



Estudo da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono da borra de café com vista à produção de bioetanol

CATARINA FILOMENA SILVA LAMAS

julho de 2019

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Mestrado em Engenharia Química – Energia e Biorrefinaria
2018/2019

Estudo da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono da borra de café com vista à produção de bioetanol



Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Nídia Caetano

Autora: Catarina Lamas

12/07/2019

Página intencionalmente deixada em branco

Agradecimentos

Agradecimentos Institucionais

A Doutora Nídia de Sá Caetano, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado pela Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE – financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC), e colaboradora do CIETI – Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial UID/EQU/04730/2019 – financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).



Resumo

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono da borra de café com vista à produção de bioetanol, utilizando diferentes enzimas de modo a perceber a influência destas para a produção do bioetanol. A principal aplicação do bioetanol é como biocombustível, alternativo aos combustíveis fósseis.

Assim, o processo encontra-se dividido em 4 etapas, o pré-tratamento ácido, a hidrólise enzimática, a fermentação dos açúcares e, por fim, a destilação, para recuperação do etanol produzido.

No pré-tratamento, o objetivo foi quebrar as barreiras de lenhina, que impedem o acesso aos polissacarídeos. Para isso, foi utilizado ácido nítrico a 3 % para realizar o ataque ácido à amostra, nas proporções de 800 ml para cada 100 g de amostra, durante 3 h a 85 °C, com agitação a 40 rpm.

Após o pré-tratamento, foi realizada a hidrólise enzimática, de modo a ser possível converter as hemiceluloses e a celulose em açúcares simples. Foram testadas 4 enzimas diferentes para a realização desta etapa: *Ban*, *Ultraflo L*, *Cellulase* e *Viscozyme*. O procedimento foi realizado a 50 °C, durante 24 h, com agitação a 40 rpm, sendo que foram adicionados 0,2 ml de cada enzima por cada 10 g de amostra.

A terceira etapa, consiste na fermentação dos açúcares obtidos na hidrólise. Para isto, foi adicionada a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, na proporção de 10 g por cada 100 g de amostra. Foi adicionada uma solução tampão de citrato de sódio, para que o pH não variasse e o procedimento foi realizado num banho termostático, com agitação de 40 rpm, durante 1 semana, à temperatura de 30 °C.

Por fim, a quarta etapa consiste na destilação no rotavapor, sendo as condições de trabalho a pressão de 175 mm Hg à temperatura de 60 °C.

Foram quantificados os açúcares totais depois da hidrólise enzimática de cada amostra, sendo que os valores das concentrações de açúcares variaram entre 16,3 g/L a 29,6 g/L.

Das 4 enzimas testadas, foi possível concluir que apenas duas originaram a formação de bioetanol. As enzimas usadas nas amostras onde foi possível obter o bioetanol foram a *Ultraflo L* e a *Cellulase*.

Foi ainda possível concluir que as duas amostras com os valores mais altos de concentração de açúcar, respetivamente 24,7 g/L e 29,6 g/L, foram as amostras onde foi possível detetar a obtenção de bioetanol. Também foi possível perceber que a amostra com a enzima *Ultraflo L*, teve um odor mais intenso a etanol do que a amostra onde foi usada a enzima *Cellulase*.

Palavras Chave

Bioetanol, Borra de café, Fermentação, Hidrólise enzimática, Pré-tratamento ácido,
Valorização de biorresíduos

Abstract

The aim of this project was to study the enzymatic hydrolysis of the carbohydrates of the coffee grounds with a view to the production of bioethanol, using different enzymes in order to perceive the influence of them for the bioethanol production. The main use of bioethanol is as a biofuel, an alternative to fossil fuels.

The experimental work was divided into 4 stages: pre-treatment, enzymatic hydrolysis, sugars fermentation and finally, the distillation to recover ethanol.

In the pre-treatment stage, the aim was to break down the lignin barriers and for that, nitric acid (3%) was used to promote lignin degradation, at a ratio of 800 ml for each 100 g of sample, in a thermostatic bath during 3 h at 85 ° C and stirring at 40 rpm.

Thereafter, enzymatic hydrolysis was performed in order to convert hemicelluloses and cellulose into simple sugars. Four different enzymes were tested to perform this stage: *Ban*, *Ultraflo L*, *Cellulase* and *Viscozyme*. The ratio of enzyme to sample was 0.2 ml enzyme : 10 g of sample, and the procedure was performed in a thermostatic bath for 24 h at 50 °C, stirring at 40 rpm.

The third stage consisted of the fermentation of sugars released during the hydrolysis step. For that, the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* was added, at a ratio of 10 g yeast to 100 g of sample. A buffer solution of sodium citrate was also added, so that the pH was fixed at the desired value, and the fermentation proceeded in a thermostatic bath, with stirring at 40 rpm, for 1 week, at 30 °C.

The fourth and final stage involved a distillation in a rotary evaporator, at 175 mm Hg and at a temperature of 60 °C.

The total sugars quantification was performed after the enzymatic hydrolysis of each sample, and the values of the sugar concentrations ranged from 16.3 to 29.6 g/L.

The results of this work show that only two enzymes promoted the production of bioethanol from spent coffee grounds: *Ultraflo L* and *Cellulase*. On the other hand, when *Ban* and *Viscozyme* enzymes were used, it was not possible to recover bioethanol.

It was also possible to conclude that the two samples with the highest sugar concentrations after the enzymatic hydrolysis step were 24.7 g/L and 29.6 g/L, corresponding to *Cellulase* and *Ultraflo L*, respectively. In addition, the sample with the enzyme *Ultraflo* had a stronger odor to ethanol than the sample where the *Cellulase* enzyme was used.

Keywords

Acid pre-treatment, Bioethanol, Biowaste valorization, Enzymatic hydrolysis, Fermentation, Spent Coffee Grounds

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. O café.....	1
1.2. Borra de café.....	3
1.3. Bioetanol.....	4
1.4. Objetivos.....	6
1.5. Estrutura do trabalho.....	7
2. Estado de Arte.....	9
2.1. A sociedade, a economia e o bioetanol.....	9
2.2. Bioetanol.....	11
2.2.1. Bioetanol de cana-de-açúcar.....	11
2.2.2. Bioetanol de materiais lenhocelulósicos.....	12
2.2.2.1. O café e os seus resíduos.....	13
2.2.2.1.1. Lenhina.....	14
2.2.2.1.2. Hemicelulose.....	15
2.2.2.1.3. Celulose.....	15
2.2.3. Hidrólise.....	15
2.2.3.1. Enzimas.....	17
2.2.4. Fermentação.....	18
2.2.4.1. Leveduras.....	19
2.2.5. Destilação.....	21
2.3. Propriedades do produto final.....	21
3. Descrição Experimental.....	23
3.1. Caracterização da amostra.....	23
3.1.1. Determinação do teor de carbono.....	23
3.1.2. Determinação do teor de nitrogénio e teor de proteínas.....	23
3.1.3. Determinação do teor de humidade.....	23
3.1.4. Determinação do teor de cinzas.....	23
3.1.5. Determinação do poder calorífico superior, PCS.....	24
3.2. Produção de bioetanol.....	24
3.2.1. Pré-tratamento.....	24
3.2.2. Hidrólise enzimática.....	25
3.2.3. Fermentação.....	26

3.2.4.	Destilação	27
3.2.5.	Análise dos açúcares redutores pelo método do DNS.....	28
4.	Resultados e Discussão	29
4.1.	Caracterização da amostra	29
4.2.	Hidrólise enzimática	30
4.3.	Produção de bioetanol.....	30
4.3.1.	Estimativa do rendimento máximo em bioetanol.....	31
5.	Conclusões e Sugestões.....	33
	Referências	35
	Anexos.....	39
	Caracterização da amostra	39
	Produção de Bioetanol	40
	Determinação dos açúcares pelo método do DNS.....	40

Índice de Figuras

Figura 1. Grão de café a) verde; b) intermédio; c) maduro (DeLonghi, s.d.).....	3
Figura 2. Fontes da biomassa para a produção de bioetanol (Gomes, 2010)	6
Figura 3. Gráfico representativo da produção de bioetanol na Europa (EUBIA, s.d.)...	10
Figura 4. Produção de Etanol a partir de diferentes matérias-primas (adaptado de (Manochio, 2014)).	13
Figura 5. Representação da estrutura lenho-celulósica com as frações de celulose, hemicelulose e lenhina (Mussatto & Teixeira, 2010).....	14
Figura 6. Reação enzimática (Potential, Kinetic, Free, and Activation Energy, s.d.)	17
Figura 7. Modelo enzimático "lock and key" (Newman, 2018).....	18
Figura 8. Pré-tratamento da borra de café extraída de óleo usado na produção de biodiesel.....	25
Figura 9. Acerto do pH da solução antes da adição de enzimas.....	26
Figura 10. Amostras no banho termostático durante a fermentação	27
Figura 11. Destilação da solução no rotavapor	27
Figura 12. Esquema do processo de produção de bioetanol.....	28

Índice de Tabelas

Tabela 1. Valor nutricional do café (por 100 g)	2
Tabela 2. Propriedades da gasolina, bioetanol e ETBE (adaptado de (EUBIA, s.d.)) ...	12
Tabela 3. Rendimento do processo de hidrólise da celulose	17
Tabela 4. Microrganismos produtores de etanol (Silva, 2011)	20
Tabela 5. Propriedades do bioetanol e da gasolina (Gomes, 2010).....	22
Tabela 6. Resumo das condições ótimas e atividade das enzimas utilizadas	26
Tabela 7. Resumo das condições de operação dos processos de produção de bioetanol	28
Tabela 8. Valores da caracterização da amostra de borra de café	29
Tabela 9. Valores da concentração dos açúcares redutores após hidrólise enzimática ..	30
Tabela 10. Valores obtidos para a determinação do teor de proteínas e teor de azoto...	39
Tabela 11. Valores obtidos para o teor de cinzas	39
Tabela 12. Valores obtidos para a determinação do teor de humidade	40

Lista de Abreviaturas

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

ETBE – Éter etil-terc-butílico

EUA – Estados Unidos da América

GEE – Gases com Efeito de Estufa

HCl – Ácido clorídrico

IEA – *International Energy Agency* (Agência Internacional de Energia)

NaOH – Hidróxido de sódio

PCS – Poder Calorífico Superior

RNA – Ácido ribonucleico

SFA – Sulfato Ferroso Amoniacal

UE – União Europeia

1. Introdução

A legislação em vigor obriga à incorporação de biocombustíveis nos combustíveis comercializados presentemente, em taxas crescentes e cada vez mais significativas.

Se a nível do biodiesel (biocombustível a incorporar no gasóleo) já tem havido alguns avanços e já há uma indústria estabelecida no mercado, a nível do bioetanol (biocombustível a incorporar na gasolina) há tecnologia sobejamente testada, quando a matéria-prima é o milho ou a cana-de-açúcar. No entanto, ainda é necessário desenvolver esforços adicionais para ser possível responder aos desafios colocados, nomeadamente quando se pretende utilizar matérias-primas não alimentares, como é o caso dos resíduos lenhocelulósicos.

Em Portugal o hábito de beber café após as refeições ou socialmente está muito enraizado. O café é um resíduo orgânico que mesmo após a extração com água, ainda pode ter cerca de 18% de óleo (p. ex. equivalente ao mesmo teor de óleo das sementes de soja), o qual pode ser valorizado na produção de biodiesel.

A borra de café, uma vez extraído o óleo, ainda tem valor, uma vez que contém muita matéria orgânica que poderá ser reconvertida através de processos como a compostagem, a digestão anaeróbia, a hidrólise da celulose e hemiceluloses e a fermentação dos açúcares, a pirólise ou apenas comprimida e transformada em *pellets* de resíduo, que podem ser usados como combustível em fornos e caldeiras.

Por estes motivos, urge avaliar o potencial da reciclagem deste tipo de resíduos, identificando também algumas condicionantes para a implementação de um tal sistema, e propondo soluções para o efeito.

Justifica-se assim o grande interesse social do presente trabalho, tanto do ponto de vista da saúde pública, como do impacto ambiental, como económico.

1.1. O café

A planta do café teve a sua origem na Etiópia, centro de África, no entanto a responsável pela sua distribuição foi a Arábia. O café tornou-se de grande importância para este povo, que tinha controlo completo sobre o cultivo e preparação da bebida. Era expressamente proibida a aproximação de estrangeiros às plantações (Café, s.d.).

Em 1615 o café começou a ser saboreado no continente Europeu, trazido pelos viajantes nas suas viagens ao oriente. Até ao século XVII, apenas os árabes produziam o café, no entanto, a partir daí os holandeses conseguiram cultivar as primeiras plantações de café em estufas em Amesterdão e, daí esta bebida passou a fazer parte definitiva dos hábitos europeus (Café, s.d.).

O valor nutricional do café encontra-se na Tabela 1, sendo estes valores apresentados para cada 100 g de café (Negro, s.d.).

Tabela 1. Valor nutricional do café (por 100 g)

Parâmetro	Valor
Energia (kJ)	2
Água (mg)	99,39
Gordura saturada (mg)	0,02
Proteínas (mg)	0,12
Cafeína (mg)	40
Vitaminas B1/B2/B3/B5/B6 (mg)	0,014 / 0,076 / 0,191 / 0,254 / 0,001
Vitaminas E/K (mg)	0,01 / 0,0001
Cálcio (mg)	2
Ferro (mg)	0,01
Magnésio (mg)	3
Manganês (mg)	0,023
Fósforo (mg)	3
Potássio (mg)	49
Sódio (mg)	2
Zinco (mg)	0,02

A produção mundial de café é de mais de cinco milhões de toneladas, sendo o Brasil, o seu maior produtor, produzindo cerca de 35% do café mundial (Azevedo, 2012).

O café é obtido a partir de um arbusto denominado cafeeiro, oriundo da etiópia sendo, atualmente, plantado em várias regiões. As condições ideais de cultivo são regiões que apresentem uma temperatura média entre os 18 e 24 °C, e com uma precipitação média entre 1200 e 2200 mm/ano (Azevedo, 2012).

Existem diversas espécies de café, sendo a mais consumida e mais antiga a Arábica. Este café é cultivado nos planaltos e encostas vulcânicas a uma altitude elevada e com temperaturas amenas (Azevedo, 2012).

Relativamente à Europa, o único país com plantação de café é Portugal, na ilha de São Jorge, nos Açores. Os terrenos onde é feita a plantação de café são planos, ao nível do mar, contendo alguns detritos vulcânicos. No entanto, é uma plantação pequena com cerca de 350 a 400 plantas apenas (Jornal I, 2015).

Nas imagens da Figura 1 é possível observar a evolução do grão de café, sendo que o primeiro é um grão de café verde, que à medida que vai perdendo a sua humidade também vai alterando a sua cor, ficando mais amarelado. Por fim, ocorrem mudanças físico-químicas no grão, ocorridas aquando da torrefação, transformando-o no grão que conhecemos e utilizamos diariamente, sendo a sua cor um castanho escuro (DeLonghi, s.d.).



Figura 1. Grão de café a) verde; b) intermédio; c) maduro (DeLonghi, s.d.)

Os componentes químicos do grão de café definem a qualidade da bebida, tanto do ponto de vista sensorial quanto do ponto de vista de saúde do consumidor. Relativamente à constituição lipídica do grão, esta relaciona-se com a qualidade da bebida depois de o grão sofrer a torrefação (Salva & Lima, 2007).

1.2. Borra de café

As borras de café são geradas em grande quantidade no setor da restauração e na produção de descafeinado, e têm um elevado potencial tanto para uso doméstico como na agricultura (Cruz, 2015). São um resíduo pouco trabalhado proveniente da produção de café solúvel, e têm geralmente como destino os resíduos sólidos indiferenciados, com o objetivo da sua eliminação (Lima P. M., 2016), o que constitui uma perda de valiosos recursos.

Hoje em dia, este produto, ou segue diretamente para os aterros sanitários ou então é usado para aquecimento de equipamentos na indústria. No entanto, como não passam por um controlo de qualidade, quando são queimados estes resíduos libertam uma grande quantidade de gases poluentes para a atmosfera (Cruz, 2015).

Devido à sua riqueza em diversos constituintes, este resíduo começou a ser estudado, sendo uma matéria orgânica com características físico-químicas excelentes que fazem com que esta possa ser valorizada e caracterizada como um subproduto do café, com bastante potencial a explorar (Lima P. M., 2016).

Para além desta borra ser usada como adubo, começou a ser estudada a produção de biocombustíveis que usam esta biomassa como fonte de matéria-prima. Os resultados obtidos em diversos estudos de valorização da borra de café variam, sendo que foi possível obter rendimentos de 97,5% na produção de bioetanol (Cruz, 2015).

Apesar da borra de café já ter sido estudada por diversos investigadores, ainda não há estudos significativos sobre a valorização da casca e da polpa do café (Ferreira, 2011).

A borra de café, um subproduto do café, para ser explorada e estudada convenientemente, deve ser caracterizada. Para conhecer a amostra são feitos diferentes ensaios de preparação e caracterização da amostra que levam a conhecer a constituição da mesma. No entanto, sabe-se que a borra de café é rica em celulose e hemiceluloses, que por sua vez são polissacarídeos constituídos por monómeros de açúcares simples, como a glicose, a xilose e a arabinose. Ora a glicose é justamente um açúcar facilmente fermentável a etanol, o que motiva o interesse da utilização da borra de café como matéria-prima para a produção de bioetanol.

1.3. Bioetanol

Cada vez mais a preocupação pelo meio ambiente está a ser considerada por todas as pessoas, e para isso é necessário diminuir as fontes de grande poluição.

Relativamente ao bioetanol, este biocombustível surge de modo a substituir combustíveis fósseis, sendo estes agentes que originam bastante poluição, nomeadamente ao nível das emissões de CO₂ e NO_x.

Esta combustível é produzido através de uma fermentação controlada e da destilação dos açúcares provenientes de resíduos vegetais, passando por processos físico-químicos até

ser transformado em combustível. A utilização do bioetanol traz várias vantagens, até porque a matéria-prima utilizada para a produção do mesmo é renovável (Pedra e Decoração, s.d.).

Como foi referido anteriormente os aspetos positivos deste combustível residem, sobretudo, no que diz respeito ao meio ambiente. O bioetanol, quando comparado com os combustíveis fósseis reduz a emissão de gases poluentes, visto que a sua queima não é tão agressiva para o meio ambiente como a gasolina, carvão ou lenha, fazendo assim com que haja uma significativa diminuição das emissões de CO₂ responsável pelo efeito de estufa (Pedra e Decoração, s.d.).

Em Portugal o bioetanol é quase uma novidade, mas no que diz respeito a alguns países, como o Brasil e os Estados Unidos da América, este biocombustível é muito utilizado e destacado como uma fonte de energia natural, limpa, renovável e sustentável (Pedra e Decoração, s.d.).

O setor dos transportes, em Portugal, tem um elevado peso no que diz respeito à poluição, tendo contribuído em cerca de 31% para o total das emissões nacionais, no ano de 2007, segundo a APA. Por este motivo, os biocombustíveis podem ser um caminho promissor para a redução da emissão destes gases que provocam o efeito de estufa (Gomes, 2010).

Devido à origem biogénica, o bioetanol, bem como outros biocombustíveis, não gera a libertação de GEE, uma vez que as emissões de CO₂ fazem parte do ciclo de carbono e a existência de elevada quantidade de matéria orgânica disponível é um ponto favorável para a produção destes compostos que substituem os combustíveis fósseis (Gomes, 2010).

Os biocombustíveis podem então, ser classificados de duas formas, os de primeira geração e os de segunda geração. Os combustíveis produzidos a partir de biomassas alimentares ricas em açúcares, óleos e amido, são classificados em biocombustíveis de primeira geração e estes podem ser produzidos através de fermentações, hidrólises, prensagens, esterificações. As biomassas mais usadas nos de primeira geração são as culturas amiláceas, como o milho, trigo, cevada e também a cana-de-açúcar (Gomes, 2010).

Relativamente aos biocombustíveis etílicos de segunda geração, estes derivam de biomassas lenho-celulósicas, de plantas herbáceas, através de processos como hidrólise, fermentação, gaseificação ou pirólise. Como exemplos destas biomassas temos os

relvados, os resíduos de árvores e arbustos, os resíduos agrícolas, entre outros (Gomes, 2010).

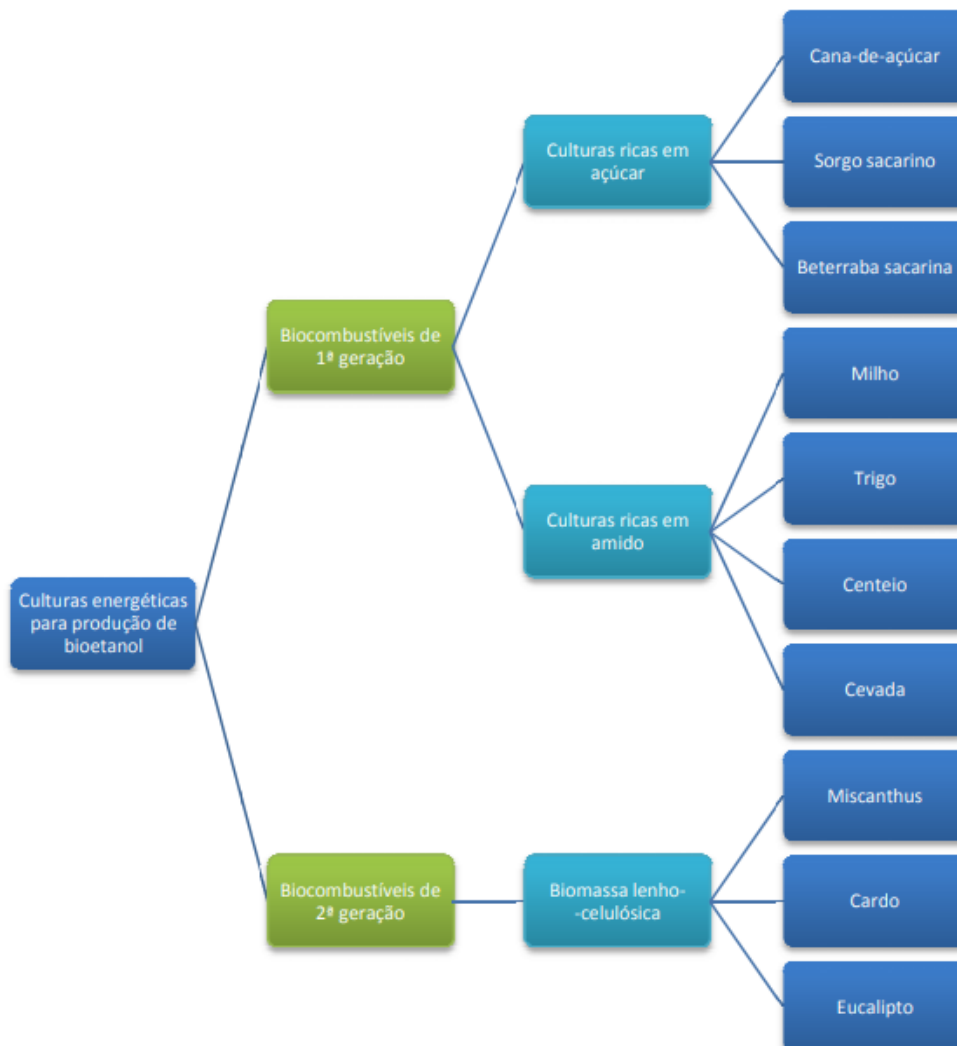


Figura 2. Fontes da biomassa para a produção de bioetanol (Gomes, 2010)

No que diz respeito ao bioetanol, este é um composto produzido a partir de biomassa ou de uma fração biodegradável de resíduos e serve para ser usado como biocombustível. A diferença entre o bioetanol e o biodiesel está sobretudo no facto de o primeiro ser um composto do grupo dos álcoois enquanto que o segundo é um éster metílico, sendo que o primeiro é um combustível alternativo à gasolina e o segundo um combustível alternativo ao gasóleo (Gomes, 2010).

1.4. Objetivos

O objetivo deste trabalho é o de produzir um composto, o bioetanol, que terá como finalidade a utilização como combustível alternativo à gasolina, sendo este mais amigo

do ambiente, menos poluente e partindo de uma biomassa que, habitualmente, não é reaproveitada.

Como a produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos residuais é um processo complexo, compreendendo várias etapas interligadas, decidiu-se centrar o objetivo deste estudo na identificação de enzimas capazes de potenciar a hidrólise enzimática, de modo a maximizar a quantidade de açúcares fermentáveis a etanol.

1.5. Estrutura do trabalho

Esta dissertação está organizada em 5 capítulos, referências bibliográficas e anexos. No 1º capítulo é apresentada uma breve introdução que aborda a importância do café e da maturação do grão, de modo a que este tenha uma maior qualidade e melhor sabor. É também abordada a composição química do café, os principais locais onde há maior produção deste e o valor nutricional do mesmo. É ainda desenvolvido o tema da borra de café, que é a biomassa utilizada para a produção do produto final, o bioetanol. São ainda referidas as etapas do processo utilizado para produzir bioetanol.

No 2º capítulo é referida e discutida a literatura, de modo enquadrar o leitor no estado de arte relativo à produção de bioetanol, em particular a partir de materiais lenhocelulósicos. Este capítulo servirá de sustentação para a elaboração do trabalho seguinte. O foco deste capítulo é a estrutura da biomassa e os processos que esta terá de sofrer para chegarmos ao produto desejado.

No 3º capítulo é apresentada uma descrição experimental das etapas do processo realizadas em laboratório, a descrição das condições de operação, bem como de todos os equipamentos necessários para a realização da experiência.

No 4º capítulo são apresentados e analisados detalhadamente os resultados obtidos experimentalmente.

No 5º capítulo é apresentada a conclusão da Dissertação, bem como são efetuadas recomendações para trabalhos futuros, tendo em conta os obstáculos encontrados durante a realização da mesma.

Segue-se a listagem das referências bibliográficas citadas.

Por fim, apresenta-se uma compilação de anexos. Nestes, são apresentados todos os cálculos efetuados, bem como as fichas de segurança dos reagentes utilizados.

2. Estado de Arte

2.1. A sociedade, a economia e o bioetanol

Uma enorme procura de combustíveis fósseis tem vindo a acontecer devido à redução das suas reservas e ao facto de estes serem preciosos a nível energético, sobretudo o petróleo. No entanto estes combustíveis são altamente poluentes e são não renováveis e, por isso, comprometem a segurança do abastecimento futuro de energia (Carvalho, 2008).

Consequentemente, existe cada vez mais uma procura por compostos energéticos alternativos, sobretudo os de origem biológica, que são renováveis e não apresentam libertação de gases poluentes para a atmosfera na sua utilização (Carvalho, 2008).

Compostos como o biodiesel e o bioetanol estão a ser usados cada vez mais frequentemente, e os seus processos de produção, a partir de diferentes matérias-primas que seriam desperdiçadas e com isto, acabam por ter um novo papel, são cada vez mais estudados.

No entanto, os processos de produção destes compostos, como estão no início tornam-se dispendiosos e para além disso são demorados, o que torna a utilização dos combustíveis fósseis mais tentadora.

O consumo mundial de gasolina em 2006 foi de 1,22 triliões de litros, segundo a IEA e estima-se que este valor aumente significativamente até 2025, passando a cerca de 1,75 triliões de litros (Melo, Santos, Galvão, & Assunção, 2009).

A nível internacional, tem decorrido um aumento frequente do preço do petróleo, devido à pressão exercida pelos países emergentes. Segundo a IEA, o consumo mundial de petróleo aumentou drasticamente entre 2000 e 2007, sendo que a China e a Índia apresentaram crescimentos de 57,7% e 31,6% (Melo, Santos, Galvão, & Assunção, 2009).

O aumento da utilização destes compostos derivados do petróleo está a aumentar drasticamente a poluição ambiental causando catástrofes climáticas como furacões, ciclones, inundações, entre outros. Por todos estes problemas ambientes há um aumento da convicção de toda a sociedade que deve haver uma substituição dos combustíveis fósseis o mais rapidamente possíveis (Melo, Santos, Galvão, & Assunção, 2009).

Recentemente tem havido um grande decréscimo no custo da produção de bioetanol proveniente da cana-de-açúcar, o que o torna competitivo com o gasóleo (Melo, Santos, Galvão, & Assunção, 2009).

Na Europa, a produção de bioetanol foi de cerca de 8,5 mil milhões de litros, sendo que o milho é a biomassa mais usada para a sua produção (EUBIA, s.d.).

No gráfico da Figura 3 é possível observar a evolução da produção de bioetanol ao longo dos anos (EUBIA, s.d.).

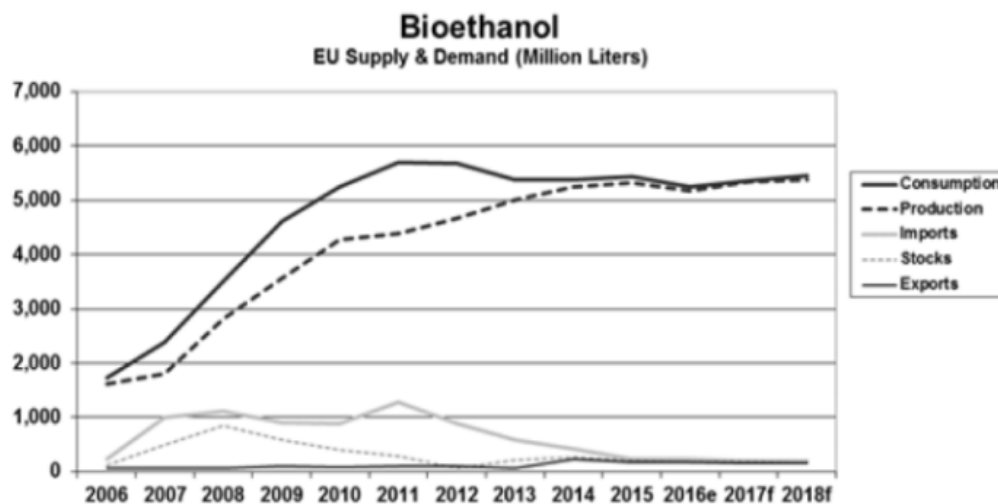


Figura 3. Gráfico representativo da produção de bioetanol na Europa (EUBIA, s.d.)

O setor dos transportes representa mais de metade do consumo mundial de petróleo, sendo que este continua a aumentar. Este consumo excessivo leva a um aumento nas emissões de gases com efeito de estufa, bem como a danos ambientais com grande impacto nos ecossistemas.

As emissões da queima destes combustíveis bateram um recorde histórico em 2011. Segundo a IEA o aumento desta emissão deve-se sobretudo aos países emergentes como a China e a Índia (Pinto, 2013). Consequentemente, a procura de fontes energéticas, ambientalmente sustentáveis, disponíveis para a economia mundial tem vindo a aumentar drasticamente (Pinto, 2013).

A IEA, prevê que, até 2030, os biocombustíveis representarão cerca de 7% dos combustíveis usados nos transportes, sendo que os principais produtores e consumidores serão os países da União Europeia (UE), Estados Unidos da América (EUA) e Brasil

(Pinto, 2013). Na UE os transportes representam cerca de 19% das emissões totais dos gases de efeito estufa. Com isto, as alterações climáticas, o aumento do preço do petróleo, entre outros, conduziram ao interesse pelos biocombustíveis como o biodiesel, bioetanol, entre outros (Pinto, 2013).

Relativamente a Portugal, este é um país com escassos recursos energéticos endógenos, nomeadamente os que podem assegurar as necessidades energéticas da maioria dos países desenvolvidos. Assim, é importante, aumentar a produção a contribuição das energias renováveis como a energia hídrica, eólica, solar, geotérmica e biomassa (Pinto, 2013).

Embora em Portugal a maior parte do combustível usado nos transportes seja o gasóleo, a utilização de gasolina é significativa e ainda não existe no mercado nenhum biocombustível comercialmente disponível, para satisfazer as necessidades de incorporação de biocombustível na gasolina. Assim, torna-se pertinente a realização de estudos relativos à produção de bioetanol, a partir de matérias-primas renováveis e que não entrem em competição com as biomassas alimentares.

2.2. Bioetanol

O bioetanol é o etanol sintetizado a partir de diferentes biomassas. Apesar de este ser muito melhor para o ambiente, apresenta algumas desvantagens em relação aos combustíveis fósseis, como o petróleo. Algumas dessas desvantagens são o facto de o bioetanol tem menor energia do que a gasolina e é muito higroscópico. O número de octanas no etanol é superior ao do petróleo. Os equipamentos que usam etanol como combustível não podem ser usados a temperaturas abaixo dos 20 °C, sendo que as temperaturas baixas são a maior dificuldade deste tipo de combustíveis (EUBIA, s.d.).

Os biocombustíveis produzidos a partir de matérias-primas lenhocelulósicas têm uma menor emissão de gases de efeito de estufa, reduzindo os impactos ambientais e as mudanças climáticas (Awolu & Ibileke, 2011). Tal como foi dito anteriormente, o bioetanol já é produzido através de outras matérias-primas diferentes da borra de café, sendo as principais o milho, a beterraba e a cana-de-açúcar.

2.2.1. Bioetanol de cana-de-açúcar

O processo de produção do bioetanol a partir da cana-de-açúcar é iniciado pela extração da sacarose, seguido de uma fermentação e por fim uma destilação (Manochio, 2014). A produção do bioetanol a partir da cana-de-açúcar é facilitada, quando comparada com

matérias-primas de origem amilácea, como o trigo e o milho. Isto acontece, pois estas matérias-primas necessitam de um processo que transforme o amido em açúcares simples, por ação enzimática (Manochio, 2014).

2.2.2. Bioetanol de materiais lenhocelulósicos

Inicialmente o bioetanol era produzido a partir da sacarose das matérias-primas, no entanto isso tem vindo a mudar, sendo agora utilizada a celulose presente nas mesmas. A produção de bioetanol tem 60% do seu fabrico centrado nas matérias-primas cana-de-açúcar e beterraba, que devido ao elevado teor de sacarose são convertidas ao seu monómero, para que seja possível esta produção. No entanto, as matérias lenhocelulósicas contêm entre 50 a 60%, em base seca, de compostos com 5 ou 6 átomos de carbono (C5 ou C6) que são açúcares (Awolu & Ibileke, 2011).

Para que a hidrólise da celulose seja eficiente é necessário que as enzimas consigam aceder a esta, o que é quase impossível devido à barreira impermeável de lenhina das células vegetais (Canilha, et al., 2010). Para destruir esta barreira, é necessário a realização de um pré-tratamento (Figura 4) que tem como objetivo maximizar a digestão enzimática, minimizar a perda de açúcares, otimizar a produção de subprodutos, e não requerer a adição de reagentes que inibam as enzimas usadas na hidrólise enzimática e os organismos fermentativos, entre outros (Canilha, et al., 2010).

Na Tabela 2 é possível observar as propriedades da gasolina, do bioetanol e do ETBE (um éter, aditivo da gasolina, produzido a partir do etanol) (EUBIA, s.d.).

Tabela 2. Propriedades da gasolina, bioetanol e ETBE (adaptado de (EUBIA, s.d.))

Propriedade	Gasolina	Bioetanol	ETBE
Peso molecular (kg/kmol)	111	46	102
Densidade (kg/L) 15 °C	0,75	0,80-0,82	0,74
Oxigénio (%)	-	34,8	-
Poder Calorífico Inferior (MJ/kg) a 15 °C	41,3	26,4	36
Nº Octanas (RON)	97	109	118

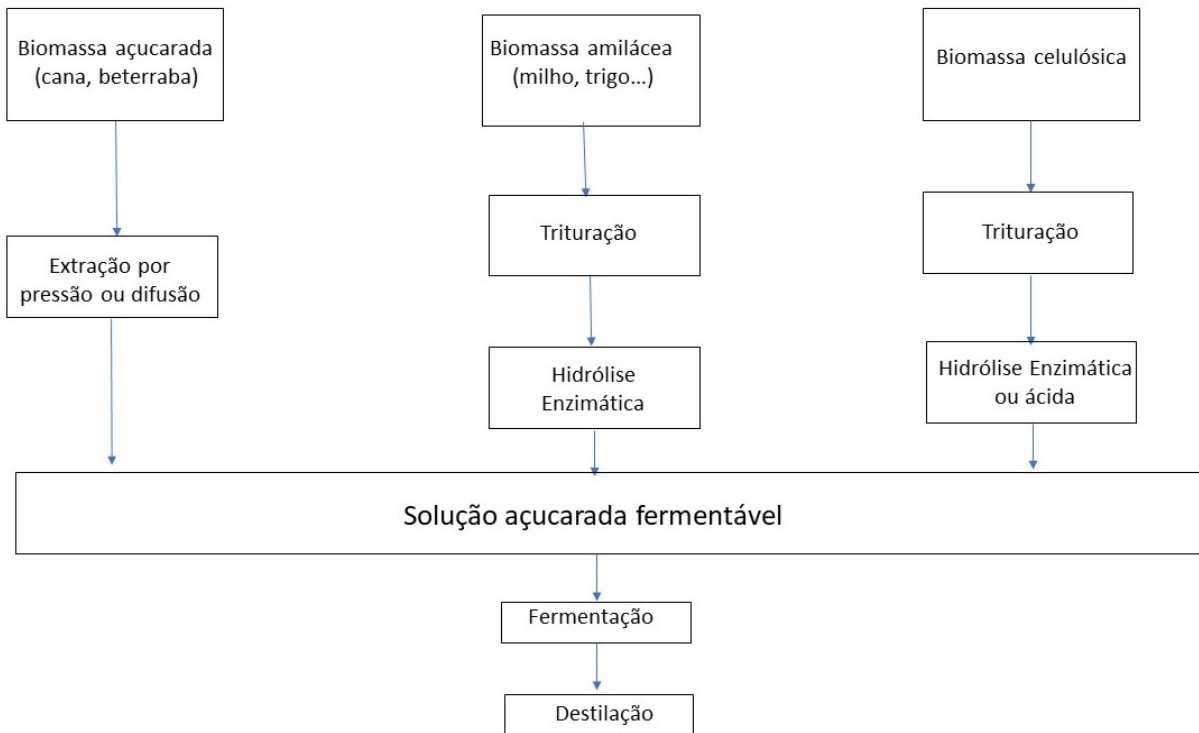


Figura 4. Produção de Etanol a partir de diferentes matérias-primas (adaptado de (Manochio, 2014)).

2.2.2.1. O café e os seus resíduos

O café, para além do grão, tem uma casca protetora envolvente e uma polpa que são retirados depois da sua colheita. Estes resíduos já foram utilizados com alimento para animais bovinos, peixes, coelhos, entre outros, no entanto a sua elevada taxa de taninos, cafeína e fenóis torna-os anti-nutricionais para os mesmos, Noutros países, estes resíduos são usados como fertilizantes, pois são ricos em azoto, matéria orgânica e potássio (Ferreira, 2011).

À semelhança da casca de café e da polpa, a borra de café também tem uma elevada quantidade de taninos, cafeína e fenóis o que acaba por torná-la um pouco tóxica. A elevada quantidade de polissacarídeos e de lípidos presentes na borra de café, na sua maioria triglicerídeos e esteres, constitui um benefício tanto para a produção de bioetanol tanto como para a produção de biodiesel (Ferreira, 2011).

A borra de café é um material lenho-celulósico, ou seja, é um conjunto de macromoléculas orgânicas, complexas constituídas na maioria das vezes por pectinas, lenhinas, hemiceluloses e celulosas as quais podem estar ligadas ou não entre si. A borra é constituída essencialmente por carbono, hidrogénio e oxigénio os quais formam

polímeros naturais contendo grupos funcionais como carboxilos, compostos polifenólicos, entre outros. A lenho-celulose é a parte fibrosa da planta (Banerjee, et al., 2010).

Para conseguirmos obter etanol a partir deste tipo de matérias-primas é necessário extrair os açúcares fermentescíveis nelas presente. O objetivo inicial é o de remover a lenhina, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose e despolimerizar as hemiceluloses (Canilha, et al., 2010).

Existem vários métodos para conseguirmos aumentar a área superficial, como por exemplo a redução da granulometria, que irá aumentar a área superficial disponível e diminuir a cristalinidade da celulose, promovendo a sacarificação enzimática, no entanto é desfavorável no que diz respeito ao consumo energético. Existem também, pré-tratamentos biológicos com fungos ou bactérias que ajudam na degradação da lenhina, no entanto, a velocidade da degradação é muito lenta (Canilha, et al., 2010).

Como foi referido anteriormente, os materiais lenhocelulósicos têm na sua constituição, maioritariamente, lenhina, hemicelulose e celulose. A imagem da Figura 5 é representativa de uma amostra lenho-celulósica (Mussatto & Teixeira, 2010).

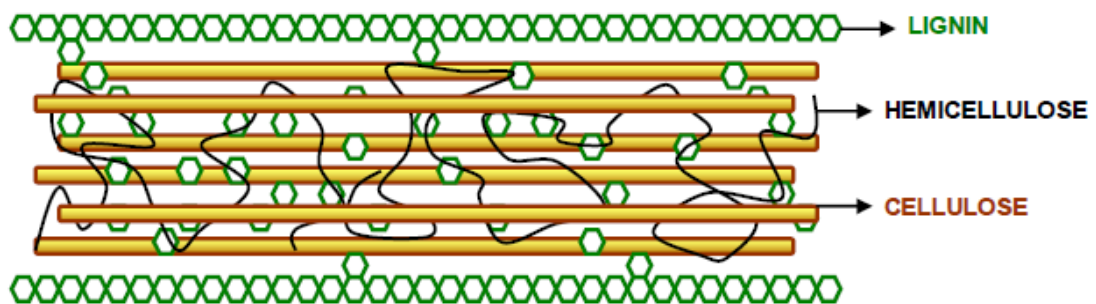


Figura 5. Representação da estrutura lenho-celulósica com as frações de celulose, hemicelulose e lenhina (Mussatto & Teixeira, 2010).

2.2.2.1.1. Lenhina

A lenhina é bio sintetizada através de uma reação de radicais livres. Este composto é estável, com alto peso molecular. A lenhina ocupa o espaço à volta da celulose e da hemicelulose e completa o polímero. Como é muito rígida, torna-se difícil o acesso às moléculas de celulose e hemicelulose (Cassales, 2010). A lenhina protege relativamente à degradação química e/ou biológica (Canilha, et al., 2010).

2.2.2.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero linear e heterogeneamente ramificado, tipicamente constituída por cinco açúcares diferentes, sendo eles a L-arabinose, a D-galactose, a D-glicose, a D-manose e a D-xilose. A cadeia principal da hemicelulose pode ser um homopolímero (constituído por um só açúcar) ou um heteropolímero (mistura de diferentes açúcares). De acordo com o principal açúcar presente na cadeia principal a hemicelulose pode ter diferentes classificações como xilana, manana, glucana, entre outros. Quando comparada com a celulose, esta é diferente na composição das unidades de açúcar, na presença de cadeias curtas, na ramificação da cadeia principal e por ser amorfa, o que a torna mais fácil de hidrolisar do que a celulose (Mussatto & Teixeira, 2010).

2.2.2.1.3. Celulose

A celulose é um composto formado por uma longa cadeia de polímeros repetidos de D-glicose. No seu estado natural, a celulose é o constituinte mais abundante da parede celular vegetal, com ligações glicosídicas que permitem as ligações por pontes de hidrogénio intra e intermoleculares (Cassales, 2010). A celulose tem uma elevada cristalinidade, resistência à tensão, é insolúvel num elevado número de solventes, entre muitas outras características (Canilha, et al., 2010).

Do ponto de vista tecnológico, a celulose e as hemiceluloses são substratos que podem ser usados na produção de etanol por via fermentativa. No entanto, o facto de a celulose, as hemiceluloses e a lenhina se encontrarem juntas faz com que seja mais difícil obter os seus monómeros com elevado grau de pureza (Canilha, et al., 2010).

2.2.3. Hidrólise

O processo de hidrólise consiste na conversão da celulose em glicose, que normalmente é catalisada com ácido, concentrado ou diluído (Gomes, 2010). A reação química que traduz a reação de conversão da celulose em glicose é a descrita na equação (1).



Existem três diferentes tipos de hidrólise, usados mais frequentemente na produção de bioetanol, sendo eles a hidrólise com ácido diluído, com ácido concentrado e a enzimática. A hemicelulose pode ser hidrolisada com ácido diluído em condições

moderadas, mas tal não acontece com a celulose, sendo necessárias condições extremas para que esta seja hidrolisada (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009).

No processo da hidrólise com ácido diluído é necessário usar altas temperaturas e pressões, devido ao baixo rendimento da conversão da celulose em glicose, que resulta num baixo rendimento de produção de etanol (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009). Este procedimento tem sido bem-sucedido no pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos em que é utilizado, por exemplo, ácido sulfúrico diluído pois faz aumentar a taxa de hidrólise da celulose. Foi desenvolvido recentemente um processo com condições menos severas e que origina altos rendimentos de xilanas a partir de xiloses (Sun & Cheng, 2002).

O uso de ácido concentrado na hidrólise origina rendimentos muito elevados em etanol, uma vez que há uma conversão quase total da celulose em glicose. As temperaturas utilizadas neste processo são inferiores a 50 °C e realiza-se à pressão atmosférica (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009). São utilizados ácidos concentrados como o ácido sulfúrico ou o ácido clorídrico e, por isso, esta hidrólise é mais perigosa para o ambiente uma vez que os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e requerem reatores resistentes à corrosão. Para além disso o ácido utilizado deveria ser recuperado para que este processo fosse rentável, o que é impossível, uma vez que ele vai ficar diluído no produto resultante (Sun & Cheng, 2002).

No entanto, para além das hidrólises com ácidos são também realizadas hidrólises enzimáticas. As enzimas são produzidas por uma enorme variedade de microrganismos e para além disso são capazes de quebrar a lenho-celulose em açúcares, mas o processo requer elevados tempos de retenção, sendo realizado em condições amenas de pressão e temperatura (Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009). O custo deste tipo de hidrólise, quando comparado com as hidrólises ácida ou alcalina é muito baixo uma vez que a hidrólise enzimática ocorre a condições moderadas, com o pH cerca de 4,8 a 6 e temperaturas entre os 45 e 50 °C e não origina problemas de corrosão (Sun & Cheng, 2002).

As bactérias e os fungos conseguem produzir celulasas a partir da hidrólise das matérias lenho-celulósicas. Os microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesófilos ou termófilos (Sun & Cheng, 2002).

Antes de ocorrer o processo de hidrólise, a amostra tem de ser submetida a um processo de pré-tratamento, de modo a que os componentes se quebrem e a lenhina sofra uma destruição de modo a ser possível os processos químicos e biológicos conseguirem atuar na mesma (Gomes, 2010).

Na Tabela 3 é possível observar a variação da percentagem da sacarificação atingida dependendo da utilização de ácido concentrado, ácido diluído ou enzimas.

Tabela 3. Rendimento do processo de hidrólise da celulose

Processo	Input	Temperatura	Tempo	Sacarificação
Ácido diluído	<1% H ₂ SO ₄	215°C	3 min	50-70%
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40°C	2-6 h	90%
Enzimático	Celulase	70°C	1,5 dia	75-95%

2.2.3.1. Enzimas

Enzimas são substâncias que aumentam a velocidade da reação química, sem alterar os produtos da reação pretendidos. Estas, são normalmente proteínas constituídas por RNA. As enzimas têm uma função de abaixamento da energia de ativação da reação (Figura 6). Estas enzimas trabalham ligando-se a moléculas reagentes de tal modo que as ligações se quebrem e se formam novas ligações mais facilmente (Biology, s.d.).

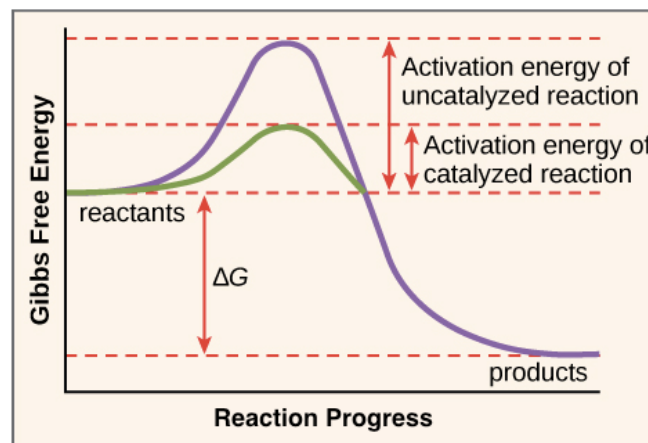


Figura 6. Reação enzimática (Potential, Kinetic, Free, and Activation Energy, s.d.)

A atividade enzimática é afetada pelo ambiente, devido à sua sensibilidade. Alguns fatores que afetam as enzimas são o pH e a temperatura (Biology, s.d.).

Altas temperaturas geralmente originam elevados rendimentos de reação. A diferença de temperatura, no entanto pode afetar desnaturar as enzimas afetando as ligações químicas e fazendo com que sejam menos adequadas para se ligarem aos substratos (Biology, s.d.).

Relativamente ao pH, este também pode afetar a atividade enzimática. As enzimas podem ter propriedades ácidas ou básicas que são muito importantes para a catálise. Mudanças de pH podem afetar esses resíduos e fazer com que as ligações sejam mais fortes. As enzimas, atuam melhor num certo intervalo de pH, ácido ou básico (Biology, s.d.).

O primeiro modelo de uma enzima foi proposto em 1894, sendo que este era constituído por um substrato e um centro ativo ao qual se ligava o substrato. A forma do centro ativo é perfeita, de modo a que os substratos se liguem e por isso passou a denominar-se de “*Enzyme lock and key model*”, tal como podemos ver na Figura 7 (Newman, 2018).

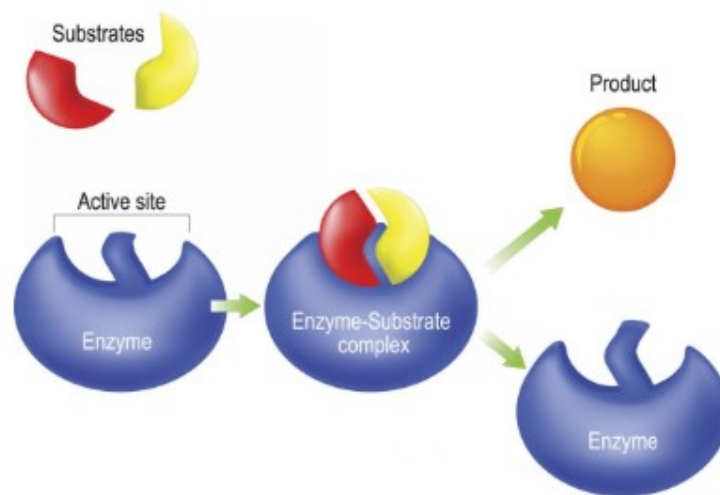


Figura 7. Modelo enzimático "lock and key" (Newman, 2018)

Consoante o produto final que se pretende obter, existem diversos tipos de enzimas como as lipases, amilases, maltases, tripsinas, lactases, entre muitas outras. A função das enzimas lipases é a de digerir a gordura, enquanto que, por exemplo, a função das tripsinas é a destruição de proteínas, transformando-as nos seus monómeros, os aminoácidos (Newman, 2018). Neste caso concreto, para a produção do bioetanol são usadas enzimas que tem como objetivo quebrar os polissacarídeos de modo a que estes consigam transformar em moléculas simples de glicose, xilose, arabinose, e outros açúcares, que serão posteriormente fermentados.

2.2.4. Fermentação

A fermentação é um processo essencial na produção de bioetanol, sendo a levedura mais frequentemente usada a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura tolera um elevado número de inibidores. No entanto, outras leveduras capazes desta fermentação foram

descobertas, como o caso da *Zymomonas mobilis* que tem uma elevada tolerância ao etanol, elevada eficiência energética e produção de etanol (Banerjee, et al., 2010).

A *Saccharomyces cerevisiae*, atualmente é a levedura mais utilizada; no entanto apenas consegue fermentar hexoses, sendo um problema, pois não consegue fazê-lo com as xiloses e outras pentoses, que são o principal constituinte das hemiceluloses, que são cerca de 30% da biomassa total (Banerjee, et al., 2010).

A fermentação pode ser de dois tipos, alcoólica ou láctea. A fermentação alcoólica tem vários fatores que a influenciam como a temperatura, oxigénio, azoto, entre outros. Relativamente à temperatura, as leveduras requerem uma temperatura ótima entre 31 e 33 °C (Carvalheira, s.d.).

O nitrogénio é imprescindível à nutrição das leveduras. Contribui para a síntese de proteínas e a adição deste pode ser feita no início da fermentação de modo a aumentar o seu rendimento. No entanto o excesso de nitrogénio é nocivo (Carvalheira, s.d.).

2.2.4.1. Leveduras

As leveduras são seres eucarióticos, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o tipo de levedura mais usada para a produção de etanol. Estes microrganismos reproduzem-se por gemação, onde uma célula, por união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (Steckelberg, 2001).

As leveduras realizam a fermentação de açúcar com o objetivo de terem a energia necessária à sobrevivência e como produto disso é possível a obtenção de etanol (Steckelberg, 2001).

Na

Estes microrganismos são como os fungos, sendo que alguns deles podem ser denominados de dimórficos, ou seja, apresentam duas formas, e por isso alguns deles são tão perigosos para os seres humanos. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais usada para a produção de pão, sendo que o dióxido de carbono produzido faz levedar a massa e aumentar o seu tamanho. Os seres iniciais começam pequenos, no entanto vão aumentando o seu tamanho progressivamente separando-se da célula mãe formando uma espécie de septo .

As leveduras do tipo *Ale* fermentam à superfície do fermentador e por isso são as mais usadas, já as do tipo *lager* preferem o fundo do fermentador, e a grande diferença entre estas é a temperatura. As leveduras *Ale* fermentam a temperaturas de 13 °C e as *lager* a temperaturas de 4 °C .

Tabela 4 é possível observar diferentes microrganismos utilizados em processos de fermentação e os seus rendimentos teóricos.

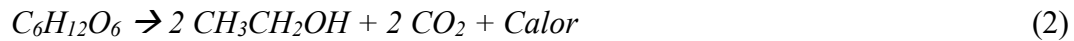
Estes microrganismos são como os fungos, sendo que alguns deles podem ser denominados de dimórficos, ou seja, apresentam duas formas, e por isso alguns deles são tão perigosos para os seres humanos. A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais usada para a produção de pão, sendo que o dióxido de carbono produzido faz levedar a massa e aumentar o seu tamanho. Os seres iniciais começam pequenos, no entanto vão aumentando o seu tamanho progressivamente separando-se da célula mãe formando uma espécie de septo (Deacon, s.d.).

As leveduras do tipo *Ale* fermentam à superfície do fermentador e por isso são as mais usadas, já as do tipo *lager* preferem o fundo do fermentador, e a grande diferença entre estas é a temperatura. As leveduras *Ale* fermentam a temperaturas de 13 °C e as *lager* a temperaturas de 4 °C (Palmer, 2017).

Tabela 4. Microrganismos produtores de etanol (Silva, 2011)

Microrganismo	Tipo de Microrganismo	Substratos assimiláveis	Rendimento Teórico (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura	Glucose, Galactose, Maltose, Sacarose	43 – 87
<i>Pichia stipitis</i>	Levedura	Glucose, Xilose, Arabinose, Manose	83 - 92
<i>Candida shehatae</i>	Levedura	Glucose, Xilose, Arabinose, Manose	75 - 90
<i>Candida lusitanae</i>	Levedura	Glucose, Xilose, Sacarose, Celobiose, Sorbitol, Maltose	70 - 85
<i>Candida tropicalis</i>	Levedura	Glucose, Xilose, Sacarose, Celobiose, Sorbitol, Maltose	76 - 85
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria	Glucose, Glicerol	70 - 90
<i>Zymomonas mobilis</i>	Bactéria	Glucose, Xilose, Frutose, Sacarose	80 - 92
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bactéria	Glucose, Frutose, Sacarose, Maltose	80-90
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Levedura	Glucosa, Xilosa, Glicerol	75-80
<i>Clostridium thermocellum</i>	Bacteria	Glucosa, Xilosa	60-80
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Levedura	Glucose	70 - 80

As leveduras são utilizadas para fermentar os açúcares, para ser possível a obtenção de biocombustível (Gomes, 2010). Os açúcares, hexoses e pentoses, são diretamente fermentados e a reação química que traduz este processo é representada pela equação (2):



Ou seja, uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$), sofre fermentação, dando origem a duas moléculas de etanol (CH_3CH_2OH) e duas moléculas de dióxido de carbono (CO_2), com libertação de calor.

Um dos principais problemas no rendimento da fermentação é o facto de as pentoses serem extremamente difíceis de fermentar, utilizando leveduras convencionais como a *Saccharomices cerevisiae*.

2.2.5. Destilação

A destilação é o último processo na produção/obtenção do etanol, e tem como objetivo a recuperação do mesmo.

A destilação fracionada é um dos métodos de destilação usados mais frequentemente para purificar o bioetanol, esta baseia-se nas volatilidades, dos compostos envolvidos. Como o ponto de ebulição da água (100 °C) é superior ao do etanol (78 °C), o último evapora e condensa primeiro, dando origem a etanol com elevado grau de pureza. O composto mais volátil é recuperado no topo e o menos volátil na base (Tavares, 2014).

Outro tipo de destilação é a destilação simples, que tem como objetivo a separação entre dois compostos com ponto de ebulição bastante diferente, ou então a separação de sólidos e líquidos, ou compostos voláteis de não voláteis. Nesta destilação o líquido mais volátil passa a vapor e é encaminhado para um condensador. Este condensador encontra-se a temperaturas mais baixas e faz com que o vapor passe novamente a líquido, sendo recolhido mais eficazmente (Helmenstine, 2019).

Na destilação recorrendo ao rotavapor, o ponto de ebulição é diminuído através de vácuo e assim consegue-se manter o solvente a uma temperatura inferior e constante. Este equipamento, permite a separação de solventes com diferentes pontos de ebulição, a realização de destilações simples ou até mesmo concentrar amostras sólidas ou líquidas (CQA Comercial Química Americana Ltda., 2015).

2.3. Propriedades do produto final

O etanol tem algumas propriedades mais positivas que a gasolina, sendo que as moléculas de etanol são constituídas por uma extremidade polar e outra apolar. Esta propriedade faz com que seja possível a ligação da molécula de etanol com átomos de hidrogénio o que pode fazer com que este se torne menos volátil e mais viscoso, o que é um aspeto positivo quando o utilizamos como combustível (Gomes, 2010).

O etanol é um composto incolor, com cheiro e sabor distinto, e é muito pouco tóxico, no entanto é muito difícil obter etanol 100% puro uma vez que este contém na maioria das vezes uma pequena percentagem de água, devido à existência de um azeótropo.

Na Tabela 5 é possível observar as propriedades do bioetanol e da gasolina, sendo possível a comparação entre estes.

Tabela 5. Propriedades do bioetanol e da gasolina (Gomes, 2010)

Propriedade	Bioetanol	Gasolina
Peso Molecular [g.mol ⁻¹]	46,07	100-105
Carbono [% mássica]	52,2	85-88
Hidrogénio [% mássica]	13,1	12-15
Oxigénio [% mássica]	34,7	0
Densidade, 20°C [kg.l ⁻¹]	0,792	0,72-0,78
Viscosidade [cST]	1,52 (20°C)	0,4-0,9 (16°C)
Temperatura de ebulição, 1 atm [°C]	78,4	27-225
Temperatura de auto-ignição [°C]	423	257
Calor de Vaporização [kJ.kg ⁻¹]	910	330-400
Calor de Combustão [MJ.l ⁻¹]	21,3	32,45
Poder Calorífico Inferior [MJ.kg ⁻¹]	26,9	42-44
Número de octanas	108	90-100

O número de octanas do bioetanol é superior ao número de octanas da gasolina e por isso a utilização do bioetanol, como aditivo da gasolina, faz com que este eleve o número de octanas, o que é um aspeto positivo, pois não deixa que as ignições sejam prematuras. Para além disso há uma grande diferença do peso molecular entre os dois compostos.

3. Descrição Experimental

Neste capítulo será descrito o procedimento experimental, iniciando pela caracterização da amostra e passando depois às etapas de pré-tratamento ácido, seguindo-se a hidrólise enzimática, a fermentação, a destilação e, finalmente, a avaliação dos resultados obtidos.

3.1. Caracterização da amostra

A borra de café usada neste trabalho era a fração resultante após a extração do óleo de café com hexano. A borra extraída foi seca ao ar antes de ser caracterizada e usada neste trabalho.

3.1.1. Determinação do teor de carbono

O teor de carbono fixo (CF) representa a massa restante após a libertação de compostos voláteis, excluindo as cinzas e humidade (Vieira, 2012). O procedimento consiste na realização de uma digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado durante 3 h seguida de uma titulação com SFA.

3.1.2. Determinação do teor de nitrogénio e teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas é uma determinação indireta, uma vez que, não determina a quantidade de proteína, mas sim o azoto orgânico total. O teor de nitrogénio é medido pelo método Kjeldahl. O método compreende três fases que são a digestão, destilação e titulação (TECNAL, s.d.).

3.1.3. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade é determinado através de um método termogravimétrico, ou seja, pela perda de peso na secagem. Resumidamente, a amostra é aquecida em estufa a 105 ± 5 °C, durante 1 h (há evaporação da humidade), seguindo-se o arrefecimento em exsiccador e pesagem. O procedimento de aquecimento, arrefecimento e pesagem é repetido até a amostra atingir peso constante. O teor de humidade é calculado através da razão entre a perda de peso da amostra e o peso da amostra original (Toledo, s.d.).

3.1.4. Determinação do teor de cinzas

Os resíduos resultantes da combustão de produtos orgânicos são caracterizados, tendo em conta o teor de cinzas. Este teor é obtido da combustão da biomassa, a qual é processada a altas temperaturas. As cinzas podem originar-se de elementos metálicos presentes na

biomassa. Em norma, altas concentrações de cinzas diminuem o poder calorífico e causam perda de energia (Vieira, 2012). Resumidamente, para determinar o teor de cinzas, uma amostra seca em estufa é pesada num cadinho previamente seco em mufla a 550 °C, é depois calcinada em mufla a 550 °C durante um período de 1 h, arrefecida em exsiccador e pesada. O procedimento de calcinação, arrefecimento e pesagem é repetido até peso constante. O teor de cinzas, exprime-se em base seca e é a razão entre a massa de cinzas sobrantes no cadinho e a massa de amostra seca usada no ensaio.

3.1.5. Determinação do poder calorífico superior, PCS

O poder calorífico é a quantidade de energia libertada pela biomassa, ou outro composto, quando há a sua combustão completa. Quando ocorre a combustão completa de um combustível, este liberta energia térmica que é geralmente medida em termos de energia por unidade de massa ou volume. De maneira geral, o poder calorífico depende da composição da biomassa e do grau de humidade da mesma. O poder calorífico pode ser dividido em dois, o poder calorífico superior (PCS) e o poder calorífico inferior (PCI) (Vieira, 2012). O PCS consiste no calor libertado durante a combustão, sendo que a água se encontra em estado líquido, enquanto que o PCI, é o calor libertado, mas com a água presente na amostra no estado gasoso (Lima A. , 2019).

3.2. Produção de bioetanol

Uma vez caracterizada a amostra, o procedimento experimental prossegue para a produção de bioetanol, iniciando-se pelo pré-tratamento com ácido diluído.

3.2.1. Pré-tratamento

Para a produção de bioetanol a partir de uma matéria prima lenho-celulósica, é necessário a realização de um pré-tratamento de modo a haver remoção, pelo menos parcial, da lenhina e assim ser facilitado o acesso das enzimas na etapa de hidrólise enzimática à celulose e às hemiceluloses.

O pré-tratamento foi realizado com ácido nítrico diluído, de modo a que a biomassa absorvesse também uma pequena percentagem de azoto permitindo que o rendimento da reação de fermentação seja superior.

Resumidamente, 100 g de biomassa (borra extraída do óleo usado para a produção de biodiesel), é posta em contacto com 800 ml de solução de ácido nítrico a 3 % (v/v) num

frasco fechado, colocado num banho termostático durante 3 h, à temperatura de 85 °C, com agitação a 40 rpm.

Na Figura 8, é possível observar-se a realização do pré-tratamento.



Figura 8. Pré-tratamento da borra de café extraída de óleo usado na produção de biodiesel

3.2.2. Hidrólise enzimática

Para a produção de bioetanol, segue-se a hidrólise enzimática, tendo como objetivo a transformação das hemiceluloses e da celulose em açúcares simples, para que estes depois possam ser fermentados de modo a obtermos o produto final desejado, o bioetanol.

Este processo é realizado com adição de enzimas, e requer um controlo tanto da temperatura como do pH. Como o pré-tratamento foi realizado em meio ácido, é necessária a adição de NaOH (a 40 %) até pH favorável às enzimas utilizadas.

Ban, *Viscozyme*, *Ultraflo L* (da *Novozymes*), e *Cellulase* (da *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich) foram as 4 enzimas usadas neste processo, sendo que todas elas têm como pH ótimo valores entre 5 e 6. O acerto de pH foi feito com a adição de NaOH concentrado, medido com o medidor de pH (Consort). Na Figura 9, é possível observar a medição do pH da solução com um medidor de pH.

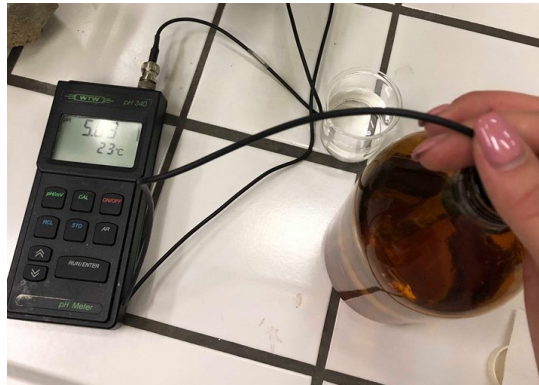


Figura 9. Acerto do pH da solução antes da adição de enzimas

Depois do pH acertado, são adicionadas as enzimas, uma em cada frasco, numa proporção de 2 ml de enzima por cada 100 g de amostra existente no frasco. As amostras são depois colocadas num banho termostático durante 24 h, a 50 °C, com agitação constante a 40 rpm.

Na Tabela 6, é possível observar um quadro resumo com as características das enzimas usadas neste trabalho.

Tabela 6. Resumo das condições ótimas e atividade das enzimas utilizadas

Enzima	pH
<i>Ban</i>	5 - 6
<i>Viscozyme</i>	5 - 6
<i>Ultraflo L</i>	5 - 6
<i>Cellulase de Aspergillus niger</i>	5 - 6

3.2.3. Fermentação

O processo seguinte à hidrólise enzimática é a fermentação. Neste processo, ocorre a fermentação dos açúcares obtidos durante a hidrólise enzimática, por ação de leveduras. Este também é um processo que requer um pH estável e, por isso, é necessária a adição de uma solução tampão de modo a que as leveduras consigam fermentar os açúcares em condições favoráveis, a fim de obtermos um elevado rendimento.

A solução tampão utilizada foi o citrato de sódio, tendo sido adicionado cerca de 150 ml em cada frasco de amostra, de modo a que o pH estabilizasse em 5. Para além do tampão, adicionou-se ainda 10 g de levedura, *Saccharomyces cerevisiae* (da *Levital*) previamente dissolvida em cerca de 5 ml de água morna, a cada amostra.

As amostras foram colocadas num banho termostático a 30 °C, com agitação a 40 rpm, durante 7 dias. Na Figura 10 é possível observar as amostras a fermentar no banho.



Figura 10. Amostras no banho termostático durante a fermentação

3.2.4. Destilação

A destilação é a última etapa do processo para a produção do bioetanol. A destilação da solução foi realizada no rotavapor, tal como se pode observar na Figura 11, e tem como objetivo separar o etanol que foi produzido durante a fermentação alcoólica. A solução de etanol que se obtém não é totalmente pura, tendo água na sua composição. A destilação é realizada apenas com o líquido, sendo que os sólidos ficaram depositados no frasco.



Figura 11. Destilação da solução no rotavapor

Para a realização da destilação foi usada uma temperatura de 60 °C e pressão de 175 mmHg.

No esquema da Figura 12, é possível observar as etapas do processo de produção de etanol, resumidamente.

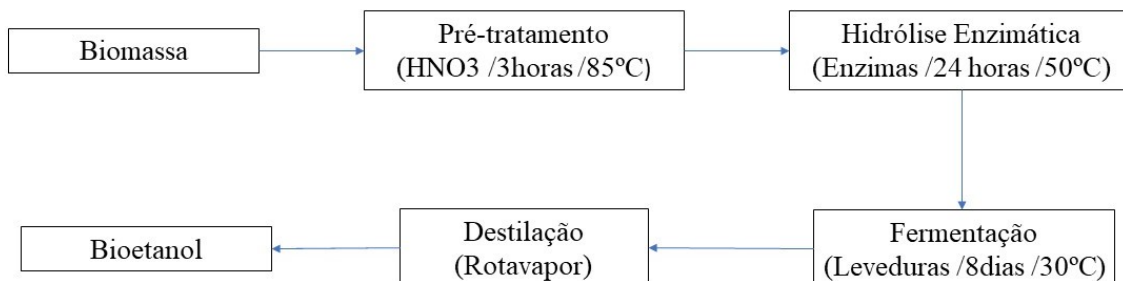


Figura 12. Esquema do processo de produção de bioetanol

Na Tabela 7 apresenta-se um resumo com as condições de operação usadas nas várias etapas do processo de produção de bioetanol a partir da borra de café extraída.

Tabela 7. Resumo das condições de operação dos processos de produção de bioetanol

Etapa	Condições de operação
Pré-tratamento	800 mL HNO ₃ 3 % / 100 g de borra de café / 85 °C / 3 h
Hidrólise enzimática	2 mL <i>Cellulase</i> / <i>Viscozyme</i> / <i>Ultraflo L</i> / <i>Ban</i> / 50 °C / 24 h
Fermentação	10 g <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / 30 °C / 1 semana
Destilação	Rotavapor à pressão e temperaturas definidas no equipamento

3.2.5. Análise dos açúcares redutores pelo método do DNS

O método do DNS tem como objetivo a quantificação da concentração de açúcares de uma solução, tendo em conta a sua absorvância. Para isto, é necessária a preparação de soluções padrão para a realização de uma curva de calibração. De seguida é preparada a amostra, sendo colocado num tubo 0,5 ml de amostra, 0,5 ml de solução de DNS e leva-se à ebulição. Após a ebulição, são adicionados 5,00 ml de água desmineralizada e a solução é agitada no vortex. Por fim, é feita a leitura da absorvância e através da curva de calibração, é calculada a concentração da amostra.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados obtidos e uma breve discussão.

4.1. Caracterização da amostra

Para a caracterização da amostra, borra de café após extração do óleo usado na produção de biodiesel, foram avaliados o teor de azoto, de proteínas, a humidade, o teor de cinzas, e o Poder Calorífico Superior (PCS).

Na Tabela 8 é possível observar os resultados obtidos e compará-los com os obtidos por diferentes autores que fizeram estudos em borra de café. É também possível observar a caracterização da borra antes de esta ser extraída para a recuperação de óleo e depois da extração.

Tabela 8. Valores da caracterização da amostra de borra de café

Parâmetro	Este trabalho		(Caetano, Silva, Melo, Martins, & Mata, 2014)		(Li, Strezov, & Kan, 2014)	(Deligiannis, Papazafeiropoulou, Anastopaulos, & Zannikos, 2011)
	A.E.	D.E.	A.E.	D.E.		
Teor de Humidade (%)	10,96	6,42	65,7	9,4	8,1	-
Teor de Cinzas (%)	3,26	2,94	2,2	1,65	1,7	4,2
Teor de Carbono (%)	21,23		67,3	69,5	54,5	52,03
Teor de Azoto (%)	2,99	2,49	2,2	2	2,4	0,492
Teor de Proteínas (%)	18,67	17,52	13,7	12,3	15	
PCS (MJ/kg)	11,64		19,3	19	23,2	21,16

% - Percentagem p/p em base seca, exceto teor de humidade

A.E. – Borra antes da extração

D.E. – Borra após a extração

Comparando os valores obtidos experimentalmente com os valores da bibliografia, é possível perceber que apenas no teor de Carbono existe uma grande diferença, sendo que o obtido experimentalmente é muito inferior ao referenciado na bibliografia.

O valor do teor de Carbono, pode estar afetado de erro, uma vez que foi necessária a realização de uma digestão de uma quantidade de amostra muito pequena (< 0,050 g), seguida de uma titulação onde o ponto de viragem é difícil de perceber.

Relativamente ao PCS, este valor também se revelou inferior aos encontrados na bibliografia, o que pode ter-se devido ao facto de a borra utilizada para esta estudo já ter

sido extraída (retirando-se o óleo, que é um constituinte com elevado conteúdo energético), sendo depois reutilizada para a produção do bioetanol.

O teor de proteínas foi calculado a partir do teor de azoto, multiplicando-o por 6,2. Os valores do teor de azoto, e do teor de proteínas sofreram uma variação muito pequena nas análises feitas antes e depois da extração do óleo da borra de café.

4.2. Hidrólise enzimática

Foram ainda analisadas as concentrações de açúcares redutores totais da amostra, depois da hidrólise enzimática. O método usado foi o do DNS e os valores obtidos encontram-se na Tabela 9, onde as amostras 1, 2, 3 e 4 resultam da hidrólise com a enzima *Cellulase*, *Ultraflo L*, *Viscozyme* e *Ban*, respetivamente.

Tabela 9. Valores da concentração dos açúcares redutores após hidrólise enzimática

	Enzima	Concentração Solução Diluída (g/L)	Concentração Solução não Diluída (g/L)
Amostra 1	<i>Cellulase</i>	0,99	24,7
Amostra 2	<i>Ultraflo L</i>	1,19	29,6
Amostra 3	<i>Viscozyme</i>	0,65	16,3
Amostra 4	<i>Ban</i>	0,69	17,3

Para fazer a determinação, a amostra foi diluída 25 vezes, portanto a concentração real foi obtida multiplicando a concentração da solução diluída pelo fator de diluição.

Como é possível observar na Tabela 9 a concentração de açúcares é superior para duas amostras, 1 e 2, sendo que estas amostras foram aquelas em que se conseguiu recuperar etanol.

4.3. Produção de bioetanol

As enzimas *Cellulase* e *Ultraflo L* potenciaram a produção de etanol, sendo que o odor a álcool no licor produzido no processo com hidrólise enzimática com *Ultraflo L* era muito mais intenso.

Para 100 g de amostra foram recuperados cerca de 7 ml de bioetanol quando foi usada a enzima *Cellulase* e 8 ml de bioetanol quando foi usada a enzima *Ultraflo L*.

Para os licores produzidos a partir da fermentação dos açúcares obtidos na hidrólise com as restantes enzimas não foi possível recuperar bioetanol.

Assim, conclui-se que a amostra 1 e 2, foram as que originaram as maiores conversões de hemiceluloses e da celulose em açúcares, e, por isso, ocorreu uma melhor fermentação dos açúcares a bioetanol, o que se traduziu numa maior recuperação de álcool.

As amostras 3 e 4, comparativamente com a 1 e 2, originaram uma menor concentração de açúcares depois da hidrólise.

Deve referir-se que a levedura usada, a *Saccharomyces cerevisiae*, apenas consegue fermentar a glicose. Portanto, dependendo da composição dos açúcares produzidos após a hidrólise enzimática, é possível que apenas uma pequena parte seja fermentável a etanol.

Não tendo sido possível identificar e quantificar os açúcares presentes no hidrolisado (por avaria do HPLC), e sendo o processo de recuperação de etanol ineficiente (uma parte do etanol evaporado pode ficar depositado nas paredes do condensador), não é possível confirmar que nas amostras 3 e 4 não deram origem à produção de etanol. Por outro lado, também não foi possível determinar a concentração de etanol recuperado (por avaria do GC-FID), para confirmar o rendimento global do processo.

4.3.1. Estimativa do rendimento máximo em bioetanol

A borra de café tem cerca de 14% de celulose na sua constituição (Silva, 2011). Então, para 100 g de borra de café é possível obter-se cerca de 14 g de glicose, afirmando que toda a celulose é convertida em glicose. Esta glicose sofre fermentação e por cada molécula de glicose são originadas duas moléculas de etanol, sendo volume máximo de etanol possível de se obter 9,34 ml.

O rendimento máximo em bioetanol é dada pelo quociente entre o volume de bioetanol possível de obter e a massa de borra seca usada. Tendo isto,

$$\eta_{\text{máximo}} = \frac{9,34}{100} * 100 = 9,34 \% \text{ (% v/m)}$$

O rendimento obtido experimentalmente é calculado do mesmo modo, como se pode ver a seguir.

$$\eta_{\text{enzima cellulase}} = \frac{7}{100} * 100 = 7 \% \text{ (% v/m)}$$

$$\eta_{\text{enzima ultraflo}} = \frac{8}{100} * 100 = 8 \% \text{ (% v/m)}$$

Como é possível verificar os rendimentos obtidos experimentalmente são bastante próximos do rendimento teórico da conversão máxima possível de celulose.

A conversão máxima de celulose é calculada com a glicose dessa celulose apenas. Se contabilizássemos a glicose das hemiceluloses teríamos uma conversão máxima superior a esse valor. No entanto, parte da glicose pode ser usada pelas leveduras no seu metabolismo ou não ser convertida, daí que o rendimento real possa ser menor do que o máximo teórico.

5. Conclusões e Sugestões

Este trabalho teve como objetivo o estudo da hidrólise enzimática dos hidratos de carbono da borra de café com vista à produção de bioetanol.

Inicialmente foi realizada uma caracterização da amostra, borra de café, onde se obteve 11,0 % de humidade na borra antes da extração do óleo, e, depois da extração, uma percentagem de 6,4 %. Relativamente ao teor de cinzas, os valores obtidos antes e depois da extração do óleo foram respetivamente 3,3 % e 2,2 %, sendo estes valores semelhantes aos da bibliografia.

O teor de carbono foi determinado antes da extração da borra, sendo que foi obtido um valor de 21,2 %, o que se revelou ser bastante diferente da bibliografia, talvez por este valor ter sido determinado através de uma digestão seguida de uma titulação com um ponto de viragem de difícil perceção. O teor de azoto medido foi de 2,99 % antes da extração e de 2,49 % depois da mesma, e o correspondente teor de proteínas foi de 18,7 e 17,5 %.

Por fim foi medido o valor do poder calorífico superior na borra, sendo o valor obtido de 11,64 MJ/kg.

Após a caracterização da amostra foi realizado o procedimento de produção do bioetanol. Para o efeito, foi realizado um pré-tratamento com HNO₃ a 3% (v/v), nas proporções de 800 mL : 100 g de borra, à temperatura de 85 °C, durante 3 h, com agitação a 40 rpm, seguido de elevação do pH a 5. Seguiu-se a hidrólise enzimática, em que as enzimas usadas foram *Ultraflo L*, *Cellulase*, *Viscozyme* e *Ban*, a 50 °C, durante 24 h, com agitação a 40 rpm, sendo que foram adicionados 2 ml de enzima por cada 100 g de amostra. De seguida procedeu-se à fermentação dos açúcares simples libertados na etapa anterior, usando 10 g de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) por cada 100 g de amostra, durante uma semana, a 30 °C e com agitação a 40 rpm.

Foi efetuada a determinação intermédia da concentração dos açúcares redutores, presentes no hidrolisado enzimático, pelo método do DNS. Para o efeito, foram analisadas 4 amostras de hidrolisado, obtidas com cada uma de 4 diferentes enzimas, e, destas, foi possível concluir que apenas duas das amostras deram origem à formação de bioetanol, enquanto que as outras duas, aparentemente não deram origem a qualquer tipo de formação do mesmo.

Foi ainda possível concluir que as duas amostras com os valores mais altos de concentração de açúcar, 24,7 g/L e 29,6 g/L, foram as amostras onde foi possível confirmar a obtenção de bioetanol. Estas amostras foram obtidas na hidrólise com a enzima *Ultraflo L*, e *Cellulase*, respetivamente, sendo que foi possível sentir-se um cheiro mais intenso na amostra onde foi usada a enzima *Ultraflo L*.

Finalmente, é possível concluir que não há conversão completa de açúcares em bioetanol durante a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que as pentoses são de difícil fermentação, sendo convertidas na maioria as hexoses.

Relativamente a propostas de trabalho futuro, sugere-se estudar a fermentação com outros tipos de leveduras que fermentem pentoses, e a utilização de outros tipos de enzimas com gamas de diferentes pH.

Seria importante a análise do bioetanol obtido usando cromatografia, de modo a avaliarmos a pureza do mesmo, e melhorar as condições de operação uma vez que podem ter ocorrido contaminações durante os procedimentos.

Referências

- Awolu, O. O., & Ibileke, I. O. (2011). *African Journal of Food Science*, 5(3), 148-155.
- Azevedo, S. (2012, Maio). Café Produção e Consumo. 6. Retrieved Maio 2019, from <http://www.academiadocafe.pt>
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 4, 77-93. doi:10.1002/bbb.188
- Biology, O. (s.d.). *Enzymes and the active site*. Retrieved Junho 12, 2019, from <https://www.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/introduction-to-enzymes/a/enzymes-and-the-active-site>
- Caetano, N. S., Silva, V. F., Melo, A. C., Martins, A. A., & Mata, T. M. (2014). Spent coffee grounds for biodiesel production and other applications. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 16, pp. 1423-1430. doi:10.1007/s10098-014-0773-0
- Café, A. B. (s.d.). A História do Café: Origem e Trajetória. p. 14.
- Canilha, L., Milagres, A. M., Silva, S. S., Silva, J. B., Felipe, M. G., Rocha, G. J., . . . Carvalho, W. (2010, Dezembro/Janeiro). Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. *Revista Analytica*, 44, 48-54.
- Carvalheira, J. (s.d.). *Fermentações alcólicas e maloláctica*. Retrieved Junho 12, 2019, from http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/fermentacoes_2009.pdf
- Carvalho, A. L. (2008). *O papel do bioetanol no contexto económico e ambiental a partir do caso brasileiro*. Dissertação de Mestrado em Economia, Universidade de Coimbra, Faculdade de Economia, Universidade de Coimbra.
- Cassales, A. R. (2010). Otimização da hidrólise da casca de soja e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microorganismos sobre este hidrolizado . p. 138.
- CQA Comercial Química Americana Ltda. (2015). Retrieved Abril 30, 2019, from <http://site.cqaquimica.com.br/wp-content/uploads/2015/05/Destila----o-por-Evaporador-Rotativo.pdf>
- Cruz, S. A. (2015). *Avaliação do potencial da borra de café fresca na mineralização do nitrogénio e do fósforo e em culturas hortícolas*. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

- Deacon, J. (s.d.). *The Microbial World: Yeasts and yeast-like fungi*. (T. U. Institute of Cell and Molecular Biology, Ed.) Retrieved Junho 18, 2019, from <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/yeast.htm>
- Deligiannis, A., Papazafeiropoulou, A., Anastopoulos, G., & Zannikos, F. (2011). Waste coffee grounds as an energy feedstock. In N. T. School of Chemical Engineering (Ed.), *Proceedings of the 3rd International CEMEPE & SECOTOX Conference* (pp. 617-622). Skiathos: Laboratory of Fuel Technology and Lubricants.
- DeLonghi. (s.d.). *Desde a planta até à chávena*. Retrieved Junho 15, 2019, from <https://www.delonghi.com/pt-pt/produtos/cafe/cultura-do-cafe/processo-da-producao-de-cafe>
- EUBIA. (n.d.). Retrieved Junho 17, 2019, from <http://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biofuels/bioethanol/>
- Ferreira, A. D. (2011). *Influência da borra de café no crescimento e nas propriedades químicas e biológicas de plantas de alface (Lactuca sativa L.)*. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança.
- Gomes, B. M. (2010). *Potencial de redução de emissões de GEE do bioetanol: Contributo da análise de ciclo de vida da beterraba sacarina e do cardo como fontes de biomassa nacionais*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- Helmenstine, A. M. (2019, Janeiro 2). *What Is Distillation? Chemistry Definition*. Retrieved Junho 18, 2019, from <https://www.thoughtco.com/what-is-distillation-601964>
- Jornal I. (2015, Agosto 31). Retrieved Junho 15, 2019, from <https://ionline.sapo.pt/artigo/409423/a-nica-plantacao-de-cafe-na-europa-fica-em-portugal-e-atrai-gente-de-longe?seccao=Portugal>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009, Março 20). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, pp. 3713-3729.
- Li, X., Strezov, V., & Kan, T. (2014). Energy recovery potencial analysis of spent coffee grounds pyrolysis products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 110, 79-87.
- Lima, A. (2019, Julho 11). Retrieved from GERAÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA : <http://www.antoniolima.web.br.com/arquivos/combust%C3%ADveis.htm>
- Lima, P. M. (2016). *Estudo como corretivo orgânico de misturas de composto de RSU com borras de café*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica, Universidade de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Manochio, C. (2014). *Produção de bioetanol de cana-de-açúcar, milho e beterraba: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos*.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química),
Universidade Federal de Alfenas - Campus de Poços de Caldas, MG, Engenharia
Química.

- Melo, L. C., Santos, M. d., Galvão, A. C., & Assunção, F. C. (2009, Outubro).
Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil. Brasília, Brasil: Centro
de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). Retrieved from
https://www.cgEE.org.br/documents/10195/734063/5Bioetanol+de+Cana+de+Açucar+2009_6407.pdf
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation
processes. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied
Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 897-907). FORMATEX.
- Negro, C. O. (n.d.). Retrieved Dezembro 24, 2018, from
<http://cafeouronegro.com.br/cafe/>
- Newman, T. (2018). *Medical News Today*. Retrieved Junho 20, 2019, from
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/319704.php>
- Palmer, J. (2017). *How to brew*. Retrieved Junho 18, 2019, from
<http://howtobrew.com/book/introduction>
- Pedra e Decoração*. (n.d.). Retrieved Dezembro 26, 2018, from
<https://www.pedradecoracao.pt/blog/o-bioetanol-em-portugal-esta-a-ganhar-terreno-9749/>
- Pinto, S. I. (2013, Março). *Produção de biocombustíveis líquidos por pirólise seguida
de hidrogenação de misturas de óleos vegetais num conceito de bio-refinaria*.
Dissertação de Mestrado em Energia e Bioenergia, Universidade Nova,
Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT), Lisboa.
- Potential, Kinetic, Free, and Activation Energy*. (s.d.). Retrieved Junho 12, 2019, from
https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:FrKEod5j@6/Potential-Kinetic-Free-and-Activation-Energy
- Salva, T. J., & Lima, V. B. (2007). A composição química do café e as características da
bebida e do grão. (Campinas, Ed.) *O Agrônomo*, 59(1), pp. 57-59.
- Silva, V. (2011, Novembro). *Valorização de cápsulas de café e produção de
biocombustíveis*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, ISEP,
Departamento de Engenharia Química, ISEP, Porto.
- Steckelberg, C. (2001, Setembro). *Caracterização de leveduras de processos de
fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e
características cinéticas*. Tese de Doutoramento em Engenharia Química,
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química,
Campinas - São Paulo. Retrieved Junho 12, 2019, from
http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/267641/1/Steckelberg_Claudia_D.pdf

Sun, Y., & Cheng, J. (2002, Novembro 6). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7

Tavares, T. F. (2014, Julho). *Valorização da drêche cervejeira: fermentação de pentoses*. ISEP, Porto: Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

TECNAL. (n.d.). Retrieved Dezembro 26, 2018, from
<https://tecnal.com.br/novidades/metodo-kjeldahl-classico-e-tradicional/>

Toledo, M. (n.d.). Retrieved Dezembro 26, 2018, from
https://www.mt.com/br/pt/home/applications/Laboratory_weighing/moisture-content-determination.html

Vieira, A. C. (2012, Janeiro). *Caracterização da Biomassa Proveniente de Resíduos Agrícolas*. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil: Dissertação de Mestrado em Energia na Agricultura.

Anexos

Caracterização da amostra

Para a determinação do teor de proteínas e do teor de azoto usou-se o método de Kjeldahl. As amostras foram digeridas no digestor cerca de 3 h 180 °C e depois foi feita a destilação, seguida de uma titulação com HCl, cujos resultados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores obtidos para a determinação do teor de proteínas e teor de azoto

	Massa (g)	V _i (mL)	V _f (mL)	ΔV (mL)	Média
Branco	0	0	0,05	0,05	0,05
Amostra 1	0,052	0,01	1,10	1,09	0,00102
Amostra 1	0,052	1,10	2,05	0,95	
Amostra 2	0,076	0,09	1,42	1,33	0,00138
Amostra 2	0,076	1,42	2,85	1,43	

$$\begin{aligned} \% \text{azoto} &= (\text{média do volume x [HCl]} \times 14,007 / m_{\text{amostra}}) \times 100 = \\ &= 0,00102 \times 0,112933 \times 14,007 / 0,052) \times 100 = 3,10 \% \end{aligned}$$

$$\% \text{ Proteínas} = 6,25 \times \% \text{azoto} = 6,25 \times 3,10 = 19,4 \%$$

De seguida é calculada a média dos resultados obtidos nas amostras sendo que a

$$\% \text{azoto}_{\text{média}} = 2,99\% \text{ e a } \% \text{proteínas}_{\text{média}} = 18,7 \%$$

Para a determinação do teor de cinzas as amostras foram colocadas na mufla, sendo que

a percentagem média de cinzas da amostra é de $3,26 \pm 1,03 \%$.

Tabela 11. Valores obtidos para o teor de cinzas

Amostra	m _{cadinho}	m _{cadinho+amostra}	m _{cinzas+cadinho}	m _{amostra}	m _{cinzas}	%cinzas	Média (%)
1	23,2382	25,5874	23,2888	2,3492	0,0506	2,15	
2	21,8681	25,2448	22,0098	3,3767	0,1417	4,20	3,26 ± 1,03
3	21,7571	25,1743	21,8741	3,4172	0,1170	3,42	

Para a determinação do teor de humidade as amostras foram colocadas na estufa até peso constante.

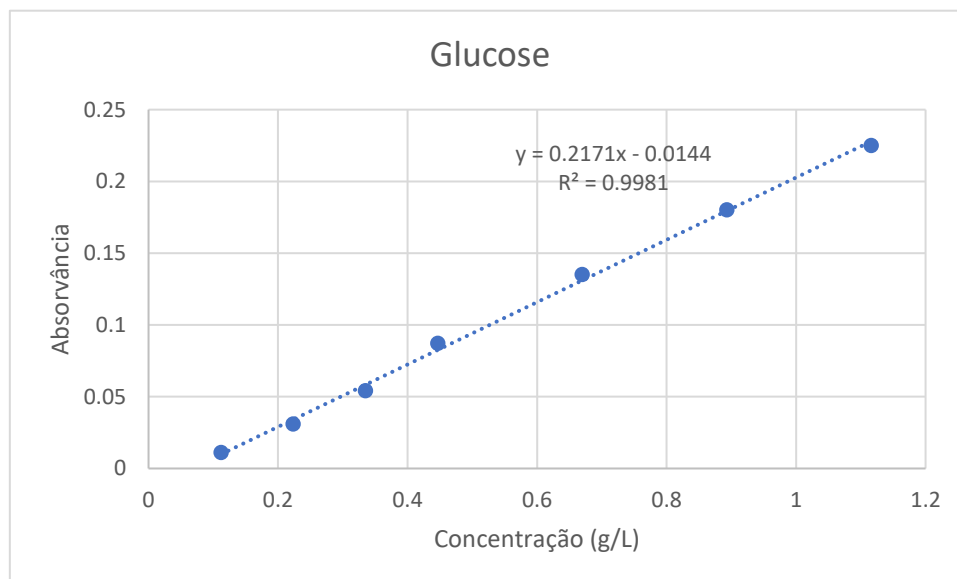
Tabela 12. Valores obtidos para a determinação do teor de humidade

Amostra	m _{cadinho}	m _{cadinho+amostra}	m _{amostra}	m _{cadinho+amostra seca}	m _{amostra seca}	%humidade	média
1	32,5596	37,1226	4,563	36,6161	4,0565	11,1002	10,96
2	26,3078	31,3897	5,0819	30,8381	4,5303	10,8542	
3	29,5502	35,6286	6,0784	34,9645	5,4143	10,9256	

Produção de Bioetanol

Determinação dos açúcares pelo método do DNS

Foram realizados sete padrões com diferentes concentrações de glicose, que variaram entre 0 e 1 g/L e obteve-se a curva de titulação seguinte.



A reta de ajuste obtida foi:

$$\text{Absorvância} = 0,2171 * [\text{açúcares}] - 0,0144$$

Foi calculada a concentração para cada uma das amostras hidrolisadas com diferentes enzimas. A concentração foi multiplicada pelo fator de diluição de 25x.