devido às menores quantidades de água adicionada ao processo, que é substancialmente reduzida e, consequentemente o tamanho necessário dos digestores também é menor quando comparado aos processos com baixas concentrações de sólidos totais (ST<10%) (Abbassi-guendouz *et al*., 2012).

Figura 8: Esquema do processo de digestão anaeróbia para biomassas lignocelulósicas. Fonte: adaptado de BAÊTA (2016).



Como uma forma de melhorar a cinética do processo de DA de biomassas lignocelulósicas, bem como a biodegradabilidade das mesmas, alguns estudos vêm utilizando o PTH como forma de melhorar a produção de biogás. Chandra *et al.* (2012) utilizou PTH na casca de arroz e obteve um aumento de 225,6% na produção de biogás e 222,0% na produção de metano em relação à palha não tratada.

Como forma de melhorar o balanço de energia do processo e aproveitar todas as correntes geradas após o pré-tratamento da biomassa visando produção de etanol 2G com a fração sólida, alguns autores têm estudado a viabilidade de produção de biogás (metano) a partir da DA-L do hidrolisado hemicelulósico rico em pentoses. Como mencionado anteriormente, Baêta *et al*. (2016) avaliaram a produção de CH_4 para hidrolisados de bagaço de cana pré-tratados por PTH em diferentes condições, chegando à produção de 156,0 $NLCH_4$ $kgTOC^{-1}$ para a melhor condição, mostrando a viabilidade de se utilizar esse hidrolisado rico em matéria orgânica para recuperação de energia. Já Santos *et al.* (2018) observaram a produção de 91,07 $NLCH_4$ $kgDQO^{-1}$ quando o hidrolisado gerado após o tratamento oxidativo das cascas de café foi usado como substrato.

Tais trabalhos mostraram que a DA de hidrolisados gerados após pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas é uma forma viável de valorizar a fração de pentoses presentes na biomassa. Entretanto, ainda existem fatores que devem ser avaliados, como por exemplo, a concentração de possíveis inibidores durante a DA dos hidrolisados e formas de diminuir essa inibição e aumentar o rendimento de produção de metano, como por exemplo adição de carvão ativado, digestão anaeróbia em duas fases, fase acidogênica separada da fase metanogênica, dentre outras.

3.7. Considerações finais a respeito da revisão e justificativa do projeto

Com base no apresentado na revisão de literatura, ficou evidenciada a grande geração de cascas de café, um subproduto da cadeia produtiva do café no Brasil. Devido à liderança do país na produção e beneficiamento mundial do fruto, este agro resíduo apresenta um grande potencial energético a ser explorado.

Por outro lado, as consequências ambientais do uso descontrolado de combustíveis fósseis tornam-se necessária a busca por novas fontes de energia, que sejam renováveis e

ambientalmente mais corretas. Uma destas fontes de energia é o bioetanol de segunda geração e o biogás, os quais podem ser produzidos a partir de biomassa lignocelulósica. Como apresentado, diversos estudos foram desenvolvidos tentando valorizar os resíduos gerados durante o processamento do café, porém ainda não foram desenvolvidas pesquisas que permitam aproveitar esta biomassa em todo o seu potencial.

Com isso, o resíduo gerado durante o processamento por via seca do café pode ser uma matéria-prima alternativa para a produção de biocombustíveis. Portanto, a valorização das correntes residuais geradas durante o processamento do café pode atrair olhares para que, uma biorrefinaria do café seja viabilizada, aumentando a lucratividade do setor e melhorando vários aspectos ambientais ligados a esta atividade agrícola.

Desta forma estão sendo estudadas técnicas de pré-tratamento capazes de serem aplicadas à casca de café como forma de fracioná-la e deixar os açúcares fermentescíveis mais disponíveis para serem usados em processos biotecnológicos. Como o PTH tem se destacado como um pré-tratamento de baixo custo, simples e eficiente para biomassas lignocelulósicas, decidiu-se estudar esta técnica para o resíduo em questão, uma vez que no melhor do nosso conhecimento não foram encontrados na literatura a utilização do PTH da casca de café visando a sua valorização energética com a produção de biogás e etanol celulósico.

Além disso, ainda existe campo para se avançar no conhecimento nessa área por meio da geração de resultados inéditos, justificando a execução deste trabalho de dissertação. A produção de etanol a partir da fração sólida rica em celulose foi avaliada em conjunto com a possibilidade de produção de biogás a partir da fração sólida, mistura das frações sólidas e líquidas e somente a fração líquida geradas após o pré-tratamento hidrotérmico. Com os resultados observados será possível refletir sobre qual a melhor rota de produção a ser seguida, produzir somente biogás a partir da biomassa pré-tratada ou separar as fases sólidas e líquidas e produzir etanol celulósico a partir da fração sólida e biogás a partir da fração líquida.

4. MATERIAIS E METÓDOS

4.2. Obtenção e preparo da casca de café

A casca de café utilizada durante o desenvolvimento do trabalho foi gentilmente cedida pela Fazenda Jangada, localizada no distrito de Criminoso, no município de Lavras (Minas Gerais, Brasil), e pertence a safra de 2015/2016. As cascas foram previamente secas sob luz solar até atingirem uma umidade inferior a 10% e, em seguida, armazenadas ao abrigo de luz em sacos plásticos fechados em ambiente seco.

4.3. Caracterização da casca de café

4.3.1. *Determinação do teor de umidade*

O teor de umidade das amostras foi determinado em balança termogravimétrica da marca OHAUS, modelo MB200 instalada no Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental (LQTA) da UFOP. Para determinação da umidade foi pesado aproximadamente 1,0 g de amostra. A balança foi programada para atingir a temperatura de 110°C e manteve-se nessa temperatura até que não houvesse uma variação significativa na medida de umidade da amostra. O teor de umidade foi determinado em triplicata e os cálculos realizados a partir da Eq. (1).

$$U\ /(\%) = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i}\right) x\ 100 \qquad \text{Eq. (1)}$$

Na qual, U (%) é o teor de umidade da biomassa em porcentagem, m_i é a massa inicial e m_f é a massa final.

4.3.2. *Determinação do teor de extrativos*

A determinação do teor de extrativos ocorreu apenas para a casca de café bruta. Para a determinação do teor de extrativos presentes na casca de café foram utilizados 15 g de biomassa em base seca. A extração ocorreu com base na norma TAPPI T204 om 97 modificada, substituindo o benzeno por cicloexano e foi realizada em triplicata.

As cascas de café foram previamente moídas (40-60 mesh - 0,420 a 0,250 mm) em moinho de facas e, então, adicionadas em um cartucho para extração, feito com papel filtro, o qual foi inserido em um extrator tipo Soxhlet. Para realização da extração foram preparados, para cada grama de casca de café em base seca, 25 mL de mistura de cicloexano e etanol absoluto na proporção 1:1, v v^{-1}, e esta mistura foi adicionada em um balão de fundo redondo de 1 L, o qual foi colocado em uma manta aquecedora. Em seguida, o sistema extrator tipo Soxhlet foi montado e iniciou-se a extração por um período de 48 h.

Após as 48 h a biomassa foi lavada com água destilada e, em seguida, levada para estufa de circulação (Solab**,-** SL-102/27**)** a 80°C por 48 h para retirar o excesso de umidade. Em seguida, a amostra foi pesada. Após a etapa de secagem, 1,0 g da biomassa foi utilizada para calcular o teor de umidade da amostra. O teor de extrativos, em base seca, foi calculado de acordo com a Eq. (2).

$$Teor\ de\ Extrativos/\% = \left(\frac{m_{i(bs)} - m_{f(bs)}}{m_{i(bs)}}\right) x\ 100 \qquad \text{Eq. (2)}$$

Na qual, $m_{i(bs)}$ é a massa inicial em base seca e $m_{f(bs)}$ é a massa final em base seca.

4.3.3. *Determinação do teor de inorgânicos*

O teor de inorgânicos (cinzas) foi determinado de acordo com a norma TAPPI T211 om-02. Para determinar o teor de cinzas foi utilizada a biomassa livre de extrativos. Inicialmente, realizou-se a calcinação dos cadinhos em mufla a 550°C por 2 h. Em seguida, os cadinhos foram retirados da mufla e transferidos para um dessecador até resfriarem à temperatura ambiente para sua posterior pesagem.

Posteriormente, pesou-se aproximadamente 1,0 g da amostra (em triplicata). Em seguida, os cadinhos foram levados à mufla a qual foi aquecida a uma taxa de 2°C min^{-1} até atingir a temperatura de 525°C, permanecendo na mesma por um período 4 h. A baixa taxa de aquecimento aplicada é responsável por garantir uma carbonização lenta da amostra sem que haja surgimento de chama e perda de massa por geração de fuligem. Após esta etapa, o procedimento de resfriamento dos cadinhos em dessecador foi repetido, e em seguida, os mesmos foram pesados. O procedimento foi realizado em triplicata. O cálculo do teor de inorgânicos foi feito de acordo com a Eq. (3).

$$Teor\ de\ Inorgânicos/\% = \left(\frac{m_f}{m_i}\right) x100 \qquad \text{Eq. (3)}$$

Na qual, m_i é a massa inicial de biomassa antes da carbonização e m_f a massa final.

4.3.4. *Determinação do teor de lignina solúvel e insolúvel*

Para determinação dos teores de lignina solúvel e insolúvel presentes na casca de café foi utilizado o método Klason, de acordo com a norma TAPPI T222 om-2 modificada, como descrito a seguir. O método foi realizado em triplicata para a casca de café bruta livre de extrativos.

Inicialmente, pesou-se cerca de 0,713 g, em base seca, de casca de café livre de extrativos, previamente moída (40-60 mesh). Em seguida, a biomassa foi transferida para tubos autoclaváveis de 450 mL. Inicialmente, para a etapa de condensação foi adicionado ao tubo contendo a biomassa, 10,7 mL de ácido sulfúrico 72% (m m^{-1}) e os tubos foram deixados sob agitação magnética por 2 h. Após o término desta fase, iniciou-se a fase de hidrólise interrompendo a agitação e adicionando 400 mL de água destilada nos tubos autoclaváveis, diluindo o ácido sulfúrico para uma concentração igual a 3% (m v^{-1}). Seguidamente, transferiu-se os tubos para autoclave previamente aquecida. Quando a autoclave atingiu uma temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, foi marcado o tempo de 1 h.

Após o período de 1 h, a autoclave foi despressurizada lentamente. Finalizada a etapa de hidrólise, os frascos foram retirados da autoclave e colocados em um béquer de 5 L com água para resfriamento parcial e, em seguida, levados para filtração à quente. A filtração foi realizada utilizando-se uma bomba de hidrovácuo, um kitassato e cadinhos filtrantes de placa sinterizada (tipo ASTM 10-15M) previamente calcinados a 550°C por 2 h e pesados. Os materiais retidos nos cadinhos foram lavados com aproximadamente 50 mL de água destilada e levados à estufa de circulação a 80°C por 4 h. Em seguida, transferiu-se os cadinhos para um dessecador onde foram mantidos até que atingissem a temperatura ambiente para sua pesagem. Após a pesagem dos cadinhos, os mesmos foram levados à mufla em uma taxa de aquecimento de 2°C min^{-1} até atingir 525°C, permanecendo nesta temperatura por 2 h. Os cadinhos foram enviados para um dessecador até que atingissem a temperatura ambiente e então efetuou-se a pesagem dos mesmos. Desta forma foi possível calcular o teor de inorgânicos (cinzas), Eq. (4), e então corrigir o teor de lignina insolúvel, Eq. (5).

$$Teor\ de\ cinzas/\ (\%) = \left(\frac{P_2 - P_0}{m_{i(bs)}}\right)\ x\ 100 \qquad \text{Eq. (4)}$$

$$Lignina\ Insolúvel\ /(\%) = \left(\frac{P_1 - P_2}{m_{i(bs)}}\right)\ x\ 100 \qquad \text{Eq. (5)}$$

Na qual, P_0 é o peso do cadinho após a calcinação, P_1 é o peso do cadinho com a amostra após a secagem em estufa, P_2 é o peso do cadinho com amostra após calcinação em mufla e $m_{i(bs)}$ é a massa inicial de amostra em base seca.

O hidrolisado obtido após a filtração foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL e o balão foi aferido com água deionizada. Diluiu-se, então, a fração líquida 10 vezes, e foram medidas as absorbâncias da solução em 280 e 215 nm para determinação da concentração de lignina solúvel, conforme a Eq. (6).

$$CL/(g\ L^{-1}) = \frac{(4{,}53 x A_{215}) - A_{280}}{300} \qquad \text{Eq. (6)}$$

A Eq. (6) foi obtida da resolução simultânea das Eq. (7) e (8).

$$\mathrm{Abs}_{280} = 0{,}68\mathrm{C_D} + 18\mathrm{C}_L \qquad \text{Eq. (7)}$$

$$\mathrm{Abs}_{215} = 0{,}15\mathrm{C_D} + 70\mathrm{C}_L \qquad \text{Eq. (8)}$$

Na qual, os valores 18 e 70 são, respectivamente, as absortividades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, Abs_{215} é o valor de absorbância da solução em 215 nm, Abs_{280} é o valor de absorbância da solução em 280 nm, C_D é a concentração de carboidratos (g L^{-1}) e C_L é a concentração de lignina solúvel (g L^{-1}).

A porcentagem em massa de lignina solúvel presente na biomassa foi calculada usando a Eq. (9).

$$Lignina\ Solúvel\ /(\%) = \left(\frac{(4{,}53\ x\ \mathrm{Abs}_{215}) - \mathrm{Abs}_{280}}{300}\right) x\ \frac{V}{m} \qquad \text{Eq. (9)}$$

Na qual, *m* é a massa, em base seca, utilizada para o teste Klason e *V* é o volume do balão volumétrico.

4.3.1. ***Determinação dos teores de hemiceluloses e celulose***

Para determinação dos teores de hemiceluloses e celulose foram quantificados os teores dos compostos presentes na fração líquida gerada durante o método Klason (seção 4.3.4). Os componentes analisados foram: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, 2-furfuraldeído e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído.

Para tal análise, utilizou-se um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE), da marca Shimadzu, equipado com sistema binário de bombas (modelo LC-30AD Shimadzu), injetor automático (modelo SIL-20AC), detector de índice de refração (RID-6A Shimadzu), detector UV-Vis (SPD-10AV Shimadzu), e forno (CTO-10A Shimadzu). A coluna utilizada como fase estacionária para análise dos compostos foi o modelo Aminex HPX 87H (300 × 7.8 mm BIO-RAD).

Para separação dos compostos de interesse foi utilizada como fase móvel ácido sulfúrico 5 mmol L^{-1} em uma vazão de 0,6 mL min^{-1}, e o forno da coluna foi mantido a uma temperatura de 55°C. Os açúcares foram identificados e quantificados pelo detector de índice de refração, enquanto os ácidos orgânicos e os furfurais foram analisados com auxílio do detector UV-Vis operado em canal duplo com comprimentos de ondas de 210 nm para determinação de ácidos e de 274 nm para determinação de FF e HMF.

Após as análises, as massas de celobiose e glicose foram convertidas em teores equivalentes de celulose. Ao passo que, as massas de xilose foram convertidas em xilanas, as massas de arabinose em arabinanas e a massa de ácido acético em grupos acetila. As massas de HMF e FF foram convertidas em glicanas (celulose) e em xilanas, respectivamente. A conversão dos componentes do hidrolisado em celulose e hemiceluloses foi feita de acordo com as Eq. (10) e Eq. (11).

$$\text{Celulose }/(\%) = \left\{\frac{[(0{,}95C_C) + (0{,}9C_G) + (3{,}52C_{ácf}) + (1{,}29C_{HMF})]\text{x}V_{H_2o+H_2SO_4}}{m_i}\right\} \times 100 \qquad \text{Eq. (10)}$$

$$\text{Hemiceluloses }/(\%) = \frac{\{[(0{,}88C_X) + (0{,}88C_A) + (1{,}375C_{FF})]\text{x}\, V_{H_2o+H_2SO_4}\}}{m_i} \times 100 \qquad \text{Eq. (11)}$$

Na qual, C_C é a concentração de celobiose, C_G é a concentração de glicose, C_{HMF} é a concentração de HMF, $C_{ácf}$ é a concentração de ácido fórmico, C_X é a concentração de xilose, C_A é a concentração de arabinose, C_{FF} é a concentração de FF e $V_{H2O+H2SO4}$ é o volume total aferido no balão volumétrico no teste Klason, conforme descrito anteriormente.

4.3.2. ***Balanço de massa***

O balanço de massa para os compostos presentes na casca de café foi determinado de acordo com a Eq. (12).

$$Balanço\ de\ massa/\ (\%) = L + H + C + E + I \qquad \text{Eq. (12)}$$

Na qual, *L* é o teor de lignina, *H* é o teor de hemiceluloses, *C* é o teor de celulose, *E* é o teor de extrativos e *I* é o teor de inorgânicos.

4.3.3. ***Área superficial e microscopia eletrônica de varredura***

Para avaliar a estrutura morfológica da casca de café bruta e o efeito do PTH na estrutura morfológica da casca de café pré-tratada, amostras de ambos materiais foram analisadas em um determinador de área superficial e porosidade e em um microscópio eletrônico de varredura. A área superficial foi determinada em um analisador de área superficial AutosorbIQ (modelo ASIQ4000-1) utilizando o método de adsorção de nitrogênio Brunauer-Emmett-Teller (BET) a 77 K. Antes da análise, as amostras foram previamente secas em estufa de circulação de ar e maceradas. Após esta etapa, a amostra macerada foi submetida a uma separação granulométrica em um conjunto de peneiras e a fração retida entre as peneiras de malha 7 e 14 mesh (2,83 a 1,41

mm) foram submetidas a um processo de desgaseificação a 100°C por 12 h. 200 mg da amostra desgaseificada foram usadas para análise.

A morfologia da casca de café bruta e pré-tratada foi examinada em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM-5510) operando com uma tensão de filamento de 20 KeV e detector de elétrons secundário. Todas as amostras foram previamente secas a 60°C por 24 h. Para a realização das imagens foi necessário realizar o embutimento das amostras em resina epóxi. Em seguida, a amostra embutida foi polida e metalizada com carbono grafite em um revestidor modular de alto vácuo da JEOL (modelo JEE-420) antes da análise.

4.4.Planejamento experimental

Com o objetivo de verificar a influência das variáveis independentes do PTH (tempo, razão líquido-sólido e temperatura) sobre as variáveis respostas do pré-tratamento (remoção de celulose, hemiceluloses, lignina, teor de açúcares no hidrolisado e teor de inibidores no hidrolisado), assim como avaliar uma condição ótima de PTH da casca de café capaz de maximizar e potencializar a produção de energia a partir desse resíduo, utilizou-se um planejamento experimental do tipo Box-Behnken, gerando um total de 15 ensaios de PTH, sendo três ensaios correspondentes às replicatas do ponto central.

Segundo Ferreira et al. (2007), o planejamento experimental do tipo Box-Behnken (BBD) pertence à classe de planejamentos rotativos ou semi rotativos de segunda ordem, sendo que para utilização de três fatores pode-se considerar um cubo que consiste do ponto central e dos pontos médios das arestas. O número de experimentos (n) requerido para o desenvolvimento do BBD é definido de acordo com a Eq. (13), na qual K é o número de fatores e C_0 é o número de repetições no ponto central.

$$n = 2K(K-1) + C_0 \qquad \text{Eq. (13)}$$

Os autores apontaram que em relação a outros planejamentos de superfície de resposta, o BBD tem se mostrado eficiente. Tal eficiência pode ser dada pelo número de coeficientes no modelo estimado, dividido pelo número de experimentos. Outra vantagem do BBD é que ele não contém combinações para as quais todos os fatores estão ao mesmo tempo nos níveis mais altos ou mais baixos. Ou seja, pode ser usado quando se pretende evitar realizar experimentos sob

condições extremas, para quais resultados insatisfatórios podem ocorrer, reduzindo o número de experimentos.

O planejamento experimental utilizado é apresentado na Tabela 4, assim como as variáveis codificadas e os níveis das mesmas. As variáveis foram codificadas de acordo com a Eq. (14).

$$x_i = \left(\frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}\right) \qquad \text{Eq. (14)}$$

Na qual, x_i é o valor codificado e X é o valor real da variável independente, X_0 é o valor real do ponto central e ΔX_i é o intervalo entre os pontos.

Tabela 4: Planejamento experimental do tipo Box-Behnken para ensaios de pré-tratamento hidrotémico.

Condição	Temperatura / (°C)	Tempo / (min)	*RLS* / (mL g^{-1})
1	120 (-1)	20 (-1)	7,5 (0)
2	200 (+1)	20 (-1)	7,5 (0)
3	120 (-1)	90 (+1)	7,5 (0)
4	200 (+1)	90 (+1)	7,5 (0)
5	120 (-1)	55 (0)	5 (-1)
6	200 (+1)	55 (0)	5 (-1)
7	120 (-1)	55 (0)	10 (+1)
8	200 (+1)	55 (0)	10 (+1)
9	160 (0)	20 (-1)	5 (-1)
10	160 (0)	90 (+1)	5 (-1)
11	160 (0)	20 (-1)	10 (+1)
12	160 (0)	90 (+1)	10 (+1)
13 (PC)	160 (0)	55 (0)	7,5 (0)
14 (PC)	160 (0)	55 (0)	7,5 (0)
15 (PC)	160 (0)	55 (0)	7,5 (0)

4.5. Ensaio de pré-tratamento hidrotérmico

Os experimentos de PTH da casca de café bruta foram realizados de acordo com a matriz de experimentos do planejamento do tipo Box-Behnken realizado em triplicata no ponto central. Os ensaios foram realizados em um reator tubular de aço inox tipo 316L com anel de vedação em politetrafluoretileno com volume útil de 475 mL (6,5 cm de diâmetro interno, 7,5 cm de

diâmetro externo e 19 cm de altura externa) e capacidade para aproximadamente 30 g de casca de café em base seca. Para aquecimento do reator foi utilizado um banho termostatizado de 25 L contendo glicerol como fluido de aquecimento.

Após permanecer na temperatura e tempo determinados por cada condição do planejamento experimental, o reator foi imediatamente resfriado por imersão em um recipiente contendo gelo em escamas e água fria. Tal ação faz-se necessária para parar as reações evitando a desidratação de carboidratos a compostos indesejáveis para os microrganismos, tais como os furanos, por exemplo. As reações de desidratação dos açúcares têm sua cinética praticamente interrompida em temperaturas inferiores a 100°C. Em seguida, a casca de café pré-tratada foi separada por filtração em um funil de Büchner com auxílio de uma bomba à vácuo da marca Quimis – modelo 355B1, e as frações sólida e líquida foram coletadas separadamente. O volume de fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) gerado foi medido com uma proveta de 500 mL e a fração sólida foi pesada em balança analítica. Em seguida uma alíquota de aproximadamente 1 g foi retirada para determinação do teor de umidade. Tais resultados foram usados posteriormente para realização dos cálculos de balanço de massa das condições de pré-tratamento, em base seca.

A severidade do PTH foi calculada de acordo com a Eq. (16).

$$Severidade\ (R_0) = \int_0^t exp\left(\frac{T(t) - 100}{14{,}75}\right) dt \qquad \text{Eq. (15)}$$

Na qual T é a temperatura (°C) atingida no pré-tratamento, t é o tempo em minutos e 14,75 é parâmetro empírico característico do processo.

4.6.Caracterização da fração sólida gerada pelo pré-tratamento

A fração sólida gerada pelo pré-tratamento hidrotérmico foi caracterizada de acordo com as metodologias de caracterização da casca de café bruta descritas no item 4.3, com exceção das etapas de determinação de extrativos e inorgânicos. As mesmas metodologias foram utilizadas para caracterizar a fração sólida pré-tratada gerada após a etapa de extração alcalina.

4.7. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico (HH) gerado após pré-tratamento da casca de café

4.7.1. Deter*minação dos teores de inibidores*

A determinação de 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) no hidrolisado foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita na seção 4.3.1. Para tal análise, 1,5 mL de cada hidrolisado foram centrifugados em tubos Eppendorf a 12.000 rpm (1.000 G) por 15 min. Após esta etapa, as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm e 200 µL do hidrolisado foram adicionados a 800 µL de água destilada em tubos vial com capacidade de 1,5 mL. Tal procedimento foi realizado devido a necessidade de diluição do hidrolisado antes que o mesmo fosse injetado no cromatógrafo. A diluição garante que todos os analitos estejam dentro das faixas lineares do método, minimizando a saturação da coluna, uma vez que uma menor quantidade de interferentes vão interagir com a fase estacionária.

4.7.2. *Demanda química de oxigênio (DQO): refluxo aberto*

O hidrolisado hemicelulósico gerado no PTH contém grande quantidade de sólidos em suspensão. Desta forma, a metodologia de DQO convencional não se aplicaria as amostras de hidrolisado. Sendo assim, a metodologia usada para quantificar a DQO foi a UNE 77004:2002, procedimento modificado para quantificar a DQO em amostras contendo elevados teores de sólido, uma vez que quantifica com maior exatidão à DQO contida na amostra.

Para garantir que os valores de DQO ficassem dentro da faixa linear do método (entre 30 mg/L e 19.000 mg/L) a amostra foi diluída 10 vezes. Para determinação da DQO foram adicionados aos tubos de digestão 10 mL de amostra diluída. Em seguida, foram adicionados lentamente 20 mL da solução de digestão (solução aquosa de $K_2Cr_2O_7$ 0,2 mol L^{-1}) e 30 mL da solução catalítica (10 g L^{-1} de $AgSO_4$ em H_2SO_4). Após adição das soluções, um condensador de bolas foi inserido no tubo digestor para garantir que não houvesse perda durante o processo. A digestão foi realizada com os tubos digestores em um bloco digestor da marca TECNAL modelo 040/25 aquecido a uma temperatura de 150 ± 2°C por 2 h. Depois de atingido o tempo de digestão, os tubos digestores foram retirados do bloco digestor e deixados em um suporte para resfriarem até temperatura ambiente.

Após o resfriamento total dos tubos, os condensadores foram retirados e transferiu-se o conteúdo para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Com intuito de facilitar a visualização do ponto de viragem da etapa de titulação do dicromato reduzido, 440 mL de água destilada foram adicionados ao frasco Erlenmeyer.

Em seguida, adicionou-se 10 gotas de indicador de ferroína em cada Erlenmeyer e estes foram levados para agitação magnética moderada para titular o excesso de dicromato com solução de sulfato ferroso amoniacal (FAS), até que o ponto de viragem fosse atingido. Após a viragem anotou-se o volume de solução de FAS. O procedimento de titulação foi realizado com auxílio de uma lâmpada branca para facilitar a observação da viragem. 10 mL de água destilada foi usado como branco passando pelo mesmo procedimento das amostras.

A DQO expressa em mg de O_2 de amostra por litro foi calculada de acordo com a Eq. (16).

$$\frac{mgO_2}{L} = \frac{(A - B)\ x\ 8000\ x\ N}{V_m}\ x\ FD \qquad \text{Eq. (16)}$$

Na qual, *A* é o volume de FAS consumido na titulação do branco (mL), *B* é o volume de FAS gasto na titulação da amostra, *N* é a normalidade da solução de FAS, V_m é o volume da amostra (mL) e FD é o fator de diluição, e o valor 8000 representa o equivalente grama do oxigênio expresso em mg

4.7.3. *Determinação de açúcares redutores totais*

Os teores de açúcares redutores no hidrolisado foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme apresentado por Miller (1959). Foram colocados 150 µL de hidrolisado hemicelulósico diluído três vezes em tubos de ensaio. Em seguida adicionou-se 900 µL de solução de DNS e 300 µL de água destilada. Os tubos foram inseridos em banho de água fervendo durante 5 min. Em seguida, os tubos foram retirados e adicionou-se 6 mL de água destilada para que fosse possível realizar a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Para determinação dos açúcares redutores foi feita uma curva analítica utilizando solução padrão de glicose na faixa de concentração de 0,5 gL^{-1} a 12 gL^{-1} .

4.7.4. *Cafeína*

Para determinação dos teores de cafeína nos hidrolisados hemicelulósicos gerados após o PTH foi realizada uma análise em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de espectrometria de massas (GC-MS) da marca Shimadzu modelo GCMS-QP2010 plus. A coluna utilizada foi a Zebron ZB-5MSi (30,0 m × 0,25 mm × 0,25 µm) com uma rampa de aquecimento de 100°C a 280°C a uma taxa de aquecimento de 20°C min^{-1} mantendo-se na temperatura de 280°C por 3 min. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma velocidade linear de 43 cm s^{-1} e uma vazão de 20 mL min^{-1}. A temperatura do injetor modo *splitless* foi fixada em 260°C. No detector de massas a fonte de ionização teve sua temperatura fixada em 250°C e a temperatura da interface foi mantida em 280°C, o íon usado para quantificação da cafeína foi o de relação massa/carga (m/z) de 194. A cafeína foi determinada diluindo-se as amostras 50 vezes e, após injeção, a área do pico foi comparada com uma curva de calibração externa feita com solução padrão de cafeína em diferentes concentrações.

4.7.5. *Determinação dos teores de fenóis totais no hidrolisado hemicelulósico*

A quantificação do teor de fenóis totais foi realizada seguindo a metodologia modificada descrita por Rossetti (2007). Inicialmente, realizou-se a etapa de extração. Para tal, foi inserido em um tubo tipo falcon de 15 mL, 1 mL de hidrolisado hemicelulósico e 9 mL de solução aquosa de acetona 70% (v v^{-1}). Em seguida, o tubo falcon contendo a mistura foi colocado em um béquer contendo água com gelo e submetido ao banho de ultrassom por 20 min. Após esta etapa o tubo falcon foi levado a uma centrífuga a 3.000 rpm (250 G) por 10 min. Para as frações sólidas utilizadas nos testes de potencial bioquímico de metano, utilizou-se a mesma metodologia, porém utilizando-se 1 g de material em base seca e 10 mL solução de acetona 70%.

Para a etapa de análise foram coletados do tubo falcon 50 µL do extrato (sobrenadante após centrifugação) e adicionados em um tubo de ensaio com tampa juntamente com 450 µL de água deionizada. Em seguida, adicionou-se ao tubo de ensaio 520 µL do reagente Folin Ciocalteau (solução contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico) e 1,25 mL de solução de carbonato de sódio 7% (m v^{-1}). Os tubos foram levados para agitação em vortex por 5 min e após a agitação os mesmos foram deixados em local ao abrigo da luz durante 35 min. Finalizado o tempo de 35 min, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro (Termo Fisher – 10S UV-VIS) em comprimento de onda fixo de 725 nm.

A quantificação de fenóis totais foi realizada a partir do método de calibração externa usando soluções padrões de ácido tânico em diferentes concentrações. Para curva analítica foram adicionados em tubos de ensaio volumes crescentes (20, 60, 80, 100, 250 e 500 µL) de solução de ácido tânico 0,1 g L^{-1} e completados com água deionizada até 500 µL para os cinco primeiros pontos e no tubo no qual foi adicionado 500 µL da solução de ácido tânico não foi necessário adicionar água. Posteriormente, adicionou-se em todos os tubos 250 µL do reagente Folin Ciocalteu e 1,25 mL da solução de carbonato de sódio 7%. Em seguida, os tubos foram agitados por 5 min e após a agitação foram deixados em local ao abrigo da luz por 35 min. Após o tempo de repouso, os padrões foram analisados em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 725 nm. Uma curva analítica relacionada à absorbância resultante da concentração de ácido tânico como fenóis foi elaborada, e a equação da reta foi utilizada para determinação dos fenóis totais nas amostras.

4.8.Extração alcalina

Visando remover possíveis fragmentos de lignina presentes na superfície da fração sólida gerada após etapa o PTH, realizou-se uma etapa de extração alcalina (EA), uma vez que o PTH alcalino favorece a remoção da lignina. A extração alcalina foi realizada com uma solução aquosa de NaOH 0,2 mol L^{-1} em um reator de acrílico contendo pás impelidoras como misturador, operado com uma *RLS* de 10 mL g^{-1} em uma rotação de 100 rpm durante 5 min.

Após a EA, a biomassa foi lavada com água destilada até que a água de lavagem atingisse pH neutro, com auxílio de uma peneira com malha de 200 mesh (0,074 mm). A fração líquida foi armazenada para posterior ensaio de digestão anaeróbia e a fração sólida foi pesada. Posteriormente, uma alíquota foi retirada para determinação da umidade, o que permitiu que os cálculos de balanço de massa fossem realizados em base seca. Os testes de EA foram realizados para condição na qual se obteve o maior rendimento da hidrólise enzimática e para a condição de desejabilidade para etanol determinada conforme será apresentado na próxima seção.

4.9.Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática das frações sólidas pré-tratadas por PTH foram realizadas, inicialmente, como descrito por Lima (2018), que otimizou as condições para o bagaço de cana pré-tratado. Os ensaios foram realizados em duplicata com uma massa de 1 g, em base seca, para

a casca de café bruta e para as 15 condições pré-tratadas, além das condições selecionadas para serem submetidas ao processo de EA. Os testes foram realizados em Erlenmeyers de 25 mL utilizando-se uma carga enzimática de 10 FPU g^{-1} de casca de café em base seca e uma *RLS* de 10 mL g^{-1}. Os ensaios de hidrólise enzimática para as condições após a EA foram realizados para duas condições previamente selecionadas, sendo elas a condição 6 do pré-tratamento (maior rendimento).

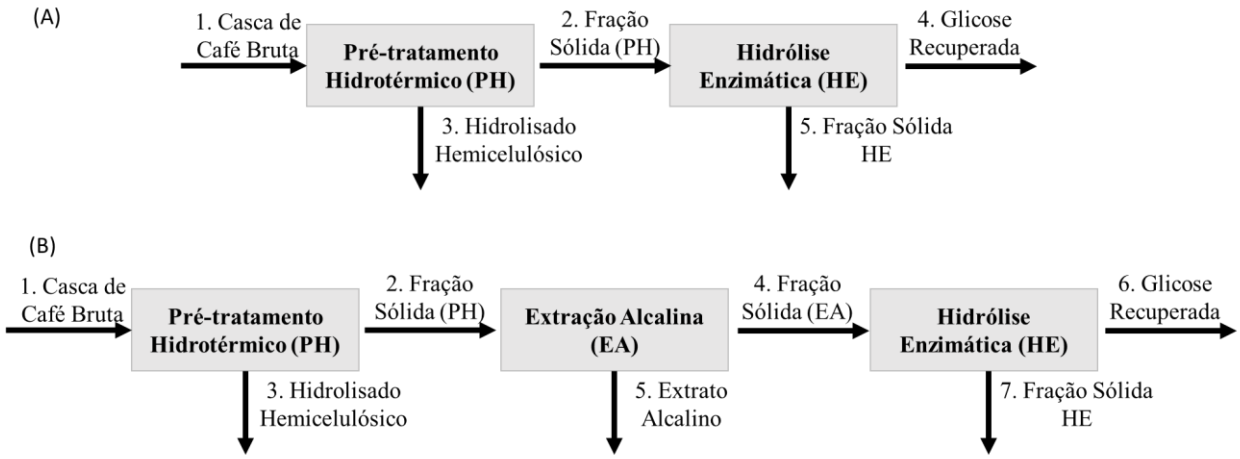
Os coquetéis enzimáticos utilizados foram Cellic CTec2 e Cellic HTec2, cedidos pela Novozymes®, na proporção 85:15 (v v^{-1}), obtendo uma solução com atividade enzimática de 2,5 FPU mL^{-1}. Para o ensaio de hidrólise enzimática foram adicionados 4 mL do coquetel enzimático por grama de casca de café em base seca, juntamente com uma solução tampão citrato de sódio (0,05 mol L^{-1}) e azida de sódio (0,02%, m v^{-1}) até atingir uma *RLS* de 10 mL g^{-1} mantendo o pH do meio em 4,8. Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 150 rpm em incubadora com agitação orbital (Marconi, modelo MA-830) à 50°C por 72 h. Após este período, a hidrólise foi interrompida por inibição térmica imergindo os frascos em banho de gelo por 30 min.

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm (24148 G), para separação das frações sólida e líquida. Em seguida, a fração líquida (sobrenadante) foi filtrada em membrana de porosidade igual a 0,45 µm e submetida a análise para determinação do teor de açúcares fermentescíveis em cromatógrafo líquido de alta eficiência, conforme metodologia descrita anteriormente (seção 4.2.1).

Os rendimentos de hidrólise enzimática (RHE) apresentados foram calculados com base na massa de glicose teórica ($Glicose_T$) considerando uma conversão de 100% da celulose em glicose. Para o cálculo de RHE foi considerada a massa de glicose presente na corrente 2 que entra na HE como pode ser visto no fluxograma apresentado na Figura 9(A), e a glicose recuperada na corrente de saída 4. O rendimento global do processo (RG), aquele que considera a unidade de pré-tratamento mais a HE, foi determinado levando em consideração o teor de celulose e glicose que entra no processo, referente a corrente 1. O rendimento global foi calculado considerando as perdas de massa que ocorrem no pré-tratamento. Tal fato se faz importante uma vez que durante as etapas de PTH e EA ocorrem grandes perdas de massas. Assim, mesmo que a etapa de hidrólise enzimática tenha rendimentos considerados satisfatórios, ao considerar a

glicose que entra no processo global, o RG pode apresentar baixos valores, neste caso deve-se haver uma busca por processos que utilizem a matéria orgânica solúvel perdida durante os pré-tratamentos para geração de outros produtos.

Figura 9: Fluxograma do processo considerado para cálculo do rendimento. (A) Processo sem extração alcalina e (B) processo com extração alcalina.



A variável $Glicose_T$ representa a glicose teórica em caso de uma conversão de 100% e foi determinada pela Eq. (17).

$$Glicose_T/(g) = \frac{g\ celulose}{g\ Casca_{PT}} x\ \frac{180\ g\ de\ glicose}{162\ g\ de\ celulose} \qquad \text{Eq. (17)}$$

Na qual, $Casca_{PT}$ representa a casca pré-tratada.

O rendimento de hidrólise enzimática foi calculado usando a Eq. (18).

$$RHE/(\%) = \left(\frac{Glicose_R}{Glicose_T}\right) x\ 100 \qquad \text{Eq. (18)}$$

Na qual, $Glicose_R$ representa a glicose recuperada após a etapa de HE em g.

O *RG* do processo sem a etapa de EA, Figura 10(A), foi calculado usando a Eq. (19), enquanto o *RG* com a etapa de EA (RG_{EA}), Figura 10(B), foi calculado usando a Eq. (20).

$$RG/(\%) = \frac{gGlicose_R}{g\ Casca_{PT}} x\ \frac{g\ Casca_{PT}}{g\ Casca_{bruta}}\ x\ \frac{g\ Casca_{bruta}}{g\ glicose_{Cascabruta}} \quad \text{Eq. (19)}$$

$$RG_{EA}/(\%) = \frac{gGlicose_R}{g\ Casca_{EA}} x \frac{g\ Casca_{EA}}{g\ Casca_{PT}}\ x\ \frac{g\ Casca_{PT}}{g\ Casca_{bruta}}\ x\ \frac{g\ Casca_{bruta}}{g\ glicose_{Casca\ bruta}} \quad \text{Eq. (20)}$$

Após a análise do planejamento experimental, um algoritmo de predição presente no pacote do programa Statistica® (Statsoft Inc, versão 10.0) conhecido como "ferramenta de desejabilidade" foi utilizado para prever uma condição "ideal" de PTH. A condição desejável tem como principal objetivo prever uma condição de pré-tratamento capaz de gerar uma fração sólida adequada para ser utilizada no processo de hidrólise enzimática para produção de etanol 2G. Como a otimização desse tipo de processo não pode ser definida com base em apenas uma variável resposta dependente, como é comumente feita em planejamentos experimentais, uma ferramenta de previsão como a "ferramenta de desejabilidade" pode ser aplicada para aproximar-se de uma condição desejável "ideal" para o processo considerando mais de uma variável resposta dependente.

Por exemplo, a condição "ideal" de PTH para produzir etanol 2G será aquela capaz de gerar uma fração sólida com maior teor de celulose, menores teores de hemiceluloses e lignina, menor remoção de celulose no pré-tratamento, maior remoção de hemiceluloses e lignina e maior rendimento global de glicose (*RG*). Na "ferramenta de desejabilidade" é possível prever a melhor condição levando em consideração os valores observados para todas as variáveis dependentes atribuindo valores de 1,0 quando o alvo são valores maiores para a variável resposta, 0,5 para valores intermediários e 0,0 para valores mínimos. Na Tabela 5 são mostradas quais variáveis dependentes foram avaliadas usando a "ferramenta de desejabilidade", bem como, os valores atribuídos para cada variável dependente. Outros autores, como Baêta *et al*. (2016) e Santos *et al*. (2018), já utilizaram essa ferramenta para predizer a melhor condição de processo. Os resultados foram avaliados com o programa Statistica®.

Tabela 5: Condições para produção de etanol 2G obtidas pela ferramenta de desejabilidade.

Desejabilidade	g*Cel* / g *CCPT*	g*Hemi* / g *CCPT*	g*Lig* / g *CCPT*	*RG* / (%)	*RCel* / (%)	*RHemi* / (%)	*RLig* / (%)
Maior produção de etanol	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0

4.9.1. *Avaliação da melhor caga enzimática*

Visando melhorar o rendimento da HE da casca de café pré-tratada foi avaliada a HE da condição de desejabilidade para produção de etanol em diferentes cargas enzimáticas 10, 20, 40 e 80 FPU/g CCPT. Os ensaios foram realizados de maneira análoga a descrita no item 4.8, utilizando-se coquetéis enzimáticos na proporção 85:15 (v v^{-1}), com atividades enzimáticas de 2,5, 5, 10 e 20 FPU mL^{-1}, respectivamente. Foram avaliados os rendimentos da HE para estas cargas enzimáticas nos pontos de 6, 8, 12, 24, 48, 60 e 72 horas.

4.10. Ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM)

Para determinação do PBM da casca de café pré-tratada, de posse dos resultados de composição das frações sólidas e líquidas e a partir da análise supervisionada do desejo do pesquisador baseado em uma análise técnica, utilizou-se a ferramenta de desejabilidade do programa Statistica® para prever uma condição que proporcionasse uma maior produção de metano. Para produção de metano a partir da casca de café considerou-se uma boa condição, aquela capaz de garantir uma maior liquefação da biomassa (solubilização da biomassa) com maior quantidade de açúcares solúveis e menores teores de fenóis no hidrolisado, compostos considerados tóxicos ao consórcio microbiano acetogênico e metanogênico. Desta forma, com intuito de avaliar o efeito da concentração de açúcares e fenóis no hidrolisado, utilizou-se tais variáveis como respostas durante a análise de predição (desejabilidade). A escolha foi feita levando-se em consideração uma análise estatística das variáveis respostas, considerando-se normalidade das mesmas, falta de ajuste do modelo não significativa e regressão do modelo significativa.

Tabela 6: Condições de desejabilidade visando a produção de biogás.

CDB	Açúcares Redutores	Inibidores (Fenol)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	RLS (ml/g)
1	1	-1	20±1	120 ±2	5
2	1	0	90±1	189±2	5
3	1	1	61±1	200±2	5

CDB- Condição de desejabilidade para biogás

Selecionadas as condições, os testes de DA para avaliação do potencial de produção de CH_4 foram realizados em batelada em condições mesofílicas com os hidrolisados gerados na etapa de PTH das condições selecionadas. Além disso, visando uma aplicação industrial, optou-se por testar a DA da biomassa sem separação das frações líquida e sólida, ou seja, como saem da etapa de PTH. Tal decisão foi motivada pela facilidade de aplicação de um processo de DA com a fração que sai diretamente do PTH sem a necessidade de inserção de uma etapa de operação unitária para separação das fases sólida e líquida. Ademais, a produção de biogás a partir somente da fração sólida também foi realizada para verificar o efeito da separação das fases na produção de metano.

Para a realização dos ensaios de digestão anaeróbia líquida DA-L (ST< 10%) foram utilizados frascos reatores de vidro de 120 mL, sendo 60 mL de volume útil e o restante de *headspace*. Em tais frascos foram adicionados 6 mL de hidrolisado. Os inóculos anaeróbios foram adicionados nos frascos em uma quantidade definida para cada ensaio, em função da quantidade de DQO do hidrolisado objetivando-se manter uma relação final alimento/microrganismo (A/M) de aproximadamente 0,4 gDQO gSSVinóculo^{-1}, conforme sugerido por outros autores como Baêta (2016). Para digestão anaeróbia sólida DA-S (ST > 15%) e semissólida DA-SS (10% < ST <15% foram utilizadas proporções de ST de 15 e 12,5%, respectivamente. Para estes casos, foi utilizada uma relação A/M igual a 2 $gSSV_{substrato}$ g^{-1})(D. S. R. Lima, Herrera, Baêta, Gurgel, & Aquino, 2018). A DA-S foi realizada com as frações sólidas geradas após pré-tratamento, ao passo que a DA-SS foi realizada com a mistura de sólido e líquido gerada após o pré-tratamento.

Em seguida, quando necessário, os fracos foram completados com água destilada para o volume útil de 60 mL. O pH foi mantido entre 6,9 e 7,2, utilizando solução de ácido clorídrico (HCl) a 2 mol L^{-1} ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol L^{-1} para ajustá-lo quando necessário. Depois do ajuste de pH uma massa de carvão ativado em pó (CAP) para manter uma

concentração de 4 $g.L^{-1}$ foi adicionado ao frasco reator. A concentração foi a mesma utilizada por Santos *et al.* (2018), na ocasião os autores avaliaram o efeito positivo do uso do CAP na produção de biogás durante a DA de hidrolisado hemicelulósico obtido a partir do processo oxidativo avançado da casca de café. Além de funcionar como um adsorvente de possíveis compostos tóxicos, o CAP pode auxiliar no tamponamento do meio, uma vez que pode contribuir para o equilíbrio dos AGVs presentes na solução reacional, conforme já observado por Baêta *et al* (2013). Inclusive, por esse motivo optou-se por não adicionar solução tamponante de $NaHCO_3$ durantes os testes. Após a adição do CAP os frascos foram purgados com $N_{2(g)}$ durante 5 min e lacrados com tampa de borracha e lacre de alumínio. Em seguida, os frascos foram levados para uma incubadora com agitação da marca Thoth®, modelo 6440, e colocados sob uma agitação de 180 rpm e a uma temperatura controlada de 35 ± 2°C para favorecer a atividade dos microrganismos metanogênicos.

O inóculo anaeróbio usado para os testes de PBM foi obtido a partir de um reator UASB alimentado com esgoto sanitário, operado em escala de demonstração no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da UFMG-COPASA. O inoculo foi previamente misturado com estrume de vaca em uma proporção 1 $gSSV_{lodo}$:1 g $SSV_{estrume}$ e, em seguida, incubado antes do início do teste por cinco dias a 35°C para eliminar a produção de metano a partir da biodegradação de qualquer material orgânico residual.

A produção de biogás foi monitorada diariamente medindo-se a pressão acumulada no frasco reator em um intervalo de monitoramento de 12 h com um manômetro diferencial da marca CCE capaz de medir pressões em uma faixa de pressão de 0 a 5 atm. Para a composição de metano no biogás, uma amostra de 1,0 mL do gás produzido foi coletada após a medida de pressão e injetada posteriormente com uma seringa *gastight* em um cromatógrafo de fase gasosa da marca Shimadzu, equipado com um detector de condutividade térmica, operado em uma temperatura de 120°C com uma coluna capilar de peneira molecular (5Å) da marca Restek, preenchida com fase estacionária Msieve 5Å trabalhando a uma temperatura 120°C usando nitrogênio 5.0 como gás de arraste, em velocidade linear de 23,8 mL min^{-1}. Todos os valores de PBM (Nm^3 kg DQO^{-1}) são apresentados nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP: 273 K; 101315 Pa).

Os ensaios foram monitorados até que ocorresse a estabilização da produção de biogás. O momento de estabilização da produção de biogás foi considerado quando não houve uma variação de produção de biogás em um intervalo de 24 h superior a 5%.

Ao finalizar a etapa de monitoramento, os ensaios foram submetidos à análise de DQO da fração solúvel para avaliar a eficiência de remoção de DQO do sistema e foram filtrados 1 mL do líquido em filtros de 0.45 µm e adicionados em *vials* para serem analisados por cromatografia líquida de alta eficiência conforme metodologia descrita na seção 4.2.1, para avaliar a presença de açúcares, furanos e ácidos graxos voláteis (AGVs) gerados na DA.

4.10.1. *Estudo de cinética da digestão anaeróbia*

Após o monitoramento da produção de biogás foi possível realizar a modelagem da cinética da produção de metano por DA. Para tal modelagem foram testados quatro modelos: ordem um, Gompertz modificado, exponencial de duas fases e múltiplos estágios. Tais modelos foram testados para avaliar qual o modelo que melhor descreve a produção de biogás.

O modelo de cinética de ordem um (Pavlostathis e Gomez 1991) considera como etapa limitante da DA a fase de hidrólise de substrato e é apresentado na Eq. (21):

$$P = P_0[1 - \exp(-kt)] \qquad \text{Eq. (21)}$$

Na qual, P é o rendimento de biogás acumulado (NmL gDQO aplicada^{-1}), P_0 é o rendimento máximo de biogás (NmL gDQO aplicada^{-1}), k é a constante cinética de produção de metano (dia^{-1}) e t é o tempo de incubação (dias).

O modelo de Gompertz modificado (Zwietering *et al*., 1990), Eq. (22), permite a determinação de parâmetros como fase lag, taxa específica de produção de biogás e produção acumulada de metano.

$$P = P_0 exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m e}{P_0}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \qquad \text{Eq. (22)}$$

Na qual, P é o rendimento de biogás acumulado (NmL.gDQO aplicada^{-1}), P_0 é o rendimento máximo de biogás (NmL gDQO aplicada^{-1}), t é o tempo de incubação (dias), λ é a

fase lag (dias), μ_m é a taxa mínima de produção de biogás (NmL.gDQO aplicada^{-1}dia^{-1}) e *e* é a constante de Euler (2,71828).

O modelo exponencial de duas fases (Pellera e Gidarakos 2016), Eq. (23), considera que a produção de biogás ocorre em dois ou mais estágios e descreve a produção de biogás em cada uma delas, desconsiderando sua interação.

$$P = P_1[1 - exp(-k_1 t)] + P_2[1 - exp(-k_2 t)] \quad \text{Eq. (23)}$$

Na qual, P_n é a produção de biogás acumulada na fase *n* (NmL gDQO aplicada^{-1}) e k_n é a constante cinética da fase *n*.

O modelo de múltiplos estágios (López *et al.*, 2010), Eq. (24), é utilizado para descrever o comportamento da produção do biogás considerando diferentes estágios e suas interações (L. C. dos Santos, 2017).

$$P = A_s[1 - exp(-k_1 t)] + A_I[1 - exp(-k_2 t)] + A_{IS}\left[1 - \frac{k_2 \exp(-k_1 t)}{k_2 - k_1} - \frac{k_1 \exp(-k_2 t)}{k_1 - k_2}\right] \quad \text{Eq. (24)}$$

Na qual, A_s, A_I e A_{IS} representam a produção de biogás acumulada em cada estágio (NmL biogás g DQO aplicada^{-1}) e k_1 e k_2 são as constantes cinéticas para cada estágio (dias^{-1}).

Para avaliar a qualidade dos ajustes dos modelos aos dados experimentais e escolher o modelo que melhor descreve a produção de biogás considerou-se o coeficiente de determinação (R^2), erro quadrático médio (*RMSE*) e o critério de informação de Akaike (*AIC*). Tais critérios são apresentados nas Eq. (25) a Eq. (27).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_i \left(Y_{i,experimental} - Y_{i,modelo}\right)^2}{N - 2}} \quad \text{Eq. (25)}$$

$$NRMSE = \left[\frac{RMSE}{Y_{máx} - Y_{mín}}\right] x\ 100 \qquad \text{Eq. (26)}$$

$$AIC = Nln\left(\frac{SS}{N}\right) + 2k \qquad \text{Eq. (27)}$$

Na qual, *N* representa o número de dados experimentais, *SS* é a soma do quadrado dos resíduos e *k* é o número de parâmetros dos modelo.

4.11. Avaliação da viabilidade do uso do PTH como alternativa para valorização da casca de café

Para avaliar a viabilidade energética do processo foi estimado um balanço de energia do sistema por meio do cálculo da energia gasta no pré-tratamento (*E*(-)) e da energia obtida (*E*(+)) considerando a queima do metano gerado na DA em um sistema de cogeração de calor e energia (CHP). Para os cálculos da *E*(+) e *E*(-) foram consideradas as informações fornecidas por Cano *et al.* (2015). De acordo com o autor, um sistema CHP convencional possui uma eficiência de combustão de 85%. Sendo que a conversão de energia química em energia térmica corresponde a 65%, enquanto a conversão em energia elétrica corresponde a 35%. A energia térmica gasta no PTH foi calculada usando a Eq. (28).

Para os cálculos de energia gasta no PTH foi considerada a temperatura inicial da água 100°C no estado de vapor, uma vez que é possível aproveitar a água utilizada para o resfriamento do sistema CHP em um trocador de calor para aquecer a água de alimentação e promover sua vaporização. Para os cálculos de energia gasta *E*(-) durante o PTH considerou-se para efeito de cálculo somente a energia gasta para aquecer a água até a temperatura de trabalho. Tal consideração deve-se ao fato do sistema reacional ser constituído basicamente por água, haja vista que nos ensaios a concentração de sólidos foi sempre inferior a 20%.

$$E(-)/MJ\ \ kg_{Casca\ bruta}{}^{-1} = Cp_{H_2O}\ m\ (T_f - 100\ °C) \qquad \text{Eq. (28)}$$

No qual, C_p é a capacidade calorífica da água média da água para as temperaturas de trabalho ($4{,}19 \times 10^{-3}$ MJ (kg°C)$^{-1}$) e *m* é a massa de água utilizada (em kg) e Tf a temperatura final de trabalho.

Para o cálculo da *E*(+) total gerada no sistema Eq. (30), foi considerada o $\Delta H°$ de combustão do metano igual a 34,5 MJ (Nm^3CH_4)$^{-1}$, bem como os rendimentos do PTH e as eficiências de conversão do sistema CHP. No entanto, é válido destacar que o sistema CHP produz energia térmica e elétrica. Para avaliar se a energia térmica gerada pela queima do metano no sistema CHP é capaz de suprir a demanda de energia gasta pelo PTH, a Eq. (29) deve ser multiplicada por 0,65, eficiência térmica do sistema CHP conforme mencionado anteriormente, para então assim obter-se a $E(+)_{\text{térmica}}$ gerada. Para calcular a energia elétrica gerada no sistema CHP, $E(+)_{\text{elétrica}}$, a Eq. (30) deve ser multiplicada por 0,35, fator de eficiência elétrica do sistema CHP, conforme mencionado anteriormente.

$$E(+)/MJ\ \ KgCasca\ bruta^{-1} = \frac{NmLCH_4}{gDQO_{entrada}} x \frac{gDQO}{gmassa_{(HH\ ou\ CPT)}} x \frac{gmassa_{(HH\ ou\ CPT)}}{g\ Casca\ bruta} x \frac{1000g}{Kg\ Casca\ bruta} x \frac{10^{-6}m^3}{mL} x \frac{34{,}5\ MJ}{Nm^3\mathrm{CH_4}}\ 0{,}85 \qquad \text{Eq. (29)}$$

Em que g massa HH é a massa de hidrolisado recuperado no pré-tratamento hidrotérmico em gramas e g massa CPT é a massa de casca pré-tratada gerada após pré tratamento, sendo considerada a massa de fração sólida para digestão sólida e a massa da fração sólida mais hidrolisado para digestão semi-sólida.

A avaliação se a energia térmica gerada pela queima do biogás no sistema CHP compensa a energia térmica gasta pelo PTH foi dado pela diferença entre os valores da energia térmica gerada ($E(+)_{\text{térmica}}$) e a energia térmica consumida no PTH (*E*(-)).

Foi considerada a energia térmica gerada pelo sistema para pagamento da demanda energética do PTH e, caso este balanço seja positivo, a energia térmica excedente poderá ser utilizada na planta de processamento do café. Já para a energia elétrica gerada, foi considerada a rentabilidade econômica considerando-se a venda desta energia de acordo com valores dispostos na Portaria n°65 de 2018, Ministério de Minas e Energia.

Para a condição de desejabilidade de etanol, foi avaliada a rentabilidade através do rendimento teórico de etanol conforme Eq. (30). Para avaliação do rendimento econômico que seria possível em um cenário com a venda do etanol, foi considerado o valor de venda do litro do etanol disponível pela União dos Produtores de Bioenergia (UDOP) no dia 28 de junho de 2019 (R$1,6256).

$$g_{etanol} gCascaBruta^{-1} = \frac{gGlicose_R}{g\ Casca_{PT}} x\ \frac{g\ Casca_{PT}}{g\ Casca_{bruta}}\ x\ \frac{0{,}51\ g_{etanol}}{gGlicose_R} \qquad \text{Eq. (30)}$$

Ao final, todos os cálculos apresentados no item de estimativa de viabilidade do sistema (item 5.2.3) foram convertidos para a base de cálculo por tonelada de casca de café bruta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da casca de café bruta e pré-tratada e desempenho do pré-tratamento hidrotérmico na hidrólise enzimática

A casca de café bruta pode apresentar teores variados de hemiceluloses entre 11-31,5%, de celulose entre 16-43,8%, de lignina entre 9-24,4%, de extrativos entre 17,7-38% e de proteínas entre 8-11% (Andrade, 2009; Gouvea *et al.*, 2009; Ayele e Reinhardt, 2010 Silva, 2012; Albuquerque e Araújo, 2016; Freitas, 2016; Santos *et al*., 2018; Baêta *et al*., 2017). As amplas faixas de valores podem ser justificadas em função das diferentes regiões de plantio, modo de processamento, tipo de solo e principalmente das metodologias de caracterização.

Os valores médios de lignina observados para casca de café usada no presente estudo foram superiores aos reportados por outros autores, totalizando 31,1 (±1,2)%. Os valores de celulose e hemiceluloses foram 36,0 (±0,9)% e 20,4 (±1,3)%, respectivamente, valores esses próximos dos encontrados por Gouvea *et al*. (2009) e Santos *et al*. (2018). Os teores de extrativos e cinzas foram iguais a 16,6 (±0,9)% e 4,1 (±0,6)%, respectivamente, e também condizem com os determinados por Baêta *et al*., (2017), 17,7% e 4,6%, respectivamente. O balanço de massa para composição da casca de café bruta foi de 108 (±3,3)%, valor considerado satisfatório considerado a complexidade da biomassa.

O PTH teve a remoção de hemicelulose da fração sólida como principal objetivo, visando assim, obter uma fração sólida rica em celulose para fermentação a etanol 2G e, uma fração líquida rica em açúcares solúveis, principalmente pentoses que podem ser usadas para produção de biogás por DA. Para avaliar o efeito das diferentes condições de PTH na biomassa as composições da fração sólida após o PTH foram avaliadas. As condições utilizadas no PTH e o balanço de massa da fração sólida obtida após o PTH são apresentadas na Tabela 7. Os balanços de massa obtidos para estas frações tiveram seus valores variando entre 85,8% e 103,8%, conforme pode ser observado na Tabela 7. Tais valores podem ser considerados aceitáveis dados à complexidade da biomassa e a falta de uma metodologia padronizada para caracterização da mesma, o que inclusive abre espaço para o desenvolvimento e melhoramento de metodologias para caracterização da casca de café.

Tabela 7: Condições de pré-tratamento hidrotérmico e composições da casca de café bruta e pré-tratada.

CE	*t* / (min)	*T* / (°C)	*RLS* / (mL g^{-1})	Severidade	Celulose / (%)	Hemiceluloses / (%)	Lignina / (%)	Balanço / (%)
CB	-	-	-	-	36,0 ± 2,1	20,4 ± 1,1	31,1 ± 1,2	87,5 ± 0,7
1	20	120	7,5	1,9	32,8 ± 0,9	21,7±1,0	32,9±1,7	87,4±0,6
2	20	200	7,5	4,3	45,6 ± 2,6	13,3 ± 0,3	31,0± 3,4	90,0±1,33
3	90	120	7,5	2,5	37,4 2,6	20,1 ± 0,3	34,8±1,0	92,4 ±0,9
4	90	200	7,5	4,9	47,8 ± 1,9	2,4±0,2	42,4 ± 1,0	92,6 ± 1,0
5	55	120	5	2,3	33,2 ± 1,2	22,5±1,63	35,9±0,6	91, 7±2,9
6	55	200	5	4,7	48, ± 0,9	4,8±0,5	38,4±1,9	91,4 ±3,6
7	55	120	10	2,3	34,9 ± 1,1	21,6 ±1,0	30,77 ± 2,1	87,4 ± 3,0
8	55	200	10	4,7	53, ± 1,8	4,7 ± 0,3	41, 8 ± 3,5	100,3 ± 0,9
9	20	160	5	3,1	35,3± 1,7	22,3± 0,8	33,7 ± 3,6	91,4 ± 3,6
10	90	160	5	3,7	40,7±0,7	23,6 ± 0,4	39,4±3,1	103,9± 2,1
11	20	160	10	3,1	33,6 ± 1,6	23,4±0,5	31,2±2,1	88,2±1,2
12	90	160	10	3,7	36,3 ± 0,5	19,7±0,6	32,4± 2,8	88,4±0,5
13(PC)	55	160	7,5	3,5	35,7 0,1	22,5±0,8	35,9 ± 0,5	94,2 ± 3,2
14(PC)	55	160	7,5	3,5	33,4 ± 0,9	22,6±0,4	36,8 ±1,2	92, 9 ± 0,4
15(PC)	55	160	7,5	3,5	31,8	20,2±1,2	33,8 ±3,3	85,8±1,3

CE- condição experimental; PC – ponto central

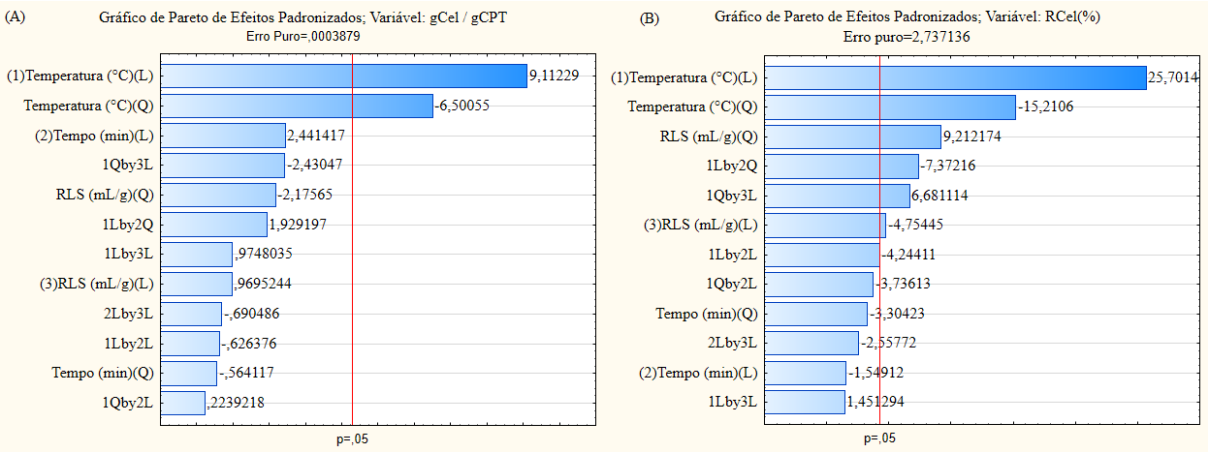
Na Tabela 7 observa-se que, assim como esperado, as condições de maior severidade, ou seja, maiores tempos e temperaturas, apresentaram um maior percentual de celulose nas frações sólidas. Como pode ser observado para todas as condições de 200°C, o percentual de celulose foi superior a 45%, provocando um incremento percentual de celulose na fração sólida remanescente em relação à casca bruta de até aproximadamente 15%. Os resultados vão de acordo com o esperado, ou seja, indicam que para as condições mais severas, houve uma maior remoção de hemiceluloses (menores teores na fração sólida), resultando em um enriquecimento da fração sólida em celulose, o que se é desejado quando o foco principal do PTH é a produção de etanol 2G.

Na Figura 10(A) é apresentando o gráfico de Pareto para composição da biomassa pré-tratada em relação ao teor de celulose (grama celulose/grama de casca de café pré-tratada - g *Cel*/g *CPT*), enquanto na Figura 11(B) é apresentado o gráfico de Pareto para a remoção de celulose da biomassa no PTH (*RCel*). Observa-se no diagrama de Pareto apresentado na Figura 10(A) que apenas a temperatura teve um efeito significativo (p-valor < 0,05) e positivo para variável resposta teor de celulose na biomassa pré-tratada, indicando que maiores temperaturas promovem um enriquecimento no teor de celulose na fração sólida pré-tratada por PTH. No entanto, para variável remoção de celulose, diagrama de Pareto apresentado na Figura 11(B), é possível perceber que as variáveis que apresentaram efeito significativo foram a temperatura e a

RLS (*p*-valor < 0,05), com valores de efeito positivo e negativo, respectivamente. Isso indica que uma maior temperatura irá contribuir para uma maior remoção de celulose, promovendo a solubilização dessa fração no meio reacional, o que para produção de etanol 2G pode ser indesejado, uma vez que se utiliza a fração sólida residual do PTH como matéria-prima para a etapa de hidrólise enzimática e fermentação da glicose liberada a etanol 2G.

A variável *RLS* teve um efeito negativo, ou seja, quanto menor a quantidade de água no PTH, maior será a remoção de celulose da fração sólida. A explicação para esse comportamento é que menores quantidades de água resultam em meios reacionais com maiores concentrações de ácidos orgânicos oriundos da hidrólise das hemiceluloses, como o ácido acético e fórmico (produzido a partir da degradação de glicose a HMF), diminuindo o pH do meio reacional, contribuindo, portanto, para a solubilização de parte da celulose por meio de hidrólise ácida das ligações glicosídicas.

Figura 10: Diagrama de Pareto para composição de celulose na casca de café pré-tratada (A) e para remoção de celulose no pré-tratamento hidrotérmico (B).



Na Figura 11 é possível observar o efeito da temperatura quando se compara os valores de remoção de celulose para as condições 3 (120°C) e 4 (200°C), sendo que ambas as condições de PTH tiveram o mesmo tempo de reação (90 min) e a mesma *RLS* (7,5 mL g^{-1}). A condição de pré-tratamento 4 com maior temperatura apresentou uma maior remoção de celulose (55,7%), enquanto a condição 3 apresentou uma menor remoção de celulose (25,3%). O efeito da temperatura também pode ser observado quando o tempo e a *RLS* foram fixados em 55 min e 5 mL g^{-1} para as condições 5 (120°C) e 6 (200°C), em que observou-se valores de remoção de celulose de 25,9% e 43,7%, respectivamente. Em ambas as comparações, é possível observar a

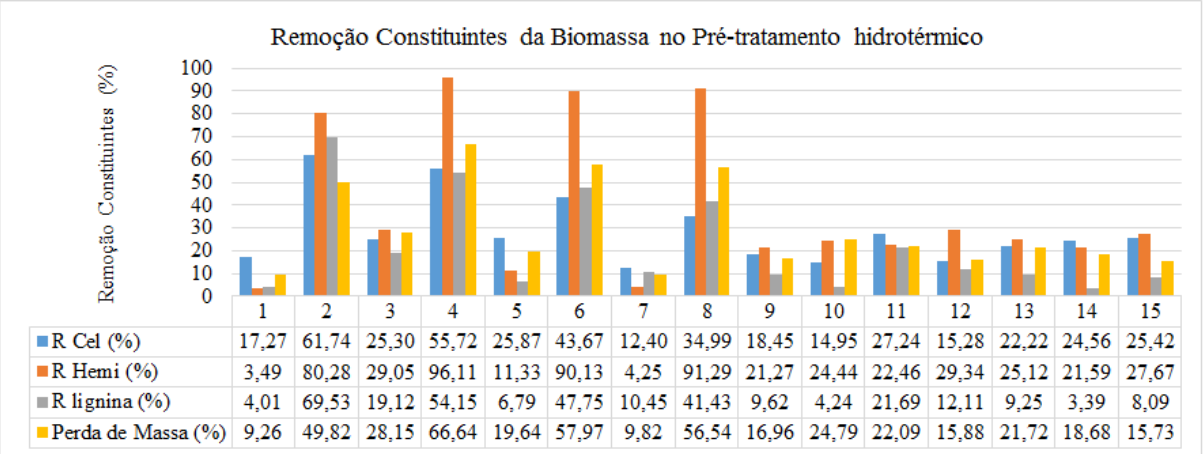
partir dos dados apresentados na Tabela 7, que as condições com maiores temperaturas, 4 e 6, também foram aquelas que apresentaram maiores valores de celulose na casca de café pré-tratada quando comparadas às condições 3 e 5. Tal observação confirma o fato de que a temperatura também apresenta efeito positivo na quantidade de celulose na casca pré-tratada, uma vez que a temperatura também atua na remoção das hemiceluloses e lignina, concentrando o componente celulose na fração sólida, embora tenha sido observada em alguns casos uma remoção concomitante desse componente na fração sólida submetida ao PTH.

O modelo polinomial completo para variável ‘g *Cel* / g *CPT*, nos termos decodificados, é apresentado na Eq. (31), com R^2 = 0,9882 e R^2_{adj} = 0,9179, indicando que 98,82% da variabilidade dos dados experimentais puderam ser explicadas pelo modelo. Para variável *RCel*, nos termos decodificados, o modelo obtido apresentou falta de ajuste não significativa, o mesmo é descrito na Eq. (32) e obteve R^2 = 0,9982 e R^2_{adj} = 0,9874, indicando que 99,82% dos dados puderam ser explicados pelo modelo.

$$\begin{aligned} gCel\ /gCPT = {} & 0{,}399 + 0{,}067\,T - 0{,}033T^2 + 0{,}018t - 0{,}003t^2 + 0{,}007RLS \\ & - 0{,}011RLS^2 - 0{,}006\,(Tt) + 0{,}134(Tt^2) + 0{,}002(T^2t) \\ & + 0{,}009(TRLS) - 0{,}017(T^2RLS) - 0{,}007(tRLS) \end{aligned} \qquad \text{Eq. (31)}$$

$$\begin{aligned} R\ Cel\ /(\%) = {} & 29{,}41 + 15{,}84\,T - 6{,}55T^2 - 0{,}956t - 1{,}42t^2 - 2{,}93RLS \\ & + 3{,}96RLS^2 - 3{,}51\,(Tt) - 4{,}31(Tt^2) - 2{,}18(T^2t) + 1{,}20(TRLS) \\ & + 3{,}91(T^2RLS) - 2{,}12(tRLS) \end{aligned} \qquad \text{Eq. (32)}$$

Figura 11: Perda de massa e remoção dos constituintes da casca de café após pré-tratamento hidrotérmico.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R Cel (%)	17,27	61,74	25,30	55,72	25,87	43,67	12,40	34,99	18,45	14,95	27,24	15,28	22,22	24,56	25,42
R Hemi (%)	3,49	80,28	29,05	96,11	11,33	90,13	4,25	91,29	21,27	24,44	22,46	29,34	25,12	21,59	27,67
R lignina (%)	4,01	69,53	19,12	54,15	6,79	47,75	10,45	41,43	9,62	4,24	21,69	12,11	9,25	3,39	8,09
Perda de Massa (%)	9,26	49,82	28,15	66,64	19,64	57,97	9,82	56,54	16,96	24,79	22,09	15,88	21,72	18,68	15,73

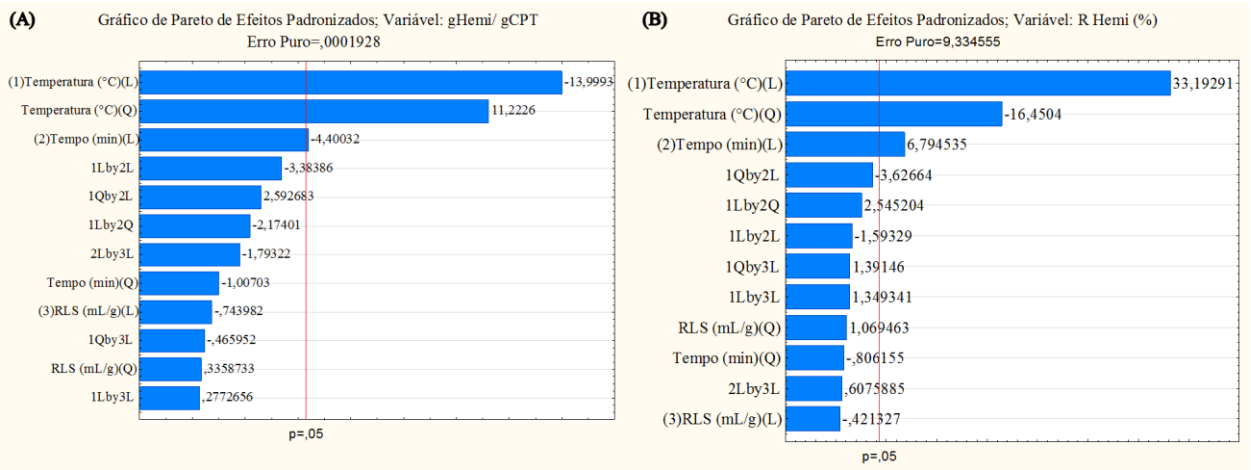
Nota-se, portanto, que, apesar das maiores temperaturas promoverem a obtenção de uma fração sólida mais rica em celulose, estas condições também levam a uma grande perda de massa e elevada remoção de celulose para fração líquida. Porém, isto não é interessante quando o objetivo é a produção de etanol 2G a partir da fração sólida pré-tratada, uma vez que o rendimento global do processo será afetado.

Sabe-se que o rendimento global de um processo integrado deve considerar as correntes de entrada e saída do volume de contorno, que no caso em questão são as unidades de pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática. É importante ressaltar que, para algumas biomassas lignocelulósicas, a solubilização da celulose já pode ser observada à partir de 170°C, principalmente quando se trata de resíduos agrícolas (Garrote *et al.* 1999).

O gráfico de Pareto apresentado na Figura 12(A) mostra que, para o teor de hemiceluloses na casca pré-tratada (g *Hemi* / g *CPT*) as variáveis temperatura e tempo apresentaram efeito significativo (p-valor < 0,05) e negativo. O efeito apresentado pela variável temperatura mostra que, quanto maior a temperatura menor será o teor de hemiceluloses na casca de café pré-tratada. O aumento da temperatura influencia diretamente na liberação dos grupos acetila presentes na cadeia hemicelulósica da casca de café, portanto, é capaz de melhorar a hidrólise das ligações glicosídicas das cadeias hemicelulosicas e consequentemente sua solubilização em xilooligômeros (XOS) e monossacarídeos para o meio reacional.

Tais resultados estão de acordo com o observado por Baêta (2016), em que maiores temperaturas favoreceram a hidrólise das hemiceluloses quando o bagaço de cana cana-de-açúcar foi tratado por PTH. Lee *et al*. (2009) também demonstraram que para a grama costeira pré-tratada por PTH, as maiores temperaturas estudadas (170°C) proporcionaram um menor teor de hemiceluloses na fração pré-tratada. O tempo também apresentou efeito significativo e negativo, o que indica que quanto maior o tempo, maior será o contato da biomassa com o meio ácido, favorecendo assim a solubilização das hemiceluloses para fase líquida. Não foram encontrados dados na literatura que permitisse a comparação da solubilização da hemicelulose na casca de café.

Figura 12: Diagrama de Pareto para composição de hemiceluloses na casca de café pré-tratada (A) e para remoção de hemiceluloses no pré-tratamento hidrotérmico (B).



Em relação aos teores de hemiceluloses na fração sólida, a partir dos dados apresentados na Tabela 7, além dos menores teores de hemiceluloses presentes nas frações sólidas submetidas ao PTH nas condições mais severas, conforme era esperado, é possível observar que para as mesmas condições de tempo e temperatura, o aumento da *RLS* provocou pouca variação nos teores de hemiceluloses da casca pré-tratada, como pode ser comprovado ao se comparar as condições 6 e 8. Esperava-se que com o uso de uma menor *RLS*, a maior concentração de ácido acético no meio reacional proporcionasse uma maior solubilização das hemiceluloses.

É importante destacar que conforme pode ser observado na Figura 11, a casca de café, diferente de outras biomassas, apresenta elevada remoção de hemiceluloses somente a 200°C, sendo que todas as condições nesta temperatura apresentaram remoções de hemiceluloses superiores a 80%, enquanto que em temperaturas mais brandas a remoção não ultrapassou 30%.

Tais resultados podem estar relacionados ao teor de grupos acetila contido nesta biomassa, que é de 2,8% (valor obtido neste trabalho), valor inferior à de biomassas como, por exemplo, o bagaço de cana, que de acordo com alguns autores como Vallejos *et al*., (2012) apresenta valores próximos de 4%. O baixo teor de grupos de acetila nesta biomassa faz com que o PTH necessário para uma boa remoção das hemiceluloses seja alcançado somente em elevadas temperaturas. Sabe-se que em elevadas temperaturas o K_a da água aumenta e provoca uma maior formação de íons hidrônio (H_3O^+) no meio reacional, o que resulta em valores de pH mais baixos.

Em biomassas com maiores teores de acetila o abaixamento do pH é corroborado também pelos maiores teores de ácidos orgânicos liberados da própria biomassa para o meio reacional, não necessitando de temperaturas tão elevadas para que seja atingido o pH necessário para a hidrólise efetiva das hemiceluloses, como é o caso da casca de café. Na Figura 13(B), os efeitos significativos para remoção de hemiceluloses são apresentados no gráfico de Pareto.

Para esta variável, a temperatura e o tempo apresentaram efeito significativo (*p*-valor < 0,05) e positivo e, diferente do esperado, a *RLS* não foi significativa na remoção de hemiceluloses. Avaliando a remoção de hemiceluloses por meio dos dados apresentados na Tabela 7, para as condições 6 e 8, em que apenas a *RLS* foi alterada de 5 para 10 mL g^{-1} mantendo a mesma temperatura (200°C) e tempo (55 min), a falta de influência desta variável é confirmada, uma vez que a remoção de hemiceluloses para essas condições apresentaram valores muito próximos, 90,1 e 91,3%, respectivamente. Um comportamento semelhante é também observado para as condições menos severas como as condições 9 e 11, que possuem a mesma temperatura (160°C) e tempo (20 min), com uma remoção de hemicelulose de 21,3 e 22,5%, respectivamente.

O efeito da temperatura na remoção de hemiceluloses pode ser observado em condições de PTH com tempo curto (20 min) e *RLS* (7,5 mL g^{-1}) intermediária, como pode ser verificado comparando-se a remoção de hemiceluloses nas condições 1 (120°C) e 2 (200°C), em que os valores de remoção foram de 3,5 e 80,3%, respectivamente (Figura 12). O mesmo comportamento pode ser observado para condições com tempo mais longo (90 min) e *RLS* (7,5 mL g^{-1}) intermediária, em que as condições 3 (120°C) e 4 (200°C) obtiveram valores de remoção de 29,1 e 96,1%, respectivamente (Figura 12). A partir desses dados é possível sugerir que o maior valor de pH do meio reacional devido ao menor teor de grupos acetila nas cascas de café demandou uma maior energia de ativação para a hidrólise das ligações glicosídicas das

hemiceluloses, energia essa obtida por meio do aumento significativo da temperatura. Portanto, uma sugestão para diminuir a temperatura do PTH e obter uma quantidade de remoção de hemiceluloses equivalente é a adição de ácido acético no meio reacional.

Para confirmar a hipótese levantada, utilizou-se como teste a condição de PTH do ponto central, uma condição mais branda (160ºC, 55 min e RLS de 7,5 mL g^{-1}). Nesta condição foi adicionado uma quantidade de ácido acético suficiente para manter no meio reacional uma concentração de 4% (m/m) do mesmo. Tal valor geralmente é a concentração observada no meio reacional em PTH para biomassa com maiores teores de acetila, como é caso do bagaço de cana.

O resultado deste ensaio mostrou que a perda de massa do ensaio feito com adição externa de ácido acético teve um valor de 29,2%, tal valor foi maior que os 22,5% observado para a mesma condição sem adição de ácido acético. O mesmo comportamento pôde ser observado para a variável remoção de hemicelulose, para esta variável o valor de 30,7% foi superior aos 23,3% observado no ensaio controle. Isto mostra que o fato da biomassa obter menos grupos acetilas em sua estrutura faz com que maiores valores de temperatura sejam necessários para que sejam atingidas maiores remoções de hemicelulose. Caso o interesse seja trabalhar em condições mais brandas, maiores remoções de hemicelulose serão obtidas com adição externa de ácido acético.

O modelo polinomial completo para variável 'g *Hemi* / g *CPT*', nos termos decodificados, apresentou falta de ajuste não significativa e é apresentado na Eq.(33), com R^2 = 0,9952 e R^2_{adj} = 0,9661, indicando que 99,52% da variabilidade dos dados experimentais puderam ser explicadas pelo modelo. Para variável *RHemi*, nos termos decodificados, o modelo obtido é o descrito pela Eq.(34) e apresentou R^2 = 0,99877 e R^2_{adj} = 0,9914, indicando que 99,88% dos dados puderam ser explicados pelo modelo, a boa modelagem foi confirmada pela falta de ajuste não significativa do modelo observada durante os testes de validação.

$$\begin{aligned} gHemi\ /gCPT = {} & 0{,}167 + 0{,}072\,T - 0{,}040T^2 - 0{,}023t - 0{,}004t^2 \\ & - 0{,}004RLS - 0{,}001RLS^2 - 0{,}023(Tt) - 0{,}010(Tt^2) \\ & + 0{,}012(T^2t) + 0{,}002(TRLS) - 0{,}002(T^2RLS) \\ & - 0{,}012(tRLS) \end{aligned} \qquad \text{Eq.(33)}$$

$$R\ Hemi\ /(\%) = 41{,}953 + 37{,}794\,T - 13{,}081T^2 + 7{,}736t - 0{,}640t^2 - 0{,}479RLS + 0{,}850RLS^2 - 2{,}434\,(Tt) + 2{,}749(Tt^2) - 3{,}917(T^2t) + 2{,}061(TRLS) + 1{,}503(T^2RLS) + 0{,}928(tRLS) \quad \text{Eq.(34)}$$

Na Figura 13 são apresentados os gráficos de Pareto para o teor de lignina na biomassa pré-tratada (g *Lig* / g *CPT*) e a remoção de lignina (*RLig*), respectivamente. Percebe-se que a variável tempo apresentou efeito significativo e positivo para a variável resposta g *Lig* / g *CPT*. Ou seja, maiores tempos de reação proporcionam uma fração sólida pré-tratada com maior teor de lignina. Esta observação pode ser explicada de acordo com observado anteriormente, isto é, o tempo e a temperatura exerceram um efeito positivo para remoção de hemiceluloses e com a solubilização majoritária desse componente, o enriquecimento da biomassa em termos de lignina acaba ocorrendo, uma vez que o PTH não é tão efetivo para remoção de lignina devido as reações de condensação e repolimerização da mesma em meio ácido.

Avaliando-se o diagrama de Pareto apresentado na Figura 13(B) é possível observar que a temperatura teve um efeito positivo significativo na remoção da lignina. Isto pode ser confirmado comparando-se os resultados de remoção de lignina para as condições 1 e 2, as quais possuem o mesmo tempo (20 min) e *RLS* (7,5 mL g^{-1}) e somente diferem em termos de temperatura. Na condição 1 (120°C) observou-se uma remoção de lignina de 4,0%, enquanto na condição 2 (200°C) uma remoção de lignina de 69,5% foi observada. O mesmo comportamento pode ser observado quando se compara a remoção de lignina entre as condições 3 (120°C) e 4 (200°C) com o mesmo tempo (90 min) e *RLS* (7,5 mL g^{-1}). Na Figura 12 é possível observar que a remoção de lignina na condição 3 foi de 19,1% e para condição 4 de 54,2%, confirmando o efeito positivo da temperatura.

Na Figura 13(B) é possível observar que a interação entre a variável temperatura e tempo teve um efeito significativo negativo na remoção de lignina. Apesar de maiores temperaturas provocarem a remoção da lignina conforme discutido anteriormente, maiores tempos podem contribuir para um processo de repolimerização dos fragmentos de lignina na superfície da fibra da casca pré-tratada em decorrência da falta de solvência do meio reacional e da formação de íons carbônio na lignina durante o PTH, contribuindo assim para menores valores de remoção.

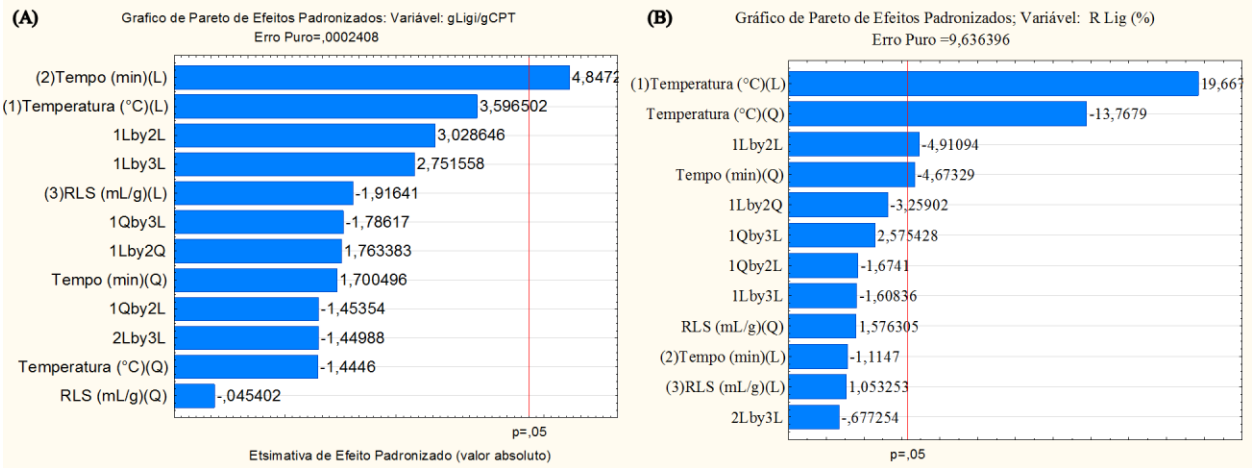
Observando-se os valores de remoção de lignina na condição 2 (200°C; 20 min; *RLS* de 7,5 mL g^{-1}) com a condição 4 (200°C; 90 min; *RLS* de 7,5 mL g^{-1}) é possível notar que a remoção de lignina na condição de tempo mais longo, 54,2%, foi inferior aos 69,5% observado para a condição de tempo mais curto. Além desta comparação, avaliando as condições 11 e 12, de mesma temperatura (160°C) e *RLS* (10 mL g^{-1}) observa-se que para o tempo mais longo (90 min), houve uma remoção de apenas 12,1% de lignina contra 21,7% para o tempo curto (20 min).

Essas comparações demonstraram que tempos mais longos podem contribuir negativamente para remoção de lignina da fração sólida. Tal comportamento já foi observado para outras biomassas como o bagaço de cana-de-açúcar, conforme relatado por Baêta *et al.* (2016). Esse autor relatou que em elevadas temperaturas a liberação de grupos acetila para o meio é favorecida, e, portanto, o meio reacional teve um valor de pH mais ácido, resultando em uma maior fragmentação da lignina.

Por outro lado, é necessário que os fragmentos de lignina tenham baixa massa molar para serem solubilizados e maior teor de grupos hidroxilas fenólicas para interagirem com as moléculas de H_2O do meio reacional por ligação intermolecular de hidrogênio. Quando isso não ocorre, um maior tempo irá provocar uma repolimerização da lignina na superfície da fração sólida, reduzindo a sua remoção. Entretanto, vale destacar que os valores de remoção de lignina observados para o PTH da casca de café são bem maiores do que aqueles observados para o bagaço de cana apresentado por Baêta *et al*. (2016), 6,34 a 26,20%, e por Vallejos *et al.* (2012) aproximadamente 6% de remoção . Isso sugere que a lignina contida na casca de café deve possuir composição e ser estruturalmente diferente daquela contida no bagaço de cana, o que abre espaço para novos estudos que buscam avaliar as diferenças existentes na lignina desta biomassa.

O modelo polinomial completo para variável ‘g *Lig* / g *CPT*’, nos termos decodificados, é apresentado na Eq. (35), com R^2 = 0,9756 e R^2_{adj} = 0,8294, indicando que 97,56% da variabilidade dos dados experimentais puderam ser explicadas pelo modelo. Para variável *RLig*, nos termos decodificados, o modelo obtido é descrito na Eq. (36) e apresentou um R^2 = 0,9969 e R^2_{adj} = 0,9786, indicando que 99,69% dos dados puderam ser explicados pelo modelo, além disso a falta de ajuste do modelo não foi significativa.

Figura 13: Diagrama de Pareto para composição de lignina na casca de café pré-tratada (A) e para remoção de lignina no pré-tratamento hidrotérmico (B).



$$gLig\ /g\ CPT = 0{,}354 + 0{,}020\,T - 0{,}005T^2 - 0{,}028t - 0{,}007t^2 - 0{,}011RLS + 0{,}023(Tt) + 0{,}010(Tt^2) - 0{,}008(T^2t) + 0{,}021(TRLS) - 0{,}010(T^2RLS) - 0{,}011(tRLS) \quad \text{Eq. (35)}$$

$$RLig\ /(\%) = 25{,}075 + 22{,}753\,T - 11{,}121T^2 - 1{,}289t - 3{,}775t^2 + 1{,}219RLS + 1{,}273RLS^2 - 7{,}622\,(Tt) - 3{,}577(Tt^2) - 1{,}843(T^2t) - 2{,}496(TRLS) + 2{,}826(T^2RLS) - 1{,}051(tRLS) \quad \text{Eq. (36)}$$

5.1.1. *Avaliação do PTH na hidrólise enzimática da casca de café pré-tratada*

Após o PTH, a fração sólida foi submetida a ensaios de hidrólise enzimática (HE), visando avaliar a liberação de glicose para posterior fermentação a etanol 2G. Na Tabela 8 são apresentados os rendimentos médios obtidos para os ensaios de HE realizados para as 15 condições do planejamento experimental.

Observa-se que o *RHE* para a casca de café foi relativamente baixo quando comparado ao rendimento de outras biomassas pré-tratadas por PTH, por exemplo, para a palha de trigo, 200°C por 40 min, o *RHE* foi 96% (Perez *et al.*, 2007) e 90,9% para palha pré-tratada a 180°C por 30 min no trabalho de Ruiz *et al.* (2012). Já para o bagaço de sorgo pré-tratado hidrotermicamente com vapor (explosão a vapor) obteve-se um *RHE* de 70% (Zhang *et al*, 2010). Para o bagaço de cana pré-tratado a 183°C por 40,7 min, obteve-se um *RHE* de 62,2% (Baêta,

2016). Neste trabalho, para a casca de café, o *RHE* não ultrapassou 41,4(±0,3)% para a condição 6 (200°C, 55 min e *RLS* de 5 mL g^{-1}), condição que gerou a casca de café pré-tratada mais adequada para HE.

Tabela 8: Rendimentos de glicose médios dos ensaios de hidrólise enzimática da casca de café pré-tratada.

CE	$Glicose_T$ / (g)	$Glicose_R$ / (g)	RHE / (%)	RG / (%)
CB	0,40	0,02	3,7 ± 0,2	-
1	0,36	0,06	17,6 ± 1,2	15,47
2	0,50	0,13	26,3 ± 3,4	10,20
3	0,41	0,06	13,5 ± 3,1	10,30
4	0,53	0,20	37,3 ± 0,6	16,75
5	0,37	0,06	15,1 ± 0,8	11,38
6	0,53	0,22	41,4 ± 0,3	24,11
7	0,38	0,07	17,0 ± 0,4	15,17
8	0,59	0,19	32,0 ± 0,5	21,12
9	0,39	0,06	14,2 ± 1,5	11,84
10	0,45	0,08	18,3 ± 0,1	15,83
11	0,37	0,06	15,5 ± 0,1	11,45
12	0,40	0,09	22,5 ± 0,4	19,32
13(C)	0,39	0,09	22,2 ± 0,6	17,42
14(C)	0,37	0,09	24,3 ± 0,3	18,56
15(C)	0,35	0,07	18,7 ± 1,1	14,15

CE: condições experimentais; CB: casca bruta; $Glicose_T$: glicose teórica; $Glicose_R$: glicose recuperada; RHE: rendimento de HE; RG: rendimento global de HE.

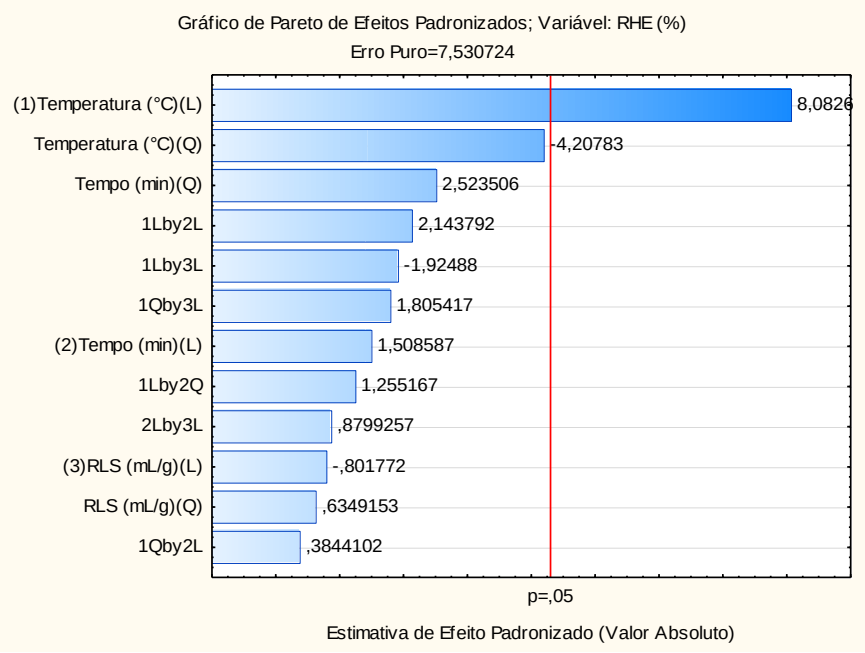
Por outro lado, quando comparado com o rendimento encontrado por Santos (2017) para a casca de café pré-tratada por tratamento oxidativo, na qual obteve-se para melhor condição estudada um *RHE* de 12%, o rendimento obtido para casca de café pré-tratada por PTH foi aproximadamente 3,5 vezes maior para a melhor condição observada (41,3%). Este resultado era esperado, uma vez que durante o tratamento oxidativo com ozônio, segundo a própria autora, vários compostos complexos oriundos da oxidação da lignina são formados e podem prejudicar a ação das enzimas devido a suas adsorções improdutivas nestes fragmentos.

Um dos motivos para os baixos valores de conversão enzimática à glicose observados para casca de café pré-tratada por PTH pode estar relacionado à baixa carga de enzimas usada durante o teste de HE, uma vez que o protocolo adotado para realização do teste não foi otimizado para à biomassa em estudo.

Alguns autores como Eriksson, *et al*. (2002), apresentam como alternativa para minimizar a adsorção improdutiva a adição de surfactante na HE. Os autores creditam a melhora no processo à capacidade da região hidrofóbica do surfactante de interagir mais facilmente com a lignina do que as enzimas, permitindo assim uma maior ação das enzimas celulolíticas sob a celulose.

No gráfico de Pareto apresentado na Figura 14 que mostra os efeitos das variáveis independentes sobre o RHE, é possível observar que assim como observado para os teores de celulose na composição da casca pré-tratada (‘g *Cel* / g CPT’), apenas a temperatura teve um efeito significativo (*p*-valor < 0,05) no *RHE*. Este resultado era esperado, uma vez que os usos de maiores temperaturas favoreceram a obtenção de uma fração sólida com maior teor de celulose e uma maior remoção de hemiceluloses e de lignina na biomassa pré-tratada, portanto, a celulose estará mais disponível e acessível ao ataque enzimático. Esses resultados corroboram com aqueles relatados por Imman, *et al*. (2017) para sabugo de milho, em que as maiores temperaturas empregadas no PTH favoreceram o aumento da hidrólise enzimática.

Figura 14: Diagrama de Pareto para o rendimento de hidrólise enzimática da casca de café pré-tratata por pré-tratamento hidrotérmico.



Conforme mencionando anteriormente, uma maior temperatura também levou a obtenção de menores teores de hemiceluloses na fração sólida, ou seja, ocorreu uma maior remoção deste componente na biomassa pré-tratada. Com um menor teor de hemiceluloses na biomassa, a

celulose se torna mais acessível ao ataque enzimático, melhorando assim, a conversão de celulose a glicose. A presença de hemiceluloses na biomassa dificulta o acesso das celulases à celulose devido ao impedimento físico, uma vez que elas diminuem a porosidade média do substrato, reduzindo, portanto, a acessibilidade das enzimas à celulose (Saritha *et al*. 2012).

Mussatto *et al*., (2008) demonstraram em seu estudo utilizando grãos usados de cervejaria que as hemiceluloses influenciaram diretamente no ataque das enzimas ao substrato (celulose), pois apesar do aumento do teor de lignina na amostra sólida gerada após o pré-tratamento com ácido diluído (solução de 1,25% (m/v) de H_2SO_4; razão liquido sólido igual a 8 ml g^{-1}, durante 17 minutos a 120° C), a redução do teor de hemiceluloses favoreceu o ataque das enzimas e consequentemente uma maior taxa de conversão à glicose. Os autores demonstraram ainda que uma etapa posterior de deslignificação deste material com hidróxido de sódio a 2% (m v^{-1}) a 120°C por 90 min, melhorou o rendimento de glicose em até 17,4% quando comparado com o material rico em celulose e lignina.

Uma explicação para a melhoria observada pelos autores é a remoção dos fragmentos de lignina liberados durante o PTH da superfície das fibras pelo tratamento com solução de NaOH. Conforme descrito por Baêta (2016), durante o PTH os fragmentos de lignina podem ficar aderidos à superfície da fibra, devido à baixa solubilidade dos mesmos no hidrolisado ácido, formando assim *droplets* de lignina aderidos na superfície da fração sólida. De acordo com Pan *et al*. (2005), a lignina além de criar uma barreira física impedindo o acesso das enzimas à celulose, pode se ligar as enzimas pelo módulo de ligação ao carboidrato, levando a uma adsorção improdutiva e impedindo sua atuação sobre a celulose.

A modificação na lignina da casca de café imposta pelo PTH pôde ser observada comparando os valores da relação entre lignina insolúvel por lignina solúvel em meio ácido da biomassa bruta e pré-tratada (Lig insolúvel/Lig solúvel) durante a caracterização feita pelo método Klason. Condições em que maiores valores da relação são encontrados, indica que existe predominância de uma lignina mais insolúvel na biomassa, quando se compara os valores entre a casca bruta e as cascas pré-tratadas é possível verificar o quanto que a lignina foi alterada durante o pré-tratamento, maiores valores da relação lignina insolúvel por lignina solúvel na casca pré-tratada quando comparado a casca bruta, é um indicativo que após o pré-tratamento uma lignina mais recalcitrante ficou remanescente na biomassa.

A partir da Tabela 9 é possível perceber que as condições de pré-tratamentos mais brandas com menor temperatura e tempo como as aplicadas para a condição 1, não tiverem diferenças significativas no valor da relação de lignina insolúvel por solúvel quando comparado a casca de café bruta. Para condições de baixa temperatura e elevado tempo como as condições 3 e 5, os valores da relação foram superiores aos observado para casca bruta. Estes resultados mostram que em baixas temperaturas uma maior modificação da lignina é observada com elevados tempos de pré-tratamento.

Já para as condições de temperaturas maiores ou igual à 160ºC observou-se que em baixos e altos tempos de contato a lignina é fortemente modificada em relação a lignina presente na casca bruta. É possível perceber que os valores da relação lignina insolúvel por solúvel para as condições 2, 6 e 8 são muito superiores ao observado para casca bruta, o que mostra que as ligninas remanescentes nas condições de PTH mais severas são mais quimicamente modificadas que aquelas submetidas a condições de PTH mais brandas.

Tabela 9: Relação de lignina insoúvel por lignina solúvel das amostras sólidas de casca de café brutas e pré-tratadas analisadas durante o método Klaison.

CE	Tempo	Temp	RLS	Lig insóluvel/ Lig solúvel
CB	-	-	-	6,7
1	20	120	7,5	7,1
2	20	200	7,5	33,3
3	90	120	7,5	20,0
4	90	200	7,5	25,0
5	55	120	5	20,0
6	55	200	5	25,0
7	55	120	10	25,0
8	55	200	10	50,0
9	20	160	5	25,0
10	90	160	5	50,0
11	20	160	10	25,0
12	90	160	10	33,3
13	55	160	7,5	25,0
14	55	160	7,5	25,0
15	55	160	7,5	25,0

Apesar do efeito da etapa de EA ser considerado positivo em algumas biomassas pré-tratadas, para a casca de café o efeito da EA após o PTH não foi efetivo para o aumento de desempenho da HE neste trabalho. A fração sólida gerada a partir do PTH da condição 6 obteve

um rendimento de HE de 41,4(±0,3)% sem a adição da etapa de EA. A mesma fração sólida após passar pela etapa de EA conforme descrito na seção 4.7, apresentou um *RHE* de 32,6%. Tais resultados são contrários aos observados por alguns autores, como por exemplo, Wu *et al*. (2018), que mostraram um aumento nos valores de *RHE* de 36,0% para 83,0% para a palha de trigo pré-tratada por PTH ao utilizar a etapa de EA.

Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar o efeito negativo da etapa de EA no valor de *RHE* da casca de café pré-tratada por PTH. Dentre elas, encontra-se a elevada perda de celulose para a fração líquida (extrato alcalino) observada durante o ensaio de EA para a casca de café pré-tratada hidrotermicamente. A partir do balanço de massa das frações sólidas antes e depois da etapa de EA da casca de café, foi possível observar que a EA removeu 34,8% de celulose da fração sólida. Uma explicação para esta elevada remoção de celulose pode estar relacionada a fragilidade da celulose deixada na fração sólida da casca de café após o PTH.

Conforme já discutido anteriormente, a temperatura teve um efeito significativo e positivo na solubilização da celulose durante o PTH, indicando que a celulose foi bastante atacada durante o pré-tratamento em elevadas temperaturas, e provavelmente houve redução de seu grau de polimerização. A elevada temperatura aplicada na condição 6 (200°C) durante o PTH pode ter deixado a celulose remanescente mais disponível, contribuindo assim para uma solubilização da celulose de baixa cristalinidade e/ou de baixo grau de polimerização durante a etapa de EA.

Ao avaliar o valor da remoção da lignina (9,6%) durante a EA da casca pré-tratada hidrotermicamente, é possível observar que esse valor não foi satisfatório, uma vez que a extração é considerada uma técnica mais seletiva para remoção de lignina do que de celulose. Em relação a remoção de hemiceluloses, como a maior parte da mesma já havia sido removida no PTH, nenhuma remoção foi observada durante a etapa de EA.

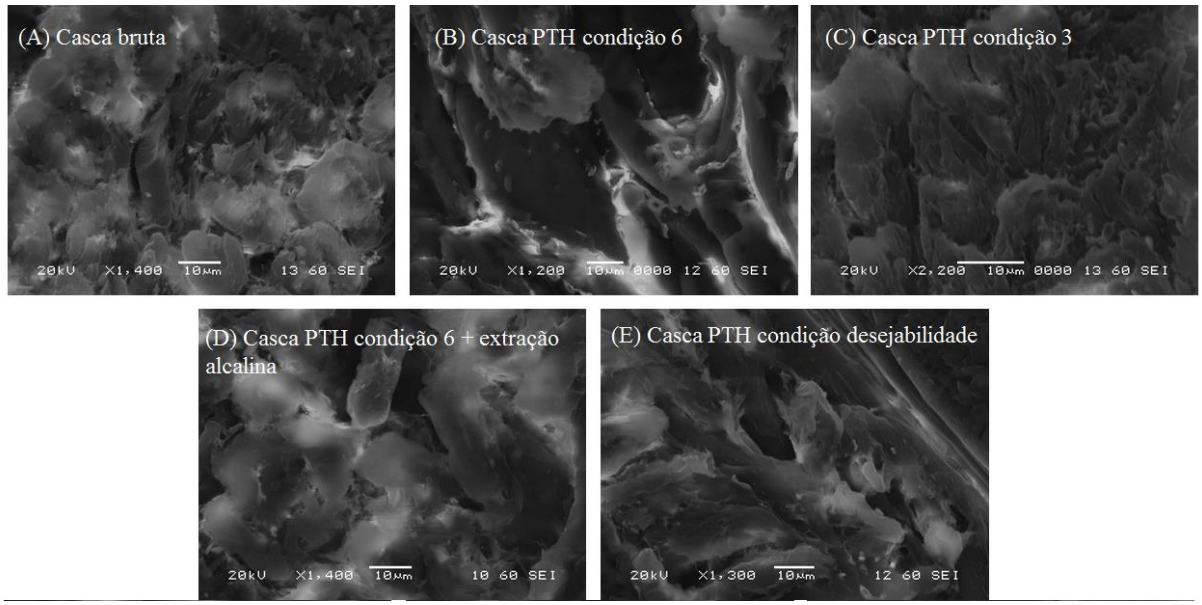
Quando se avalia a composição da fração sólida da casca de café após a etapa de EA (celulose = 44,9% ± 1,4, Lignina = 49,64% ± 2,3 e Hemiceluloses = 7,60 % ± 0,6) é possível observar algumas alterações em relação a composição da casca pré-tratada na condição 6 (Celulose = 48,25%, Lignina = 38,42% e Hemiceluloses = 4,79%). A fração gerada na EA apresentou um empobrecimento em termo de celulose de aproximadamente 4% e um enriquecimento em termos de lignina de 11,22%, o que evidencia que a EA para esta biomassa

não foi tão efetiva, uma vez que o enriquecimento final de celulose na mesma não ocorreu, resultando em teores menores do que os observados antes desta etapa.

Para melhor avaliar o efeito negativo da etapa de EA no valor de *RHE* da casca de café pré-tratada hidrotermicamente, uma análise estrutural da biomassa antes e depois da EA foi realizada em termos de morfologia e área superficial. A Figura 15 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura da casca de café bruta, pré-tratada hidrotermicamente antes e depois da EA. A partir da comparação das imagens apresentadas nas Figura 15(B) e (D) da fração sólida antes e depois da etapa de EA, respectivamente, é possível observar que a fração sólida antes da etapa de EA (Figura 15(B)) apresentava aparentemente ser um material mais poroso quando comparado com a fração sólida gerada após a EA (Figura 15D).

Além disso, a análise de área superficial realizada na fração sólida gerada no PTH da condição 6 antes da EA apresentou uma área superficial de 5,71 $m^2 g^{-1}$, enquanto a área superficial para a fração sólida da condição 6 submetida a EA apresentou área superficial igual a 0,0 $m^2 g^{-1}$. Valor igual ao observado para a casca de café bruta. A redução da área superficial da biomassa após a etapa de EA pode ser o motivo para redução de aproximadamente 9% no valor de *RHE* observado quando compara-se a fração sólida da condição 6 com e sem EA.

Figura 15: Imagem de MEV da casca de café bruta (A), casca do PTH na condição 6 (B), casca do PTH na condição 3 (C), casca do PTH na condição 6 + extração alcalina (D) e casca do PTH na condição desejabilidade (E).



A efetividade do PTH da casca de café no aumento do *RHE* pode ser confirmada avaliando as características morfológicas das frações sólidas geradas antes e depois do PTH. É possível observar que, até mesmo para a condição de pré-tratamento 3 (120°C, 90 min e *RLS* de 7,5 mL g^{-1}), que apresentou um menor valor de *RHE* (13,5%), o valor do *RHE* foi 4 vezes maior que o rendimento observado para casca de café bruta (3,7%). Para a condição de PTH que gerou o melhor substrato para HE, condição 6 (200°C, 55 min e *RLS* de 5 mL g^{-1}), o *RHE* foi 11 vezes superior ao observado para casca bruta, atingindo um valor de 41,4%.

Tais resultados indicam que, apesar de ainda não ter sido possível obter elevados rendimentos, o PTH foi eficiente em tornar a celulose da casca de café mais disponível para o ataque enzimático. Este aumento de acessibilidade provocado pelo PTH pode ser confirmado quando se avalia as imagens de MEV da casca de café bruta (Figura 16(A)), pré-tratada pela condição 3 (Figura 16(C)) e condição 6 (Figura 16(B)). A partir dessas imagens é possível observar que a condição 6, de elevada severidade (4,7), gerou uma fração sólida bastante modificada morfologicamente em relação a casca bruta. Já para a fração sólida obtida pela condição 3, de menor severidade (2,5), tal modificação não foi tão efetiva.

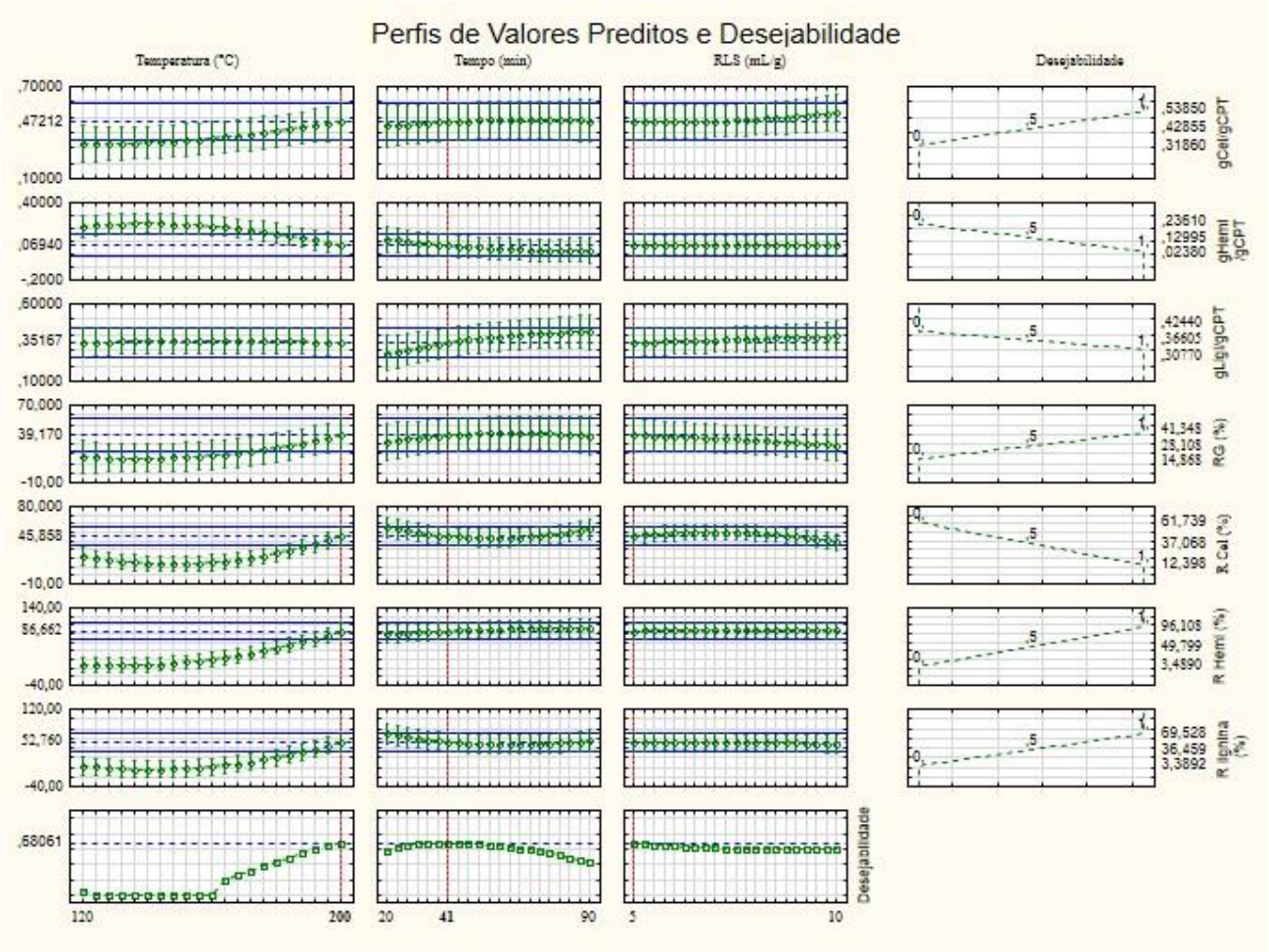
O efeito da severidade do PTH no aumento da área superficial da fração sólida e consequentemente no *RHE* pode ser observado comparando os valores de área superficial para casca de café bruta sem pré-tratamento (0,0 m^2 g^{-1}), casca pré-tratada pela condição 3, de severidade intermediária (1,19 m^2 g^{-1}) e casca pré-tratada pela condição 6, elevada severidade (5,79 m^2 g^{-1}). É possível observar que o aumento da severidade do PTH provocou um aumento na área superficial da fração sólida e, consequentemente, uma melhoria nos valores de *RHE*. Vários autores como Laureano-Perez *et al*. (2005) e Mosier *et al*. (2005), atribuem o aumento da área superficial da fração sólida após o pré-tratamento como sendo um dos principais motivos para a melhoria do desempenho da HE de materiais lignocelulósicos.

Para prever uma condição de PTH considerada capaz de gerar uma casca de café pré-tratada adequada para produção de etanol 2G, além do *RHE* o *RG* do processo foi estimado conforme apresentado na seção 4.8. Diferentemente do *RHE* que considera somente a etapa de HE, o *RG* considera a quantidade de glicose que entra no volume de contorno total, o qual é composto pela etapa de PTH e hidrólise enzimática. Para a melhor condição de pré-tratamento observada no planejamento experimental, condição 6, o *RG*, que considera a quantidade de

glicose recuperada na fase líquida da HE em relação a quantidade de glicose que entra no pré-tratamento da biomassa bruta, foi de 24,1%.

Conforme descrito na seção 4.8, um algoritmo de predição de desejabilidade que utiliza como dados de entrada diferentes variáveis reposta obtidas para as distintas condições de pré-tratamento foi utilizado para predizer qual seria a melhor condição de PTH para se obter o maior rendimento global de recuperação de glicose. Na Figura 16 é apresentado o perfil de valores preditos de acordo com o algoritmo, indicando a melhor condição de PTH, bem como as respostas preditas para cada uma das variáveis dependentes consideradas no estudo.

Figura 16: Perfil dos valores previstos para condição de desejabilidade de acordo com o algoritmo de predição.



Na Figura 17 é possível observar que o algoritmo apontou que a melhor condição de PTH para geração de uma fração sólida capaz de ser usada para produção de etanol 2G foi temperatura

200°C, tempo de 41 min e *RLS* de 5 mL g^{-1}. Os valores das variáveis dependentes previstas pelo algoritmo são apresentados na Tabela 9. A fim de avaliar a exatidão da previsão do algoritmo, o PTH na condição prevista foi realizado e a fração sólida gerada foi caracterizada e os valores de remoção de celulose, hemiceluloses e lignina determinados. O ensaio de hidrólise enzimática para fração sólida gerada foi realizado e os valores de *RHE* e *RG* foram calculados. A partir dos resultados apresentados na Tabela 9 é possível observar que o algoritmo apresentou uma exatidão considerada satisfatória com valores entre 70 e 110% para todas as variáveis respostas.

Tabela 9: Valores das variáveis dependentes para condição de desejabilidade prevista pelo modelo e as obtidas experimentalmente.

	***Cel* / (%)**	***Hemi* / (%)**	***Lig* / (%)**	**Balanço**	***RCel* / (%)**	***RHemi* / (%)**	***RLig* / (%)**	***RHE* / (%)**	***RG* / (%)**
Previsto	47,2	6,9	35,2	89,3	45,9	86,7	52,8	-	39,2
Observado	47,9±1,7	5,8±0,4	38,2±1,2	93,3±2,4	43,1±1,3	89,5±0,8	47,4±1,1	51,3±2, 3	29,3±2,1
Exatidão (%)	101,6	83,4	108,7	104,4	94,0	103,3	89,8		74,7

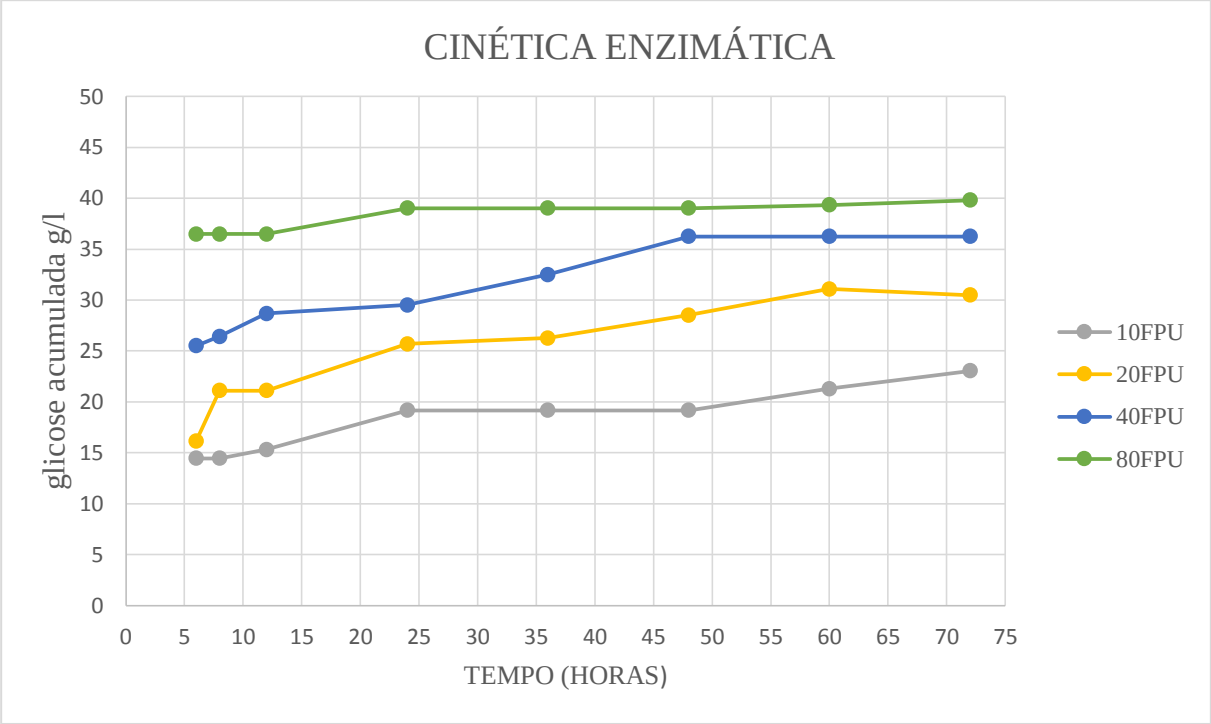
Avaliando o valor de *RHE* experimental obtido a partir da fração sólida pré-tratada na condição de desejabilidade prevista pelo algoritmo (51,30%), e comparando com o valor de *RHE* para a melhor condição observada durante o planejamento experimental condição 6 (41%), é possível observar que a condição prevista pelo algoritmo foi capaz de gerar um substrato mais adequado para a HE. Considerando o valor de *RG*, é possível observar que a condição de desejabilidade apresentou um valor superior (29,3%) aos 24,1% observados para a condição 6. A condição de desejabilidade prevista pelo algoritmo (200°C, 41 min e *RLS* de 5 mL g^{-1}) diferiu da condição 6 do planejamento experimental (200°C; 55 min e *RLS* de 5 mL g^{-1}) somente na variável tempo.

Na condição de desejabilidade, o PTH foi realizado em tempo mais curto (41 min) quando comparado ao PTH na condição 6 (55 min). De acordo com o discutido anteriormente, tempos mais longos de PTH combinados com elevadas temperaturas podem provocar a repolimerização de fragmentos de ligninas na fração sólida, e, portanto, tais fragmentos por sua vez podem interagir com as enzimas celulolíticas impedindo que as mesmas acessem a celulose de forma efetiva. Possivelmente, esta seja a explicação para o maior valor de *RHE* observado para condição de desejabilidade quando comparado ao valor de *RHE* observado para a fração sólida gerada no PTH na condição 6 (tempo mais longo).

5.1.2. *Avaliação do efeito da carga enzimática no RHE*

Visando avaliar o efeito da utilização de uma maior carga de enzimas na conversão enzimática da celulose a glicose com o objetivo de aumentar o rendimento global do processo, avaliou-se a HE da casca de café na condição de desejabilidade para etanol. Foram realizados testes para avaliar a cinética da HE para cargas enzimáticas iguais a 10, 20, 40 e 80 FPU g de casca em base seca^{-1} e os resultados são apresentados na Figura 17.

Figura 17: Cinética enzimática para diferentes cargas de enzima pra CDE



Nota-se que as concentrações de glicose nos testes sobem de 23,05 g L^{-1} com uma carga enzimática de 10 FPU para 30,48 g L^{-1}, 36,25 g L^{-1} e 39,81 g L^{-1} ao utilizar cargas enzimáticas de 20, 40 e 80 FPU respectivamente. O aumento da carga enzimática mostrou uma relação proporcional com a conversão de celulose a glicose, o que aumenta o RHE.

Por outro lado, observa-se que ao aumentar a carga enzimática de 40 para 80 FPU g de casca em base seca^{-1} a concentração de glicose aumentou em aproximadamente 3 g L^{-1} (aumento do RHE de 75,33% para 83,07%., Pensando-se em uma aplicação em um processo industrial, este aumento pode não ser atrativo, uma vez que o dobro da carga enzimática apresentou pouca melhora no rendimento e concentração de glicose. Portanto, visando um aumento na conversão

enzimática, porém avaliando-se um melhor custo benefício a carga enzimática de 40 FPU pode ser considerada como carga ideal. Para tal carga o rendimento global do processo foi de 50,01%, alor superior aos 29% observados para a carga enzimática de 10 FPU g de casca em base seca^{-1}.

5.1.3. *Conclusões a respeito do desempenho do pré-tratamento hidrotérmico e o efeito do mesmo na hidrólise enzimática*

Em relação ao objetivo específico I que aborda a questão do efeito das variáveis independentes temperatura, tempo e RLS no pré-tratamento dá casca de café foi possível concluir de forma geral, que a variável temperatura apresentou efeito positivo sobre a remoção dos três constituintes majoritários da biomassa, ou seja, maiores temperaturas no processo resultam em maiores solubilizações de celulose, hemicelulose e lignina.

Já a variável tempo mostrou-se efeito positivo para remoção da celulose e hemicelulose, porém, para a variável remoção de lignina sua interação com a temperatura apresentou efeito negativo, isto permite concluir que maiores temperaturas e tempo de pré-tratamento diminuem a remoção de lignina pelo efeito da condensação e repolimerização durante o processo. Sobre a RLS foi possível concluir que esta variável não apresenta efeito significativo na remoção de nenhum dos constituintes majoritários, o que indica que condições que utilizem menores quantidades de água e consequentemente impacte menos o ambiente sejam preferidas. Em relação ao pré-tratamento, também foi possível concluir que a menor concentração de grupos acetila na estrutura da casca de café pode ter sido o fator responsável pela necessidade de maiores temperaturas para remoção da hemicelulose.

No que diz respeito ao objetivo específico II, o qual visou avaliar a melhor condição de pré-tratamento para gerar um substrato com maior qualidade para hidrólise enzimática, foi possível concluir que a condição que apresentou melhor rendimento (RHE-75,33%) foi a condição de pré-tratamento de 200°C, 41 min e *RLS* de 5 mL g^{-1} com uma carga enzimática de 40 FPU g de substrato $seco^{-1}$. Entretanto, nessa temperatura foram observadas altas perdas de massa e grande remoção de celulose durante o pré-tratamento, o que proporcionou baixos rendimentos globais (RG ~50%) no processo de recuperação de glicose e permitiu concluir que a utilização da fração de celulose perdida durante o pré-tratamento na fração líquida, juntamente com a fração de hemicelulose, deveriam ser consideradas um substrato potencial para geração de outros produtos como, por exemplo, o biogás.

Já sobre o objetivo específico III, o qual teve o intuito de verificar o efeito da inclusão da etapa de extração alcalina na melhoria do rendimento da hidrólise enzimática foi possível concluir que a implementação desta etapa para a casca de café não surtiu efeito positivo, haja

vista que durante o processo observou-se elevadas perdas de celulose da fração sólida para fração líquida, o que provocou uma redução da composição da celulose no substrato que foi submetido a hidrólise enzimática.

5.2. Efeito do pré-tratamento hidrotérmico no hidrolisado hemicelulósico e produção bioquímica de metano a partir da casca pré-tratada

Conforme observado anteriormente, o pré-tratamento para casca de café mostrou que a biomassa em questão necessita de elevadas temperaturas para atingir boas solubilizações de hemicelulose, no entanto, em condições mais severas também se observa uma elevada solubilização de celulose para fração líquida. A solubilização de parte das hexoses que poderiam ser usadas para produção de etanol utilizando a fração sólida do PTH, abre a possibilidade para avaliar a utilização da fração sólida e líquida remanescente ao pré-tratamento para produção de outros biocombustíveis como o biogás por digestão anaeróbia.

Na Figura 18 são apresentados os diagramas de Pareto, os quais são responsáveis por mostrarem o efeito das variáveis independentes do pré-tratamento nas variáveis respostas que definem a característica dos hidrolisados gerados para serem usados em um processo de digestão anaeróbia. Para tanto, a caracterização dos hidrolisados com base na concentração em g/L de DQO e/ou outros compostos observados no hidrolisado é apresentada na Figura 19 (A e B). As variáveis foram estudadas em g L^{-1} uma vez que se considerou que a concentração destes compostos no hidrolisado é o que possui influência nos testes de PBM. É valido destacar que, por utilizar as concentrações dos compostos, a RLS tem efeito significativo sempre, entretanto, tal comportamento é esperado uma vez que baixas RLS acarretam em maiores concentrações no final do processo.

Na Figura 18 (A) e na Figura 19 (A) é possível observar que a temperatura teve um efeito significativo positivo na concentração de DQO do hidrolisado em relação à massa de casca bruta de entrada no PTH. Tal comportamento atribui-se ao fato de altas temperaturas solubilizarem maiores teores de compostos da biomassa, disponibilizando-os assim para a fração líquida.

Além da temperatura, observa-se um efeito significativo negativo da interação das variáveis independentes tempo e temperatura. A interação negativa destas variáveis pode ser

observada ao avaliar a DQO de condições mais severas. Por exemplo, em 200 °C e RLS 10 ml g^{-1}, observa-se uma redução da concentração de DQO ao aumentar o tempo de 20 para 90 minutos (condições 2 e 4), indicando que em altas temperaturas ocorre maior solubilização de DQO. Por outro lado, altos tempos podem contribuir, como já foi discutido anteriormente, com as reações repolimerização ou condensação de fragmentos de matéria orgânica até então solúveis. Esta repolimerização pode, por sua vez, contribuir para diminuição da concentração de DQO no meio.

É importante destacar também que a casca de café apresentou baixa solubilização da DQO durante o PTH. Por exemplo, para a condição 12 (160°C, 90 min e 10 mL H_2O gCC^{-1}), aquela que apresentou no hidrolisado uma maior quantidade de DQO solubilizada em relação a quantidade de DQO que entra no pré-tratamento por massa de casca bruta, observa-se que apenas 13,6% da DQO disponível na casca bruta (1,29 gDQO g casca $bruta^{-1}$) foi solubilizada. Já para as condições de menor solubilização, como a condição experimental 1 (120°C, 20 min e 7,5 mL H_2O gCC^{-1}), esse valor é reduzido para 4,6% de solubilização. Isto mostra que em termos de solubilização de DQO o PTH não foi tão efetivo, mostrando que uma parte da matéria orgânica presente na biomassa não é solubilizada durante o pré-tratamento hidrotérmico. Outra possível justificativa é a oxidação de compostos a alta temperatura, reduzindo a disponibilidade de DQO solúvel.

Avaliando-se a concentração de açúcares redutores, Figura 19, é possível perceber que as condições de temperatura igual a 200 °C (condições experimentais 2, 4, 6 e 8) foram as que obtiveram uma maior solubilização dos açúcares redutores por grama de casca bruta alimentada no pré-tratamento. Tais resultados estão de acordo com o comportamento observado para o efeito do pré-tratamento nas características da fração sólida, uma vez que apenas para esta temperatura foram observadas remoções consideráveis de celulose e hemicelulose da fração sólida para fração líquida.

Figura 18: Gráficos de Pareto para as variáveis respostas dos hidrolisados

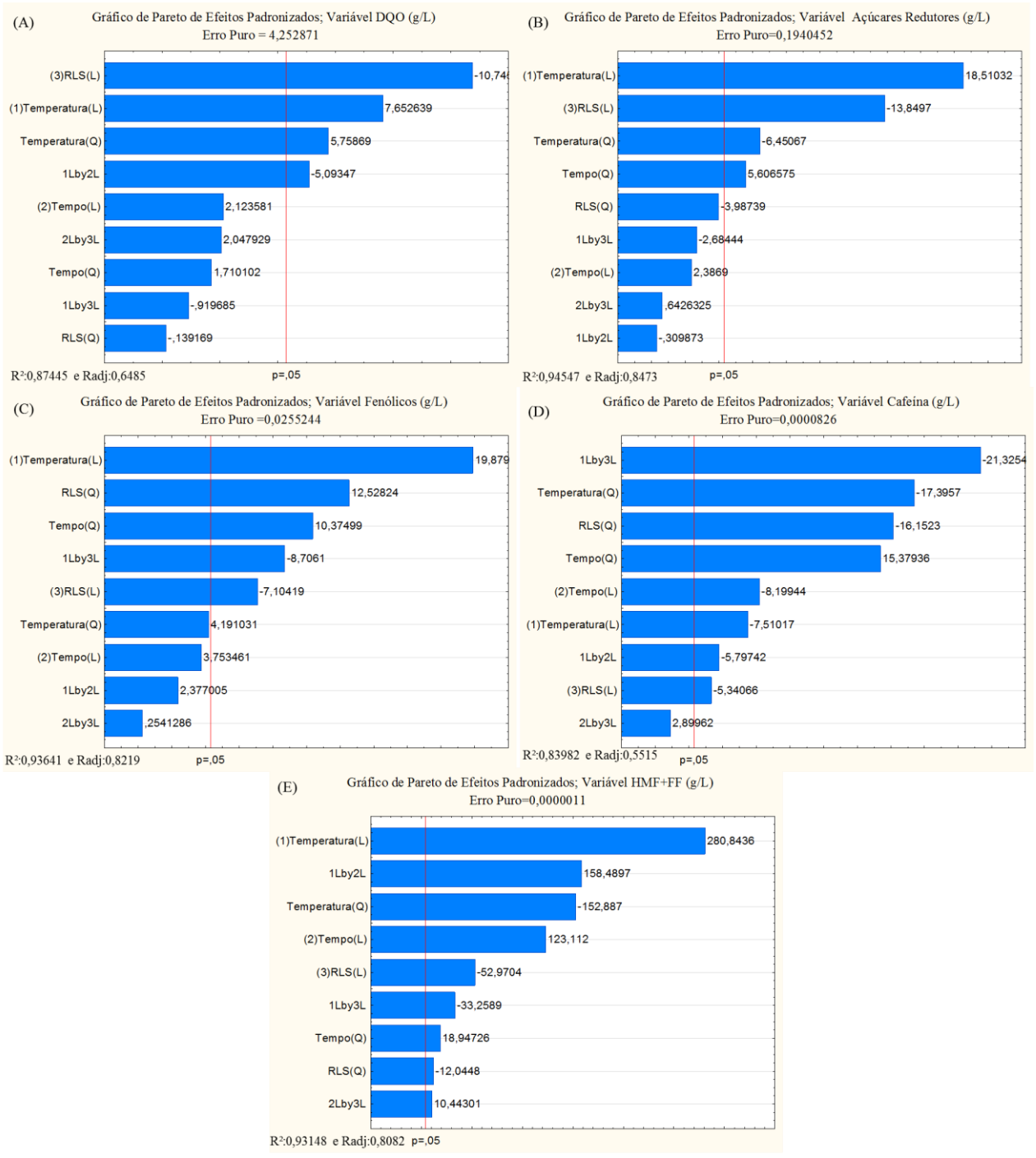
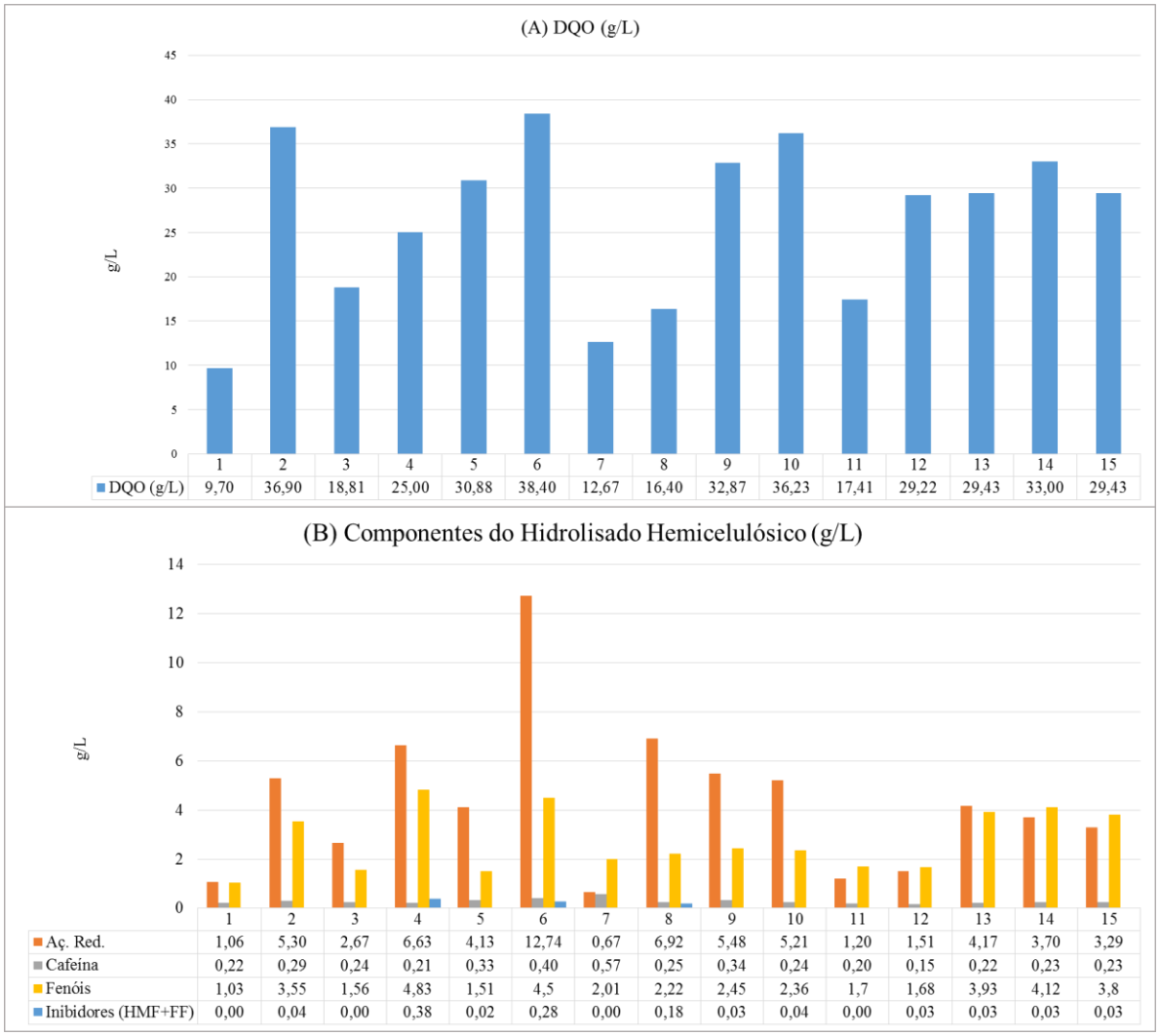


Figura 19: Concentração dos compostos do hidrolisado(a) DQO (B) açúcares redutores, cafeína, fenóis, HMF, FF e fenóis.



A Figura 18 (B) apresenta o diagrama de Pareto da variável resposta açúcares redutores. Observa-se que a variável independente temperatura teve um efeito significativo (positivo) na quantidade de açúcares redutores, indicando que quanto maior a temperatura, maior o teor de açúcares redutores no hidrolisado hemicelulósico gerado no PTH, o que era esperado, uma vez que em maiores temperaturas observa-se uma hidrólise mais efetiva dos carboidratos presentes na biomassa. Este efeito da temperatura na concentração de açúcares na fração solúvel de pré-tratamento hidrotérmico foi observado por Wang *et al*. (2018) ao pré-tratar hidrotermicamente a palha de arroz (10% de sólidos e 15 minutos) . Os autores observam um aumento de glicose de 1,3 g L^{-1} para 1,9 g L^{-1} e xilose de 0 g L^{-1} para 0,3 g L^{-1} ao aumentar a temperatura de pré-

tratamento de 90 para 210 °C indicando que a hidrolise dos açúcares aumentou com a severidade do tratamento.

Na Figura 18 (D) é apresentado o diagrama de Pareto da variável concentração de cafeína. Para esta variável resposta, as variáveis independentes tempo e temperatura apresentaram efeito significativo negativo. Diante dos resultados, é possível afirmar que maiores temperaturas e tempos contribuem para menores quantidades de cafeína na fração líquida. O efeito negativo da temperatura na cafeína pode ser avaliado comparando a concentração da substância no hidrolisado da condição 8 (200°C; 55 min e RLS de 10 mL H_2O gCC^{-1}) com a condição 7, em que, a única diferença foi a temperatura (120°C). De acordo com o apresentado na Figura 19 (B) o valor da concentração de cafeína para condição de menor temperatura (condição 7 - 0,57g L^{-1}) foi 128% maior que a observada para condição de maior temperatura (condição 8 - 0,25g L^{-1}).

Uma possível explicação para este comportamento esteja associada ao ponto de ebulição da cafeína (178°C), em temperaturas superiores como a utilizada na condição 8 (200°C), parte da cafeína pode ser perdida do sistema na forma de vapor ou até mesmo degradada em outros compostos voláteis que saem durante abertura do reator após pré-tratamento na forma de vapor. Os valores da concentração de cafeína no hidrolisado podem ser importante uma vez que, segundo estudo desenvolvido por Prabhudessai *et al.* (2009), concentrações maiores de cafeína no meio foram capazes de melhorar a performance dos microrganismos, aumentando a produção de biogás, uma vez que este composto pode atuar como estimulante para os microrganismos.

Para avaliar qual das condições de PTH geraria a maior quantidade de inibidores pela desidratação de açúcares, as concentrações de FF e HMF foram avaliadas em conjunto. Observa-se na Figura 18 (E) que maiores temperaturas e maiores tempos (efeitos significativos positivos) favoreceram para uma maior formação destes inibidores no hidrolisado. Na **Figura 19** (B) é possível observar que só ocorre a formação de HMF nas condições de temperatura igual a 200°C (2, 4, 6 e 8) que são aquelas nas quais ocorre maior solubilização de celulose. Já a formação de FF, ocorre também além das condições de 200ºC, nas condições de 160°C e tempo superior a 55 minutos.

Observa-se também que as maiores temperaturas além de contribuírem para maiores conversões de açúcares em produtos de inibição (FF e HMF), também apresenta efeito significativo positivo, Figura 18 (C), na solubilização de compostos fenólicos. Quando se compara na Figura 19 (B) a concentração de compostos fenólicos na condição 5 (1,51 g fenólicos L^{-1}) com a condição 8 (2,22 g fenólicos L^{-1}), em que o que difere é a temperatura de 120°C para condição 5 e 200°C para condição 8, percebe-se o efeito positivo da temperatura na solubilização destes compostos.

5.2.1. *Potencial bioquimico de produção de metano (PBM) da casca de café*

Em função das diferenças observadas nas características da fração hidrolisada após o pré-tratamento térmico e com intuito de minimizar o número de experimentos para avaliar a digestão anaeróbia da fração pré-tratada e pensando na possibilidade de utilizar o melhor hidrolisado como substrato para DA foram gerada condições para levar para a DA visando produção de biogás, conforme descrito no item 4.10 da metodologia. Considerando algumas variáveis respostas observadas para o hidrolisado, utilizou-se a ferramenta de desejabilidade para predizer algumas condições de pré-tratamento de acordo com os critérios estabelecidos pelo pesquisador (Tabela 6), as escolhas tiveram como intuito avaliar a produção de biogás do hidrolisado pré-tratado em diferentes condições de pré-tratamento.

As variáveis respostas que direcionaram a definição das condições de pré-tratamento desejáveis foram a concentração de açúcar redutor e de fenóis na fração hidrolisada, a escolha destas variáveis ocorreu, pois, o açúcar é teoricamente a fonte de carbono de mais fácil degradação para os microrganismos e os compostos fenólicos são considerados inibidores para o processo de digestão anaeróbia (Battista *et al*. 2014). A partir da utilização da ferramenta de desejabilidade e com base nas atribuições de peso dada para as variáveis respostas, três condições de desejabilidade foram avaliadas.

A primeira condição CDB1 (120°C; RLS 5 $mL.g^{-1}$; 20 min) teve como objetivo atingir uma condição de pré-tratamento capaz de produzir um hidrolisado com o máximo de açúcares redutores possível e com a menor concentração possível de fenóis, já a segunda condição CDB2 (189°C; RLS 5 $mL.g^{-1}$; 90 min) teve como objetivo buscar uma elevada concentração de açúcar e concentração intermediaria de compostos fenólicos, ao passo que a terceira condição CDB3 (200°C; RLS 5 $mL.g^{-1}$; 61 min) buscou alcançar elevadas concentrações de açúcar e elevadas

concentrações de compostos fenólicos no hidrolisado. A composição das frações sólida e líquida gerada nestas condições são apresentados na Tabela 10 e Figura 20.

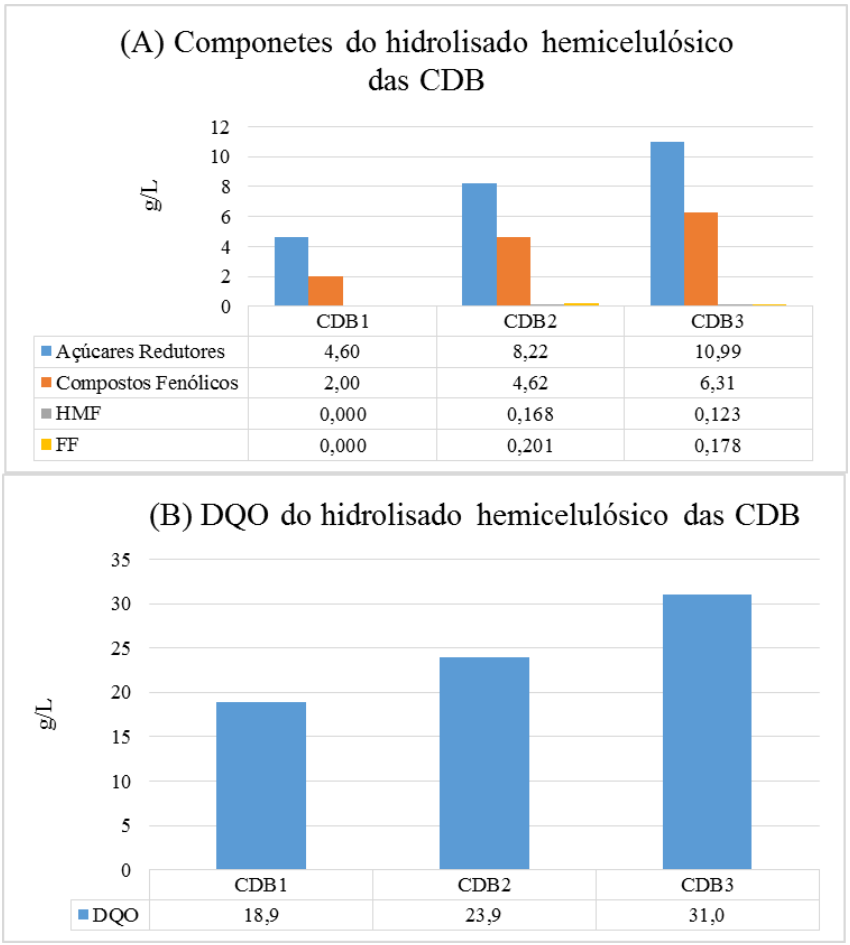
Tabela 10: Caracterização da fração sólida gerada para as CDB

CE	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)	Balanço (%)	Remoção Cel (%)	Remoção Hemi (%)	Remoção Lig (%)
CDB1	30,6±0,2	21±5,0	37,5±0,5	89,15	31,77	28,27	2,90
CDB2	36,6±1,7	11,1±1,2	38,1±4	85,8	35,86	70,20	22,47
CDB3	48,1±2,1	7,8±0,2	40,7±3,8	96,6	38,12	84,63	39,20

A partir da Figura 20(A) é possível perceber que, o comportamento observado durante o pré-tratamento realizado nas condições estabelecidas de acordo com o planejamento experimental foi o mesmo observado nas condições de desejabilidade para produção de biogás. Observou-se que a condição mais severa, CDB3 (log Ro = 4,73), gerou um hidrolisado com maior concentração de açúcar quando comparado as condições menos severas como as condições CDB1 (log Ro = 4,57) e CDB2 (log Ro = 1,84). Além disso, foi possível perceber que da mesma forma que o observado nos ensaios do planejamento experimental, as condições de maiores severidades geraram também hidrolisados com maiores concentrações de fenóis. Na Figura 21 (B) conforme já era esperado, as maiores severidades no pré-tratamento provocaram maiores solubilizações na matéria orgânica, o que pode ser confirmada pelas maiores concentrações de DQO no hidrolisado das condições DQO CDB3 > CDB2 >CDB1.

Visando avaliar a possibilidade do uso integral de toda a fração pré-tratada gerada durante o pré-tratamento (fase sólida + líquida), bem como compreender como a digestão anaeróbia acontece na fração sólida e líquida separadamente, realizou-se os ensaios de digestão anaeróbia de forma que todas as frações da biomassa pós pré-tratamento fossem aproveitadas. Além de avaliar a digestão do hidrolisado e da fração sólida de forma separada, também foi avaliada a digestão das partes sólida e liquida (S+L) em conjunto, ou seja, como saem do reator de pré-tratamento. Tal estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de usar a casca pré-tratada diretamente para produção de biogás sem a necessidade de utilização de uma unidade de operação unitária para separação das frações.

Figura 20 Concentração dos compostos do hidrolisado (A) açúcares redutores, fenóis. HMF, FF e inibidores e (B) DQO



A digestão da casca bruta também foi avaliada para fim de comparação da eficiência do pré-tratamento no aumento da biodegradabilidade da casca de café. Desta forma, para cada condição de desejabilidade para biogás foram realizados os ensaios de potencial bioquímico de metano (PBM) com a fração líquida (L), fração sólida (S) e fração sólida e líquida (S+L). Na Tabela 11 são apresentados os valores da concentração inicial nos testes de PBM dos compostos fenólicos, açúcares redutores e DQO e na Figura 21 são apresentadas as produções acumuladas de metano ao final do teste para as condições estudadas.

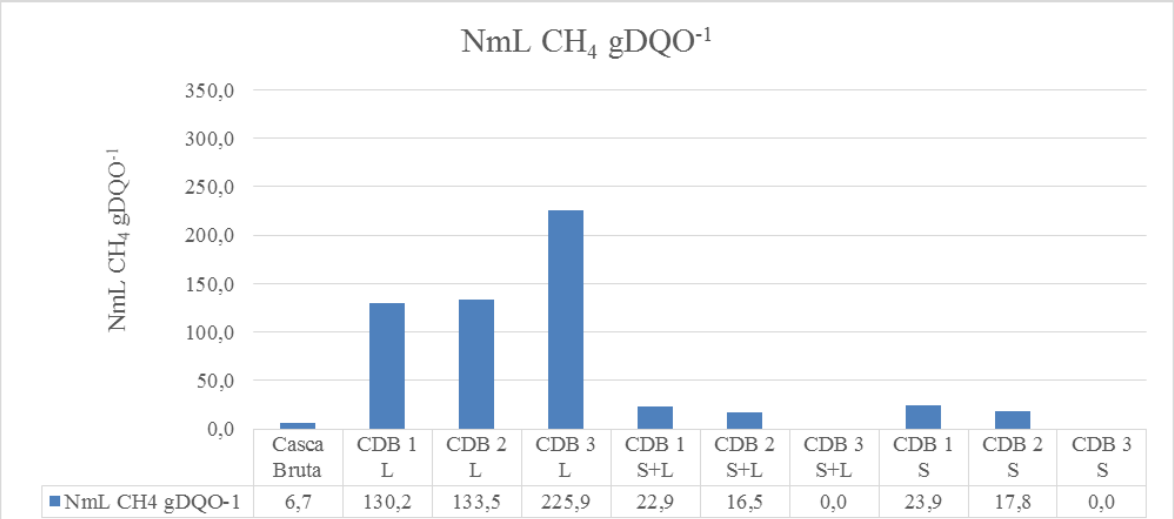
Avaliando a Figura 21 é possível perceber que de forma geral o PTH foi eficiente na produção de biogás em relação a casca de café bruta. Isto pode ser facilmente observado comparando o valor da produção de biogás da casca bruta com as frações sólidas (S) e (S+L)

das condições de menores severidades CDB 1 e 2. O aumento na produção de biogás observado na fração sólida após o pré-tratamento, pode estar associado ao fato do pré-tratamento deixar os açúcares nestas duas condições mais hidrolisáveis e acessíveis aos microrganismos, principalmente quando comparados aos açúcares presentes na caca bruta, os quais se apresentam intactos na estrutura da biomassa, bem como aqueles presentes nas condições mais severas, os quais apesar de estarem hidrolisáveis, estão acompanhados de altas quantidades de fragmentos fenólicos liberados durante o pré-tratamento nestas condições.

Tabela 11: Caracterização de alguns compostos na entrada dos ensaios de PBM

Condição	Fenólicos (g/L)	DQO (g/L)	Holocelulose (g/L)	Açúcares Redutores (g/L)	Açúcares Totais (g/L)
Casca Bruta	0,2	119,2	52,1	0	52,1
CDB 1 L	0,2	4	0	0,5	0,5
CDB 2 L	0,4	5	0	0,8	0,8
CDB 3 L	0,6	6	0	1,1	1,1
CDB 1 S+L	0,4	86,5	17,7	1,1	18,8
CDB 2 S+L	0,8	106,5	13,6	2,9	16,5
CDB 3 S+L	1,7	116,8	19,1	4,2	23,3
CDB 1 S	0,2	145,2	24,4	0	24,4
CDB 2 S	1,1	131,3	20,6	0	20,6
CDB 3 S	4,6	138	28,7	0	28,7

Figura 21: Produção acumulada de CH_4



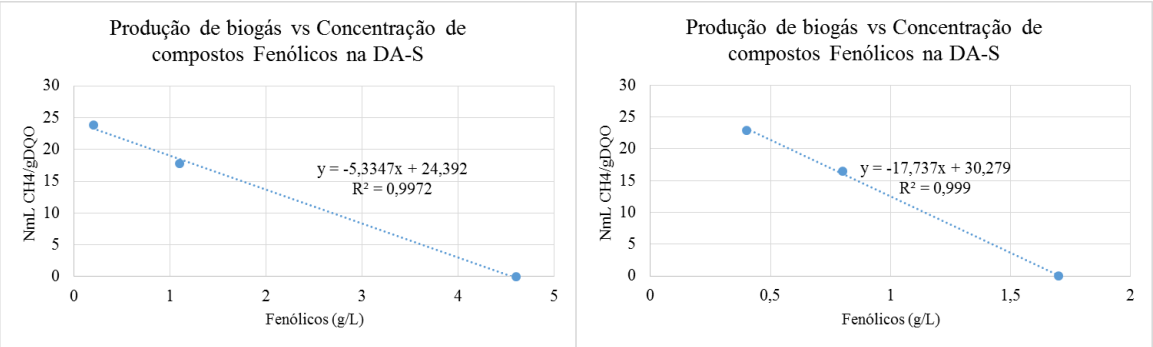
Por outro lado, as digestões S e S+L da condição CDB 3, maior severidade (4,73) apresentou uma maior solubilização dos açúcares da fração sólida para fração líquida, o que tornou a fração sólida mais rica em lignina e compostos inibitórios, como os compostos fenólicos. Monlau *et al*. (2014) descrevem que os compostos fenólicos podem danificar as células dos organismos presentes no consórcio microbiano da DA, alterando seletivamente a permeabilidade da membrana, o que os tornam mais tóxicos que os furanos. Os autores destacam ainda que os compostos fenólicos de baixo peso molecular são aqueles considerados mais tóxicos para os microrganismos. Portanto, a alta concentração destes compostos observados no início dos testes de PBM das condições CDB 3S e CDB 3S+L conforme apresentando na Tabela 11, pode ter interferido na estabilidade dos microrganismos, o que provocou uma inibição na produção de metano nestes testes.

Comparando-se as DA das condições 1 e 2 nos estados sólido (S) e semissólido (S+L), observa-se uma leve redução na produção de biogás das condições CDB 1 S (23,9 NmL CH_4 $gDQO^{-1}$) para CDB 2 S (17,8 NmL CH_4 $gDQO^{-1}$) e CDB 1S+L (22,9 NmL CH_4 $gDQO^{-1}$) para CDB 2 S+L (16,2 NmL CH_4 $gDQO^{-1}$). Essa redução na produção de biogás apresentou relação com o aumento da concentração de compostos fenólicos no início dos ensaios de PBM nas frações sólida e sólida mais líquida da condição 1 para condição 2, aumentos de 100 a 500% na concentração de fenóis foram observados.

Também foi possível verificar uma redução na produção de biogás ao digerir as frações sólida e liquida em conjunto quando comparada com as frações sólida e liquida separadamente para todas as condições de pré-tratamento. Este decréscimo na produção de biogás pode estar associado ao fato de, ao tentarem digerir as frações em conjunto, os microrganismos poderem utilizar a fração sólida como meio de suporte. Entretanto, como nesta fração sólida possui grande quantidade de compostos fenólicos, os quais prejudicam o metabolismo dos microrganismos, a digestão dos açúcares que se encontram solúveis na fração liquida se vê prejudicada. A Figura 22 mostra que a relação entre a concentração de fenóis e produção de biogás seguiu uma relação linear inversamente proporcional. Além disso, é valido ressaltar que à medida que a severidade do pré-tratamento aumenta, a concentração de fenóis aumenta e a produção de biogás diminui.

A grande quantidade de fenóis observada nas condições sólida e semissolida pode ter contribuído para aumento da fase lag na digestão anaeróbia destas condições conforme pode ser observado na Tabela 12. O estudo de Poirier *et al*. (2016) que mostrou que maiores concentrações de fenóis aumentaram a fase lag da DA corroboram para esta observação. Além disso, Chapleur *et al.* (2016) mostraram que concentrações de fenóis de 1,00, 1,50, 2,00 e 4,00 g/L reduziram respectivamente 10, 29, 78 e 98% a produção de metano em relação ao frasco controle. Poirier e Chapleur (2018), destacam ainda que, a suplementação do meio com carvão ativado foi eficiente em reduzir a inibição causada por este composto e melhorar a porução de metano. Portanto, pode-se atribuir a extensa fase lag das condições de maior severidade à presença de fenóis no sistema. Exceto para casca bruta, a qual a concentração de fenólicos é baixa, e sua fase lag se deve a difícil degradação dos seus compostos, os quais estão com sua estrtura intactas.

Figura 22: Relação entre a concentração de fenóis e produção de biogás nos testes S e S+L



Não foram encontrados trabalhos na literatura que tenham avaliado o efeito da digestão da casca de café submetida ao pré-tratamento hidrotérmico separando-se as frações sólida e líquida. Todavia, foi possível comparar os resultados com outras biomassas e com a casca de café pré-tratada com outros pré-tratamentos. Por exemplo, Chandra *et al.* (2012) observaram em seu trabalho um aumento de 220% na produção de metano para palha de arroz pré-tratada hidrotermicamente a 200 °C durante 10 minutos em relação à palha não tratada. O aumento observado pelos autores foi de 59,8 ml CH_4 g SSV^{-1} para 132 ml CH_4 g SSV^{-1}. No presente trabalho, para a DA da fração sólida da casca de café na melhor condição de pré-tratamento, houve um aumento de produção de metano de 356%, de 13,12 ml CH_4 g SSV^{-1} na casca bruta para 40,08 ml CH_4 g SSV^{-1} para a fração sólida gerada na condição CDB 1S.

Já Baêta *et al.* (2017) e Passos *et al*. (2018) obtiveram resultados interessantes para a casca de café em condições semíssólidas (S+L) quando ambos realizaram o pré-tratamento hidrotérmico por explosão a vapor. O primeiro obteve uma produção de CH_4 para condição de pré-tratamento de 120 °C e 60 min de 144,96 NmL CH_4 $gDQO^{-1}$, enquanto o segunto obteve uma produção de 196 NmL CH_4 $gSSV^{-1}$. A explicação para o maior rendimento nos dois trabalhos citados pode estar relacionada ao fato do pré tratamento utilizado pelos autores ter sido a explosão a vapor. Este pré-tratamento permite uma maior fragmentação da biomassa quando comparada com o pré-tratamento hidrotermico sem vapor. Desta forma, os componentes da biomassa lignocelulósica encontram-se mais disponíveis a ação dos microrganismos.

A explosão a vapor também gera menos compostos fenólicos como subprodutos do pré tratamento, uma vez que durante a despresurização que ocorre no processo parte dos fenóis voláteis saem do sistema junto com o vapor. Além disso, Passos *et al*. (2018) mostrou que o pré-tratamento por explosão a vapor da casca de café e a biomassa algal em conjunto e sua co-digestão apresentou efeito positivo sobre a produção de biogás. Ambos os autores que realizaram o pré-tratamento por explosão a vapor da casca de café, como o observado neste trabalho para o pré-tratamento hidrotérmico sem a utilização de vapor, observaram também que as condições de pré-tratamento mais severas não são ideais para produção de biogás, sendo as condições mais brandas as mais indicadas para esta finalidade.

Em relação à digestão anaeróbia dos hidrolisados gerados pelo pré-tratamento da casca de café, Santos *et al*. (2018) obtiveram para sua melhor condição de pré-tratamento oxidativo (RLS de 10 mL/g, PTH 11 e COEA de 18,50 mg O_3g $cascas^{-1}$) a produção de 91,1 NmlCH_4 $gDQO^{-1}$ sem adição de carvão ativado durante a digestão anaeróbia, e 218,2 NmlCH_4 $gDQO^{-1}$ na mesma condição quando 4 g L^{-1} de carvão ativado foi adicionado durante o bioprocesso. No presente trabalho, a condição que gerou um hidrolisado que resultou em uma melhor biodegradabilidade foi a CDB 3 L, atingindo uma produção de 225,9 NmlCH_4 $gDQO^{-1}$. A biodegradabilidade deste efluente calculada tomando como base a produção teórica máxima (350 NmL CH_4 $gDQO^{-1}$) foi de aproximadamente 64%.

Para a fração líquida, diferentemente do observado para as frações sólidas e semissólida a condição de pré-tratamento de maior severidade foi aquela que gerou um hidrolisado com

maior biodegradabilidade, isto pode ser interessante, uma vez que conforme observado anteriormente as condições mais severas foram aquelas que apresentaram uma fração sólida com maiores rendimentos de hidrólise enzimática. A produção destes dois biocombustíveis em conjunto, usando a fração sólida e líquida pode ser uma alternativa para viabilizar a utilização da casca de café como matéria prima para uma biorrefinaria.

As condições de menores severidades CDB 1 L e CDB 2 L geraram hidrolisados com biodegradabilidade de 37,2% e 38,4%, respectivamente. Na digestão anaeróbia da fração líquida os ensaios com maiores concentrações de fenóis foram aqueles que obtiveram maiores produções de biogás. Em todas as condições conforme pode ser observado na Tabela 11 a concentração de fenóis foram inferiores a 1,0 g L^{-1}, quantidade a partir da qual Chapleur *et al.* (2016) observou influência negativa de 10% na produção de biogás em um estudo em que avaliou o efeito da concentração de fenóis na produção de biogás, isto pode explicar melhores índices biodegradabilidade observadas para o hidrolisado gerado nas condições de PTH, quando comparado a fração sólida e a mistura sólida e líquida gerada pelas mesmas condições de pré-tratamento.

Comparando-se a melhor condição observada por Santos *et al*. (2018) utilizando o pré-tratamento oxidativo com a melhor condição do pré-tratamento hidrotérmico, observa-se que o hidrolisado obtido pelo pré-tratamento hidrotérmico apresentou melhor biodegradabilidade. Uma possível explicação para isto é a solubilização de açúcares para o hidrolisado durante o pré-tratamento. No processo usando ozônio de acordo com os autores a remoção de celulose foi igual a 2,5% e a remoção de hemicelulose foi igual a 38,9%, valores inferiores aos observados na CDB 3 do PTH usado neste estudo, as quais foram 55,72% e 86,11%, respectivamente. Estes resultados são coerentes, uma vez que o PTH tem uma maior seletividade para remoção de hemicelulose (xilanas) e celulose (glicanas) da casca de café, quando comparado com o pré tratamento por ozonolise, principalmente em altas temperaturas, conforme já discutido anteriormente.

No entanto, em função da maior solubilização da fração de carboidratos usando o PTH esperava-se uma produção ainda maior de biogás, porém, a presença de compostos fenólicos no hidrolisado pode ter influenciado negativamente na produção de biogás. Já o processo por oxidação usando ozônio estudado por Santos *et al*. (2018) não solubilizou tanto açúcar, no

entanto, observou-se uma elevada solubilização de fragmentos de lignina, os quais foram solubilizados e possivelmente levados a compostos mais simples, haja vista que alguns autores (Peretz *et al*., 2017; Zeng *et al*., 2013, Turhan e Uzman; 2008) tem usado este tipo de pré-tratamento para degradar os compostos fenólicos e gerar um hidrolisado com uma melhor condição de biodegradabilidade.

Visando avaliar a cinética da produção de metano, foram testados cinco modelos: Gompertz modificado, exponencial de duas fases, múltiplos estágios e primeira ordem. Os ajustes dos modelos foram avaliados considerando as funções de erro quadrático médio (RMSE), erro quadrático médio normalizado (NRMSE), coeficiente de determinação (R^2) e critério de informação de Akaike (AIC). Os parâmetros cinéticos para cada modelo usado durante a DA das frações S, L e S+L são apresentados na Tabela 12, visando melhorar os ajustes de alguns modelos testados considerou-se como produção máxima, a produção teórica de metano em relação à DQO, 350 Nml CH_4 g DQO^{-1}·sta ação visou apresentar um melhor significado físico para os modelos, haja vista que não é possível obter uma produção de metano específica superior à teórica.

Na Tabela 12, são apresentados os paramentros cinéticos para a DA em estado sólido, sólido + líquido e líquido das cascas pré-tratadas pelas condições CDB 1 (S) e CDB 2 (S), aquelas em que observou-se produção de biogás, além da casca bruta. O modelo que melhor descreveu a DA da casca de café bruta foi o modelo de Gompertz, tal modelo foi aquele que apresentou menor valor de AIC, assim como para para as frações sólidas das cascas pré-tratadas nas condições CDB 1 (S) e CDB 2 (S). Pelo fato da casca bruta possuir uma estrutura mais complexa e de difícil degradação um maior tempo de adaptação faz-se necessário por parte dos microrganismos para o início da produção de biogás.

Observa-se a partir da Tabela 12 e Figura 23 (A-C) que para a digestão em estado sólido, a casca de café bruta foi a que necessitou de maior tempo de adaptação, sendo sua fase lag superior a 20 dias, valor muito maior que os observados para a fração sólida das condições CDB 1 e CDB2. A maior complexidade da casca bruta e menor acessibilidade exige maior eficiência do maquinário enzimático dos microrganismos. Para digestão em fase sólida é possível perceber que a fração sólida gerada pelos pré-tratamentos com menor severidade da casca de café além

de promover uma melhora na biodegradabilidade em relação a casca bruta, também foi eficiênte na redução do período de adaptação do consórcio microbiano (fase lag).

A condição de (120 °C, 20 min e 5ml g^{-1}) foi aquela em que a fração sólida necessitou de menor período de adaptação por parte do consórcio microbiano, o que pode indicar que nesta condição o pré-tratamento além de melhorar o potencial de produção de biogás da casca de café, também contribuiu para melhora na cinética do processo. Para todas condições estudadas da fração sólida incluindo a casca bruta, observou-se a presença de patamares durante os ensaios de produção de biogás.

Observa-se na Figura 23 (A-C) que para condição de menor severidade CDB 1, além de uma maior redução na fase lag, os patamares de estabilização são menores, isso se deve ao fato de, nestas condições, o pré tratamento ter sido eficiente em tornar os açúcares mais facilmente acessíveis, sem grandes solubilizações dos mesmos da superfície da biomassa para o hidrolisado. Já para condição de maior severidade pode ser observado a existência de patamares de estagnação maiores durante o processo, porém, menores que o da casca bruta. Tal fato pode estar associado a complexidade do substrato, a casca bruta apesar de conter açúcares intactos em sua estrutura, os mesmos encontram-se em uma forma muito complexa e pouco disponíveis.

Já na condição mais severa a maior parte dos açúcares foi solubilizada, o que resultou em uma fração sólida rica em lignina e fragmentos fenólicos, consequentemente, mais recalcitrante. Lima *et al.* (2018) observou em estudo recente a importância da presença da hemicelulose durante a digestão anaeróbia em fase sólida do bagaço de cana-de-açúcar. O autor atribuiu a remoção da hemicelulose da fração sólida como um dos motivos para piora observada no rendimento na produção de biogás após condições de pré-tratamento mais severas, alegando que, com a remoção da hemicelulose a fração sólida se torna concentrada em compostos de mais difícil degradação tais como a lignina e celulose.

A Tabela 12 e Figura 23 (D-E) apresentam os dados cinéticos da digestão em fase semissólida (S+L). É possível observar que para digestão anaeróbia da mistura de sólido e líquido advindas do pré-tratamento houve um efeito de inibição quando comparado com os resultados das frações separadas, resultando em uma menor biodegradabilidade. Além disso, é possivel observar que, assim como para digestão sólida, a condição CDB 1 teve uma menor fase lag quando comparado a condição CDB 2, o que provavelmente está relacionado com o

menor teor de compostos fenólicos presentes na fase sólida e maior teor de açúcares na fração sólida, como discutido anteriormente para digestão sólida.

Na Tabela 12 também são apresentadas os parâmetros dos modelos que melhor se ajustaram para a DA líquida para os substratos das diferentes condições de pré-tratamento. É possível observar para todos os substratos modelo de Gompertz foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, o qual é capaz de prever fases de adaptação dos microrganismos do consórcio anaeróbio.

Observando os resultados é possível perceber que houve grande variação da fase lag para as três condições, sendo elas maiores para as condições com maiores concentrações de compostos fenólicos. Entretanto, vale destacar que, na digestão líquida houve uma redução das fases lag ao comparar com as digestões das fases sólidas (S) e semissólida (S+L). Tal fato se deve aos açúcares presentes no hidrolisado já estarem hidrolisados ou parcialmente hidrolisável e facilmente disponíveis aos microrganismos, assim, o tempo de adaptação dos mesmos é menor.

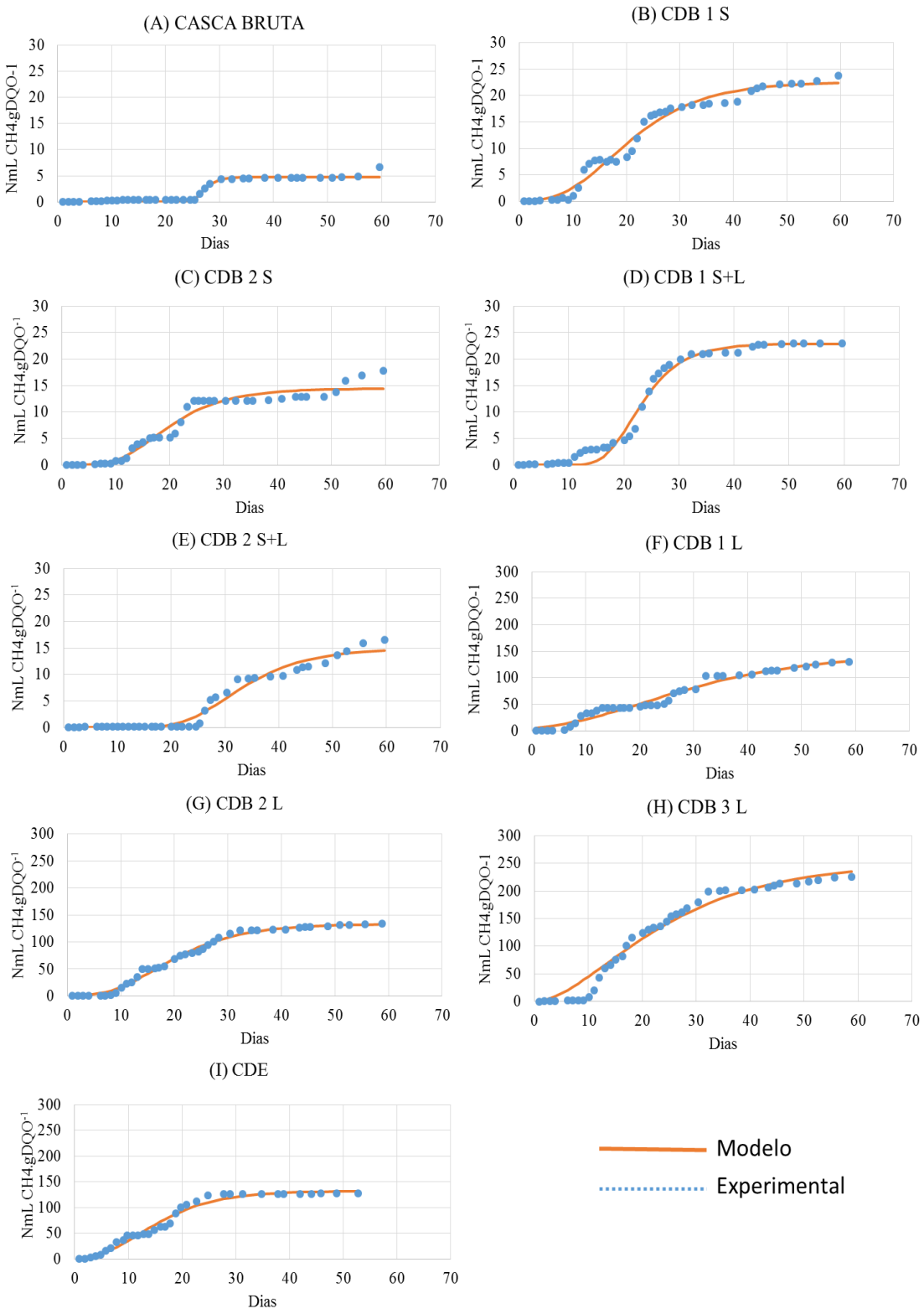
Vale ressaltar que para a digestão líquida o hidrolisado gerado pela condição CDB 3L, apesar de possuir o maior teor de inibidores, foi o que obteve um maior rendimento e biodegradabilidade Figura 23 (H), devido ao seu alto teor de açúcares solúveis prontamente bidegradáveis, diferente do observado por Baêta *et al* (2016), Baêta *et al* (2018) e Santos *et al* (2018), em que as condições com maiores teores de açúcares não foram, necessáriamente, aquelas que apresentaram maiores rendimentos devido à presença de compostos inibitórios.

Pode-se destacar também, que, como os hidrolisados foram diluídos dez vezes para a realização dos testes, a concentração de compostos fenólicos foi reduzida, provavelmente diminuindo a interferencia destes compostos na produção de metano. É valido destacar a necessidade de estudos futuros que visem avaliar o efeito da concetração destes compostos fenólicos presentes no hidrolisado gerado pela casca de café no metabolismo do consórcio anaeróbio. O melhor entendimento deste comportamento pode ser importante para aplicação real deste substrato para geração de biogás.

Tabela 12: Parâmetros cinéticos e de ajuste de diferentes modelos usados para avaliar a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da casca de café fração sólida (S), sólida + líquida (S+L) e líquida (L)

MODELO	PARAMETROS	CB	CDB 1 S	CDB 2 S	CDB 1 S+L	CDB 2 S+L	CDB 1 L	CDB 2 L	CDB 3 L	CDE
Gompertz modificado	P_0	4,757	22,603	14,399	22,885	14,917	145,860	133,561	217,649	132,2654
	R	1,111	0,903	0,740	1,671	0,668	3,179	5,691	10,201	6,3924
	Λ	24,944	7,920	10,090	16,272	21,917	4,023	7,757	8,378	4,4165
	RMSE	**0,391**	1,280	1,238	1,261	**0,999**	7,768	**4,576**	7,742	**7,3099**
	NRMSE	**5,875**	5,367	6,961	5,496	**6,043**	5,967	**3,429**	3,427	**5,7428**
	AIC	**-71,230**	23,698	21,016	22,503	**3,907**	167,945	**125,622**	167,682	**139,2063**
	R^2	**0,968**	0,977	0,955	0,984	**0,969**	0,966	**0,992**	0,992	**0,9771**
Primeira ordem	P_0	350,000	53,018	44,125	29,000	350,000	350,000	253,633	350,000	173,3726
	K	0,002	0,011	0,009	0,024	0,001	0,008	0,015	0,020	0,0333
	RMSE	1,047	2,351	1,981	4,388	2,816	8,454	13,719	24,597	13,1908
	NRMSE	15,745	9,856	11,139	19,126	17,024	6,494	10,279	10,889	10,3630
	AIC	5,630	70,322	56,627	120,266	84,766	172,719	211,450	258,160	179,3461
	R^2	0,769	0,923	0,885	0,806	0,752	0,960	0,928	0,916	0,9253
Exponencial de duas fases	P_1	258,082	0,089	0,087	0,100	0,000	0,083	0,000	0,000	40,0000
	k_1	0,001	0,011	0,009	2,000	0,992	1,988	1,957	1,929	0,0010
	P_2	12,000	52,818	44,040	29,000	2416,621	502,956	253,629	350,000	173,3730
	k_2	0,000	0,011	0,008	0,024	0,000	0,006	0,015	0,020	0,0333
	RMSE	1,587	2,351	1,983	4,409	2,796	8,369	13,719	24,597	13,2525
	NRMSE	23,858	9,856	11,152	19,216	16,906	6,429	10,279	10,889	10,4114
	AIC	42,877	74,322	60,720	124,644	88,208	175,913	215,450	0,916	179,6633
	R^2	0,469	0,923	0,885	0,805	0,756	0,961	0,928	0,916	0,9246
Multiplos estágios	A_S	0,010	0,001	0,010	0,000	0,000	0,001	1,000	0,001	1,0000
	k_1	0,025	0,071	0,069	0,054	0,006	0,049	0,075	0,077	0,1109
	A_I	0,010	0,003	0,011	0,000	0,000	26,425	0,096	0,000	0,0000
	k_2	0,025	0,071	0,069	0,054	0,006	0,049	0,078	0,077	0,1109
	A_{IS}	14,305	26,045	17,639	31,778	350,000	139,032	149,830	250,094	138,1196
	RMSE	0,838	1,586	1,572	2,902	1,580	7,545	8,060	14,783	8,5531
	NRMSE	12,602	6,649	8,839	12,648	9,550	5,796	6,039	6,544	6,7195
	AIC	-6,186	44,836	44,119	93,183	44,524	169,624	174,898	223,427	149,8869
	R^2	0,852	0,965	0,928	0,915	0,922	0,968	0,975	0,970	0,9686

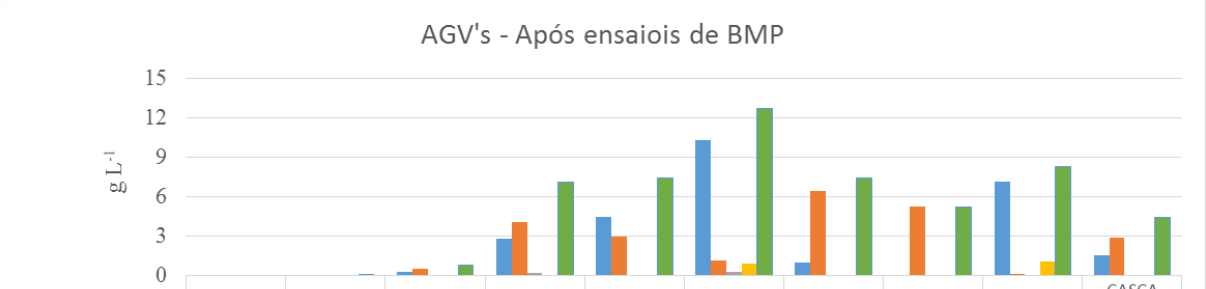
Figura 23: Dados de produção acumulada de metano estimada pelo modelo de Gompertz modificado e experimental durante a digestão anaeróbia da casca de café bruta e das frações sólida (S), sólida + líquida (S+L) e líquida da casca de café pré-tratada



Observa-se na Figura 23 (F) e (G) que a produção das condições CDB 2 L e CDB 3 L não possui patamares extensos como nas digestões sólida e semisólida. Nestas condições, devido a severidade do PTH, os açúcares estão mais solúveis e são mais facilmente digeridos pelos microrganismos. Já na Figura 23H, CDB 1 L, é possível notar um perfil de produção com mais patamares, o que pode estar associado com o menor teor de açúcares presentes no hidrolisado, uma vez que o PTH mais brando solubilizou menores teores de açúcars para o meio líquido. Isto mostra que para a casca de café quando a digestão anaeróbia ocorre com a fração líquida, condições de PTH que solubilizam maiores quantidades de açúcares são as preferidas para produção de biogás.

Na Figura 24 são mostrados os valores de ácidos graxos voláteis (AGVs) acumulados e quantificados após o término dos ensaios de PBM. É possível perceber que, nas condições de DA liquida ocorreu pouco acúmulo de AGV's, sendo que as concentrações de ácido acético e propiônico no meio aumentaram com o aumento da concentração de compostos fenólicos, atingindo 0,85 g L^{-1} de AGV's para CDB 3 L, aquela que possui maior concentração de fenóis.

Figura 24: Avaliação do perfil de AGV's após os ensaios de PBMBM (g/L)



	CDB 1 L	CDB 2 L	CDB 3 L	CDB 1 S+L	CDB 2 S+L	CDB 3 S+L	CDB 1S	CDB 2S	CDB 3S	CASCA BRUTA
Ac. Acético	0,00	0,03	0,27	2,84	4,46	10,33	0,99	0,00	7,15	1,55
Ac. Propionico	0,00	0,08	0,57	4,09	2,98	1,15	6,44	5,26	0,13	2,94
Ac. Isobutírico	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Ac. Butírico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00	1,07	0,00
TOTAL	0,00	0,11	0,85	7,13	7,45	12,77	7,42	5,26	8,35	4,49

Nas condições CDB 3 S e CDB 3 S+L é possível observar a ocorrência de um grande acúmulo de ácido acético, 7,15 e 10,33 g L^{-1}, respectivamente. Este acúmulo pode justificar a inibição da produção de CH_4, indicando que os microrganismos que convertem o acetato podem ter sido prejudicados pelas altas concentrações de compostos inibitórios observadas para as condições mencionadas.

Já as condições de DA da casca bruta e as condições CDB 1 S, CDB 1 S+L e CDB 2 S tiveram um maior acúmulo de ácido propiônico. De acordo com Aquino e Chernicharo, (2005) pode-se destacar dois problemas associados à formação de compostos mais reduzidos que o acetado em DA como, por exemplo, propianato. O primeiro é que estes compostos não são substratos diretos dos microrganismos metanogênicos, desta forma o bom desempenho do reator anaeróbico passa a depender também da atividade dos microrganismos sintróficos. Além disso, a produção de acetato a partir de propianato e butirato pelos microrganismos sintróficos acetogênicos é termodinamicamente inibida na presença de altas concentrações de hidrogênio dissolvido e de acetato.

Desta forma, o acúmulo de ácido propiônico nos ensaios pode indicar que principalmente para as digestões anaeróbias dá fração sólida e sólida + líquido o grupo de microrganismos responsáveis por converter o ácido propiônico a acetato foi limitado pelas maiores concentrações de compostos fenólicos. O acúmulo de ácido propiônico nestas condições sólidas e semissólidas, indicam a existência de toxidade para os microrganismos acetogênicos, uma vez que se observa um acúmulo de ácidos superiores, o que evidencia um desbalanço termodinâmico do sistema possivelmente provocado pela presença dos inibidores. Zeng *et al*. (2013) mostraram que a concentração de ácido propiônico igual a 900 mg L^{-1} foi capaz de inibir a ação das bactérias acidogênicas reduzindo significativamente a degradação dos AGV's e, consequentemente, o acúmulo dos mesmos no sistema, inibindo ou prejudicando assim, o crescimento dos microrganismos metanogênicos.

A adição de CAP na concentração de 4 g L^{-1} conforme usado durante os ensaios de PBM não foram suficientes para adsorver os AGV's e impedir que o acúmulo dos mesmos no sistema prejudicasse o consórcio de microrganismos. Sendo assim, para trabalhos futuros indica-se um estudo sobre a DA do substrato sólido e semissólido da casca de café pré-tratada hidrotermicamente em sistemas anaeróbios de dois estágios (acidogênico e metanogênico), tais sistemas além de permitirem a separação espacial dos microrganismos acidogênicos e metanogênico garantindo uma melhor condição de processo para as espécies, permite também recuperar os ácidos gerados na etapa acidogênica, possibilitando a produção de mais um bio-produto de alto valor.

As elevas concentrações de ácido observadas para as condições mais severas durante a digestão anaeróbia da fração sólida e semissólida podem facilitar a recuperação dos AGVs em uma eventual operação unitária de separação. Alguns autores como Tonucci *et al.*. (2018), estão desenvolvendo tecnologias de separação alternativas que utilizam a técnica de adsorção seletiva para recuperação de AGVs gerados em reatores anaeróbios. Em tal trabalho, os autores observaram que em ambientes com maiores concentrações de AGVs à capacidade máxima de adsorção dos materiais utilizados por eles foram melhores, indicando que maiores concentrações de AGVs contribuem para o melhor desempenho dos materiais adsorventes testados.

Os resultados de uma forma geral obtidos para os ensaios de produção de biogás permitem avaliar que a produção a partir da fração sólida + líquida da casca de café pré-tratada não apresentaram valores consideráveis, além disso o incremento no rendimento da produção de metano observado pelo pré-tratamento em relação a casca bruta não foi significativo, isto indica que uma separação da fração sólida e líquida geradas pelo pré-tratamento pode ser uma alternativa para o melhor aproveitamento da casca de café.

Como visto anteriormente, as frações líquidas das condições mais severas de PTH foram aquelas que apresentaram maiores potenciais de produção de metano, em consonância a isto na avaliação do efeito do pré-tratamento no rendimento da hidrólise enzimática, conforme visto anteriormente, observou-se também que substratos gerados por condições mais severas foram aqueles que obtiveram maiores valores de rendimento de hidrólise enzimática. Isto mostra que possivelmente a separação da fração sólida para produção de etanol e a fração líquida para produção de biogás pode ser uma alternativa para utilização da casca de café como matéria prima de uma biorrefinaria. Diante desta possibilidade, o estudo da produção de biogás a partir da fração líquida gerada pela condição ótima para produção de etanol (CDE) será discutido no próximo tópico.

5.2.2. *Avaliação do potencial bioquímico de metano (PBM) do hidrolisado gerado pela condição ótima de PTH para a produção de etanol a partir da fração sólida*

Com o objetivo de avaliar o aproveitamento de todas as correntes do processo de forma otimizada visando um contexto de biorrefinaria, foi avaliada a produção de metano pela DA da

fração líquida da condição definida como ótima para produção de etanol CDE (200ºC, 41 min e RLS 5 mL g^{-1}). O hidrolisado desta condição apresentou concentração de açúcares redutores igual a 8,68 g L^{-1}, compostos fenólicos iguais a 5,47 g L^{-1} e DQO igual a 47,7 g L^{-1}, resultando em concentrações de entradas nos testes de PBM iguais a 0,9, 0,56 e 4,77 g L^{-1}, respectivamente. Já a concentração de HMF e FF encontradas no hidrolisado foram respectivamente 0,38 e 0,01 g L^{-1}.

É possível perceber na 24 (I) que a produção acumulada para o hidrolisado gerado pela CDE foi igual a 127,29 Nml $gDQO^{-1}$. Tal resultado se aproxima bastante do encontrado para as condições CDB 1 L e CDB 2 L. No entanto, pelo fato da concentração de açúcares redutores no hidrolisado na condição CDE ter sido maior quando comparado a estas condições, e mais próximo do encontrado no hidrolisado da CDB 3L, esperava-se maiores produções de metano. Entretanto, sua produção mais baixa pode justificar-se pela menor razão entre açúcares redutores e compostos fenólicos. Ou seja, apesar do seu teor de açúcares redutores, a temperatura desta condição (200°C) gerou uma alta concentração de compostos fenólicos no hidrolisado, mesmo com um baixo tempo.

A Tabela 12 apresenta os parâmetros cinéticos para a produção de biogás da CDE. É possível perceber que o modelo cinético de Gompertz foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais. É possível perceber na Figura 23 I que existe um patamar intermediário na produção de biogás. Tal patamar pode estar associado a presença de oligômeros gerados durante o PTH no meio, em altas temperatura e tempos intermediários como os aplicados nesta condição os açúcares não são totalmente hidrolisados a monômeros, durante o pré-tramento em menores tempos principalmente as cadeias de hemicelulose podem dar origem a uma grande quantidade de oligômeros solúveis, como os mesmos são considerados complexos, para que sejam usados pelos microrganismos precisam passar por processos de hidrólise.

5.2.3. *Estimativa da viabilidade do uso do PTH para valorização da casca de café*

Com intuito de fazer uma estimativa da viabilidade de utilização da casca de café como matéria prima para produção de biocombustível foi realizado uma análise considerando o balanço de energia do processo (energia térmica gerada na queima de biogás – energia térmica gasta no PTH), bem como as receitas oriundas da possível venda dos produtos obtidos em cada

condição (energia elétrica e etanol). Para a análise da estimativa de viabilidade foram considerados três diferentes cenários para a valorização da casca de café com base no avaliado neste trabalho.

O primeiro cenário (1) considerado foi a digestão anaeróbia da casca de café sem passar por nenhum tipo de pré-tratamento. Nesta condição é possível perceber que apesar de não haver gastos com a energia, os valores de rentabilidade total são considerados baixos. Para esta condição o único produto considerado foi a energia elétrica gerada no sistema CHP a partir da combustão do biogás produzido pela digestão anaeróbia da casca bruta, que conforme já discutido apresentou valores baixos de produção de biogás.

Conforme observado anteriormente, o pré-tratamento hidrotérmico foi capaz de melhorar a biodegradabilidade da casca de café, no entanto, observou-se que as condições com temperaturas mais baixas foram aquelas que apresentaram balanço de energia térmica positiva. Com o objetivo de propor um sistema mais simples no qual a demanda energética do pré-tratamento fosse suprida pela energia térmica gerada, a condição CDB1 foi escolhida como um possível cenário (2). Neste cenário, considerou-se como etapas do processo o pré-tratamento térmico da casca de café seguido da digestão anaeróbia sem separação das frações sólidas e líquidas após o pré-tratamento.

Nesta condição, a energia térmica gerada no sistema paga a energia despendida no pré-tratamento conforme pode ser observado na Tabela 13 e ainda possui um potencial excedente, que poderia ser utilizado em outras etapas do processo de beneficiamento do café, como por exemplo, a torrefação, gerando assim mais economia na planta. A energia elétrica gerada pelo sistema também poderá ser vendida para a concessionária de distribuição local ou utilizada dentro da planta de processamento.

O fato de somente a condição CDB1 possuir balanço energético térmico positivo justifica-se por sua temperatura mais branda (120°C). Isso está relacionado ao fato de o pré-tratamento hidrotérmico ter como fator limitante o consumo energético, uma vez que demanda elevada energia para aquecer a água utilizada no processo, portanto, quanto maiores as temperaturas de trabalho, mais difícil se torna pagar energeticamente o sistema. Desta forma, o pré-tatamento hidrotérmico a altas temperaturas não pode ser considerado eficiente

energeticamente quando se deseja utilizar a casca de café como substrato para digestão anaeróbia.

No entanto, em elevadas temperaturas de pré-tratamento foi possível observar um bom rendimento na HE e uma boa produção de biogás com a fração líquida gerada após o pré-tratamento. Dentro deste contexto, visando melhorar a rentabilidade econômica do processo, o terceiro cenário (3) condição desejabilidade para produção de etanol (CDE-200°C, 41 min e *RLS* de 5 mL g^{-1}), no qual se aproveita a fração líquida e sólida para produção de metano e etanol, respectivamente, foi aquele que se mostrou mais vantajoso conforme pode ser visto na Tabela 13. Entretanto, esta condição não supre a demanda energética do pré-tratamento com a energia térmica gerada pela queima do biogás produzido pela fração líquida, conforme pode ser observado na Tabela 13. Um déficit de 1611,19 MJ por tonelada de casca de café processada é observado.

Uma alternativa para melhorar a viabilidade térmica do processo para este cenário seria utilizar uma parte da casca de café para queima direta e geração de energia térmica. Considerando para efeito de cálculo um poder calorífico da casca de 16,1MJ/kg de casca bruta (Saenger et al., 2001) e uma eficiência térmica de 80%, uma quantidade de aproximadamente 125 kg de casca bruta deveria ser queimada para gerar o excedente de energia térmica necessária para suprir o pré-tratamento para esta condição.

Tabela 13: Estimativa energética e econômica para os cenários propostos

Cenário	Demanda energética (MJ/ton CB)[a]	Produção Etanol (L/ton CB)[b]	Rentabilidade Economica Etanol (R$/ton CB)[C]	Produção total de energia via DA (MJ/ton CB)[d]	Energia Disponível (MJ/ton CB)[e]	Energia Elétrica (KWh/ton CB)[f]	Energia Térmica (MJ/ton CB)[g]	Rentabilidade Energia Elétrica (R$/ton CB)[h]	Balanço Energia térmica (MJ/ton CB)[i]	Rentabilidade Total (R$/ton CB)[j]
1-Casca Bruta	0	-	-	294,18	250,05	24,31	162,53	8,51	0,00	8,51
2-CDB1 digestão conjunta	420	-	-	1212,66	1030,76	100,21	669,99	126,27	**249,99**	35,07
3-Etanol+ Biogás (CDE)	2100	101,60	165,16	884,72	752,02	73,11	488,81	92,12	**1611,19**	**190,75**

a – Demanda energética do PTH para tratar 1 tonelada de casca de café bruta;

b – Produção de etanol considerando uma conversão da glicose recuperada igual a 0,51 para a CDE submetida a hidrólise enzimática com uma carga de 40 FPU g^{-1};

c - Rentabilidade econômica do etanol considerando o valor de mercado igual a R$1,6256/L (UDOP, 2019);

d – Produção de energia por tonelada de casca bruta via DA;

e – Energia disponível considerando-se um sistema CHP;

f e g – Energia elétrica e térmica considerando uma conversão da energia disponível de 35 e 65% respectivamente (Conversão 1 MJ = 0,277778 KWh);

h – Rentabilidade de venda da energia elétrica gerada. Valor considerado igual a R$ 0,35/KWh (Portaria n°65 de 2018, Ministério de Minas e Energia);

i – Balanço entre a energia consumida (-) e energia gerada no sistema (+);

j – Soma da venda de energia elétrica e venda de etanol, quando o caso.

5.2.4. *Conclusões a respeito do efeito do pré-tratamento hidrotérmico no HH e da avaliação do PBM*

Em relação ao objetivo específico IV, o qual buscou avaliar o potencial do uso da casca de café pré-tratada hidrotermicamente como substrato para digestão anaeróbia, foi possível perceber que os elevados teores de fenóis presentes nesta biomassa dificultaram a biodegradabildiade da mesma. O pré-tratamento de uma forma geral foi capaz de melhorar a produção de biogás quando comparado a casca bruta. Quando o objetivo for a utilização da casca de café para produção única de biogás a condição mais branda CDB 1 (120°C, 90 min e 5 ml g^{-1}) foi aquela que apresentou melhores resultados de produção.

Por outro lado, quando o objetivo é utilizar a fração sólida para produção de etanol e a líquida para produção de biogás conclui-se que as condições mais severas que solubilizaram maiores matérias orgânicas para o hidrolisado como as condições CDB 3 e CDE foram aquelas que apresentam maior potencial para produção de biogás a partir da fração líquida.

Em relação ao objetivo específico V, relacionado aos parâmetros cinéticos é possível concluir de uma forma geral que para casca de café os microrganismos necessitam de longos períodos de adaptação para iniciarem a produção de biogás. Além disso, observou-se que os modelos logísticos de crescimento como o modelo de Gompertz modificado foram aqueles que melhor explicaram o comportamento dos dados experimentais de produção de biogás para casca de café.

Visando responder o objetivo específico VI foi possível concluir que quando o objetivo é produzir somente biogás a partir da casca de café somente condições brandas como a CDB1 são capazes de obter um balanço térmico de energia positivo. Quando se avalia a rentabilidade do processo com a venda de possíveis produtos como etanol e energia elétrica, conclui-se que as condições mais severas como a CDE são as mais viáveis. No entanto, é valido ressaltar que para estas condições a energia térmica advinda da queima do biogás em sistemas CHP não é suficiente para gerar toda energia térmica necessária na planta, porém, conclui-se que a queima direta da casca de café pode ser uma alternativa para geração da energia térmica que falta para fechar o balanço de energia do pré-tratamento.

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A casca de café possui potencial para aproveitamento energético, o que se faz importante, uma vez que, desta forma a grande quantidade deste resíduo possa ser aproveitado deixando de ser um problema ambiental. E, além disso, prover uma fonte de energia renovável o que tem se tornado cada vez mais importante e necessário no atual contexto energético.

Os melhores rendimentos de Hidrólise enzimática encontrados foram para a condição de desejabilidade para etanol de segunda geração (CDE). Atingindo um rendimento de 73% de hidrolise enzimática e 50% de rendimento global quando se visa a produção de etanol de segunda geração. Tais valores permitiram o cálculo teórico da produção de 101,6 litros de etanol a cada tonelda de casca bruta pré tratado. Para esta condição também foi realizada a DA da fração liquida (hidrolisado hemicelulósico) na qual alcançou-se uma produção de CH_4 igual a 127,29 nmL CH_4 $gDQO_{aplicada}^{-1}$.

Em relação à produção de biogás, a maior produção ocorreu de CH_4 para a CDB3 na digestão da fração liquida, atingindo 225,3 nmL CH_4 $gDQO_{aplicada}^{-1}$. Por outro lado, os ensaios em estado sólido e semissólido para esta condição não apresentou produção de biogás, sendo inibida devido a alta concentração dos compostos fenólicos nestas condições. Para a digestão em estado sólido e semissólido, o melhor resultado observado foi para a CDB 1, atingindo 23,9 nmL CH_4 $gDQO_{aplicada}^{-1}$ e 22,9 nmL CH_4 $gDQO_{aplicada}^{-1}$ respectivamente, vale destacar que, para todas as condições, o modelo cinético que melhor representou a produção de biogás foi o modelo de compertz modificado.

O pré-tratamento hidrotérmico possui uma alta demanda energética o que faz com que seja necessárias elevadas produções de metano para suprir a necessidade energética nas condições de PTH mais altas. Assim, a única condição que paga a demanda energética do pré tratamento, é a DA semissólida da CDB1, gerando uma receita de R$35,07 por tonelada de casca de café bruta pré-tratada. Visando uma receita maior, o melhor cenário é a produção de etanol a partir da fração sólida da CDE e DA da fração liquida, gerando uma receita de R$190,75 por cada tonelada de casca de café processada. Entretanto, como esta condição não paga a demanda energética, são necessários utilizar 125 kg de casca bruta para cada tonelada de casca processada para suprir tal demanda, reduzindo a receita gerada para R$169,55 por casca processada.

Um fator importante a ser destacado, é o alto teor de compostos inibitórios gerados no PTH, sendo necessário buscar técnicas que minimizem o efeito dos mesmos na fermentação. Desta forma, algumas estratégias podem ser estudadas em trabalhos futuros visando melhorar o aproveitamento energético desta biomassa como, por exemplo:

- Avaliar a DA em dois estágios a fim de avaliar a redução do acúmulo de AGV's na etapa de metanogênese
- Avaliar a adição de recargas carvão ativado durante todo o período de DA para adsorção de possíveis compostos inibitórios formados durante a DA
- Testar diferentes relações alimento/microrganismos nas digestões sólidas e semissólidas para avaliar possíveis melhoras no rendimento de metano com uma maior e uma menor disponibilidade de substrato.
- Avaliar o uso de surfactantes na a hidrólise enzimática da casca de café visando reduzir a carga enzimática e aumentar o rendimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbassi-guendouz, A., Brockmann, D., Trably, E., Dumas, C., Delgenès, J., Steyer, J., & Escudié, R. (2012). Bioresource Technology Total solids content drives high solid anaerobic digestion via mass transfer limitation. *Bioresource Technology*, *111*, 55–61. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.174

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, *29*(6), 675–685. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005

Albuquerque, L. S., & Araújo, J. C. S. de. (2016). B IOGAS PRODUCTION BY CO - DIGESTION USING A MIXTURE OF COW. *Brazilian Journal of Production Engineering*, *2*, 44–54.

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

Amiri, H., & Karimi, K. (2015). Autohydrolysis: A promising pretreatment for the improvement of acetone, butanol, and ethanol production from woody materials. *Chemical Engineering Science*, *137*, 722–729. https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.07.020

Andrade, A. P. S. (2009). *ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DA CASCA DO CAFÉ (Coffea arabica)*. Universidade Federal de Uberlandia.

Aparecida, L., Batalha, R., Han, Q., Jameel, H., Chang, H., Luiz, J., … Gomes, B. (2015). Bioresource Technology Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, *180*, 97–105. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.060

Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, *34*(6), 755–781. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002

Araújo, C. R. De, Vicência, C., Garrido, S., Marcus, J., Moraes, G., Costi, S., … Campos, A. (2013). Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produçai de etanol de segubnda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. *XII SEPA - Seminário Estudantil de Produçao Acadêmica - UNIFACS*, 40–57. Retrieved from http://www.revistas.unifcas.br/index.php/sepa

Ayele, S., & Reinhardt, B. H. (2010). Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard, 1049–1060. https://doi.org/10.1617/s11527-009-9565-0

Ba??ta, B. E. L., Lima, D. R. S., Adarme, O. F. H., Gurgel, L. V. A., & Aquino, S. F. de. (2016). Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, *200*, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003

Badocha, T. E., Costa, R. S. C. da, & Leônidas, F. das C. (2003). Casca de café: um importante insumo para agricultura orgânica. Porto Seguro - BA: Anais do III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Retrieved from http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/1581

Baêta, B. E. L. (2016). Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria, 1367–1368. Retrieved from http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/7124

Baêta, B. E. L., Cordeiro, P. H. de M., Passos, F., Gurgel, L. V. A., de Aquino, S. F., & Fdz-Polanco, F. (2017). Steam explosion pretreatment improved the biomethanization of coffee husks. *Bioresource Technology*, *245*(August), 66–72. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.110

Battista, F., Fino, D., & Ruggeri, B. (2014). Polyphenols Concentration ' s Effect on the Biogas Production by Wastes Derived from Olive Oil Production Polyphenols Concentration ' s Effect on the Biogas Production by Wastes Derived from Olive Oil Production, (March 2015). https://doi.org/10.3303/CET1438063

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical

pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *36*, 91–106. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047

Blinová, L., Sirotiak, M., Bartošová, A., & Soldán, M. (2017). FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY IN TRNAVA REVIEW : UTILIZATION OF WASTE FROM COFFEE PRODUCTION, *25*(40), 91–101.

Bussemaker, M. J., & Zhang, D. (2013). E ff ect of Ultrasound on Lignocellulosic Biomass as a Pretreatment for Biore fi nery and Biofuel Applications.

Carrott, P. J. M., & Carrott, M. M. L. R. (2007). Lignin – from natural adsorbent to activated carbon : A review, *98*, 2301–2312. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.008

Carvalheiro, F., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, *67*(11), 849–864. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.045

Castro, J. F., Parra, C., Yáñez-S, M., Rojas, J., Teixeira Mendoncìa, R., Baeza, J., & Freer, J. (2013). Optimal pretreatment of Eucalyptus globulus by hydrothermolysis and alkaline extraction for microbial production of ethanol and xylitol. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *52*(16), 5713–5720. https://doi.org/10.1021/ie301859x

Chandra, R., Takeuchi, H., & Hasegawa, T. (2012). Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass : A potential and promising method for enhanced methane production. *APPLIED ENERGY*, *94*, 129–140. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.01.027

Chapleur, O., Madigou, C., Civade, R., Rodolphe, Y., Mazéas, L., & Bouchez, T. (2016). Increasing concentrations of phenol progressively affect anaerobic digestion of cellulose and associated microbial communities. *Biodegradation*, *27*(1), 15–27. https://doi.org/10.1007/s10532-015-9751-4

Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, *99*(10), 4044–4064. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057

Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for

producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, *51*(7), 1412–1421. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015

Cherubini, F., & Jungmeier, G. (2010). LCA of a biorefinery concept producing bioethanol, bioenergy, and chemicals from switchgrass. *International Journal of Life Cycle Assessment*, *15*(1), 53–66. https://doi.org/10.1007/s11367-009-0124-2

Chiaramonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., & Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, *46*, 25–35. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.04.020

Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. A., & Lantinga, E. A. (n.d.). Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds, *64*(96), 77–89.

Cybulska, I., Lei, H., & Julson, J. (2010). Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Prairie Cord Grass, (12), 718–727. https://doi.org/10.1021/ef9009179

De Aquino, S. F., & Chernicharo, C. A. L. (2005). Acúmulo de ácidos gordos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbis sob stress:causas e estratégias de controlo. *Eng. Sanit. Ambient. 10*, 152–161. Retrieved from http://www.scielo.br/pdf/esa/v10n2/a09v10n2

Dias, M. O. S., Cunha, M. P., Jesus, C. D. F., Rocha, G. J. M., Pradella, J. G. C., Rossell, C. E. V, … Bonomi, A. (2011). Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? *Bioresource Technology*, *102*(19), 8964–8971. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.098

Fernandes, S., & Murray, P. G. (2010). Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation, *1018*. https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.12724

Fernández-cegrí, V., Rubia, M. Á. De, Raposo, F., & Borja, R. (2012). Bioresource Technology Effect of hydrothermal pretreatment of sunflower oil cake on biomethane potential focusing on fibre composition, *123*, 424–429.

Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brand, G.

C., … Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design : An alternative for the optimization of analytical methods, *597*, 179–186. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011

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

Galbe, M., & Zacchi, G. (2012). Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, *46*, 70–78. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026

García Martín, J. F., Cuevas, M., Bravo, V., & Sánchez, S. (2010). Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with Candida tropicalis. *Renewable Energy*, *35*(7), 1602–1608. https://doi.org/10.1016/j.renene.2009.12.015

Garrote, G., Parajo, J. C., & Arbeit, D. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials, *57*.

Ge, X., Xu, F., & Li, Y. (2016). Bioresource Technology Solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass : Recent progress and perspectives. *Bioresource Technology*, *205*, 239–249. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.050

Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., & Marques, S. (2010). Bioresource Technology Hemicelluloses for fuel ethanol : A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4775–4800. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088

Gouvea, B. M., Torres, C., Franca, A. S., Oliveira, L. S., & Oliveira, E. S. (2009). Feasibility of ethanol production from coffee husks. *Biotechnology Letters*, *31*(9), 1315–1319. https://doi.org/10.1007/s10529-009-0023-4

Gravitis, J., & Abolins, J. (2013). Biorefinery Technologies for Biomass Conversion Into Chemicals and Fuels Towards Zero Emissions (Review) / Nulles Emisiju Princips Biomasas Konversijas Tehnoloģijās Aizstājot Fosilos Resursus (Pārskata Raksts). *Latvian Journal of Physics and Technical Sciences*, *50*(5), 29–43. https://doi.org/10.2478/lpts-2013-0031

Gujer, W., & Zehnder, a J. B. (1983). Conversion Processes in Anaerobic Digestion.

Water Sci Technol, *15*, 127–167. Retrieved from http://www.iwaponline.com/wst/01508/wst015080127.htm

Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, *28*(4), 384–410. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002

Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L., & Bakker, R. (2010). *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. *Energy*. https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.08.004

Imman, S., Arnthong, J., Burapatana, V., Laosiripojana, N., & Champreda, V. (2013). Autohydrolysis of tropical agricultural residues by compressed liquid hot water pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *170*(8), 1982–1995. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0320-1

Imman, S., Laosiripojana, N., & Champreda, V. (2017). Effects of Liquid Hot Water Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis and Physicochemical Changes of Corncobs. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2541-1

Jayachandra, T., Venugopal, C., & Anu Appaiah, K. A. (2011). Utilization of phytotoxic agro waste- Coffee cherry husk through pretreatment by the ascomycetes fungi Mycotypha for biomethanation. *Energy for Sustainable Development*, *15*(1), 104–108. https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.01.001

Jesus, M. S., Romaní, A., Genisheva, Z., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2017). Integral valorization of vine pruning residue by sequential autohydrolysis stages. *Journal of Cleaner Production*, *168*, 74–86. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.08.230

Keshav, P. K., Naseeruddin, S., & Rao, L. V. (2016). Improved enzymatic saccharification of steam exploded cotton stalk using alkaline extraction and fermentation of cellulosic sugars into ethanol. *Bioresource Technology*, *214*, 363–370. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.108

Kim, S., & Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, *26*(4), 361–375.

https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002

Kumari, D., & Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *90*(April), 877–891. https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111

Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *124*, 1081–1099. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_91

Lee, J. M., Shi, J., Venditti, R. A., & Jameel, H. (2009). Autohydrolysis pretreatment of Coastal Bermuda grass for increased enzyme hydrolysis. *Bioresource Technology*, *100*(24), 6434–6441. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.068

Leifa, F., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2001). Production of flammulina velutipes on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *44*(2), 205–212. https://doi.org/10.1590/S1516-89132001000200015

Lima, D. R. S. (2018). *AVALIAÇÃO DE ROTAS TECNOLÓGICAS PARA O APROVEITAMENTO ENERGÉTICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO.

Lima, D. S. R., Herrera, O. A., Baêta, B. L. E., Gurgel, L. V. A., & Aquino, S. F. De. (2018). Industrial Crops & Products In fl uence of di ff erent thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion : A kinetic analysis, *111*(May 2017), 684–693. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.048

Lima, G. S., Carvalho, J. H. M., Nascimento, Thaís Pessoa Miguel, D. L., & Simões, M. L. G. (2013). UTILIZAÇÃO DE CASCA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE USE OF COFFEE HULL AS SUBSTRATE FOR PRODUCTION OF CELLULASE BY Trichoderma spp, 2000–2003.

Liu, S. (2010). Woody biomass : Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction / hydrolysis. *Biotechnology Advances*, *28*(5), 563–582. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.006

Mahmoodi, P., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2018). *Hydrothermal processing as pretreatment for efficient production of ethanol and biogas from municipal solid waste Corresponding author : Bioresource Technology*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.115

Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J. P., & Carrère, H. (2013). Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: Impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *43*(3), 260–322. https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258

Monlau, F., Sambusiti, C., Barakat, A., Quéméneur, M., Trably, E., Steyer, J., & Carrère, H. (2014). Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures ? A comprehensive review, *32*, 934–951.

Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol ; a comprehensive review on pretreatment, *27*(November), 76–93. https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *96*(6), 673–686. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., & Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, *43*(2), 124–129. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006

Ogeda, T. L. (2011). Hidrólise Enzimática de Celuloses Pré-tratadas, 110.

Oliveira, L. S., & Franca, A. S. (2014). An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. *Coffee in Health and Disease Prevention*, (November), 283–291. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00031-0

Oliveira, W. E., Franca, A. S., Oliveira, L. S., & Rocha, S. D. (2008). Untreated coffee husks as biosorbents for the removal of heavy metals from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, *152*(3), 1073–1081. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.085

Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (2005). Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with High Residual Lignin Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *124*(1–3), 1069–1080. https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1069

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, *6*(2), 153–162. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00084-X

Passos, F., Henrique, P., Cordeiro, M., Eduardo, B., Baêta, L., Francisco, S., … Perez-elvira, S. I. (2018). Bioresource Technology Anaerobic co-digestion of co ff ee husks and microalgal biomass after thermal hydrolysis. *Bioresource Technology*, *253*(December 2017), 49–54. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.071

Peretz, R., Gerchman, Y., & Mamane, H. (2017). Bioresource Technology Ozonation of tannic acid to model biomass pretreatment for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *241*, 1060–1066. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.204

Perez, A. J., Gonz, A., Oliva, J. M., Ballesteros, I., & Manzanares, P. (2007). Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor, *938*(September), 929–938. https://doi.org/10.1002/jctb

Perez, J., Muñoz-Dorado, J., Rubia, T. de la, & Martinez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose , hemicellulose and lignin : an overview (pp. 53–63). https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3

Phimsen, S., Kiatkittipong, W., Yamada, H., Tagawa, T., Kiatkittipong, K., Laosiripojana, N., & Assabumrungrat, S. (2016). Oil extracted from spent coffee grounds for bio-hydrotreated diesel production. *Energy Conversion and Management*, *126*, 1028–1036. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.08.085

Poirier, S., Bize, A., Bureau, C., Bouchez, T., & Chapleur, O. (2016). Community shifts within anaerobic digestion microbiota facing phenol inhibition: Towards early warning microbial indicators? *Water Research*, *100*, 296–305. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.041

Poirier, S., & Chapleur, O. (2018). Influence of support media supplementation to reduce the inhibition of anaerobic digestion by phenol and ammonia: Effect on degradation performances and microbial dynamics. *Data in Brief*, *19*, 1733–1754. https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.06.071

Prabhudessai, V., Ganguly, A., & Mutnuri, S. (2009). Effect of caffeine and saponin on anaerobic digestion of food waste, *59*(June), 643–648.

Rabelo, S. C. (2010). Avaliação E Otimização De Pré-Tratamentos E Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Para a Produção De Etanol De Segunda Geração, 447. https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2

Rambo, M. K. D., Schmidt, F. L., & Ferreira, M. M. C. (2015). Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. *Talanta*, *144*, 696–703. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.045

Rios-González, L. J., Morales-martínez, T. K., Rodríguez-flores, M. F., Rodríguez-de, J. A., Castillo-quiroz, D., Castro-montoya, A. J., & Martinez, A. (2017). Bioresource Technology Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse, *242*, 184–190.

Romaní, A., Garrote, G., López, F., & Parajó, J. C. (2011). Eucalyptus globulus wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresource Technology*, *102*(10), 5896–5904. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.070

Rossetti, R. P. (2007). Determinação de Fenóis Totais em Frutos do Café: Avaliações em Diferentes Fases de Maturação, 72.

Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels, *454*(August), 841–845. https://doi.org/10.1038/nature07190

Ruiz, H. A., Thomsen, M. H., & Trajano, H. L. (n.d.). *Hydrothermal Processing in Biorefineries*. https://doi.org/978-3-319-56457-9

Ruiz, H. A., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2012). Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process, *36*,

100–107. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.014

Saenger, M., Hartge, E. U., Werther, J., Ogada, T., & Siagi, Z. (2001). Combustion of coffee husks. *Renewable Energy*, *23*(1), 103–121. https://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00106-3

Santos, L. C. dos. (2017). *TRATAMENTO OXIDATIVO DE CASCAS DE CAFÉ COM OZÔNIO COM VISTAS À PRODUÇÃO DE BIOGÁS E ETANOL 2G*. Universidade Federal de Ouro Preto.

Santos, L. C. dos, Adarme, O. F. H., Baêta, B. E. L., Gurgel, L. V. A., & Aquino, S. F. de. (2018). Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. *Bioresource Technology*, *263*(May), 601–612. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.037

Santos, F. A., Queiroz, J. H. De, Colodette, J. L., Manfredi, M., Queiroz, M. E. L. R., Celso, S., & Soares, F. E. F. (2014). Artigo, *37*(1), 56–62.

Santos, F., Queiroz, J., Colodette, J., Souza, C., & Gomes, F. (2013). Produção de Etanol cCelulósico a Partir da Cana-de-Açúcar. In F. Santos, J. Colodette, & J. Queiroz (Eds.), *Bioenergia e Biorrefinaria* (p. 551). Visoça.

Saritha, M., Arora, A., & Lata. (2012). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian Journal of Microbiology*, *52*(2), 122–130. https://doi.org/10.1007/s12088-011-0199-x

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, *37*(1), 19–27. https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045

Schuchardt, U., & Ribeiro, M. L. (2001). A INDÚSTRIA PETROQUÍMICA NO PRÓXIMO SÉCULO: COMO SUBSTITUIR O PETRÓLEO COMO MATÉRIA-PRIMA?, *24*(2), 247–251.

Shukor, H., Abdeshahian, P., Al-Shorgani, N. K. N., Hamid, A. A., Rahman, N. A., & Kalil, M. S. (2016). Saccharification of polysaccharide content of palm kernel cake using

enzymatic catalysis for production of biobutanol in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, *202*, 206–213. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.078

SILVA, J. P. da. (2012). *Caracterização da Casca de Café (coffea arábica , L) in natura , e de seus Produtos Obtidos pelo Processo de Pirólise em Reator Mecanicamente Agitado Caracterização da Casca de Café (coffea arábica , L) in natura , e de seus Produtos Obtidos pelo Proc*. Universidade Estadual de Campinas.

Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2015). Bioresource Technology Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030

Singh, J., Suhag, M., & Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion , acid and alkaline pretreatment methods : A review. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 624–631. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012

Soccol, C. R. (2002). Residues of coffee as a potential substrate for industrial production of byproducts with high aggregate value. / Resíduo de café um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. *I Simpósio de Pesquisa Dos Cafés Do Brasil, Palace Cassino, Poços de Caldas, MG, Brazil, 26-29 Setembro 2000*, (41), 83–98.

Suhas, Gupta, V. K., Carrott, P. J. M., Singh, R., Chaudhary, M., & Kushwaha, S. (2016). Bioresource Technology Cellulose : A review as natural , modified and activated carbon adsorbent. *Bioresource Technology*, *216*, 1066–1076. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.106

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresource Technology*, *83*(1), 1–11. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9). https://doi.org/10.3390/ijms9091621

Tehrani, N. F., Aznar, J. S., & Kiros, Y. (2015). Coffee extract residue for production of ethanol and activated carbons. *Journal of Cleaner Production*, *91*, 64–70.

https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.12.031

Tonucci, M. C., Fidélis, L. S., Baêta, E. L., Ricardo, C., Tarley, T., & Aquino, S. F. De. (2018). Influence of synthesis conditions on the production of molecularly imprinted polymers for the selective recovery of isovaleric acid from anaerobic effluents, (November). https://doi.org/10.1002/pi.5726

Turhan, K., & Uzman, S. (2008). Removal of phenol from water using ozone, *229*, 257–263. https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.09.012

Ulsido, MD; Zeleke, G; Li, M. (2016). Biogas Potential Assessment From a Coffee Husk: an Option for Solid Waste Management in Gidabo Watershed of Ethiopia. *15th International Scientific Conference on Engineering for Rural Development*, 1348–1354.

Val Del Río, Á., Palmeiro-Sanchez, T., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., & Méndez, R. (2014). Anaerobic digestion of aerobic granular biomass: Effects of thermal pre-treatment and addition of primary sludge. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *89*(5), 690–697. https://doi.org/10.1002/jctb.4171

Vallejos, M. E., Zambon, M. D., Area, M. C., & Da Silva Curvelo, A. A. (2012). Low liquid-solid ratio (LSR) hot water pretreatment of sugarcane bagasse. *Green Chemistry*, *14*(7), 1982–1989. https://doi.org/10.1039/c2gc35397k

Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1447–1457. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003

Wan, C., Zhou, Y., & Li, Y. (2011). Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresource Technology*, *102*(10), 6254–6259. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.075

Wang, D., Shen, F., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S., & Zhang, J. (2018). Bioresource Technology Can hydrothermal pretreatment improve anaerobic digestion for biogas from lignocellulosic biomass ? *Bioresource Technology*, *249*(August 2017), 117–124. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.197

Wang, W., Tao, L., Markham, J., Zhang, Y., Tan, E., Batan, L., … Biddy, M. (2016).

Review of Biojet Fuel Conversion Technologies, (July), 98. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.09.016

Windeisen, E., Wegener, G., & München, T. U. (2012). *Lignin as Building Unit for Polymers*. *Polymer Science:A Comprehensive Reference* (Vol. 10). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00263-6

Wu, X., Huang, C., Zhai, S., Liang, C., & Huang, C. (2018). Bioresource Technology Improving enzymatic hydrolysis e ffi ciency of wheat straw through sequential autohydrolysis and alkaline post-extraction. *Bioresource Technology*, *251*(December 2017), 374–380. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.066

Xiao, X., Bian, J., Peng, X., Xu, H., Xiao, B., & Sun, R. (2013). Bioresource Technology Autohydrolysis of bamboo (Dendrocalamus giganteus Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. *Bioresource Technology*, *138*, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.160

Xu, F., & Li, Y. (2012). Bioresource Technology Solid-state co-digestion of expired dog food and corn stover for methane production. *Bioresource Technology*, *118*, 219–226. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.102

Yamashita, Y., Shono, M., Sasaki, C., & Nakamura, Y. (2010). Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. *Carbohydrate Polymers*, *79*(4), 914–920. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.017

Yang, M., Zhang, J., Kuittinen, S., Vepsäläinen, J., Soininen, P., Keinänen, M., & Pappinen, A. (2015). Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, *189*, 131–137. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.008

Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*, 751–774. https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038

Zeng, Z., Zou, H., Li, X., Arowo, M., Sun, B., Chen, J., & Chu, G. (2013). Degradation of phenol by ozone in the presence of Fenton reagent in a rotating packed bed. *Chemical*

Engineering Journal, *229*, 404–411. https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.018

Zhang, X., Zhang, J., Tan, T., Yu, J., & Ma, X. (2010). The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, *102*(6), 4585–4589. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.093

Zhao, X., Cheng, K., & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(5), 815–827. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014a). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, *42*(1), 35–53. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014b). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001