

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

GISELLA DE OLIVEIRA COELHO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES  
BIOPOLIMÉRICOS COMPOSTOS MAJORITARIAMENTE POR  
GALACTOMANANAS RECUPERADAS DA BORRA DE CAFÉ

Belo Horizonte  
2019

GISELLA DE OLIVEIRA COELHO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES  
BIOPOLIMÉRICOS COMPOSTOS MAJORITARIAMENTE POR  
GALACTOMANANAS RECUPERADAS DA BORRA DE CAFÉ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Soares de Oliveira

Belo Horizonte  
2019

C872d Coelho, Gisella de Oliveira.  
Desenvolvimento e caracterização de filmes biopoliméricos compostos majoritariamente por galactomananas recuperadas da borra de café / Gisella de Oliveira Coelho. – 2019.  
149 f. : il.

Orientador: Leandro Soares de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Café – Teses. 2. Borra de café – Teses. 3. Biopolímeros – Teses. 4. Polissacarídeos – Teses. 5. Biomateriais – Teses. I. Oliveira, Leandro Soares de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 663.93

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPGCA

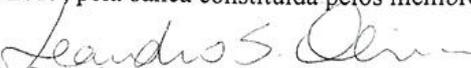
## FOLHA DE APROVAÇÃO

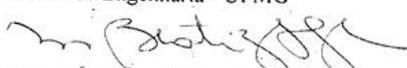
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIOPOLIMÉRICOS  
COMPOSTOS MAJORITARIAMENTE POR GALACTOMANANAS  
RECUPERADAS DA BORRA DE CAFÉ

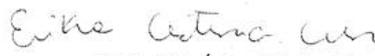
**GISELLA DE OLIVEIRA COELHO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 22 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Dr. Leandro Soares de Oliveira (Orientador e Presidente da Comissão)  
Escola de Engenharia - UFMG

  
Profa. Dra, Maria Beatriz de Abreu Glória  
Faculdade de Farmácia - UFMG

  
Profa. Dra. Érika Cristina Cren  
Escola de Engenharia - UFMG

Belo Horizonte, 22 de julho de 2019.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus por sempre me dar força para alcançar tudo que almejo, à minha família por ser meu porto seguro e ao meu namorado pelo apoio, incentivo, paciência e auxílios profissionais.

Ao meu orientador, Prof. Leandro Soares de Oliveira pela oportunidade e pelos ensinamentos que resultaram em crescimento profissional e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório que me receberam de braços abertos e tornaram essa jornada muito mais leve. Agradeço em especial à Michelle que me ensinou tanto e dividiu comigo momentos de felicidades e dificuldades.

Aos meus amigos por todo carinho, compreensão e apoio.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Irene Yoshida (DQ) por possibilitar as análises de DSC.

Ao Prof. Antônio Ferreira Ávila (DEMEC) por possibilitar a realização dos ensaios mecânicos.

Ao professor Carlos Rosa (ICB) por possibilitar as análises no HPLC.

Ao professor Vicente Buono (DEMEC) por possibilitar as análises no DRX.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela minha formação.

À Capes pela concessão da bolsa; e ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

## RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, apresentando um efeito cultural e social. Em 2017/2018, a produção mundial foi de aproximadamente 164,99 milhões de sacas de café e, conseqüentemente, foram produzidos mais de 2 bilhões de toneladas de subprodutos, que englobam cascas, polpas, mucilagens, pergaminhos, películas prateadas e borras de café. O principal resíduo produzido é a borra de café, visto que uma tonelada de grãos de café cru gera 650 kg de borra de café. Diante da grande quantidade de resíduos produzidos, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de encontrar alternativas para o descarte desses, que causam contaminação ambiental e outros problemas específicos, como a adulteração do pó de café com a adição da borra de café. A borra de café é rica em compostos orgânicos como ácidos graxos, cafeína, taninos, aminoácidos, polifenóis e, principalmente polissacarídeos, que viabilizam potenciais aplicações. As galactomananas são os polissacarídeos mais abundantes na borra do café, as quais possuem baixo grau de ramificação e elevado grau de polimerização, além de apresentarem excelentes propriedades de reforço e de estabilização de emulsões. Em vista disso, a borra de café é uma fonte alternativa para produção de biopolímeros, os quais têm recebido atenção nos últimos anos, especialmente em função dos grandes impactos ambientais causados pelas embalagens sintéticas. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um biomaterial constituído predominantemente por galactomananas recuperadas da borra de café através de tratamentos alcalino e enzimático. Inicialmente, foram analisados os efeitos de três pré-tratamentos visando remover a lignina da borra de café, sendo um deles com solução de peróxido alcalino, outro com hidróxido de sódio e o último com solução de permanganato de potássio alcalino submetido ao banho ultrassônico. Todos os pré-tratamentos apresentaram uma remoção considerável de lignina, entre 55 e 73%, sendo o conteúdo de lignina restante entre 6-11%. Os materiais deslignificados foram submetidos ao tratamento enzimático, no qual utilizou-se a enzima celulase comercial proveniente do microrganismo *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Buscando otimizar o processo hidrolítico, foram testadas diferentes concentrações de borra de café e de celulase, e diferentes tempos de incubação, bem como conjugação de métodos físicos como ultrassom, autoclave e micro-ondas para melhorar a eficiência da ação enzimática. A caracterização do material deslignificado foi realizada antes e após o tratamento enzimático. Além disso, o material deslignificado rico em galactomananas foi utilizado para produzir biofilmes, assim como o material antes do tratamento enzimático. Os biofilmes produzidos com a borra de café deslignificada e com a fração rica em galactomananas foram semelhantes na aparência física e textura. No entanto, mostraram-se diferentes em relação à permeabilidade ao vapor d'água, temperatura de transição vítrea e propriedades mecânicas. Desse modo, a remoção parcial da celulose resultou em um filme mais rígido e com características diferentes que apresenta potenciais aplicações como membrana no tratamento de água, membranas bioativas e como embalagens para mudas.

**Palavras chaves:** Borra de café. Galactomananas. Biomaterial. Tratamento enzimático.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most popular beverages in the world with strong cultural and social impacts. In 2017/2018, world coffee production was approximately 164,99 million bags of 60 kg, and consequently, more than 2 billion tons of by-products were concomitantly produced, such as husk, mucilage, parchment, coffee silverskin and spent coffee grounds (SCG). The main waste produced in the processing of coffee is SCG, which is rich in organic compounds such as fatty acids, caffeine, amino acids, polyphenols and especially polysaccharides, which enable potential applications. Galactomannans are the most abundant polysaccharides in SCG, presenting a low degree of branching and a high degree of polymerization, which enables excellent emulsifying and stabilizing properties. In view of the aforementioned, SCG is a potential alternative source for the production of biofilms, which have received attention in recent years, especially due to the large environmental impacts caused by synthetic packaging. Thus, the objective of this work was to develop a biopolymeric film comprised mostly of galactomannans recovered from spent coffee grounds by alkaline and enzymatic treatment. Initially, the effects of three distinct pretreatments to remove lignin from SCG were studied, one with alkaline peroxide solution, the other with alkaline solution and the last with alkaline potassium permanganate solution assisted by ultrasound. All pretreatments resulted in considerable removal of lignin, with the remaining lignin content in the range of 6-11%. The delignified materials were submitted to enzymatic treatment using commercial cellulase enzymes produced by *Trichoderma reesei* ATCC 26921. In order to optimize the hydrolytic process, different concentrations of SCG, cellulase and incubation times were evaluated, as well as the combination of extraction methods assisted by techniques such as ultrasound, autoclave, and microwave. Characterization of the delignified material was performed before and after the enzymatic treatment. Furthermore, the galactomannan-rich delignified material was used to produce biofilms, as well as the material after enzymatic treatment. The biofilms produced with the delignified coffee grounds and the cellulose-depleted galactomannan-rich fractions were similar in physical appearance and texture. However, they were different in relation to water vapor permeability, glass transition temperature and mechanical properties. Thus, the partial removal of the cellulose allowed for the formation of a more rigid film than that with the cellulose due to the strong interactions between the galactomannan chains. The different characteristics of this film allow for potential applications such as water filtration membranes, bioactive membranes and seedling packaging.

**Keywords:** Spent coffee ground. Galactomannan. Biomaterial. Enzymatic treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Subprodutos oriundos da produção de café: A=Polpa; B =Casca; C = película prateada; D = Borra de café. ....	6
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura genérica das galactomananas isoladas do grão de café. ....	9
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura genérica das arabinogalactanas isoladas do grão de café. ....	10
Figura 4 - Mecanismo de deslignificação pelo pré-tratamento álcali. ....	15
Figura 5- Os principais ésteres metílicos de ácidos carboxílicos formados na oxidação da lignina com permanganato de potássio. ....	17
Figura 6- Hidrólise por enzimas celulases. ....	21
Figura 7 - Esquema de representação da precipitação por imersão (S=solvente; NS= não solvente)...	30
Figura 8 - Ligação entre moléculas de celulose e íons $Zn^{2+}$ . ....	31
Figura 9- Processo de preparo do filme: A= mistura da solução filmogênica; B= filme após coagulação com etanol. ....	47
Figura 10 - Gráfico de pareto para o modelo de planejamento $2^2$ (pré-tratamento $KMnO_4$ alcalino)...	52
Figura 11 - Mapa de contorno pré- tratamento $KMnO_4$ alcalino. ....	52
Figura 12- Gravura ilustrativa da borra de café e dos materiais provenientes desta: A = Borra de café; B= BPP; C= BPHA; D=BHS. ....	60
Figura 13 - Espaço de cor CIELAB. ....	60
Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) Borra de café 500x B) Borra de café 1000x C) BPP 500x D) BPP 1000x E)BPHA 500x F) BPHA 1000X G) BHS 500x H)BHS 1000x ...	62
Figura 15 - Difratoograma da borra in natura e das borras tratadas.BPHA = Borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino; BHS = Borra de café tratada com hidróxido de sódio; e BPP= borra de café tratada com permanganato de potássio alcalino.....	64
Figura 16 - Espectros da borra de café e das amostras BPHA, BHS e BPP. ....	67
Figura 17 - Curvas de TGA das amostras de borra de café, BPHA, BHS e BPP. ....	71
Figura 18 - Curvas de DTG das amostras de borra de café, BPHA, BHS e BPP. ....	71
Figura 19 - Curva de concentração de glicose por tempo de incubação (horas). ....	79
Figura 20 - Difratoograma da borra BPHA = Borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino; e da BPHAE = Borra de café tratada com peróxido de hidrogênio e submetida ao tratamento enzimático. ....	83
Figura 21 - Espectro FT-IR das amostras BPHA e BPHAE. ....	84
Figura 22 - Curvas de TGA das amostras BPHA e BPHAE. ....	86

Figura 23 - Curvas de DTG das amostras BPHA e BPHAE.....	87
Figura 24 - Filmes desenvolvidos: filme superior a partir da BPHA e filme inferior a partir da BPHA enzimaticamente tratada.....	90
Figura 25 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura filmes: (A) Filme BPHA 200x B) Filme BPHA 500x C) Filme BPHA 200x D) Filme BPHA tratamento enzimático 200 x E) Filme BPHA tratamento enzimático 500 x F) Filme BPHA tratamento enzimático 200x .....	91
Figura 26 - Difratoograma para filmes produzidos com BPHA, e outro com BPHA e hidrólise enzimática. BPHA=borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.....	93
Figura 27 - Crosslinking entre cadeias de celulose e íons $Ca^{2+}$ .....	94
Figura 28 - Comparação entre BPHA e filme BPHA. ....	95
Figura 29 - Comparação entre BPHAE e filme BPHAE.....	95
Figura 30 - Espectros dos filmes desenvolvidos BPHA e BPHAE.....	96
Figura 31 - Análise termogravimétrica dos filmes - Curvas de TGA. ....	98
Figura 32 - Análise termogravimétrica dos filmes - Curvas da DTG. ....	98
Figura 33- Comparação da análise das frações ricas em polissacarídeos e os filmes (a) Curvas de TGA BPHA e filme BPHA; (b) Curvas da DTG BPHA e filme BPHA; (c) Curvas de TGA BPHAE e filme BPHAE; (d) Curvas de DTG BPHAE e filmes BPHAE.....	100
Figura 34 - Fraturas dos filmes: A = filme BPHA com fratura dúctil; B= filme BPHAE com fratura frágil.....	107
Figura 35 - Representação de fratura dúctil moderada.....	108
Figura 36 - Corpos de prova utilizados na análise das propriedades mecânicas: A= filme BPHA; B= filme BPHAE. ....	108

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Resultados obtidos pelos pré-tratamentos aplicados a borra de café. ....	51
Tabela 2 - Caracterização físico-química da borra de café e frações ricas em polissacarídeos. ....	55
Tabela 3 - Composição dos monossacarídeos da borra e das amostras tratadas BPHA, BHS e BHS. .	58
Tabela 4- Resultados dos parâmetros $L^*$ , $b^*$ e $a^*$ das amostras de borra, BPP, BPHA, BHS, e amostras tratadas enzimaticamente. ....	60
Tabela 5 - Índice de cristalinidade (IC) da borra de café in natura e pré-tratamentos. ....	65
Tabela 6- Dados das curvas TGA e DTG das amostras de borra de café, BPHA, BHS e BPP. ....	72
Tabela 7 - Análise de tratamentos precedentes a hidrólise enzimática. ....	76
Tabela 8 - Concentração de monossacarídeos na BPHA e BPHAE em função do tempo de hidrólise enzimática. ....	81
Tabela 9 - Índice de cristalinidade da borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (BPHA) e após o tratamento enzimático (BPHAE). ....	84
Tabela 10 - Dados das curvas TGA e DTG das amostras de BPHA e BPHAE. ....	87
Tabela 11- Resultados dos parâmetros de cor $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ das amostras dos filmes. ....	89
Tabela 12 - Dados das curvas TGA e DTG dos filmes BPHA e BPHAE. ....	99
Tabela 13 - Temperatura de transição vítrea dos filmes. ....	101
Tabela 14- Espessura e valor de permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes desenvolvidos BPHA e BPHAE. ....	103
Tabela 15 - Propriedades mecânicas dos filmes BPHA e BPHAE. ....	105
Quadro 1 - Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. ....	13
Quadro 2 - Componentes presentes no hidrolisado e seus fatores de conversão. ....	46
Quadro 3 - Codificação das frações ricas em polissacarídeos obtidas após pré-tratamentos. ....	54
Quadro 4 - Codificação e descrição dos tratamentos precedentes a hidrólise enzimática. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

a\* - Parâmetro CIELAB relacionado a tonalidades de vermelho a verde

AC- Autoclave

AFEX- Explosão de fibra por amônia

ANOVA - Análise de variância

ASTM - Sociedade Americana para Testes de Materiais

ATCC - Coleção de Cultura Tipo Americana

ATR - Refletância total atenuada

b\* - Parâmetro CIELAB relacionado a tonalidades de amarelo a azul

BHS - Borra de café submetida a tratamento com solução de hidróxido de sódio 4%

BPHA - Borra de café submetida a tratamento com solução peróxido de hidrogênio alcalino 35%

BPHAE - Borra de café submetida a tratamento com solução peróxido de hidrogênio alcalino 35%, com posterior hidrólise enzimática.

BPP - Borra de café submetida a tratamento com solução de permanganato de potássio 3% alcalino

CG - Cromatografia a gás

CIELAB - Sistemas de cores substrativas

CMC - Carboximetilcelulose

DCM - Diclorometano

DEMEC - Departamento de Engenharia Mecânica

DLATGS - Sulfato de Triglicina Deuterado dopado com L-Alanina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNS - Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DRX- Difração de raio X

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

DTG - Derivada da curva da análise de termogravimetria

FID - Detector de ionização de chamas

FPU - Por Unidade de Filtro

FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HS - Pré-tratamento com hidróxido de sódio

IC - Índice de cristalinidade

L\* - Luminosidade  
LI - Lignina insolúvel  
M/G - Razão entre os resíduos dos monossacarídeos manose e galactose  
MW - Micro-ondas  
NS - Não solvente  
NT - Nitrogênio total  
OIC - Organização Internacional de Café  
PB - Proteína bruta  
PHA - Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino  
PP - Pré-tratamento com permanganato de potássio  
PTFE - Politetrafluoretileno  
PVA - Permeabilidade ao vapor de água  
PVDF - Fluoreto de polivinilideno  
S - Solvente  
TFA - Ácido trifluoro acético  
Tg – Temperatura de transição vítrea  
TGA - Termogravimetria  
TTVA - Taxa de transmissão ao vapor de água  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
US - Banho ultrassônico  
UV-VIS - Ultravioleta visível

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Produção de Café .....	4
2.2	Resíduos.....	5
2.3	Borra de café.....	8
2.4	Filmes de Biopolímeros ou Biodegradáveis .....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.1	Materiais e reagentes .....	33
3.2	Pré-tratamento da Borra de Café.....	33
3.3	Determinação da Atividade Enzimática.....	35
3.4	Hidrólise Enzimática.....	36
3.5	Análise das Frações Ricas em Polissacarídeos .....	37
3.6	Análise da Fração Rica em Galactomananas .....	44
3.7	Preparação dos Filmes .....	46
3.8	Caracterização dos Filmes .....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1	Pré-tratamento.....	51
4.2	Caracterização das Frações Ricas em Polissacarídeos.....	54
4.3	Hidrólise Enzimática.....	75
4.4	Caracterização da Fração Rica em Galactomananas .....	80
4.5	Desenvolvimento e Caracterização dos Filmes .....	88
5	CONCLUSÃO .....	110
6	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS .....	111
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os resíduos agrícolas e alimentares têm sido considerados um problema crescente seja em nível regional, nacional ou global (KATARE *et al.*, 2017). Aproximadamente 1,3 bilhões de toneladas de resíduos, que equivalem a um terço da produção mundial de alimentos, são descartados gerando danos ambientais e adversidades econômicas e sociais (FAO, 2011). Isso inclui perdas e desperdícios gerados durante a produção, transporte, embalagem, armazenamento e consumo de alimentos. Ademais, é esperado o aumento da produção de resíduos com o crescimento da população e da urbanização. Nos países desenvolvidos, cerca de 40% dos alimentos são perdidos ou desperdiçados, por exemplo, nos Estados Unidos, 38 milhões de toneladas de alimentos são descartados anualmente, sendo 76,3% destinados a aterros sanitários. Na União Européia, 98 milhões de toneladas de resíduos são gerados por ano com perspectiva de aumento de 42% até 2020. Já na China, 90 milhões de toneladas de resíduos são produzidas por ano (XU *et al.*, 2018). E o Brasil, encontra-se entre os dez maiores produtores globais de resíduos alimentares, descartando 40 mil toneladas de resíduos por dia (SOARES, 2017), os quais são encaminhados, majoritariamente, para aterros sanitários, ou submetidos à incineração e compostagem. Desse modo, o reaproveitamento desses resíduos é imprescindível para o desenvolvimento sustentável, além de impactar a economia (XU *et al.*, 2018).

O café é a bebida mais consumida no mundo (MUSSATTO *et al.*, 2011), com produção mundial, na safra 2017-2018, em torno de 159,7 milhões de sacas de 60 kg (OIC, 2018). Além disso, o café ocupa o segundo lugar no ranking de commodities, ficando atrás apenas do petróleo. Sendo assim, é um produto muito importante economicamente para vários países como o Brasil, Vietnã, Colômbia e Indonésia (MURTHY & NAIDU, 2012; OIC, 2017). O Brasil é o maior produtor mundial de café, e o segundo maior consumidor (FRANCA & OLIVEIRA, 2009). Em 2018, no Brasil, foi estimada a produção de 51 milhões de sacas de café, com exportação de 33,5 milhões de sacas (OIC, 2018). Durante a produção da bebida cerca de 90 % do fruto torna-se resíduo, presume-se que, para cada tonelada de grão de café produzido, é gerada aproximadamente uma tonelada de resíduos, que engloba casca, polpa, mucilagem, pergaminho, película prateada e borra de café (VALENCIA & FRANCO, 2010). Portanto, em 2016, foram produzidos 15 milhões de toneladas de resíduos, sendo aproximadamente 45-50% correspondente a borra de café, proveniente da extração aquosa dos grãos torrados (CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015).

Diante da grande quantidade de resíduos produzidos, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de encontrar alternativas para o aproveitamento desses que causam preocupação ambiental, além de apresentarem outros problemas específicos, como utilização de borra de para adulteração de café torrado e moído (CRUZ *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2013). Dessa forma, a polpa e a mucilagem podem ser empregadas na produção de biocombustíveis, biogás, etanol, alimentação animal, fertilizante, adsorventes, entre outros (SILVA *et al.*, 1998; TOKIMOTO *et al.*, 2005; VALENCIA & FRANCO, 2010). O pergaminho pode ser usado como matéria-prima para produção de biocombustíveis alternativos a combustíveis oriundos de fontes não renováveis, e ingrediente funcional para alimentos por apresentar alta concentração de compostos antioxidantes e fibras (MUSSATO *et al.*, 2011). A borra de café pode ser empregada na alimentação animal (porcos, coelhos, ruminantes e frangos); na produção de combustíveis para caldeiras industriais e biocombustíveis, como etanol e biodiesel; na compostagem; como fertilizante; na formulação de cosméticos; como ingredientes ou aditivos em alimentos; e na produção de carbonos ativos e enzimas (MATA *et al.*, 2018).

A borra é um dos principais subprodutos da indústria e do comércio de café, obtida a partir da produção de café solúvel e na preparação comercial da bebida, correspondendo a 45 % dos resíduos (MARTINEZ-SAEZ *et al.*, 2017). A composição da borra, no que tange aos compostos orgânicos, possibilita potenciais aplicações, extrapolando as citadas anteriormente. Essa é rica em ácidos graxos, lignina, celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos, além de compostos fenólicos (BALLESTEROS *et al.*, 2018), que podem ser recuperados para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado. Os principais polissacarídeos são as galactomananas, as arabinogalactanas tipo II e a celulose. Dentre estes, o polissacarídeo majoritário é a galactomanana, que é hidrofílica e não tóxica, além de apresentar excelentes propriedades de reforço e de estabilização de emulsões. Em vista disso, a borra de café é uma potencial fonte alternativa para produção de biopolímeros (CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

A produção de filmes comestíveis ou revestimentos biodegradáveis é altamente atrativa para indústrias alimentícias por estes serem considerados uma alternativa para embalagens sintéticas, e contribuírem para redução de impactos ambientais (GHANBARZADEH *et al.*, 2010). As embalagens plásticas convencionais são provenientes de fontes não renováveis, como o petróleo, e causam vários problemas ambientais, por serem necessários longos períodos para degradação (DEGRUSON, 2016). Porém, são imprescindíveis para proteger os alimentos do meio ambiente, garantindo assim a qualidade de produtos. Dessa forma, buscam-

se materiais biodegradáveis para aumentar a vida útil do produto, que não provoquem contaminação ambiental, e apresentem baixos custos. Os biopolímeros utilizados para desenvolver materiais de embalagem de alimentos são polissacarídeos, proteínas e lipídios, devido às capacidades destes de estabelecerem interações entre si criando uma rede contínua responsável pelas propriedades funcionais semelhantes às de filmes sintéticos (DELGADO *et al.*, 2016).

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um biomaterial constituído predominantemente por galactomananas recuperadas da borra de café por meio de tratamento alcalino e enzimático, e, desse modo, reduzir os problemas causados pela produção e descarte inadequado de resíduos agroindustriais oriundos da produção do café, principalmente, a borra de café, além de substituir alguns materiais poliméricos oriundos de fontes não renováveis. Para tanto, os objetivos específicos foram: a) otimizar os parâmetros do pré-tratamento e hidrólise enzimática empregados na borra de café; b) obter material a partir da borra de café predominantemente constituído por galactomananas que possa ser empregado na produção de filmes biopoliméricos; c) caracterizar e comparar a borra de café antes e após o tratamento enzimático; d) desenvolver e caracterizar os filmes biopoliméricos oriundos da borra de café expostos a hidrólise enzimática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Produção de Café

O café é uma das bebidas mais populares no mundo, com o consumo de mais de 400 bilhões de xícaras por ano, principalmente devido às propriedades refrescantes e estimulantes (ARYA & RAO, 2007; MUSSATTO *et al.*, 2011c). Desde o século XVI, esse exerce um papel fundamental na economia bem como na cultura ocidental (OESTREICH-JAZEN, 2013).

Nos últimos anos, a visão em relação ao café mudou drasticamente, esse além de “commodity”, é um produto de alta qualidade, podendo ser comparado ao vinho. Assim sendo, o consumo de café trata-se de uma questão de prazer, experiência, status social e estilo de vida (SAMOGGIA & RIEDEL, 2018). Essa mudança no comportamento do consumidor reflete no mercado cafeeiro.

Em vista disso, o mercado de café apresenta inúmeras novidades para o consumidor como diversas aquisições e tecnologias, grandes investimentos no marketing e mídia, e também novas plantas (CARDOSO *et al.*, 2017). As espécies mais comumente exploradas e comercializadas são *Coffea arabica* L. (Café Arábica) e o *Coffea canephora* L. (Café Robusta). A primeira é proveniente da Etiópia, adapta-se bem a altitudes elevadas e é a espécie de maior valor comercial, correspondendo a 75% da produção mundial. Em contrapartida, o café Robusta é considerado a espécie mais ácida e resistente a pragas, e desenvolve-se em baixas altitudes (MUSSATTO *et al.*, 2011c).

Diante da inquietação do mercado cafeeiro e exigências do consumidor, observa-se uma evolução neste setor. Nos anos 2016-2017, a produção mundial de café foi de 153,9 milhões de sacas, enquanto nos anos 2017-2018, a produção mundial de café foi 164,99 milhões de sacas, registrando um aumento de 6,7% (OIC, 2017; OIC, 2018).

Contudo, em 2017-2018, o consumo mundial de café foi de 161,71 milhões de sacas, representando um aumento de 4,1 % em relação aos anos anteriores, 2016-2017, correspondente a 155,1 milhões de sacas. O Brasil é o segundo maior consumidor (20 milhões de sacas), bem como o maior produtor de café do mundo (61,7 milhões de sacas), seguido pelo Vietnã, Colômbia, Indonésia, Etiópia, Honduras e Índia (OIC, 2018).

Como consequência da popularidade e importância do café, e do aumento da produção, enormes quantidades de resíduos são geradas. Em relação aos grãos de café produzidos, mais de 70% destes se transformam em resíduos (RODRÍGUEZ & ZAMBRANO, 2013). Além

disso, na produção de café, a cada 1 kg de café verde produzido é gerado 650 kg de borra de café (MUSSATTO, 2014).

## 2.2 Resíduos

### 2.2.1 Resíduos Agroindustriais

Os resíduos são substâncias que não são caracterizados como matérias-primas ou produtos, não apresentando valor econômico notório (SILVA, 2012). Esses são gerados durante a produção, manuseio, armazenamento, processamento, distribuição e consumo dos alimentos (DAHIYA *et al.*, 2017).

Os principais resíduos agroindustriais gerados são cascas, caroços, bagaços e sementes (SOUSA *et al.*, 2011). Por serem originados de hortaliças, frutas e grãos, esses são extremamente heterogêneos com alto teor de umidade e índice de cinzas, estruturas amorfas, além de serem ricos em carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, nutrientes e antioxidantes (CERDA *et al.*, 2017; DAHIYA *et al.*, 2017). Desse modo, esses são precursores de problemas ambientais como a poluição de solos e de corpos hídricos, resultando em problemas de saúde pública quando descartados inadequadamente; ou são considerados problemas para as empresas devido ao custo gerado pela necessidade de transporte, disposição adequada ou tratamento ideal para um posterior descarte (SOUSA *et al.*, 2011).

Além dos resíduos serem materiais de alto volume e baixo valor, estes são propensos a deterioração microbiana, limitando a respectiva exploração. Outros fatores que dificultam as aplicações destes são as restrições legais e os custos para coleta, secagem, armazenamento e transporte (OLIVEIRA & FRANCA, 2008). Diante desse contexto, procura-se realizar ações viáveis para minimização ou reutilização desses resíduos, por exemplo, empregando-os na alimentação animal, que nem sempre é adequada devido à dificuldade de equilibrar as necessidades nutricionais; ou utilizando os resíduos como substâncias ativas como antibacterianos e antioxidantes. Além disso, esses podem ser usados como matéria-prima para combustão ou submetidos ao processo de compostagem, transformando-os em materiais ricos em húmus e minerais (SILVA, 2012). Porém, a incineração e compostagem podem resultar na emissão de grandes quantidades de materiais voláteis, como os gases de efeito estufa, ou na contaminação de águas subterrâneas, provocando eutrofização ou acidificação do ecossistema local (SALEMDEEB *et al.*, 2017).

Como resultado do grande volume produzido de resíduos pelas indústrias agrícolas e alimentícias, aliado as preocupações com impactos ambientais, há uma crescente demanda por gerenciamentos adequados dos resíduos. Grande pressão tem sido exercida nas industriais, instituições governamentais e em vários ramos da pesquisa para estudar adequadamente e formular propostas para o reaproveitamento desses resíduos biológicos. Por exemplo, o desenvolvimento de bicompostíveis ou de materiais ecológicos, sustentáveis e de baixo custo (OLIVEIRA & FRANCA, 2009).

#### 1.1.1. Resíduos Agroindustriais do Café

Dentre os resíduos gerados durante o processamento do café, os principais são polpa, casca, película prateada e a borra de café (Figura 1).

**Figura 1- Subprodutos oriundos da produção de café: A=Polpa; B=Casca; C = película prateada; D = Borra de café.**



Fonte: Gadernal (2013); Zachlatimore (2015); Niglio *et al.* (2017); Karmee (2017).

A polpa do café é o primeiro subproduto obtido no processamento do café, durante o processamento úmido. Essa equivale a 29% de peso do fruto, e a cada 2 toneladas de café produzido, uma tonelada de polpa é obtida. Os principais compostos orgânicos presentes na polpa do café são carboidratos, proteínas, minerais, compostos fenólicos (ácidos clorogênicos

e cafeína), e taninos (MURTHY & NAIDU, 2012). Já casca de café, diferentemente da polpa, é obtida no processamento seco do fruto. Essa reveste o grão de café e corresponde a 12% do peso do fruto. A cada tonelada de fruto de café são geradas 0,18 toneladas de cascas de café, que são compostas principalmente por carboidratos (72,3%) (MURTHY & NAIDU, 2012).

Tal composição permite que esses subprodutos sejam empregados em inúmeras áreas, como na produção de biogás, que se origina da degradação da matéria orgânica em condições anaeróbicas; na produção de bioetanol, por apresentar em torno de 15% de açúcares; e como combustível direto por ter um poder calorífico em torno de 16 MJ/kg de polpa seca; como fertilizante por serem ricas em potássio e outros minerais; como ração animal, se retirados os compostos antinutricionais; ou compostagem quando adicionados compostos ricos em carbono e nitrogênio; em fermentações; na produção de cogumelos; e como adsorventes (FRANCA & OLIVEIRA, 2009; RODRIGUEZ & ZAMBRANO, 2013).

O pergaminho do café é conhecido como um endocarpo fibroso que representa 5,8% do peso seco do fruto. Esse é composto por celulose, hemicelulose, lignina, e cinzas, e atua como cobertura dos hemisférios da semente do café, separando um grão do outro. Durante o processamento úmido do café, o fruto passa pela secagem e descascamento removendo o pergaminho (IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2019). Esse pode ser empregado para produção de energia por meio da queima em produtores de gás, como ocorre com o biogás (RATHINAVELU & GRAZIOSI, 2003).

Outro importante subproduto é a película prateada, a qual se origina do processo de torrefação do grão cru de café. Essa apresenta alta concentração de fibras dietéticas, bem como alto teor de compostos fenólicos que conferem considerável atividade antioxidante (MUSSATTO, 2014). Desse modo, pode ser aplicada na produção de extratos que atuam como melhoradores da secreção da insulina e para produção de pães (POURFARZAD *et al.*, 2013; FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 2016).

No entanto, quando o objetivo é a produção de café solúvel ou a preparação da bebida em cafeterias, restaurantes e preparos domésticos, uma enorme quantidade de borra de café é gerada, com uma produção anual em torno de 6 milhões de toneladas no mundo (NGUYEN *et al.*, 2017).

A borra de café é rica em polissacarídeos e proteínas, bem como contém cafeína, taninos e polifenóis (MATA *et al.*, 2018). Esse resíduo pode ser aplicado como matéria-prima para produção de combustível para indústria devido ao alto poder calorífico (5000 kcal/kg); produção de etanol; bebida destilada com aroma de café; matéria prima para cultivo de microrganismos (BALLESTEROS *et al.*, 2014); na compostagem; como ração animal;

biossorventes; produção de enzimas (MUSSATTO, 2014; MARTINEZ-SAEZ *et al.*, 2017); e também como substrato para obter corantes e ácidos orgânicos (JUNG *et al.*, 2016).

Assim sendo, os subprodutos do processamento e produção do café são empregados para os mais comuns usos como a produção de biogás, silagem, alimentação animal, álcool, vinagre, enzimas, biopesticidas e probióticos. Contudo, considerando as elevadas quantidades de resíduos gerados, usos alternativos para este resíduo sólido têm sido estudados como a utilização da casca e polpa para o cultivo de cogumelo; a incorporação da película prateada e da borra de café na produção de pães, biscoitos e aperitivos (MURTHY & NAIDU, 2012).

## 2.3 Borra de café

### 2.3.1 Composição

A borra de café é considerada o principal resíduo associado à indústria do café. A composição química desse subproduto varia de acordo com o tipo e idade da planta, localização geográfica, clima e solo nos quais a planta do café é cultivada (KARMEE *et al.*, 2018).

Genericamente, a borra de café é composta por lipídeos (9-15% m/m), polissacarídeos (45-55% m/m), proteínas (13-17% m/m), alcalóides (cafeína (0,007-0,50%), trigonelina), minerais (K, Mg, P, Ca, Na, Fe, Mn e Cu) (0,25-1,6% m/m) e compostos fenólicos (1-1,5% m/m) (CRUZ *et al.*, 2012; BALLESTEROS *et al.*, 2014; CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015; ZABANIOTOU & KAMATEROU, 2019). Os principais polissacarídeos presentes na borra de café são celulose (10%) e hemicelulose (30-40%), que englobam as galactomananas e arabinogalactanas tipo II (KOVALCIK *et al.*, 2018).

A propriedade mais conhecida do café é o efeito estimulante resultante da presença de cafeína (MUSSATTO & TEIXEIRA, 2013). No entanto, os compostos fenólicos e os carboidratos contribuem para as particularidades do café. Além da atividade antioxidante, os compostos fenólicos apresentam atividade antibacteriana, antiviral, antiinflamatória e anti-tumoral (MUSSATTO *et al.*, 2011b). Já os polissacarídeos presentes no café são fibras dietéticas, uma vez que eles não são despolimerizados pelas enzimas do intestino humano. Esses polissacarídeos são fermentados por bactérias intestinais, originando ácidos graxos de cadeia curta, os quais promovem efeitos fisiológicos benéficos e também afetam a composição da microbiota intestinal. Além desses benefícios para o intestino, as galactomananas presentes no café apresentam uma estrutura similar às mananas acetiladas

provenientes da babosa (*Aloe vera* (L.)), assim sendo, apresentam atividade imunoestimulatória, ou seja, ativam respostas de células do sistema imunológico, contribuindo para efeitos terapêuticos como cicatrização de feridas e atividade antitumoral (PETKOWICZ, 2014).

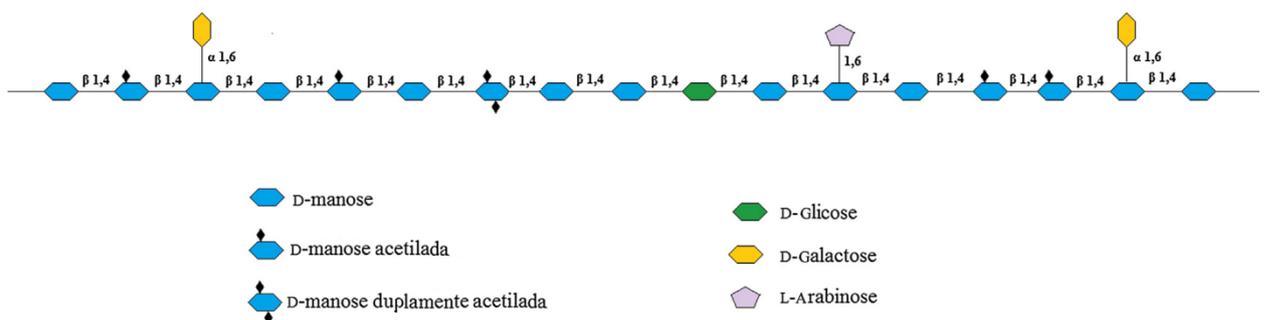
Assim sendo, os compostos presentes na borra de café apresentam benefícios para a saúde humana e múltiplas propriedades biológicas, tornando a borra de café muito atrativa para as indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos (GIRALDO, 2016).

### 2.3.1.1 Polissacarídeos

Os grãos de café são ricos em polissacarídeos, que correspondem a aproximadamente metade do conteúdo dos grãos verdes de café (50% do peso seco). O teor de polissacarídeos é semelhante entre o café arábica e robusta (PETKOWICZ, 2014). Os principais polissacarídeos presentes no café são mananas ou galactomananas, arabinogalactanas tipo II e celulose (CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015).

As galactomananas (Figura 2) são compostas por uma cadeia principal de mananas ligadas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e substituídas em O-6 por resíduos de galactose ou arabinose, estas unidas por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Ademais, as galactomananas são acetiladas, com grupo acetil nas posições O-2 e O-3 (SIMÕES *et al.*, 2013).

**Figura 2 - Representação esquemática da estrutura genérica das galactomananas isoladas do grão de café.**

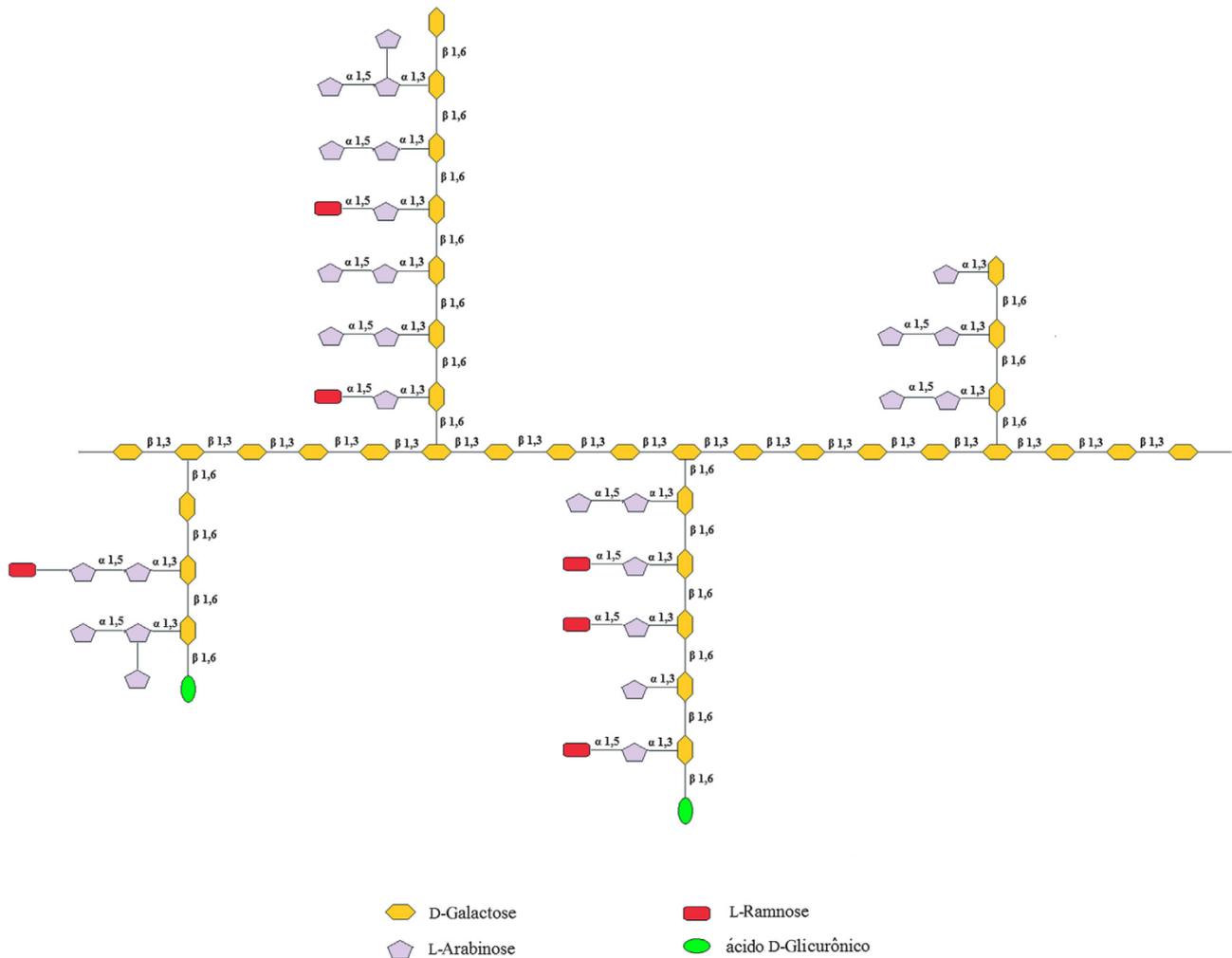


Fonte: Moreira *et al.* (2015).

No entanto, as arabinogalactanas (Figura 3) são polissacarídeos ramificados, e constituídos por uma cadeia principal de galactose unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) ligadas a cadeias laterais de galactose por meio de ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) em posições O-6. Além disso, as cadeias laterais são substituídas em O-3 por arabinose anexada por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3). Algumas arabinogalactanas podem ter ácido glucurônico na posição terminal da cadeia lateral

(SIMÕES *et al.*, 2014). As arabinogalactanas tipo II, geralmente estão ligadas a proteínas (PETKOWICZ, 2014).

**Figura 3 - Representação esquemática da estrutura genérica das arabinogalactanas isoladas do grão de café.**



Fonte: Moreira *et al.* (2015).

Durante a torrefação, ocorre um aumento no volume do grão de café e a abertura das células da parede celular resultando no aparecimento de microporos. Além disso, em torno de 80% das arabinoses, 50% das galactoses e 35% das manoses são degradadas, variando de acordo com o grau de torrefação, evidenciando a maior vulnerabilidade das unidades da arabinose a altas temperaturas (NUNES *et al.*, 2006). Apesar das galactomananas serem consideradas mais resistentes do que as arabinogalactanas quando submetidas ao processo de torrefação, estas sofrem despolimerização, desramificação, reações de Maillard, caramelização, isomerização, oxidação, descarboxilação e formação de melanoidinas (SIMÕES *et al.*, 2014).

Essas mudanças provocam aumento da solubilidade das arabinogalactanas e das galactomananas, tornando os polissacarídeos mais susceptíveis a extração durante o preparo da bebida (NUNES *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2012; SIMÕES *et al.* 2013). Assim sendo, os polissacarídeos solúveis em água presentes no café torrado exercem um papel importante na retenção de substâncias voláteis e também contribuem para viscosidade da bebida, proporcionando uma sensação cremosa conhecida como “corpo” da bebida (CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015).

Parte das galactomananas e arabinogalactanas é extraída durante a preparação da bebida (NUNES & COIMBRA, 2010), mas a maioria dos polissacarídeos permanece associada à parede celular como material insolúvel na borra de café (SIMÕES *et al.*, 2013).

Assim sendo, semelhante ao grão de café, a borra é uma abundante fonte de polissacarídeos, principalmente de galactomananas. Essas são hidrocolóides solúveis em água, estáveis e altamente viscosas. Com isso, podem ser utilizadas como modificadores de propriedades reológicas, espessantes, agentes de suspensão em emulsões e alimentos. A ausência de toxicidade das galactomananas permite o emprego na indústria têxtil, farmacêutica, biomédica, cosmética e alimentícia. Essas são cada vez mais consumidas como fibras alimentares para diminuir a ingestão de calorias e promover redução de peso, para controlar os níveis de glicose, colesterol e insulina, para reduzir os riscos de doenças cardíacas e câncer de cólon. Além disso, as galactomananas são utilizadas como modificadores de textura e estabilizadores (CERQUEIRA *et al.*, 2011a; ROSSI *et al.*, 2017).

Além das potenciais aplicações, as galactomananas são responsáveis por características organolépticas do café, como o aroma, que geralmente está relacionado com ligação glicosídica; a estabilidade da espuma no café *espresso* que é um parâmetro de qualidade; e também são responsáveis pela viscosidade nos extratos de café (ARYA & RAO, 2007).

As galactomananas de fontes distintas apresentam diferentes características em relação à razão manose/galactose (M/G), a distribuição dos resíduos de galactose ao longo da cadeia principal de manose, e à massa molecular (ROSSI *et al.*, 2017).

Simões *et al.* (2004) compararam as galactomananas presentes no café com uma das principais galactomananas comerciais, a goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*). Este encontrou uma razão de M/G de 12,7 para as galactomananas presentes na borra do café, enquanto a goma de alfarroba apresentou razão M/G igual a 3,5. Além disso, perceberam que as galactomananas da borra de café são mais resistentes a altas temperaturas do que as galactomananas da goma de alfarroba (M/G = 3,5) visto que as galactomananas da goma de alfarroba apresentaram maior perda de massa (72%) do que as galactomananas do café (48%),

quando expostas a alta temperatura. Isso pode ser correlacionado com o menor grau de ramificação da galactomananas da borra de café, que resultam em alta interação de hidrogênio intermolecular, originando uma estrutura altamente ordenada (SIMÕES *et al.*, 2014).

Por fim, as galactomananas são os principais polissacarídeos presentes no café, tanto no grão de café cru quanto no grão de café torrado, contribuindo para inúmeras propriedades diferentes. A variedade na estrutura dessas depende da origem do café, do grau de torração, do preparo da bebida, dentre outros parâmetros. E essa pluralidade de estruturas pode ser relacionada com as respectivas propriedades, como benefícios para saúde e percepções organolépticas.

### 2.3.2 Pré-tratamento

A biomassa lignocelulósica, de maneira semelhante à parede celular das plantas, é composta por grande quantidade de carboidratos, sendo esses celulose e polissacarídeos não celulósicos, associados covalentemente ou por meio de ligações não covalentes, uns com os outros e também com polímeros, como lignina e proteínas. Devido a essa composição, tais estruturas são potenciais fontes para produtos com alto valor agregado como biocombustíveis, biofilmes e biocompósitos. No entanto, as características estruturais dos materiais formam estruturas recalcitrantes para enzimas, bem como dificultam a aplicação destes. Assim sendo, é necessária a quebra da recalcitrância desta para permitir o acesso de enzimas e tornar os polissacarídeos disponíveis (HARRIS & STONES, 2009; SUN *et al.*, 2016; RAVINDRAN *et al.*, 2017).

Os aspectos que influenciam no acesso aos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica são teor de lignina, grau de polimerização e cristalinidade da celulose, presença de grupos acetil, associação da celulose, hemicelulose e lignina, bem como a área superficial e porosidade. Portanto, os pré-tratamentos são essenciais para realizar mudanças estruturais e composicionais no material lignocelulósico (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

Para que o pré-tratamento seja eficiente, esse deve proporcionar rendimento elevado; baixo custo; mínima degradação de açúcares; não gerar substâncias tóxicas que interfiram em procedimentos posteriores, como a hidrólise enzimática; não produção de resíduos sólidos ou prejudiciais ao meio ambiente; e mínima demanda de energia (ALVIRA *et al.*, 2010).

Com finalidade de abranger essas necessidades dos pré-tratamentos, inúmeros métodos têm sido estudados e propostos. Esses podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (quadro 1).

**Quadro 1 - Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.**

<b>Método</b>	<b>Processo</b>
Físico	Moagem e Trituração
	Ultrassom
	Extrusão
	Irradiação
Químico	Pré-tratamento alcalino
	Pré-tratamento ácido
	Deslignificação oxidativa
	Organosolv
	Pré-tratamento com líquidos iônicos
Físico Químico	Explosão de vapor
	Explosão de fibra de amônia (AFEX)
	Pré-tratamento de CO <sub>2</sub> supercrítico
	Pré-tratamento hidrotérmico
Biológico	Consórcio microbiano
	Pré-tratamento usando fungos
	Hidrólise enzimática

Fonte: Taherzadeh & Karimi, 2008; Alvira *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2016; Ravindran & Jaiswal, 2016.

Os métodos físicos têm como objetivo aumentar a área superficial do material lignocelulósico, reduzindo o tamanho das partículas e rompendo as estruturas. Além disso, esse tipo de pré-tratamento diminui o grau de cristalinidade e de polimerização da celulose, deixando, desta maneira, os polissacarídeos mais expostos e facilitando o acesso até estes. No entanto, esse método é pouco eficiente em relação ao aumento da digestibilidade da biomassa (TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

De modo semelhante aos pré-tratamentos físicos, os métodos físico-químicos aumentam a área superficial e os poros das partículas. Esses apresentam inúmeras vantagens como nenhuma exigência de catalisador, baixo custo, baixo teor de inibidores e provoca menor impacto no meio ambiente. Porém, esses degradam a hemicelulose, o que pode ser considerada uma desvantagem do processamento (SUN *et al.*, 2016).

Por outro lado, pré-tratamento biológico é mais específico visto que são usados fungos ou enzimas oriundas desses fungos que atuam diretamente na lignina, e às vezes também na

hemicelulose. Com isso, o método biológico, reduz o grau de polimerização, diminui a área superficial e os poros, bem como degrada lignina e hemicelulose. Embora esse método apresente inúmeras vantagens como ausência de produtos químicos, condições brandas de tratamento e menor consumo de energia, requer um longo tempo e pode ocorrer a formação de subprodutos inibidores para enzimas (TAHERZADEH & KARIMI, 2008; SUN *et al.*, 2016).

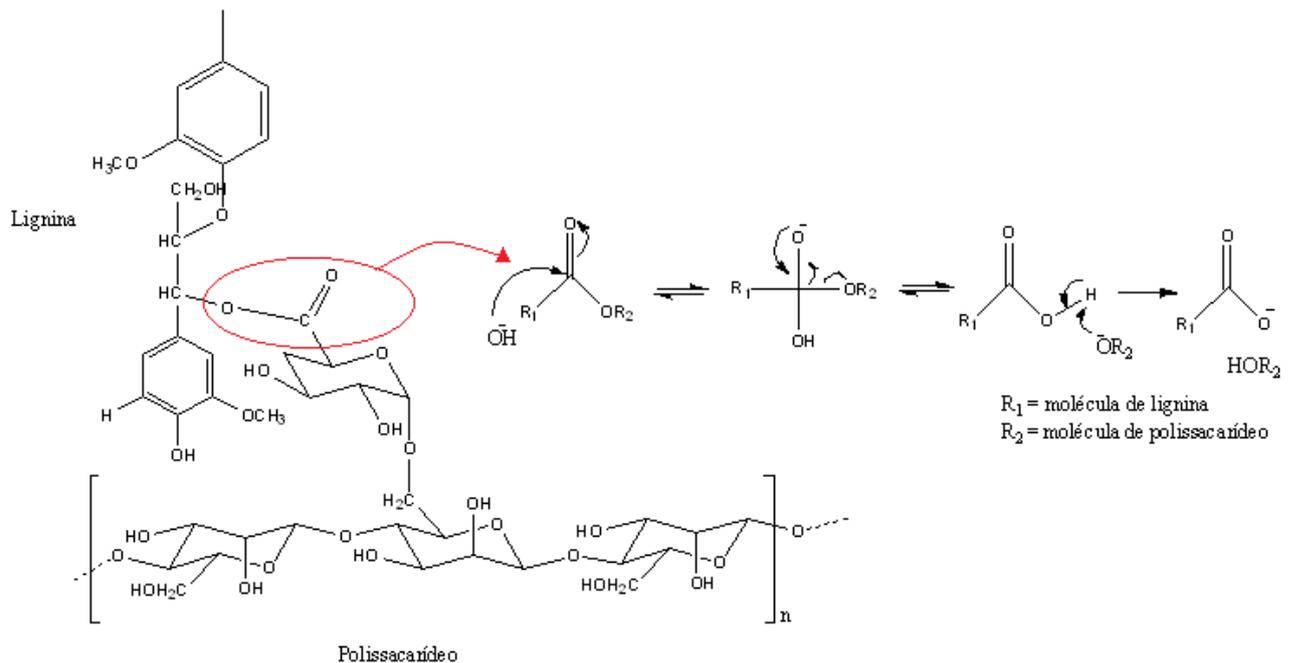
Por sua vez, os métodos químicos atuam diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, aumentando a área superficial e degradando a lignina e parcialmente a hemicelulose que está covalentemente ligada à lignina. As maiores desvantagens desse tipo de tratamento são a quantidade necessária de reagentes químicos e os custos desses. Todavia, os métodos químicos mostram-se mais eficientes na remoção da lignina (ALVIRA *et al.*, 2010).

#### 2.3.2.1 Pré-tratamento Alcalino

O pré-tratamento alcalino é o método mais comumente empregado para remoção da lignina em biomassa lignocelulósica. Nesse pré-tratamento, a reação ocorre na ligação éster entre a lignina e a hemicelulose. Essa ligação é quebrada, fazendo com que a lignina seja solubilizada (SUN *et al.*, 2016). O tratamento alcalino pode ser conduzido em temperatura ambiente, e o tempo de reação pode variar em segundos ou dias (ALVIRA *et al.*, 2010).

O mecanismo da reação é mostrado na Figura 4. Na primeira etapa, o íon hidróxido ataca o carbono da ligação éster entre a lignina e o polissacarídeo ou entre duas moléculas de lignina, ou ainda entre duas moléculas de polissacarídeo. Na segunda etapa, forma-se um intermediário tetraédrico. Com intuito de se estabilizar, o alcóxido (-OCH<sub>3</sub>) do ácido carboxílico é eliminado, e forma-se uma ligação dupla estabilizando o átomo de oxigênio. Na etapa 3, o alcóxido desprotona o íon hidroxila da molécula, resultando na formação de íon carboxilato (etapa 4). Desse modo, ocorre a deslignificação do material lignocelulósico (MODENBACH & NOKES, 2014).

**Figura 4 - Mecanismo de deslignificação pelo pré-tratamento álcali.**



**Fonte: Modenbach & Nokes, 2014 (modificada).**

Os reagentes alcalinos empregados nesse pré-tratamento são hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), hidróxido de potássio (KOH), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e amônia aquosa (ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento com hidróxido de sódio acarreta inúmeras modificações estruturais. Dependendo das condições do tratamento aplicado, a lignina é totalmente ou parcialmente solubilizada, e também pode ocorrer a degradação da fração hemicelulósica. Dessa maneira, esse tratamento dilata o material lignocelulósico, aumentando a área superficial, possibilitando maior acesso à fração celulósica. Além disso, ocorre a redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, facilitando a digestibilidade enzimática do polissacarídeo (MODENBACH & NOKES, 2014).

Esse tratamento pode ser classificado em duas categorias: o processo com baixa concentração e o processo com alta concentração. O método envolvendo baixas concentrações (0,5 – 4%) e temperaturas brandas (25-55°C) é favorável uma vez que afeta a lignina, e mantém inalterados e disponíveis para reações posteriores os carboidratos. Já o método que emprega concentrações de álcali maiores do que 6% causam mudanças estruturais e morfológicas na hemicelulose e celulose. Nesse caso, as regiões amorfas da celulose dilatam seguidas pelas estruturas cristalinas. Com isso, ocorre a redução do grau de polimerização e cristalização com o aumento da concentração do álcali.

Por sua vez, a hemicelulose, em baixas concentrações, permanece intacta, porém, em altas concentrações essa é solubilizada. Além disso, pode ocorrer a saponificação das ligações éster que ligam a hemicelulose e outros componentes lignocelulósicos, a remoção do grupo acetil e substituição do ácido urônico presentes na molécula da hemicelulose, bem como a formação de sais (XU *et al.*, 2016).

Giroto *et al.* (2018b) empregaram um pré-tratamento alcalino na borra de café, durante 24 horas, para posterior utilização desta na digestão anaeróbia. Testaram diferentes concentrações de hidróxido de sódio, 2, 4, 6 e 8%, e observaram que a maior remoção de lignina ocorreu com NaOH 2%, com pequenas remoções de hemicelulose e celulose. No entanto, em concentrações maiores do que 4% a remoção de lignina foi menos eficiente com consequente remoção de celulose e hemicelulose.

O tratamento com NaOH é um dos mais utilizados visto que apresenta baixo custo, é efetivo em diferentes matérias primas e exige baixo gasto de energia comparado a outros pré-tratamentos (SUN *et al.*, 2016). Contudo, o pré-tratamento com NaOH apresenta algumas limitações, como a necessidade de longos tempos de reação, horas ou dias; a perda de fração dos açúcares devido a solubilização durante o tratamento; e produção de compostos inibitórios como ácidos orgânicos, fenóis, furfural, hidroximetil furfural (HMF). Além disso, a remoção da lignina pode não ser completa, dependendo da estrutura da lignina presente na matéria-prima, com esta podendo solubilizar e condensar em torno da celulose. Também pode ocorrer do NaOH consumido durante a reação incorporar na biomassa formando sais (MODENBACH & NOKES, 2014; XU *et al.*, 2016).

No entanto, a eficiência do pré-tratamento alcalino, bem como a de outros pré-tratamentos, pode ser melhorada com a combinação do ultrassom. Essa técnica fundamenta-se no princípio de cavitação em que ocorre a formação de micro cavidades ou bolhas devido à propagação das ondas ultrassônicas no líquido. A implosão dessas cavidades resulta em altas temperaturas e gradiente de pressão, por curto tempo, formando pontos de alta densidade energética em torno das cavidades. Consequentemente, a alta densidade energética pode provocar alterações morfológicas na superfície dos compostos (SUBHEDAR & GOGATE, 2016).

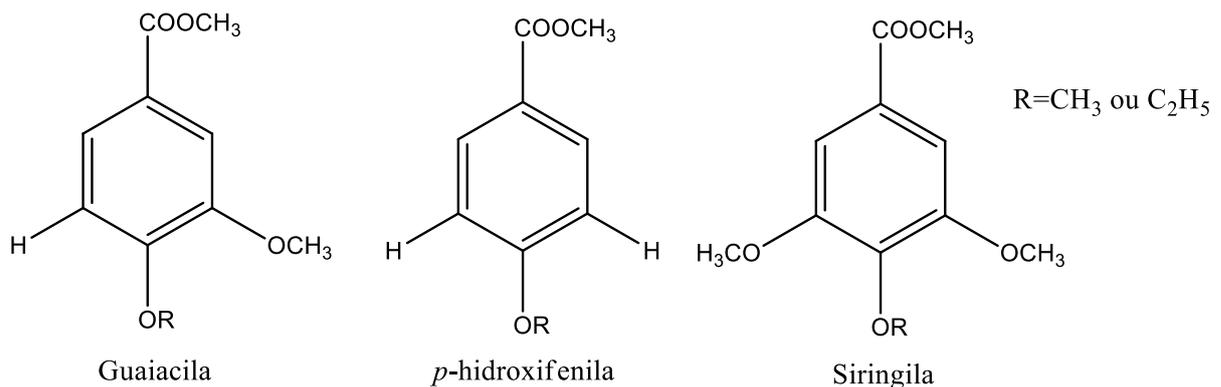
#### 2.3.2.2 Pré-tratamento com Permanganato de Potássio Alcalino

O permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) é considerado um forte agente oxidante, não tóxico, barato, e seguro em vista de outros oxidantes como ozônio e líquidos iônicos (MA *et al.*, 2015; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

O  $\text{KMnO}_4$  é comumente empregado na desinfecção de água e na oxidação da matéria orgânica, podendo ser aplicado na deslignificação da biomassa lignocelulósica. O líquido residual dos tratamentos com  $\text{KMnO}_4$  pode ser precipitado gerando óxido de manganês que apresenta capacidade de adsorção. Assim sendo, esse pré-tratamento é ecologicamente correto quando comparado com o pré tratamento alcalino (MODENBACH & NOKES, 2014). Contrastando esse com os pré-tratamentos explosão a vapor e AFEX, o pré tratamento com  $\text{KMnO}_4$  não necessita de equipamentos especiais e condições severas, sendo estes aspectos vantajosos (UPPUGUNDLA *et al.*, 2014).

Além disso, o pré-tratamento com permanganato de potássio remove a lignina com oxigênio e retém grande parte dos carboidratos na biomassa lignocelulósica em condições brandas (MA *et al.*, 2015), uma vez que a lignina é a molécula mais suscetível à oxidação com permanganato de potássio dentre as moléculas que compõem a parede celular (RAVINDRAN *et al.*, 2017). O  $\text{KMnO}_4$  age nas ligações éter e éster entre a lignina e os carboidratos (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Dessa forma, esse método de deslignificação fundamenta-se na degradação seletiva das cadeias laterais alifáticas ligadas a partículas aromáticas na lignina, formando inúmeros ácidos carboxílicos aromáticos (Figura 5) (GELLERSTEDT, 1992).

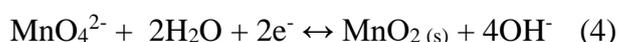
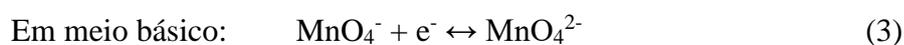
**Figura 5- Os principais ésteres metílicos de ácidos carboxílicos formados na oxidação da lignina com permanganato de potássio.**



**Fonte: Gellerstedt (1992) modificada.**

A capacidade de oxidação está relacionada com a concentração de  $\text{KMnO}_4$ , com o pH do meio, e com estrutura da cadeia lateral. Em concentrações até 4%, a oxidação ocorre somente na lignina. No entanto, concentrações maiores do que 4% causam a oxidação das ligações éster e éter na fração hemicelulósica, visto que essa apresenta natureza amorfa e é mais vulnerável que a celulose (RAVINDRAN *et al.*, 2017).

Já em relação ao pH do meio, constatou-se que o rendimento da reação de deslignificação com  $\text{KMnO}_4$  foi maior em condições alcalinas que em condições neutras (GELLERSTEDT, 1992). De acordo com o pH do meio, o íon permanganato ( $\text{MnO}_4^-$ ) sofre reações de redução, resultando em diferentes estados de oxidação (equações 1, 2, 3 e 4). Em meio ácido, é o íon  $\text{Mn}^{2+}$ ; em pH básico, é o  $\text{MnO}_4^{2-}$ ; e, em meio neutro, é o  $\text{MnO}_2$ . Assim sendo, o íon  $\text{MnO}_4^{2-}$  só é estável em meio alcalino, o qual fica disponível para oxidar lignina (PEARSON & GEORGE, 1988).



Por sua vez, de acordo com o grupo presente na cadeia lateral das ligninas, maior será o rendimento da oxidação, ou seja, as ligninas que apresentam grupo metoxílico na posição alfa em relação ao anel aromático são menos reativas do que ligninas com grupos hidroxila correspondentes a alcoóis primários, secundários ou terciários (GELLERSTEDT, 1992).

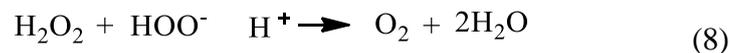
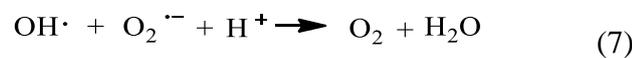
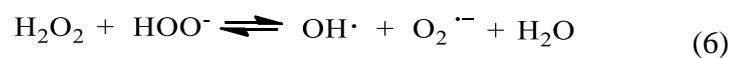
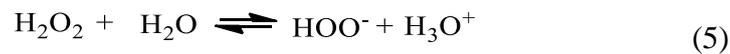
### 2.3.2.3 Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é um composto altamente reativo com intenso poder oxidativo, miscível em água e não inflamável. Esse é encontrado em diversos organismos e participa de rotas biológicas, sendo considerado um metabolito natural (DUTRA *et al.*, 2017). Comercialmente, é encontrado na concentração de 20 a 60%, e é comumente empregado na indústria de papel para o branqueamento das polpas de celulose, bem como no tratamento de efluentes por processos oxidativos avançados (SU *et al.*, 2015; DUTRA *et al.*, 2017).

Esse composto é empregado em pré-tratamento atuando na deslignificação de biomassa lignocelulósica, ocorrendo a remoção de 50% ou mais de lignina (GOULD, 1984). A degradação da lignina é acompanhada pela solubilização de parte da fração hemicelulósica. No entanto, a celulose fica altamente susceptível para posteriores reações como a hidrólise enzimática por celulase *Trichoderma reesei* (GOULD, 1985).

Monte *et al.* (2011) trataram bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio com subsequente hidrólise enzimática. Para isso, foi utilizado  $\text{H}_2\text{O}_2$  2% e 0,5% de sulfato de magnésio durante 4 horas. Desse modo, constatou-se a remoção de 70% de lignina, bem como a solubilização de 36% de hemicelulose, produzindo um substrato com características adequadas para a hidrólise enzimática com enzimas celulase.

O pré-tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  fundamenta-se em reações químicas que este agente oxidante sofre no meio alcalino ( $\text{pH}=11,5$ ). O peróxido de hidrogênio decompõe formando radicais como  $\text{HOO}^\cdot$  (equação 5), o qual reage com fenilpropanol/propafenona ou quinonas que compõem a lignina, assim como ataca ligações duplas e carbonil presente na cadeia lateral da lignina. Além disso, o radical  $\text{HOO}^\cdot$  pode reagir com outra molécula de peróxido de hidrogênio formando outros radicais como  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{HO}^\cdot$  (equação 6). Os radicais formados a partir da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  atacam preferencialmente a lignina (GUO *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2016).



Os pré-tratamentos são influenciados por inúmeras variáveis. Portanto, o pré-tratamento com peróxido alcalino depende da concentração de sólidos, da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , do tempo, da temperatura e do pH. A concentração de sólidos influencia na escolha dos outros parâmetros. Já a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  afeta significativamente na melhoria da acessibilidade da biomassa à hidrólise enzimática, a qual depende das características da matéria-prima. Ao passo que o tempo de reação depende da recalcitrância da biomassa. De forma semelhante, a temperatura do tratamento depende das particularidades do material tratado, sendo a temperatura geralmente utilizada entre 25-70°C, com pressão 1 atm (DUTRA *et al.*, 2017).

Por sua vez, o pH é o fator mais importante, visto que, de acordo com o pH do meio, o peróxido de hidrogênio se decompõe formando um radical diferente. Estudos mostram que o emprego do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino sem correções do pH resulta em baixa eficiência, produzindo pequena quantidade de açúcares durante a hidrólise enzimática (DUTRA *et al.*, 2017). Segundo Gould (1984), que avaliou o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em resíduos agrícolas como palha de trigo e resíduos da colheita de milho, em pH 6,8, de 10-15% da lignina é solubilizada, enquanto, em pH acima de 10, nota-se considerável digestibilidade de lignina, alcançando o máximo de eficiência (60-65%) em pH igual a 12,5.

Diferentemente de outros pré-tratamentos, como explosão a vapor e AFEX, o tratamento com peróxido de hidrogênio necessita de pouca energia, não produz compostos inibidores a enzimas como hidroximetilfurfural e furfural, os reagentes são de fácil aquisição,

não são necessários reatores especiais, e são compatíveis com altas concentrações de sólidos (DUTRA *et al.*, 2017). Além disso, o tratamento com peróxido de hidrogênio não deixa resíduos na biomassa, uma vez que o peróxido se decompõe em água e oxigênio (ZHANG *et al.*, 2019). Dessa forma, é considerado um pré-tratamento promissor (RABELO *et al.*, 2011).

### 2.3.3 Métodos de Isolamento de Galactomananas

Atualmente, há um interesse especial no uso de polissacarídeos oriundos de fontes naturais e resíduos agro-alimentares (BALLESTEROS *et al.*, 2017). Dos polissacarídeos, a classe que constitui a hemicelulose é muito visada devido às respectivas propriedades imunoestimuladoras (SIMÕES *et al.*, 2009), atividade antimicrobiana e antioxidante (BALLESTEROS *et al.*, 2015), e de controle dos níveis de glicose, colesterol e insulina (ROSSI *et al.*, 2017). Esses polissacarídeos são geralmente constituídos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, galactose e glicose), com a composição destas variando de acordo com a origem da hemicelulose (MUSSATO *et al.*, 2011a; VILARO *et al.*, 2017). De modo geral, a hemicelulose é encontrada na natureza associada à celulose e lignina, resultando em uma rede forte e recalcitrante. Desse modo, são necessários processos que sejam capazes de romper as ligações covalentes entre esses compostos para a extração e isolamento desses polissacarídeos (SCULLY *et al.*, 2016; GETACHEW *et al.*, 2018).

A extração é um processo importante para recuperação de compostos de interesse que se encontram em matérias-primas complexas (BALLESTEROS, 2016). Para isso, inúmeros métodos têm sido estudados e adotados, como processos químicos que se dividem em tratamentos alcalinos (hidróxido de sódio e hidróxido de potássio) (BALLESTEROS *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2009; FISCHER *et al.*, 2001), e tratamento ácido (ácido sulfúrico) (MUSSATTO *et al.*, 2011a); métodos físicos, por exemplo, extração assistida por ultrassom (YANG *et al.*, 2008); auto-hidrólise (RODRÍGUEZ-JASSO *et al.*, 2013) e também hidrólise enzimática (PRATTO *et al.*, 2016).

Esses métodos apresentam vantagens e desvantagens. A hidrólise ácida é um dos métodos mais eficientes para liberação de açúcares, todavia pode ocorrer a decomposição de alguns açúcares durante a reação (MUSSATTO & ROBERTO, 2004; MUSSATTO *et al.*, 2011a). Já as hidrólises alcalinas resultam em alto nível de degradação (açúcares simples) quando realizada em conjunto com aquecimento (GETACHEW *et al.*, 2018).

A auto-hidrólise não requer o uso de reagentes químicos, sendo assim é ecologicamente favorável. Contudo é um processo complexo que depende de muitos fatores como a proporção matéria-prima e solvente, temperatura, tamanho de partícula da matriz sólida, tempo de

extração, estrutura e grau de polimerização das moléculas e interações dos compostos (BALLESTEROS *et al.*, 2017). Assim sendo, pode resultar em baixos rendimentos, decomposição dos açúcares e formação de produtos indesejáveis (GETACHEW *et al.*, 2018).

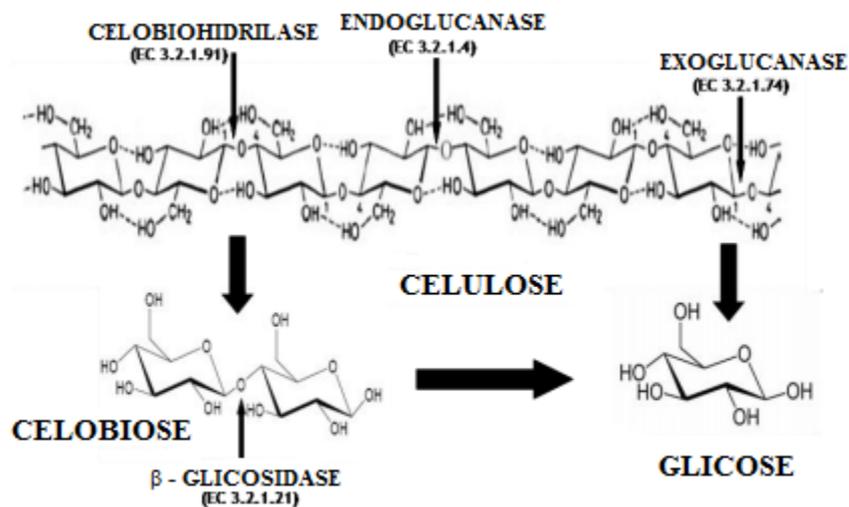
Por sua vez, a hidrólise enzimática é favorável em relação a outros métodos, por ser ecologicamente correta, ocorrer em condições moderadas, produzir menos subprodutos de degradação e apresentar maior especificidade em relação ao substrato. No entanto, esse método depende da otimização das variáveis e é geralmente de custo elevado (SCULLY *et al.*, 2016). Assim, busca-se encontrar um método de extração eficiente com minimização de produtos de degradação.

### 2.3.3.1 Tratamento Enzimático

As enzimas são empregadas no desenvolvimento de produtos químicos, em ciências médicas, aplicações analíticas, alimentos, detergentes e no tratamento de resíduos. Industrialmente, as enzimas são muito visadas por serem sustentáveis, ou seja, apresentam baixo impacto ambiental e consumo energético, além de minimizarem efeitos indesejáveis, e são biodegradáveis (ROCHA, 2010).

A celulase é uma enzima pertencente à classe das hidrolases e é produzida por fungos, bactérias e protozários. Essa enzima atua nas ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídica de materiais celulósicos, promovendo a quebra da ligação e liberação de açúcares, como a glicose que é de grande interesse da indústria. Tais enzimas são divididas em endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, de acordo com a reação catalítica que promovem (Figura 6) (MORANA *et al.*, 2011).

**Figura 6- Hidrólise por enzimas celulases.**



Fonte: Morana *et al.*, 2011 (Modificada).

As endoglucanases, também conhecidas como CMCase, catalizam a clivagem interna das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídica das regiões amorfas e solúveis da celulose. A ação dessa enzima resulta em uma rápida diminuição do comprimento das cadeias de celulose e uma gradual elevação da concentração de açúcares redutores, e, conseqüentemente, forma novos terminais redutores e não redutores. Além disso, atua nos produtos intermediários da hidrólise da celulose convertendo-os em celobiose e glicose (LYND et al., 2012; SHARADA et al., 2014).

As exoglucanases se dividem em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As celobiohidrolases atuam nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, removendo unidades celobiose. Enquanto que as glucanohidrolases atuam na molécula de celulose liberando glicose (ZHANG & LYND, 1988; LYND *et al.*, 2012).

Por sua vez, as  $\beta$ -glicosidases convertem a celobiose e alguns oligossacarídeos resultantes em glicose (MORANA et al., 2011). Essas enzimas, assim como as celobiohidrolases, são inibidas pelo seu produto de hidrólise (AWAFO, 1997).

Portanto, a completa degradação da celulose envolve a interação das diferentes enzimas celulolíticas. Essas enzimas agem sinergicamente visto que as enzimas endo quebram as moléculas de celulose gerando nova cadeia com terminais redutores e não redutores, tais cadeias são degradadas pelas enzimas exo liberando celobiose, e então os fragmentos de celobiose são convertidos em glicose pelas enzimas  $\beta$ -glicosidases (HORN *et al.*, 2012). Essa sinergia faz com que a velocidade da hidrólise das ligações glicosídicas aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas individuais (FLORENCIO, 2011).

As celulases possuem relevância significativa atualmente devido às inúmeras pesquisas envolvendo a degradação de celulose para conversão de biomassa lignocelulósica em etanol e bioprodutos. Além disso, estas apresentam relevância econômica, sendo empregadas em inúmeros ramos industriais como gestão de resíduos, e indústrias de bioetanol, de alimentos, agrícola, de detergentes, têxteis, de papel e celulose, de vinho e cervejeira, de extração de azeite de oliva, farmacêuticas, de engenharia genética e outras (SHARADA *et al.*, 2014).

As enzimas de maior interesse comercial são as celulases de fungos aeróbicos celulolíticos, como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens* (NG *et al.*, 2011). O único obstáculo que essas enzimas apresentam é o alto custo. Contudo, nas biorrefinarias são adotadas estratégias para reduzir o custo, como aumento da produtividade volumétrica das enzimas, o uso de substratos mais baratos, produção de celulases com maior

atividade específica sobre substratos sólidos e desenvolvimento de coquetéis enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos (ZHANG *et al.*, 2006).

## **2.4 Filmes de Biopolímeros ou Biodegradáveis**

### **2.4.1 Filmes de Polissacarídeos**

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, que empregam materiais inovadores com propriedades únicas, os polímeros conquistaram espaço na indústria e no mercado, devido as respectivas propriedades e versatilidade, sendo essenciais no cotidiano. Os polímeros são moléculas constituídas por pequenas unidades repetitivas, denominadas monômeros, formando compostos de altas massas moleculares, lineares ou ramificados. Esses apresentam inúmeras aplicações nas indústrias petroquímicas, farmacêuticas, médicas, odontológicas, biomédicas, de alimentos e cosméticos, sendo a principal aplicação, na produção de embalagens para itens alimentares, eletricidade e produtos agrícolas (GINJUPALLI *et al.*, 2017; KULKARNI & DASARI, 2018). Pelo fato dos polímeros serem compostos por longas cadeias de carbono, estes são demasiadamente resistentes à degradação (GINJUPALLI *et al.*, 2017) e, por serem em geral provenientes de fontes não renováveis (petróleo), acarretam inúmeros problemas como elevado consumo de energia, aquecimento global, problemas ambientais gerados pelo desenvolvimento de bactérias e fungos, mal odor, e danos a animais e a à saúde humana (THIAGAMANI *et al.*, 2017).

O consumo mundial de embalagens plásticas apresenta crescimento anual entre 5-9%, impulsionando o desenvolvimento da indústria de plástico, visto que essas são empregadas para armazenarem, protegerem e aumentarem a vida útil de produtos, auxiliarem no transporte e na identificação e consumo do produto, e são essenciais para o sucesso comercial da maioria das mercadorias (PELLEGRINO, 2008). Em 1950, a produção mundial de plástico foi de 1,5 milhões de toneladas, atingindo 288 milhões de toneladas em 2012, sendo a China o maior produtor. Em 2016, foram vendidas 480 bilhões de garrafas plásticas e somente, 7% destas foram coletadas e recicladas, devido ao custo e o tempo do processo de reciclagem (SIRACUSA *et al.*, 2008; SOTO, 2015; ANDA, 2017). Além disso, as embalagens plásticas são as mais produzidas dentre outros tipos de embalagens, bem como as mais exportadas pelo Brasil, representando 38,85% da produção de embalagens, e 39,80% do total exportado (GORGULHO, 2018).

Portanto, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos com intuito de atender às necessidades das indústrias têxteis, cosméticas, farmacêuticas e alimentícias, que buscam

novos materiais oriundos de fontes renováveis, preferencialmente, que não sejam recursos alimentares, e que sejam obtidos em grandes quantidades, para produção de embalagens biodegradáveis com propriedades similares as das embalagens sintéticas e que apresentem baixo custo e reduzam o impacto ambiental (BALLESTEROS *et al.*, 2017; YE *et al.*, 2017).

As embalagens biodegradáveis se dividem em filmes biodegradáveis e revestimentos comestíveis. Os filmes são estruturas pré-formadas que envolvem os alimentos, enquanto que os revestimentos são formados durante a aplicação direta nos produtos alimentares a serem cobertos (YOUSUF *et al.*, 2018). Ambos podem ser utilizados para preservar o produto, controlando e inibindo a migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono e aromas e também para manter e aumentar as características sensoriais dos alimentos pela adição de compostos bioativos (MARTINS *et al.*, 2012; BALLESTEROS *et al.*, 2017).

Os filmes são formados por materiais biopoliméricos que são divididos em três diferentes classes: polímeros produzidos por microrganismos, como a pululana e hidroxipolialcanoatos (PHAs); polímeros produzidos por síntese química a partir de fontes renováveis de origem biológica, por exemplo, o ácido polilático, polimerizado a partir do ácido láctico; e os polímeros oriundos da biomassa, dentre estes proteínas, polissacarídeos, lipídios e resinas (SRINIVASA & THARANATHAN, 2007).

Os biopolímeros originários da biomassa apresentam características físicas e químicas diferentes, assim sendo, resultam em filmes e revestimentos com propriedades distintas (LACROIX, 2009). Os lipídios e ceras, quando empregados nos filmes e revestimentos, auxiliam no controle da umidade, gases e migrações de compostos semelhantes e, desse modo, são aplicados à alimentos frescos, congelados ou processados conservando a qualidade destes, como a cera de carnaúba e a cera de abelha. Quando associados a outras matérias-primas, esses compostos melhoram as propriedades dos filmes e revestimentos.

Por sua vez, as proteínas formam biofilmes que apresentam excelentes barreiras ao dióxido de carbono e ao oxigênio. As proteínas mais estudadas e empregadas como matéria-prima são caseína, glúten, proteína de soja, whey protein, colágeno e gelatina, as quais apresentam baixo custo, alta disponibilidade por serem subprodutos da indústria de alimentos e da produção agrícola, além de apresentarem biodegradabilidade inerente. Essas, bem como os polissacarídeos, são os biopolímeros mais empregados na produção de filmes biodegradáveis devido a habilidade de estabelecer interações poliméricas e criar uma rede contínua, que proporciona propriedades funcionais semelhantes às de filmes sintéticos (DELGADO, 2016; YOUSUF *et al.*, 2018).

Além dessa habilidade, os polissacarídeos têm a capacidade de sinergia com outros compostos, formando biopolímeros com características superiores. Essa propriedade dos polissacarídeos desperta grande interesse do mercado, visto que as propriedades físico-químicas e mecânicas da matriz final podem ser influenciadas pelo tipo de ligação química, forma, massa molecular e grau de polimerização dos compostos que constituem a matéria-prima (MARTINS *et al.*, 2012; BALLESTEROS *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos que são comumente utilizados para formação de filmes e revestimentos são: quitosana; amido; celulose e derivados, compreendendo metilcelulose (MC), carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e hidroxipropilcelulose (HPC); e gomas que são subdivididas em alginato, pectina, carragenina e galactomananas (GIRALDO, 2016). Esses são hidrofílicos proporcionando uma boa barreira a gases, como oxigênio e dióxido de carbono, porém, oferecem fraca barreira ao vapor d'água e propriedades mecânicas insuficientes (CERQUEIRA *et al.*, 2011a).

Além disso, os filmes formados apresentam estruturas frágeis e duras, com aparências quebradiças (PINHEIRO *et al.*, 2010). No entanto, o desempenho do filme pode ser melhorado com a incorporação de aditivos como plastificantes, sendo os mais comumente empregados os polióis, como glicerol, sorbitol, polietilenoglicol (DU *et al.*, 2016). Ademais, os filmes e revestimentos à base de polissacarídeos podem atuar como veículos para antioxidantes (ácido ascórbico), agentes antimicrobianos, aromas, nutrientes, aumentando a funcionalidade e a segurança dos alimentos (CERQUEIRA *et al.*, 2009a; SARTORI & MENEGALLI, 2016).

Os filmes de polissacarídeos são amplamente utilizados, especialmente para conservação de vegetais, mariscos, produtos cárneos e frutas. Baldwin *et al.* (1996) aplicaram filmes comestíveis de celulose para conservação de maçãs e batatas fatiadas por apresentarem compostos antioxidantes, acidulantes e preservativos. Distintivamente, Antosik *et al.* (2017) estudaram a aplicação dos filmes de carboximetilcelulose (CMC) como adesivos sensíveis a pressão (PSA), que são utilizados para conectar diferentes materiais, como metal, papel, plástico, vidro, madeira e couro. Desse modo, podem ser aplicados na fabricação de fitas de montagem, rótulos, filmes de proteção, fitas de máscaras, bandagens e eletrodos biomédicos (ANTOSIK *et al.*, 2017).

Os filmes de quitosana podem ser empregados para evitar o escurecimento do pêssego pós-colheita ou da lichia, bem como outras frutas descascadas e subprodutos (LI & YU, 2001; DONG *et al.*, 2004). Segundo Crini & Badot (2008), esses polímeros também servem como adsorventes para remoção de metais pesados e corantes.

Por sua vez, os filmes de amido podem aumentar a vida útil de frutas como morangos e uvas (GARCÍA *et al.*, 1998; FAKHOURI *et al.*, 2015). Outra aplicação citada por Ali *et al.* (2017) foi uso do filme de amido para produção de cápsulas medicinais, visto que apresentam boas propriedades mecânicas e maior proteção contra radiação UV.

Ademais, os biofilmes constituídos por polissacarídeos são completamente degradados em curto tempo, variando de acordo com o material do filme, o solo e as condições agronômicas. O filme a base de amido degrada completamente entre 40 a 60 dias, já o filme de quitosana precisa de 90 a 150 dias, enquanto que o filme à base de celulose gasta mais de 365 dias dependendo do conteúdo de lignina e da cristalinidade da celulose (SRINIVASA & THARANATHAN, 2007).

#### 2.4.1.1 Filmes de Galactomananas

O potencial de formação de filme dos polissacarídeos como amido, carragena, quitosana e galactomananas é explorado há anos, porém, tem ganhado maior ênfase nos últimos anos devido à maior demanda por materiais biodegradáveis (LIU & PAN, 2018; LIU *et al.*, 2019).

Dentre os polissacarídeos naturais, um dos mais conhecidos e explorados atualmente são as galactomananas, sendo a goma de alfarroba, goma guar e goma tara, comercialmente conhecidas (CERQUEIRA *et al.*, 2011b). As galactomananas apresentam a capacidade de alterar as respectivas propriedades físicas quando em solução, formando soluções estáveis e viscosas, em pequenas concentrações e com a necessidade apenas de água.

Além disso, esse polissacarídeo apresenta alta massa molecular, solubilidade em água, caráter não-iônico e ausência de toxicidade (MENDES *et al.*, 2017). No entanto, essas propriedades podem variar de acordo com a razão de manose/galactose, com a distribuição de manose e galactose ao longo da cadeia principal e também com o grau de polimerização (PRAJAPATI *et al.*, 2013). Diante das características apresentadas pelas galactomananas, essas podem ser empregadas no desenvolvimento de biofilmes (CERQUEIRA *et al.*, 2011b).

Em relação à razão manose e galactose (M/G), quando maior a presença de galactose como grupos laterais, mais afastada as cadeias de manose encontram-se. Desse modo, formam-se filmes menos coesos visto que para a formação de um filme coeso e resistente são necessárias interações fortes entre as cadeias poliméricas. Assim sendo, as galactomananas que interagem mais fortemente são aquelas menos ramificadas, i.e., com menores quantidades de galactose (DEA *et al.*, 1986; MORRIS, 1990). Logo, quando as cadeias principais contêm mais de seis unidades de manose não substituídas, as interações intermoleculares ocorrem

majoritariamente nessa área. Mas, se a cadeia principal é mais substituída, as interações ocorrem nos lados não substituídos da cadeia (DEA *et al.*, 1986).

Além disso, a razão M/G interfere na viscosidade das soluções poliméricas, bem como na solubilidade das galactomananas. Se o número de grupos laterais for reduzido, a viscosidade da solução aumentará (CERQUEIRA *et al.*, 2011a; PRAJAPATI *et al.*, 2013). Todavia, se esse número for muito pequeno, a solubilidade dos polímeros também diminui, ou seja, uma molécula com alto teor de galactose dissolve em água fria, ao contrário de uma molécula de galactomanana pouco ramificada que exige calor para dissolução (MIKKONEN *et al.*, 2007; PRAJAPATI *et al.*, 2013).

A viscosidade da solução também é influenciada pelo grau de polimerização. Quanto menor a massa molecular, menor a viscosidade da solução. Logo, quanto maior a cadeia do polissacarídeo, mais coeso e resistente é o filme (MIKKONEN *et al.*, 2007).

Diante das características estruturais, as hemiceluloses apresentam inúmeras desvantagens quando utilizadas no desenvolvimento de biofilmes em relação a permeabilidade ao vapor de água, propriedades mecânicas e propriedades térmicas (HANSEN & PLACKETT, 2008).

A alta hidrofiliabilidade das hemiceluloses proporcionada pelos numerosos grupos hidroxila ao longo da cadeia resulta em baixa proteção contra água (PENG *et al.*, 2011b ; ESCALANTE *et al.*, 2012). Ademais, o baixo grau de polimerização das hemiceluloses, dá origem a filmes com pobres propriedades mecânicas (QI *et al.*, 2016a). E as hemiceluloses também são menos resistentes termicamente que a celulose e lignina (YANG *et al.*, 2007). Assim sendo, se aplicada como embalagem, não protege o alimento do contato com a água, é mecanicamente fraca e pouco resistente a temperaturas.

Contudo, buscando melhorar as características estruturais das hemiceluloses, são adotadas várias estratégias como modificações enzimáticas, modificações químicas, modificações por acoplamento e crosslinking (ligações cruzadas) (LI & PAN, 2018).

O *crosslinking* é um método eficiente de melhorar as propriedades de filmes de polissacarídeos e proteínas (LI & PAN, 2018). Baseia-se em ligações covalentes ou não, formando uma rede tridimensional. As ligações covalentes são estabelecidas por reações químicas ou irradiação, enquanto as ligações não-covalentes são oriundas de ligações iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. No caso dos polissacarídeos, essa ligação se dá entre hidroxilas e carbonilas (AZEREDO & WALDRON, 2016). Essa rede tridimensional reduz a mobilidade das estruturas poliméricas, melhorando as propriedades

mecânicas (XU *et al.*, 2016), as propriedades de barreira a gases (BALAGUER *et al.*, 2011), bem como aumentando a resistência a solventes químicos (RAWLINS & MENDON, 2008).

Com essas modificações, as propriedades mecânicas, de barreiras e reológicas dos filmes e revestimentos de galactomananas podem ser utilizadas para manter ou melhorar a estabilidade, a segurança e a qualidade dos alimentos e também para aplicações biotecnológicas. Quando esses filmes e revestimentos foram aplicados em frutas, como acerola, manga, seriguela, cajá, maçã, houve diminuição da taxa de troca gasosa entre as frutas e o ambiente, funcionando de forma semelhante à atmosfera controlada, diminuindo o consumo de oxigênio e produzindo menor quantidade de dióxido de carbono, e, dessa forma, mantendo os aspectos sensoriais da fruta (CONFORTI & TOTTY, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2009c). Os envoltórios também podem ser utilizados para reduzir a contaminação em queijos durante o armazenamento, diminuindo as taxas de transferência de gás, a perda de peso e as mudanças de cor no queijo (CERQUEIRA *et al.*, 2009b).

Além disso, os filmes de galactomananas podem ser empregados no campo farmacêutico immobilizando compostos como peptídeos, antioxidantes, lecitinas, e, desse modo, exercendo o papel de curativo de feridas e como forma de dosagem farmacêutica sólidas para indivíduos com dificuldade de deglutição (ALBURQUEQUE *et al.*, 2017).

As galactomananas são compatíveis com outras gomas, agentes espessantes e outros materiais, formando produto final mais forte, elástico e com desempenho desejável. Por exemplo, a mistura de dois polissacarídeos com distintas propriedades, permite a melhoria da funcionalidade, como galactomanana e carragena origina filmes com melhores propriedades mecânicas e barreira à água (MARTINS *et al.*, 2012), enquanto a junção de galactomananas e xiloglucana proporciona filmes com maior transparência e estabilidade térmica (MENDES *et al.*, 2017). Já a fusão de galactomananas de diferentes espécies de plantas (*A. pavonina* and *C. pulcherrima*) resultou na otimização das propriedades mecânicas, de transporte e molhabilidade do filme, o qual pode ser empregado como envoltório de mangas e maçãs (LIMA *et al.*, 2010).

Assim sendo, o grande potencial dos polissacarídeos no desenvolvimento de filmes e coberturas, principalmente as galactomananas, desencadeia o interesse de pesquisadores e indústrias para a exploração desses materiais como fonte para substituintes dos polímeros sintéticos ampliando o campo de aplicações e não prejudicando o meio ambiente.

#### 2.4.2 Métodos de Formação de Filmes

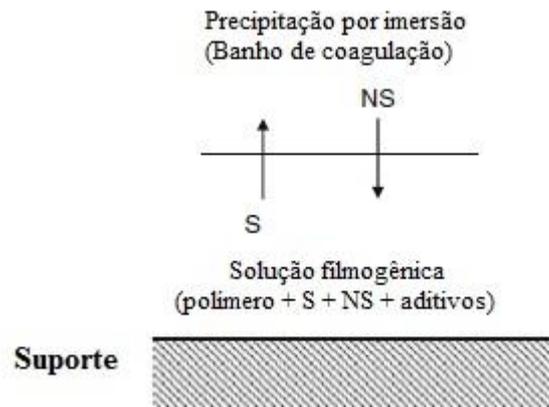
Sabe-se que os filmes de biopolímeros não podem ser extrudados assim como filmes plásticos sintéticos, visto que a extrusão envolve temperaturas superiores a 200°C e os biopolímeros não apresentam pontos de fusão definidos, além de sofrerem decomposição em altas temperaturas (SRINIVASA & THARANATHAN, 2007). Desse modo, a formação dos filmes e membranas de biopolímeros ocorre pelo método de inversão de fases, a qual é amplamente aplicada em pesquisas e na indústria.

O processo de inversão de fases fundamenta-se na transformação de uma solução polimérica em um sistema de duas fases ocasionada pela instabilidade termodinâmica desta solução. No processo de separação de fases, a solução polimérica é precipitada em duas diferentes fases, uma que é rica em polímero, que se encontra no estado sólido e origina a matriz da membrana, enquanto a outra é líquida e com menor teor de polímero, a qual forma os poros da membrana (BAKER, 2012).

Esse método pode ser classificado de acordo com o mecanismo de separação adotado que compreende a separação de fases termicamente induzida, ou a separação por difusão. A separação de fases termicamente induzida compreende a redução da temperatura da solução polimérica para que ocorra a precipitação induzida. Na separação induzida por difusão, esta ocorre devido ao contato da solução do polímero com um vapor ou líquido, desse modo, resulta na troca de massa por precipitação induzida (REN & WANG, 2011).

A separação induzida por difusão pode ser por adsorção de vapor, por evaporação do solvente e por precipitação de imersão. Na separação por adsorção de vapor, a solução polimérica é exposta a um vapor ausente de solventes e gases. Ao adsorver o vapor, ocorre a precipitação da solução. Já a separação por evaporação do solvente, também conhecida como método *casting*, a solução polimérica é composta por um solvente volátil, um polímero e um não solvente que seja menos volátil. A volatilização do solvente mais volátil gera uma solução estável que precipita. Por sua vez, a precipitação por imersão ocorre quando a solução polimérica é imersa em um não-solvente. Dessa forma, o não-solvente difunde-se para solução polimérica e o solvente difunde para o banho de coagulação, causando a rápida precipitação (Figura 7). Essa precipitação origina uma estrutura assimétrica e com poros (REN & WANG, 2011; LALIA *et al.*, 2013).

**Figura 7 - Esquema de representação da precipitação por imersão (S=solvente; NS= não solvente).**



Fonte: Ren & Wang, 2011 (modificada).

As características da membrana assimétrica formada pela inversão de fases por precipitação por imersão são controladas pela termodinâmica da solução, bem como pela cinética de transferência de massa (TIAN *et al.*, 2014). A termodinâmica está relacionada com o equilíbrio entre o solvente, não solvente e o polímero. Ao passo que a cinética é relativa ao transporte mútuo dos componentes, ou seja, a difusão do não solvente e do solvente. Desse modo, a morfologia final da membrana que inclui os poros, pode ser alterada ao variar a concentração da solução polimérica, o tempo de difusão do solvente, introduzindo aditivos ou modificando o par de solvente e não solvente (GUILLEN *et al.*, 2013).

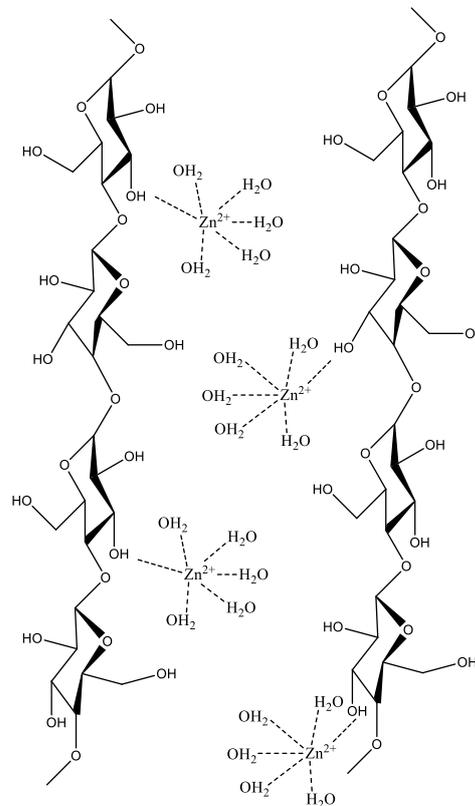
Por meio da técnica inversão de fases é possível preparar filmes e membranas de diferentes tipos de polímeros. Assim sendo, a inversão de fases é considerada uma técnica muito versátil. No entanto, para que essa técnica seja empregada, o polímero deve ser solúvel no solvente e o sistema deve apresentar falta de miscibilidade em determinada concentração e temperatura (FIGOLI *et al.*, 2015; HILAL *et al.*, 2015).

Assim sendo, inúmeros estudos envolvendo biopolímeros, como amido, galactomananas e quitosana, utilizam o método de inversão de fases com separação de fases induzida por evaporação, uma vez que esse é mais rápido e fácil. Albuquerque *et al.* (2017) produziram um filme a base de galactomananas extraídas das sementes da planta *Cassia grandis*, empregando o método casting, utilizando água, galactomanana e glicerol na solução filmogênica. Dong *et al.* (2004) usaram, além de água e o biopolímero quitosana, ácido acético glacial para o desenvolvimento do filme pelo método de separação induzida por evaporação que ocorreu a 25°C. De forma semelhante, Ali *et al.* (2018) avaliaram um filme elaborado com amido, água e adição de cristais de celulose, também pelo método *casting*.

Embora os biopolímeros sejam altamente hidrofílicos, a celulose é um polímero com baixa solubilidade em água, justificada principalmente pela cristalinidade da mesma (REN & WANG, 2011). A dissolução da celulose é alcançada pelo uso de solventes alternativos como N-metilmorfolina-N-ido (NMMO), N,N-dimetilacetamida (DMAC) e cloreto de lítio/N-metilpirrolidona (NMP/LiCl), cloreto de lítio/1,3-dimetil-2-imidazolidinona (LiCl/DMI), cloreto de lítio/N,N-dimetilacetamida N-metilmorfolina N-óxido (NMMO/LiCl), amônia/sal de amônia, ácido fosfórico, cálcio e tiocianato de sódio. No entanto, são preferidos os sais inorgânicos comuns, como o cloreto de zinco, devido a problemas de toxicidade e necessidade de temperaturas elevadas para dissolver apresentados pelos solventes alternativos (REN & WANG, 2011; XU *et al.*, 2016).

Dentre os sais inorgânicos usados para a dissolução da celulose, encontra-se o cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ). O íon  $\text{Zn}^{2+}$  atua nas ligações de hidrogênio que são responsáveis pela rigidez e insolubilidade da celulose, quebrando-as e deixando a cadeia da molécula de celulose mais flexível. Ademais, ocorre a formação de complexos Zn-celulose, alterando as ligações de hidrogênio intermoleculares (Figura 8) (SEN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016).

**Figura 8 - Ligação entre moléculas de celulose e íons  $\text{Zn}^{2+}$ .**



Fonte: Xu *et al.* (2016), modificada.

Como apresentado no item 2.3.1.1, os polissacarídeos presentes na borra de café são galactomananas, celulose e arabinogalactanas tipo II. As galactomananas presentes na borra de café, assim como a celulose, apresentam baixa solubilidade, pois exibem baixo grau de ramificação, e são compostas por cadeias lineares e longas.

Em vista disso, pesquisadores desenvolveram filmes utilizando sais inorgânicos e o método de inversão de fases por imersão, e apontaram isso como uma opção para utilizar a celulose e materiais que contêm celulose na produção de biomateriais. Thiagamani *et al.* (2017) utilizaram a borra de café como agente de reforço em um filme de celulose, empregando o mesmo método, sendo o solvente usado para dissolver a celulose o hidróxido de lítio com uréia.

Dessa forma, no presente trabalho foi empregado o método de inversão de fases com precipitação induzida por imersão para o desenvolvimento de biofilmes, e o cloreto de zinco como solvente para dissolver as frações polissacarídicas isoladas da borra de café através do tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associada à hidrólise enzimática.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais e reagentes

Borra de café gerada de bebidas tipo espresso foi coletada na cafeteria *Intuição e Grão de Café*, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Após coletada, a borra foi seca a uma temperatura 105°C, durante 16h (SILVA e QUEIROZ, 2002). Em seguida, esta foi armazenada em embalagem de polipropileno hermeticamente fechada e mantida a temperatura ambiente (25°C) para utilizações posteriores.

Os reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos da Anidrol (Diadema, São Paulo – Brasil), Neon (Suzano, São Paulo – Brasil), Sigma – Aldrich (Jurubatuba, São Paulo - Brasil) e Synth (Diadema – Brasil). A enzima celulase do microrganismo *Trichoderma reesei* ATCC 26921 e os padrões de açúcares foram obtidos na Sigma – Aldrich (Jurubatuba, São Paulo - Brasil).

#### 3.2 Pré-tratamento da Borra de Café

##### 3.2.1 Permanganato de Potássio Assistido por Ultrassom (PP)

Para realização do pré-tratamento com permanganato de potássio assistido por ultrassom, a borra de café previamente seca foi adicionada em um frasco Erlenmeyer com solução de permanganato de potássio, na proporção de 1:10 (10% m/v).

Para otimizar as condições reacionais, foi realizado o planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central (Tabela 1), utilizando o Software STATISCA. Desse modo, foram avaliados os principais efeitos de cada fator e também a interação entre estes. Foram analisadas diferentes concentrações de permanganato de potássio (1, 2, 3, 4 e 5%) em pH 11,5-12, variando também o tempo de reação (20, 40, 60 e 80 minutos), em temperatura ambiente.

**Tabela 1- Planejamento fatorial do pré-tratamento com permanganato de potássio assistido por ultrassom (© = triplicata no ponto central).**

Amostra	Tempo (min)	Concentração KMnO <sub>4</sub> (%m/v)
7 ©	50	3
5 ©	50	3
4	80	5
2	20	5
6 ©	50	3
1	20	1
3	80	1

As amostras preparadas foram submetidas ao banho ultrassônico (Unique USC-1650A) na frequência de 25 kHz, 150 W. Após o tratamento em banho ultrassônico, os resíduos foram lavados utilizando água destilada, filtrados e secos a 55°C por 16 horas em uma estufa convectiva com circulação de ar (Nova ética, modelo 420).

Concluído o tratamento, estas foram armazenadas em embalagens plásticas de polietileno de baixa densidade zip lock (fecho hermético) em ambiente seco e ao abrigo de luz, para subseqüentes caracterizações objetivando determinar as condições ótimas para esse tratamento que resultasse na maior remoção de lignina e conservasse a fração hemicelulósica.

A metodologia adotada fundamentou-se nos estudos de Ravindran *et al.* (2017a).

#### 1.1.1. Álcali assistido por ultrassom (HS)

Para a condução do pré-tratamento com álcali assistido por ultrassom, baseou-se na metodologia de Ravindran *et al.* (2017a), na qual a borra de café seca foi adicionada em um frasco Erlenmeyer contendo hidróxido de sódio (NaOH). Foram avaliadas diferentes concentrações de NaOH (1; 2; 3; 4; 5% m/v). A solução foi homogeneizada e esta foi conduzida ao ultrassom (Unique USC-1650A) por 30 minutos em 25 kHz, 150 W. Em seguida, o resíduo foi submetido à subseqüentes lavagens com água destilada, seco em estufa convectiva à 55°C por 16 horas, e armazenado em ambiente seco e ao abrigo de luz, para posteriores análises.

#### 3.2.2 Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino (PHA)

Para o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, foi adicionada uma solução de peróxido de hidrogênio 35% à borra de café seca, na proporção de 1:5 (m/v) (BATISTA, 2017). Na seqüência, incorporou-se na mistura, gota a gota, solução de hidróxido de sódio 40% (m/v) até ocorrer uma reação exotérmica notada pela expansão da mistura com liberação de O<sub>2</sub> resultante da degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acompanhada pelo aumento de temperatura do sistema (GUO *et al.*, 2013). Ao findar a reação e resfriamento da mistura, ajustou-se o pH da suspensão até pH 11,5±0,1, acrescentando solução de NaOH 40% (GOULD, 1984). Em seguida, a mistura foi conduzida a incubadora orbital (marca Quimis, modelo Q816M20) sob agitação de 120 rpm, por 18 h a 25 °C. Após esse período sob agitação, neutralizou-se a mistura utilizando solução de ácido acético 10% (m/v), filtrou e lavou a mesma. O filtrado foi seco em estufa convectiva com circulação de ar (marca Unique, modelo 420) a 55 °C, por 16 horas.

O material obtido foi moído e peneirado em peneiras de malha 35 mesh. A fração rica em polissacarídeos passante foi armazenada em embalagens de polipropileno, em ambiente seco e ao abrigo de luz, para decorrentes análises e aplicações.

Embasou-se na metodologia de Vilela *et al.* (2016) e Gould & Freer (1984) para o desenvolvimento desse tratamento com adaptações.

### 3.3 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática da enzima celulase oriunda do microrganismo *Trichoderma reesei* ATCC 26921 foi determinada de acordo com a metodologia de Adney & Baker, (1996).

Para isso, adicionou-se em um tubo de ensaio, uma tira de papel filtro (1× 6 cm), em forma de espiral, utilizada como substrato. Subsequentemente, foi adicionado 1 mL de uma solução tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), de forma a imergir a tira de papel. O tubo foi acondicionado por um minuto em banho-maria a 50°C, para que houvesse um equilíbrio da temperatura antecedendo a adição da enzima. Logo, adicionou-se 1 mL da solução de enzimas ao tubo. A concentração da solução enzimática utilizada deve ser aquela em que a enzima libera 2 mg de glicose. A mistura foi colocada e mantida em banho-maria por 60 minutos a 50°C.

Após o período no banho-maria, adicionou-se 3,9 mL solução de DNS para parar a reação enzimática. Para o preparo da solução de DNS, foram dissolvidos 10,6 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada, e, em seguida, foram adicionados 306 g de sais de Rochelle (tartarato de sódio e potássio), 7,6 mL de fenol (aquecido a 50°C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

Ademais, foram preparados o branco, controle da enzima e o controle do substrato. Para o branco, utilizou-se 1,5 mL da solução tampão de citrato de sódio 50 mM. Para o controle da enzima, adicionaram-se 1 mL da solução tampão de citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL da enzima em um tubo de ensaio. E para o controle do substrato, foi colocada em um tubo de ensaio uma tira de papel filtro (1× 6 cm) e 1,5 mL de solução tampão de citrato de sódio 50 mM.

Para quantificar os açúcares redutores na solução, foi preparada a curva de calibração, a partir de uma solução de glicose 10 mg/mL, que foi diluída com solução de citrato de sódio 50 mM para obtenção dos pontos da curva. Estes foram 1,00 mg/0,5 mL; 1,65 mg/0,5 mL; 2,50 mg/0,5 e 3,35 mg/0,5 mL .

As soluções controle, branco e a para a curva de calibração de glicose foram incubadas de modo semelhante aos tubos contendo o complexo enzimático, 60 minutos a 50°C, com consecutiva adição de 3 mL da solução de DNS.

Todas as soluções preparadas foram juntamente fervidas por 5 minutos, com conteúdo de água suficiente para cobrir o volume contido nos tubos. Na sequência, as soluções foram colocadas em um banho de gelo e centrifugadas. Para leitura das amostras no espectrofotômetro, essas foram diluídas sendo adicionados 0,2 mL das soluções em 2,5 mL de água. A leitura foi feita no espectrofotômetro UV-Vis (marca Gold, modelo Spectrumlab 53), no comprimento de onda 540 nm. O experimento foi feito em triplicata.

Após as leituras, foi plotada a curva de calibração de glicose possibilitando a determinação da quantidade de glicose na amostra. Aplicando a equação 9, foi calculada a atividade enzimática no papel filtro em FPU, dado em unidade mL<sup>-1</sup>.

$$\text{Atividade enzimática em papel filtro} = \frac{0,37}{[\text{enzima}]} \quad (9)$$

### 3.4 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com o intuito de remoção da celulose da fração rica em polissacarídeos extraída da borra de café, para posterior produção de um biofilme predominantemente constituído de galactomananas. Para este fim, utilizou-se a enzima celulase comercial proveniente do microrganismo *Trichoderma reesei* ATCC 26921.

Essa etapa do estudo foi efetuada de acordo com os métodos descritos por Ravindran *et al.* (2017b) e Yang *et al.* (2015), modificados. A reação foi conduzida em frasco Erlenmeyer de 250 mL, no qual adicionou-se 100 mL da solução tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 5% m/v de amostra. Para evitar a proliferação de microrganismos, o frasco Erlenmeyer contendo a solução tampão e a fração rica em polissacarídeos foi previamente esterilizado na autoclave (marca Quimis, modelo 38L - 1180) a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Além disso, foi avaliado o efeito de três tratamentos precedentes à adição de enzima, objetivando maior atividade enzimática e aumento da remoção da celulose. Estes foram: no primeiro tratamento, a mistura foi submetida ao ultrassom (Unique USC-1650A), durante 55 minutos, na frequência 25 kHz, 150 W (Adulkar & Rathod, 2014); no segundo, a mistura foi conduzida a forno de micro-ondas (Panasonic, modelo Piccolo ST35HW) com potência de 800W, durante 60 segundos (HU & WEN, 2008); e, no terceiro, a mistura foi colocada em autoclave, durante 20 minutos, com o frasco Erlenmeyer aberto para que o vapor de água entrasse em contato com a suspensão.

Após o resfriamento, adicionaram-se, nos frascos Erlenmeyer, 1,5 mL da solução enzimática, e estes foram mantidos em uma incubadora com agitação orbital (marca Quimis, modelo Q816M20) à 50°C, com agitação de 150 rpm. Ademais, foi analisado o tempo ideal de reação, ou seja, que alcançasse a maior remoção de celulose, variando em 24, 48, 72 e 120 horas.

Depois do período de incubação, as suspensões foram filtradas para que o sobrenadante, contendo o material hidrolisado, fosse separado do material não hidrolisado, e ambos pudessem ser analisados em relação ao conteúdo de monossacarídeos. O sólido foi seco em estufa convectiva (marca Unique, modelo 420) durante 16 h à 55°C, e o sobrenadante foi armazenado a -4°C para análises posteriores.

A determinação dos açúcares hidrolisados foi feita pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Sendo assim, transferiram-se 0,5 mL da solução a ser analisada para um tubo de ensaio, e adicionaram-se 0,5 mL da solução de fenol 5%. A mistura foi homogeneizada, e, em seguida, foram adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como ocorre uma reação exotérmica, as soluções foram incubadas por 15 minutos até resfriar. As leituras das amostras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (marca Gold, modelo Spectrumlab 53), a 485 nm, em cubeta de quartzo. O branco utilizado para zerar o espectrofotômetro foi água destilada. Para quantificar a glicose, foi feita uma curva de calibração, com as seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL. As soluções foram preparadas da mesma maneira que a amostra a ser analisada, utilizando uma solução mãe de 0,01 mg/mL.

### 3.5 Análise das Frações Ricas em Polissacarídeos

#### 3.5.1 Rendimento

Após os pré-tratamentos químicos, associados ao banho ultrassônico, aplicados à borra de café, foi calculado o rendimento do processo com o objetivo de avaliar a perda de massa das amostras. Para isso, utilizou-se a equação:

$$R(\%) = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (10)$$

em que  $R(\%)$  é o percentual de rendimento do pré-tratamento,  $m_f$  é a massa da borra de café após o pré-tratamento, e  $m_i$  é massa da borra de café antes do pré-tratamento.

### 3.5.2 Determinação do Teor de Lignina

A determinação da lignina insolúvel foi realizada de acordo com a norma TAPPI 222 – método de Klason de lignina insolúvel modificado (GOMIDE & DEMUNER, 1986).

Para esse fim, 300 mg das amostras foram transferidas para um tubo de ensaio de aproximadamente 15 mm de diâmetro e 60 mm de comprimento, assim como 3 mL de ácido sulfúrico 72%. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 30°C por 1 hora, com agitação constante. Após o tempo de permanência em banho-maria, o conteúdo dos tubos foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, aos quais foram adicionados 84 mL. O conjunto foi fechado com papel Kraft, e transferido para autoclave (marca Quimis, modelo 38L - 1180) e mantido por 1 hora, à 120 °C, e aproximadamente 1 atm. Em seguida, a mistura foi filtrada e lavada com água destilada quente até a completa remoção do ácido.

O sólido obtido foi seco em estufa convectiva (Deleo) a 105°C até peso constante. O teor de lignina insolúvel (LI) foi determinado pela equação:

$$LI (\%) = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (11)$$

em que LI (%) é o teor percentual de lignina Klason insolúvel,  $m_f$  é a massa de lignina Klason insolúvel seca (g) e  $m_i$  é a massa da amostra inicial (g).

### 3.5.3 Determinação do Teor de Umidade

Para a determinação do teor de umidade, três cápsulas de porcelana por amostra foram identificadas e secas em estufa com circulação de ar (Nova ética, modelo 420) a 105°C, durante 30 minutos. Posteriormente, essas foram resfriadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Após esse procedimento, pesaram-se as cápsulas vazias na balança analítica e depois foram adicionados 2 g de amostra em cada uma delas. O conjunto foi acondicionado em estufa com circulação de ar à 105°C por 3 horas. Para resfriar, as cápsulas foram transferidas para o dessecador e mantidas por 20-30 minutos até atingirem temperatura ambiente, e em seguida, a massa foi aferida (ZENEBOON *et al.*, 2008). O procedimento foi realizado em triplicata. Para calcular o teor de umidade, empregou-se a equação:

$$\% \text{ umidade} = \frac{(m_{a_i} - m_{a_s})}{m_{a_i}} \times 100 \quad (12)$$

sendo,  $m_{a_i}$  a massa da amostra inicial e  $m_{a_s}$  a massa da amostra final.

### 3.5.4 Determinação de Extrato Etéreo

Para a determinação de lipídeos ou extrato etéreo empregou-se o método gravimétrico de Soxhlet modificado (SILVA E QUEIROZ, 2002; ZENEBON *et al.*, 2008). A análise foi realizada em triplicata.

Para isso, foram adicionadas pérolas de vidro nos recipientes específicos para determinação da gordura bruta, denominados *reboiler*. Esses foram secos em estufa à 105°C, por 1 hora, e, em seguida, colocados no dessecador por 30 minutos, pesados e identificados. Ademais, pesou-se 1,5 g da amostra seca que foi inserida em um cartucho extrator composto por papel filtro qualitativo com 12 cm de diâmetro, dobrado e grampeado. O cartucho foi colocado no extrator Soxhlet.

Em cada *reboiler*, adicionou-se 150 mL de éter de petróleo (ponto de ebulição 35-70°C). Subsequentemente, o conjunto constituído pelo extrator, *reboiler* e condensador foi montado; e foram ligados o condensador e o aquecimento. A extração ocorreu em duas etapas: nos primeiros 20 minutos, foi feita por imersão, e depois em 40 minutos se deu por gotejamento, com uma taxa de refluxo de 3 a 5 gotas por segundo. Ao findar a recuperação do solvente, os copos contendo a gordura bruta e as amostras foram colocadas em capela de exaustão para a evaporação do excesso de solvente. Depois os copos foram secos na estufa convectiva à 100°C, por 30 minutos, para a remoção do solvente residual. Foram mantidos no dessecador por 30 minutos e, ao resfriarem atingindo temperatura ambiente, foram pesados.

O percentual de lipídeos foi calculado a partir da equação:

$$\text{Gordura bruta (\%)} = \frac{(x-b) \times 100}{m_a} \quad (13)$$

em que  $x$  é a diferença da massa do copo com a gordura extraída (g) e da massa do copo vazio (g),  $b$  o branco da análise (g), e  $m_a$  é a massa da amostra (g).

### 3.5.5 Determinação de Nitrogênio Total (Proteínas)

A análise de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl, que compreende três etapas: digestão, destilação e titulação (LABCONCO, 1998; ZENEBON *et al.*, 2008).

Na etapa de digestão, a matéria orgânica da amostra é decomposta com ácido sulfúrico e um catalisador, e o nitrogênio é transformado em sal amoniacal. Para isso, pesaram-se 0,25g de amostra em um papel isento de nitrogênio (papel manteiga 6×6 cm), que foi fechado cuidadosamente e colocado no tubo de Kjeldahl. Ademais, foram pesados 2 g da mistura catalítica que consiste em 96% de sulfato de potássio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e 4% de sulfato de cobre hidratado (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) em papel manteiga, também dispostos no tubo de Kjeldahl. Cuidadosamente, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico no mesmo recipiente da amostra e catalisador. Em seguida, os tubos foram agitados e levados para o bloco digestor. Esses

foram submetidos ao aquecimento gradual até 350°C, evitando a perda de nitrogênio junto com a fumaça orgânica 350°C (LABCONCO, 1998; GALVANI & GAERTNER, 2006). O procedimento foi encerrado quando o balão ficou límpido e transparente (azul ou verde claro), e os gases brancos desapareceram, 4 horas após o início.

Após o resfriamento dos tubos, prosseguiu-se para etapa de destilação, em que a amônia é liberada do sal amoniacal posteriormente formado, pela reação com hidróxido de sódio. Para tanto, nos tubos foram adicionados 15 mL de água até dissolver a amostra digerida. Esses foram colocados no destilador de Kjeldahl (marca Quimis, modelo Q328S21). No equipamento também foi adicionado 20 mL da solução de NaOH 40%, com a torneira fechada, a qual foi aberta lentamente para neutralização e alcalinização do produto da digestão. No bico do condensador, foi posicionado frasco Erlenmeyer de 250 mL com 10 mL de ácido bórico 3% e indicador misto. A chave do equipamento foi ligada, e deixou-se destilar até a solução do frasco Erlenmeyer mudar da cor marrom-alaranjada para uma coloração verde, decorrente da formação do borato de amônio, e completar um volume de aproximadamente 50 mL para garantir o término da evaporação e condensação de toda a amônia presente na amostra.

Por último, foi feita a titulação do excesso de ácido utilizado na destilação com hidróxido, e, com isso, determinou-se a quantidade de nitrogênio. Portanto, o destilado foi titulado com uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L, acondicionado em um bureta de 25 mL, até a mudança de cor de verde/azulado para laranja.

A partir do volume de ácido clorídrico gasto na titulação foi possível calcular o teor de nitrogênio aplicando a equação

$$NT(\%) = \frac{V \times f \times 0,1 \times 0,014 \times 100}{m} \quad (14)$$

em que NT é o teor de nitrogênio total de amostra (em porcentagem); V é o volume gasto de HCl 0,1N; f é o fator de correção do HCl 0,1N; 0,014 é o miliequivalente grama do nitrogênio; e m é a massa da amostra (g).

Para determinar a proteína bruta da amostra (PB) utilizou-se a equação:

$$PB(\%) = NT \times Fn \quad (15)$$

em que se multiplica o teor de nitrogênio total de amostra (NT) pelo fator de conversão do nitrogênio total em proteína (Fn) igual a 6,25.

### 3.5.6 Determinação de Açúcares Neutros

A determinação de açúcares neutros (ramnose, xilose, galactose, glicose, manose arabinose e fucose) foi realizada por cromatografia a gás com detector FID, após a hidrólise ácida dos polissacarídeos e transformação dos monômeros em acetatos de alditol. Baseou-se na metodologia MELTON & SMITH (2001), modificada.

A derivatização desses polissacarídeos pode ser dividida em três etapas: hidrólise dos polissacarídeos, redução dos monossacarídeos em acetatos de alditóis e acetilação dos alditóis.

#### 3.5.6.1 Hidrólise dos Polissacarídeos

Para hidrólise dos polissacarídeos, aproximadamente 5 mg de amostra foram adicionadas em um frasco de vidro limpo com tampa de politetrafluoretileno (PTFE), seguida da adição de 125  $\mu\text{L}$  de solução de ácido sulfúrico 72%, e este foi incubado em banho-maria por 3 h, a 30°C. Posteriormente, foram adicionados 1,37 mL de água ultrapura no frasco, e este foi submetido ao tratamento na autoclave por 1 h a 121°C. Findado o tempo de incubação adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de solução de amônia 15M para neutralizar a solução, e então, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de padrão interno alose (20 mg/mL).

O hidrolisado foi filtrado utilizando seringas descartáveis com filtro com membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com diâmetro de  $\varnothing = 0,13$  mm e poros com  $\varnothing = 0,22$   $\mu\text{m}$ , aproximadamente, 200  $\mu\text{L}$ , que foi acondicionado em frascos limpos.

#### 3.5.6.2 Redução dos Monossacarídeos aos Acetatos de Alditol Correspondentes

Na etapa de redução dos monossacarídeos aos acetatos de alditol correspondentes, foram adicionados 1 mL da solução de borohidreto de sódio 0,5 M em DMSO na fração hidrolisada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , e esta foi agitada e incubada a 40 °C durante 90 minutos. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido acético 18N, em ambas as frações, consumindo o excesso de  $\text{NaBH}_4$ .

#### 3.5.6.3 Acetilação dos Alditóis

Na etapa de acetilação dos alditóis, foram adicionados em cada tubo 200  $\mu\text{L}$  de 1-metilimidazol, catalisador da reação, e 2 mL de anidrido acético. Os tubos foram agitados em vortex e incubados até atingir temperatura ambiente, aproximadamente, por 10 minutos. Logo após, acrescentaram-se 5 mL de água ultrapura, para neutralizar o excesso de anidrido acético, agitando e incubando a mistura até atingir temperatura ambiente.

Subsequente à acetilação, foi feita a extração dos acetatos de alditóis, adicionando 1 mL de diclorometano (DCM) e agitando. Ao separar as fases, a fase inferior foi transferida para um frasco limpo. Repetiu-se o processo de extração com a fase aquosa. Nos extratos de DCM obtidos, foram adicionados 4 mL de água ultrapura. O tubo foi agitado e a fase aquosa superior foi removida e descartada. Tal procedimento foi realizado três vezes, para eliminação do DCM. Por fim, o DCM foi completamente evaporado por meio da secagem dos tubos em atmosfera inerte de nitrogênio.

Os frascos foram armazenados em freezer até o uso.

#### 3.5.6.4 Determinação dos Acetatos de Alditol por Cromatografia a Gás

Na determinação dos acetatos de alditóis por cromatografia a gás foi utilizado o cromatógrafo a gás Varian 3900, equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada uma coluna capilar BPX-70 (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm; SGE Chromatography Products).

O método empregado para essa análise foi: temperatura inicial do forno de 38°C, com rampa de aquecimento de 50°C/min até atingir a temperatura de 170°C, com posterior aquecimento de 2°C/min até atingir 210°C, na qual a temperatura foi mantida por 20 minutos; com duração da corrida de 42 minutos. A temperatura do detector foi 230°C. O gás de arraste usado foi o gás nitrogênio com fluxo de 1,5 mL/min.

Imediatamente antes da análise, foram adicionados 2 mL de DCM em cada fração anteriormente preparada. Além disso, foram preparados frascos de controle de água ultrapura, dos ácidos sulfúrico e TFA, e o controle com mistura de 13 padrões de monossacarídeos. Cada frasco controle continha 100 μL.

Para o preparo dos padrões de monossacarídeos, os seguintes monossacarídeos foram secos usando pentóxido de fósforo (dessecante): 2-desoxi-D-glucose, 2-desoxi-D-ribose, D-(-)-ribose, D-(+)-galactose, D-(+)-manose, D-(+)-xilose, Eritritol (i-eritritol, meso-eritritol), L-(+)-arabinose, L-(+)-ramnose, mio-inositol, α-D-(+)-fucose (6-desoxi-D-galactose), α-D-(+)-glucose e β-D-alose. Em seguida, foram pesados 20 mg de cada monossacarídeo seco em frascos individuais e adicionou-se 1 mL de água ultrapura em cada frasco. Então, foram coletados 100 μL de cada padrão de monossacarídeo, os quais foram misturados em um único frasco. As misturas foram mantidas no *freezer* até o momento de uso.

Foi feita a análise de cada amostra e dos padrões preparados e utilizou-se o software de aquisição de dados Galaxie Workstation para analisar e calcular a área dos picos presentes nos cromatogramas. A análise foi realizada em triplicata.

### 3.5.7 Análise Colorimétrica

Para análise colorimétrica, utilizou-se o colorímetro triestímulo (marca Hunter lab, modelo Colorflex 45/0) com ângulo de observação de 10 graus e luz diurna (iluminante padrão D65). As amostras foram colocadas no equipamento em quantidade suficiente para completar o recipiente de análise, e as leituras foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A análise foi feita em triplicata. O aparelho fornece os resultados em termos numéricos expressando a cor da amostra por meio de coordenadas L\* (luminosidade), a\*(coordenada de vermelho a verde) e b\* (coordenada de amarelo a azul), fundamentadas no espaço instrumental CIELAB (MINOLTA, 2007).

Foram calculados os parâmetros h\*(hue - tonalidade) e c\*(croma - intensidade da cor), de acordo com as equações 16 e 17, respectivamente (BORGES *et al.*, 2002). A partir desses valores foi possível obter a cor e realizar uma avaliação comparativa entre as frações obtidas por cada tratamento.

$$h * = \arctan \left( \frac{b *}{a *} \right) \quad (16)$$

$$c * = \sqrt{(a *)^2 + (b *)^2} \quad (17)$$

### 3.5.8 Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação de alterações na estrutura morfológica da borra de café antes e após pré-tratamento e tratamento enzimático, foi realizada de acordo com a metodologia adotada por Raghavi *et al.* (2016). Para isso, utilizou-se o equipamento Shimadzu (SSX-550), com filamento de tungstênio. As amostras foram secas em estufa de circulação de ar por 4 horas, transferidas para o suporte e recobertas com uma fina camada de ouro, visto que esses materiais não são condutores de elétrons. Desse modo, foram submetidas à uma tensão de aceleração de 15kV com ampliação de 500×.

### 3.5.9 Cristalinidade

Para avaliar a cristalinidade das amostras de borra de café antes e após os pré-tratamentos e tratamento enzimático, empregou-se o difratômetro X Philips-PANalytical, modelo PW 1710. Logo, os parâmetros utilizados foram: ângulos de difração abrangidos entre  $2\theta = 5^\circ$  a  $50^\circ$ , passo  $0,06^\circ$  por segundo. Além disso, foi empregada fonte de radiação de Cu K $\alpha$  ( $\alpha = 0,154$  nm), gerada em voltagem de 40 kV e corrente 35 mA (RAVINDRAN *et al.*, 2017a).

O índice de cristalinidade foi calculado pela equação 18 (Segal *et al.*, 1959), em que  $I_{002}$  é a intensidade em um ângulo  $2\theta$  próximo a  $22^\circ$ , que representa a parte cristalina do material, e  $I_{am}$  é a intensidade em um ângulo  $2\theta$  próximo a  $18^\circ$ , equivalente a fração amorfa do material.

$$IC = \left[ 1 - \frac{I_{am}}{I_{002}} \right] \times 100 \quad (18)$$

### 3.5.10 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise por Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR) foi utilizada para detectar mudanças nos grupos funcionais e ligações químicas causadas pelo pré-tratamento e tratamento enzimático da borra de café.

Para esta análise, utilizou-se o espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). O procedimento foi realizado em triplicata, baseando no estudo de Belchior *et al.* (2016). O detector empregado foi o DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine) que abrange as faixas do espectro de  $4000$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$  com 20 scans e modo de transmissão com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Além disso, foram utilizados acessórios de refletância total atenuada (ATR, do inglês Attenuated Total Reflectance) em cristal de ZnSe, à  $20^\circ\text{C}$  em atmosfera seca. As medidas de referência foram realizadas com o prisma de cristal vazio (background).

### 3.5.11 Análise Térmica

A análise termogravimétrica (TGA) mostra o comportamento de uma amostra de acordo com a temperatura em que esta é exposta, já a termogravimetria derivada (DTG), é a derivada primeira da TGA, sendo registrada em função da temperatura ou tempo. Ambos determinam o comportamento térmico de uma amostra.

Dessa forma, as técnicas TGA e DTC foram utilizadas para analisar o comportamento térmico da borra de café e das frações obtidas após o pré-tratamento e tratamento enzimático. As análises foram realizadas no equipamento Shimadzu TGA-51. Para as análises, colocou-se entre 10-20 mg de amostra em um cadinho de alumínio. As condições adotadas foram: variação de temperatura de  $25^\circ\text{C}$  até  $580^\circ\text{C}$ , sob taxa de aquecimento  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , em atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $120 \text{ mL}/\text{min}$  (CERQUEIRA *et al.*, 2011c).

## 3.6 Análise da Fração Rica em Galactomananas

Para caracterização da fração rica em galactomananas resultantes da hidrólise enzimática, foram feitas as análises de maneira semelhante às realizadas para as borras

tratadas, que engloba análise colorimétrica (item 3.5.7), microscopia de varredura eletrônica (item 3.5.8), cristalinidade (item 3.5.9), infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (item 3.5.10), análise térmica (item 3.5.11), e também a determinação e quantificação dos monossacarídeos (item 3.6.1).

### 3.6.1 Determinação e Quantificação dos Monossacarídeos

A quantificação dos monossacarídeos que constituem as frações celulósica e hemicelulósica foi realizada de acordo com Sulter *et al.* (2008).

Para isso, as amostras foram submetidas à hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como descrita no item 3.5.2 (determinação do teor de lignina). Assim como as amostras, uma solução preparada com todos os padrões foi submetida à hidrólise para corrigir as perdas devido à destruição de açúcares durante a hidrólise ácida. Para tal, pesou-se a quantidade necessária de cada açúcar. Em seguida, adicionou-se 10 mL de água deionizada e 348 µL de ácido sulfúrico.

Após a hidrólise, 20 mL do hidrolisado foram transferidos para um frasco Erlenmeyer. Este foi neutralizado utilizando o carbonato de cálcio, até pH 5-6. Após atingir o pH 5-6, a solução foi deixada em repouso para que o sobrenadante decantasse.

Para a análise no HPLC, as amostras foram filtradas em filtro de 0,2 µm e colocadas diretamente no vial. Cada amostra foi preparada em duplicata. Além disso, foram preparadas curvas de calibração de cada padrão, com cinco pontos, variando de 0,1- 4,0 mg/mL.

As análises das amostras e padrões foram realizadas no HPLC (Shimadzu LC-20AP) empregando uma coluna Supelcogel C-610H (30 cmx 7,8 mm), com detector por índice de refração. Este foi operado a uma temperatura de 60°C, tendo como fase móvel ácido sulfúrico 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. O volume injetado na coluna foi de 20 µL.

O teor de cada monossacarídeo foi calculado por meio da equação 19.

$$\% \text{ Monossacarídeos} = \frac{V \cdot f_i \cdot C_i}{M_{bs}} \quad (19)$$

em que V é o volume de água adicionado na hidrólise ácida (L);  $f_i$  corresponde ao fator de conversão do componente  $i$  relacionado ao respectivo monossacarídeo;  $C_i$  é a concentração de componente  $i$  relacionado ao respectivo monossacarídeo (g/L); e  $M_{bs}$  é a massa da amostra em base seca (g).

Os fatores de conversão (quadro 2) foram utilizados para determinação dos teores dos monossacarídeos.

**Quadro 2 - Componentes presentes no hidrolisado e seus fatores de conversão.**

<b>Componente</b>	<b>Fator de conversão</b>
Arabinose	0,88
Celobiose	0,90
Galactose	0,90
Glicose	0,90
Manose	0,90

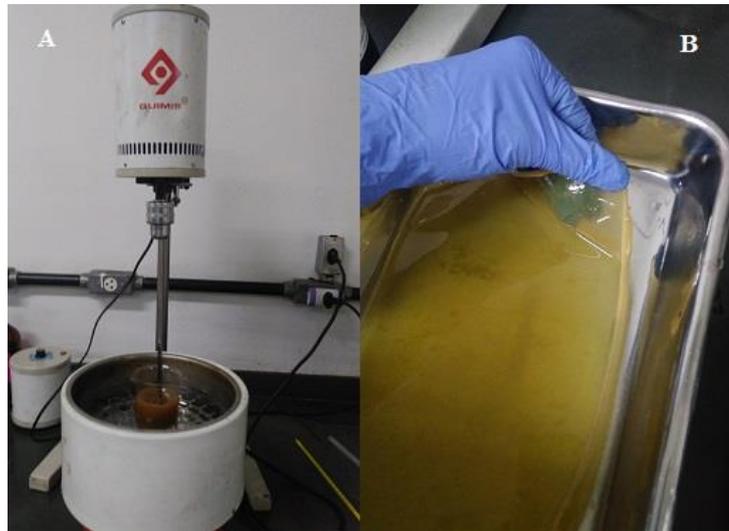
### 3.7 Preparação dos Filmes

A metodologia adotada para o desenvolvimento dos filmes baseou-se na metodologia descrita por Xu *et al.* (2016), modificada. Primeiramente, as frações de polissacarídeos foram solubilizadas em solução de cloreto de zinco, sendo a concentração das frações 2,3% (m/m) e da solução de cloreto de zinco 67% (m/m). Desse modo, a solução de cloreto de zinco foi preparada adicionando, em um béquer, 210 g de cloreto de zinco em 90 mL de água destilada, com aquecimento e agitação por 10 minutos a 65°C (Figura 9A). Em um béquer, foram adicionados 7,2 g da amostra e 6 mL de água destilada, formando uma pasta. Essa pasta foi transferida para o béquer contendo a solução de cloreto de zinco, e a mistura foi aquecida por 90 minutos a 65°C.

Após a homogeneização da mistura, com intuito de obter um filme mais coeso, foram adicionados 0,3 g de cloreto de cálcio, e o aquecimento foi mantido por mais 20 minutos. A mistura foi levada ao ultrassom (Unique USC-1650A) somente para remoção das bolhas. Subsequentemente, a solução foi vertida em bandejas de alumínio de 20×25 cm. Após a gelificação da mistura nas bandejas, foram adicionados 300 mL de etanol anidro, permanecendo nesta durante 60 minutos a 8°C. Em seguida, o filme coagulado (Figura 9B) foi transferido para um banho com 800 mL de água destilada a 75°C, no qual foi mantido por 5 minutos para retirar o excesso de sal utilizado na preparação da mistura. Por fim, o filme foi imerso em uma solução de glicerol 10% (v/v) por 15 minutos. O filme foi seco a 24°C durante 15 horas aproximadamente.

Quando prontos, os filmes foram acondicionados em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade, tipo zip lock, e mantidos a temperatura ambiente.

**Figura 9- Processo de preparo do filme: A= mistura da solução filmogênica; B= filme após coagulação com etanol.**



Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.8 Caracterização dos Filmes

A caracterização dos filmes foi realizada de acordo com a norma ASTM D618 – 13 (ASTM, 2013), a 23°C e com umidade relativa de 50%, por no mínimo 48 horas antes de tais procedimentos. Para tanto, foram realizadas as seguintes análises: determinação da permeabilidade do filme ao vapor de água, análise colorimétrica, análises térmicas (análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura), espectroscopia no infravermelho médio, difração de raio X, microscopia de varredura eletrônica e análise das propriedades mecânicas de tração.

#### 3.8.1 Análise Colorimétrica

A medição de cor dos filmes foi realizada em um colorímetro HunterLab Colorflex 45/0, modelo tristimulus, com ângulo de observação 10° e luz diurna (iluminante padrão D65). Para leitura das amostras, os filmes foram recortados, com raio de 29 mm, encaixando-se perfeitamente no acessório de vidro do aparelho. Os resultados foram expressos pelas coordenadas L\* (luminosidade), a\* (vermelho a verde) e b\* (amarelo a azul), do espaço instrumental CIELAB. O cálculo da cor, ou seja, os parâmetros h\* (tonalidade) e c\* (intensidade da cor), foram calculados pelas equações 17 e 18, item 3.5.7 (BORGES *et al.*, 2002).

### 3.8.2 Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação de alterações na estrutura morfológica do filme foi realizada de acordo com a metodologia adotada por Raghavi *et al.* (2016), descrita no item 3.5.8. Para isso, utilizou-se o equipamento Shimadzu (SSX-550), com filamento de tungstênio.

### 3.8.3 Cristalinidade

A análise da cristalinidade dos filmes foi realizada de forma similar a análise das amostras de borra de café sem tratamento e com pré-tratamento (item 3.5.9). Portanto, utilizou-se o difratômetro X Philips-PANalytical, modelo PW 1710. Logo, os parâmetros utilizados foram: ângulos de difração abrangidos entre  $2\theta = 5^\circ$  a  $50^\circ$ , passo  $0,06^\circ$  por segundo. Além disso, foi empregada fonte de radiação de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 0,154$  nm), gerada em voltagem de 40 kV e corrente 35 mA (RAVINDRAN *et al.*, 2017a). O índice de cristalinidade foi calculado pela equação 18 (Segal *et al.*, 1959), citada no item 3.5.9.

### 3.8.4 Análise térmica

#### 3.8.4.1 Termogravimetria (TGA)

As análises TGA e DTG foram realizadas no equipamento Shimadzu TGA-51, nas mesmas condições utilizadas para as frações ricas em polissacarídeo, descritas no item 3.5.11. As condições adotadas foram: variação de temperatura de  $25^\circ\text{C}$  até  $580^\circ\text{C}$ , sob razão de aquecimento  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , em atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $120$  mL/min (CERQUEIRA *et al.*, 2011c). Utilizaram-se  $20$  mg de amostra para análise, que foram colocadas em um cadinho de alumínio.

#### 3.8.4.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada de acordo com a norma D3418 - 12 (ASTM, 2012), em um Calorímetro Diferencial de Varredura DSC60 Shimadzu, do Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da UFMG.

Para tanto, as amostras foram adicionadas em cadinhos de alumínio selados, sendo submetidos a dois ciclos subsequentes de aquecimento e resfriamento, em atmosfera de  $\text{N}_2$  com fluxo de gás de  $50$  mL/min. No primeiro, os filmes foram submetidos ao aquecimento iniciando em temperaturas ambientes até  $120^\circ\text{C}$ , deixando  $10$  minutos isotérmicos nesta temperatura, com taxa de aquecimento de  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ . Posteriormente, as amostras foram

resfriadas até -50°C. No segundo aquecimento, a temperatura foi variada de -50°C a 150°C, também com taxa de aquecimento de 20°C/min.

### 3.8.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros vibracionais na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos pelo equipamento IRAffinity-1 da Shimadzu, com detector DLATGS (faixa 7800 a 370 cm<sup>-1</sup>). Os filmes foram medidos em relação à transmitância, empregando a técnica ATR com cristal de seleneto de zinco, na faixa de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>, com 20 scans e resolução de 4 cm<sup>-1</sup> (BELCHIOR *et al.*, 2016). Realizaram-se as análises em atmosfera seca a 20°C. Também foram realizadas medidas de referência, background, com prisma do cristal vazio.

### 3.8.6 Análise de Permeabilidade dos Filmes ao Vapor de Água

A análise de permeabilidade dos filmes ao vapor de água foi executada em conformidade com a norma E96 – 15 (ASTM, 2015), pelo método dessecante adaptado. Os filmes foram acondicionados em cápsulas circulares com paredes impermeáveis, contendo cloreto de cálcio seco em estufa com circulação de ar. Com o intuito de manter a umidade relativa do sistema em 75%, o sistema cápsula e filme foi vedado com cera de abelha, pesado e acondicionado em dessecadores contendo solução saturada de cloreto de sódio à 21°C. Foram efetuadas pesagens sucessivas durante cinco horas, em intervalos pré-determinados.

A partir dessa análise foi possível relacionar o ganho de massa do sistema com a umidade permeada pelo filme, e assim calcular a taxa de transmissão ao vapor de água (TTVA) e a permeabilidade ao vapor de água (PVA) das amostras. Para o cálculo empregou-se as equações:

$$TTVA = \frac{G}{t.A} \quad (20)$$

sendo TTVA a taxa de transmissão ao vapor de água, G/t é o coeficiente angular da reta de ganho de massa (g) versus tempo (h) e A é área de permeação de cada filme (m<sup>2</sup>), e

$$PVA = \frac{TTVA.e}{P_{sat} \cdot (UR_1 - UR_2)} \quad (21)$$

em que PVA é a permeabilidade ao vapor de água, *e* é a espessura média (mm) de cada corpo de prova, P<sub>sat</sub> (kPa) é a pressão de saturação do vapor de água na temperatura de ensaio e (UR<sub>1</sub>-UR<sub>2</sub>) é a diferença entre a umidade relativa do interior do sistema cápsula-filme e do dessecador.

### 3.8.7 Análise das Propriedades Mecânicas de Tração

A análise das propriedades mecânicas de tração foi realizada de acordo com a norma ASTM D 882-12 (ASTM, 2012). Os testes foram realizados no equipamento de ensaios universal da marca EMIC, com célula de carga 20 N e velocidade de separação das garras  $12,5 \text{ mmmin}^{-1}$ , do Laboratório de Compósitos (DEMEC/UFMG).

Nos ensaios, foram testados nove corpos de prova para cada grupo, com dimensões de aproximadamente  $10 \times 2,5 \text{ cm}$ . As medidas espessura e largura foram feitas por micrômetro Mitutoyo, N<sup>o</sup> 103-137, por meio de cinco pontos distintos e aleatórios nos corpos de prova, e utilizando uma régua graduada, respectivamente. Empregaram-se essas medidas para efetuar os cálculos referentes às propriedades mecânicas de tração. Além disso, utilizou-se o software ImageJ para calcular o teor de inclusões nas amostras, evidenciando a influência dessas nas análises de propriedades mecânicas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Pré-tratamento

A borra de café *espresso* era composta por 25g de lignina em 100g de borra seca (Tabela 1). Tal valor de lignina se aproxima do encontrado por Ballesteros *et al.* (2014), 23,9 g em 100g de material seco, bem como do valor encontrado por Ravindran *et al.* (2017b), 31,1 g em 100 g de material seco. A quantidade de lignina presente em materiais lignocelulósicos inviabiliza reações, visto que esses materiais são significativamente recalcitrantes (RAVIDRAN & JAISWAL, 2016).

A etapa de pré-tratamento é uma das principais etapas para processos que utilizam materiais lignocelulósicos como matéria-prima. O principal objetivo do pré-tratamento é a remoção da lignina para reduzir a cristalinidade e aumentar a porosidade desses materiais, e assim possibilitar reações e etapas subsequentes (NIGLIO *et al.*, 2017). Com o intuito de obter uma fração rica em polissacarídeos, foram empregados três diferentes pré-tratamentos: permanganato de potássio alcalino (PP) assistido por ultrassom; álcali (HS) assistido por ultrassom; e tratamento com peróxido alcalino (PHA).

**Tabela 1 - Resultados obtidos pelos pré-tratamentos aplicados a borra de café.**

Amostras	Lignina (%m/m)	Teor de remoção de lignina (%m/m)	Rendimento (%)
Borra	25,01 ± 1,95 <sup>a</sup>	-	-
PP	9,56 ± 2,51 <sup>b</sup>	61,78	104,43 ± 0,80 <sup>a</sup>
PHA	6,88 ± 1,62 <sup>b</sup>	72,49	48,55 ± 1,56 <sup>c</sup>
HS	11,18 ± 1,80 <sup>b</sup>	55,30	65,01 ± 2,41 <sup>b</sup>

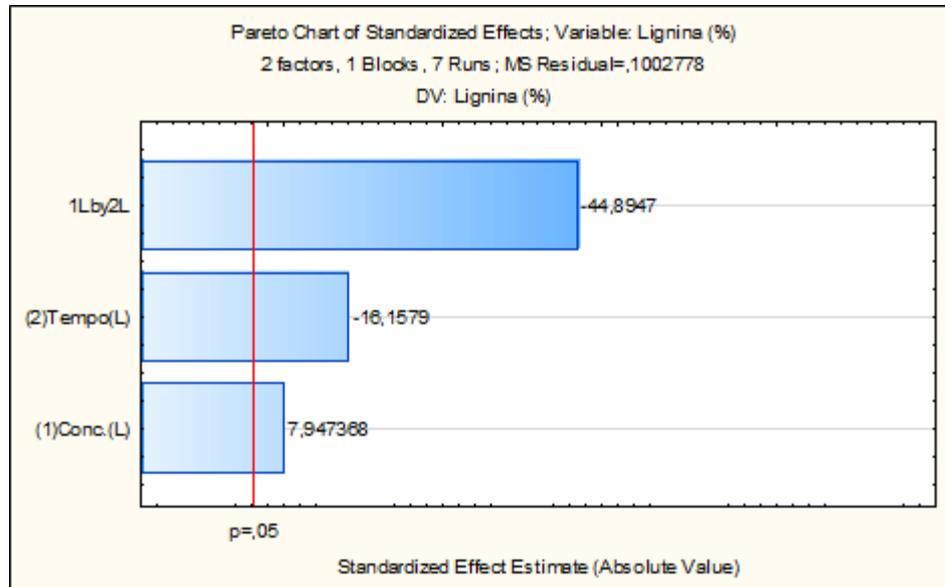
Valores expressos em porcentagem.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

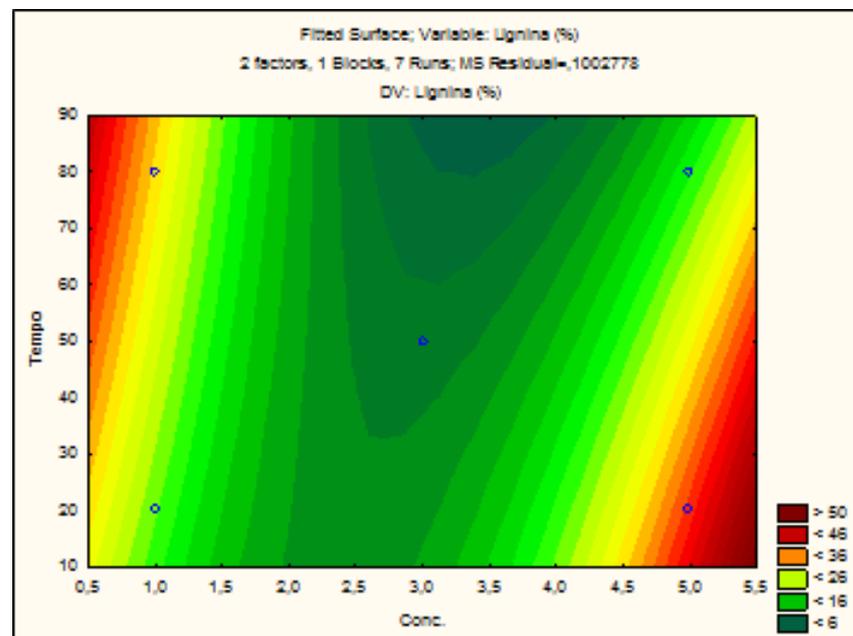
Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

No pré-tratamento com permanganato alcalino assistido por ultrassom (PP), foram avaliadas diferentes condições: concentração de permanganato 1, 2, 3, 4 e 5%; e o tempo de permanência da solução no banho ultrassom 20, 40, 60 e 80 minutos. Para isso, aplicou-se o planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central. A condição ótima do tratamento foi estabelecida com base no teor de lignina removido. Assim sendo, observou-se que a interação dos dois fatores influencia a reação, sendo esta interação a maior influência na reação (Figura 10). Analisando o mapa de contorno obtido (Figura 11), nota-se que a condição em que a concentração de lignina é menor, ou seja, situação em que ocorreu a maior remoção de lignina, foi com solução de KMnO<sub>4</sub> 3% e tempo de permanência igual a 50 minutos, com uma remoção de 61,78% de lignina (Tabela 1).

**Figura 10 - Gráfico de pareto para o modelo de planejamento  $2^2$  (pré-tratamento  $\text{KMnO}_4$  alcalino).**



**Figura 11 - Mapa de contorno pré- tratamento  $\text{KMnO}_4$  alcalino.**



Nesse pré-tratamento, o permanganato de potássio reage com a lignina degradando as cadeias laterais alifáticas ligadas às partículas aromáticas na lignina e quebrando as ligações éter e éster entre lignina e carboidratos, originando uma mistura de estruturas de ácido carboxílico aromático, bem como de ésteres metálicos carboxílicos (GELLERSTEDT, 1992; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Tal pré-tratamento possibilita a recuperação de

hemicelulose e celulose devido à maior susceptibilidade da lignina à oxidação causada pelo permanganato de potássio que dos polissacarídeos (RAVINDRAN *et al.*, 2017a).

De modo semelhante, no pré-tratamento com álcali (HS) assistido por ultrassom também foi avaliada a melhor concentração de hidróxido de sódio (NaOH): 1, 2, 3, 4 e 5%. A maior remoção de lignina foi de 55,30 %, (Tabela 1) alcançada utilizando uma solução de NaOH 5%. O NaOH promove clivagem das ligações éter (quebra das ligações  $\alpha$ -aril éter e  $\beta$ -ariléter do tipo fenol, e  $\beta$ -aril do tipo não fenol) e o acúmulo de solvente na celulose, conseqüentemente, causando a degradação parcial da celulose e da hemicelulose, e formando ácido fórmico, ácido acético, e pequenas quantidades de ácidos dicarboxílicos (XU *et al.*, 2016), como mostrado no item 2.3.2.1.

Inúmeros estudos mostraram que o uso do ultrassom como mecanismo adicional ao pré-tratamento do material lignocelulósico é bastante eficaz. Isso porque a cavitação gerada pelas ondas ultrassônicas promovem a formação de espécies altamente reativas, como íons hidrônio, hidroxilas, ozônio, que reagem com os componentes da biomassa, resultando na degradação destes, principalmente da lignina. No entanto, a exposição por longos períodos e a altas frequências de ultrassom pode alterar a estrutura das celulosas, mas principalmente das hemicelulosas, visto que estas são menos resistentes por apresentarem natureza amorfa enquanto as celulosas apresentam natureza cristalina. Desse modo, conclui-se que o tempo de exposição ao ultrassom influencia significativamente nas estruturas da biomassa (SUBHEDAR & GOGATE, 2014).

Já para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (PHA), foi utilizado peróxido de hidrogênio 35%, baseado nos estudos de Batista (2017), alcançando uma remoção de 72,49 % de lignina (Tabela 1). O peróxido de hidrogênio quando em pH 11,5-11,6, se degrada, formando íons hidroperoxila ou radicais hidroxil que reagem com quinona ou fenilpropanol, assim como com ligações duplas e grupos carbonil presentes na estrutura da lignina. Estes fragmentam a lignina formando compostos de baixa massa molecular solúveis em água. Tais íons e radicais podem reagir com os polissacarídeos, causando a perda de celulose e hemicelulose (XU *et al.*, 2016).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 1, nota-se que os três tratamentos apresentaram um teor de lignina final que não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey. No entanto, a amostra PP apresentou melhor rendimento, em média, 104,43% (m/m). Esse rendimento elevado (maior que 100%) possivelmente foi obtido por causa da precipitação do dióxido de manganês (MnO<sub>2</sub>), quando o permanganato de potássio atua como agente oxidante em solução alcalina (PASCHOALATO, 2005). Além disso, o rendimento

pode ser justificado pela capacidade de deslignificação por meio da oxidação e retenção de carboidratos na biomassa lignocelulósica em condições brandas (RAVINDRAN *et al.*, 2017a).

A amostra BPHA apresentou o menor rendimento, em média 48,55% (m/m) (Tabela 1). De acordo com Ma *et al.* (2015), o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino pode levar a alta remoção de lignina, mas também alta perda de hemicelulose e celulose, justificando o baixo rendimento.

Por sua vez, o tratamento alcalino com hidróxido de sódio removeu lignina, porém, não tanto quanto ao encontrado na literatura visto que não foram utilizadas altas temperaturas, como mostrado pelo estudo desenvolvido por Macdonald *et al.* (1983), em que alcançaram a solubilização de 85% do conteúdo de lignina quando empregaram temperatura elevada, 120°C. Esse tratamento apresentou um rendimento intermediário em relação aos dois outros tratamentos, uma vez que o NaOH solubiliza lignina e uma parte das hemicelulose devido à quebra das ligações ésteres, mas a fração celulósica quase não é afetada por ser mais resistente (MODENBACH & NOKES, 2014).

## 4.2 Caracterização das Frações Ricas em Polissacarídeos

As frações ricas em polissacarídeos resultantes dos pré-tratamentos foram codificadas para facilitar compreensão ao longo do texto, de acordo com o Quadro 3.

**Quadro 3 - Codificação das frações ricas em polissacarídeos obtidas após pré-tratamentos.**

<b>Grupo amostral</b>	<b>Descrição dos tratamentos</b>
BPP	Borra de café submetida ao tratamento de banho ultrassônico durante 55 minutos e solução de permanganato de potássio 3%.
BHS	Borra de café submetida ao tratamento de banho ultrassônico durante 30 minutos e solução de hidróxido de sódio 5%
BPHA	Borra de café submetida ao tratamento com solução 35% de peróxido de hidrogênio alcalino.

### 4.2.1 Caracterização Físico-Química

A borra de café apresenta uma diversidade substancial na sua composição na forma de polissacarídeos, lipídeos, aminoácidos, minerais e polifenóis (KOURMENTZA, 2018). A

composição química da borra de café depende de vários fatores como a variedade do café; o local de cultivo, incluindo solo e clima; e a idade da planta que originou o café (KARMEE, 2018). Além disso, o modo de preparo da bebida pode influenciar a composição da borra de café. Diante desta diversidade, foi feita a caracterização físico-química da borra de café *espresso* e das frações ricas em polissacarídeos obtidas após pré-tratamento. Os dados das análises estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Caracterização físico-química da borra de café e frações ricas em polissacarídeos.**

Componentes					
Amostras	Umidade (%m/m)	Proteína (%m/m)	Gordura (%m/m)	Cinzas (%m/m)	Carboidratos (%m/m)
Borra	6,58 ± 0,20 <sup>a</sup>	14,10 ± 0,42 <sup>a</sup>	11,36 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,43 <sup>a</sup>	67,38 ± 0,31 <sup>a,c</sup>
BPP	14,48 ± 0,83 <sup>b</sup>	9,26 ± 1,31 <sup>b</sup>	3,06 ± 0,26 <sup>b</sup>	16,29 ± 0,05 <sup>b</sup>	56,91 ± 0,56 <sup>b</sup>
BPHA	7,36 ± 0,31 <sup>a</sup>	5,78 ± 1,50 <sup>c</sup>	14,36 ± 0,87 <sup>c</sup>	8,28 ± 1,57 <sup>c</sup>	64,22 ± 3,54 <sup>a</sup>
BHS	5,84 ± 0,38 <sup>a</sup>	11,12 ± 0,44 <sup>b</sup>	7,72 ± 0,20 <sup>d</sup>	6,46 ± 0,84 <sup>c</sup>	68,86 ± 0,27 <sup>c</sup>

Valores expressos em porcentagem.

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo

Teste de Tukey, a 5% de significância.

Analisando os resultados expostos na Tabela 2, verifica-se que o teor de umidade das borras inicialmente secas variou de 5,84 a 14,48% de umidade. Mata *et al.* (2018) reuniram dados de diversos trabalhos e relataram que a borra de café apresenta uma enorme variação quando se trata do teor de umidade, obtendo valores de 1,18 a 65,7% (m/m). O teor de umidade é uma das variáveis mais importantes quando são aplicados outros tratamentos à borra de café, como a pirólise (GIROTTI *et al.*, 2018a).

O conteúdo de proteína encontrado nas amostras variou de 5,78 a 14,10 % (m/m). A borra de café sem nenhum tratamento apresentou teor de proteína, 14,10% (m/m), semelhante ao relatado no estudo de Cruz *et al.* (2012) que utilizaram 50 amostras de café de 14 marcas diferentes, sendo 2,13-2,70% teor de nitrogênio total e 13,3-16,9% teor de proteína. O teor de proteína das amostras que foram submetidas ao pré-tratamento com permanganato de potássio alcalino e com hidróxido de sódio, 9,26% e 11,12% (m/m), respectivamente, não diferem significativamente entre si em nível de 5% de probabilidade. Tais valores encontram-se dentro da faixa referenciada por Campos-Vega *et al.* (2015), 8,5-13,6% (m/m).

O teor de proteína da borra de café submetida ao tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi de 5,75% (m/m), significativamente inferior aos teores das demais amostras. Esse resultado pode ser justificado pela ação do peróxido de hidrogênio nas proteínas reduzindo a estabilidade conformacional destas, tornando-as mais susceptíveis a

hidrólise alcalina pelo hidróxido de sódio (LE *et al.*, 2009). Ademais, deve ser enfatizado que o conteúdo de proteína calculado a partir do conteúdo de nitrogênio total obtido pelo método de Kjeldahl pode ter sido superestimado visto que a borra de café contém outros compostos nitrogenados além das proteínas, como aminoácidos, amins livres, cafeína e trigonelina (MUSSATTO *et al.*, 2011).

Em relação ao teor de gordura, nota-se uma grande variação de acordo com o tratamento aplicado. A borra de café sem nenhum tratamento apresentou 11,36% (m/m) de gordura, que se aproxima do valor encontrado por Zarrinbankhsh *et al.* (2016), que caracterizou os resíduos da indústria de café para produção de material compósito, obtendo um teor de lipídeos de 10,3%. Também foi reportado por Mata *et al.* (2018), 10-20% de lipídeos em caracterizações da borra do café. Karmee (2018) encontrou 15% de lipídeos na borra de café.

Em contrapartida, as borras de café tratadas com permanganato de potássio alcalino e com hidróxido de sódio apresentaram baixo teor de gordura, 3,06% e 7,72% (m/m), respectivamente, quando comparadas com a borra de café sem tratamento. O teor reduzido de lipídios na borra de café tratada com hidróxido de sódio pode ser decorrente da hidrólise alcalina, comumente conhecida como saponificação, em que os glicerídeos reagem com hidróxido de sódio resultando em glicerol e sais de ácidos graxos (DEBET *et al.*, 2017). Já o valor encontrado para a borra tratada com permanganato de potássio em meio alcalino, pode ser resultante da peroxidação lipídica. Essa reação consiste na incorporação de oxigênio nas moléculas de ácidos graxos insaturados, devido à ação de enzimas ou de agentes oxidantes, produzindo hidroperóxido lipídico, bem como radicais lipídicos alcóxila, peróxila e hidroxila (LIMA & ABDALLA, 2001).

Se opondo aos resultados decorrentes dos demais pré-tratamentos, a borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, apresentou 14,36% (m/m) de gordura, valor maior do que o encontrado para a borra de café sem nenhum tratamento. Esse valor condiz com os resultados anteriores dos outros componentes na borra de café, ou seja, o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é bastante agressivo degradando os demais componentes, como proteína e carboidrato, fazendo com que a concentração de lipídeos seja aparentemente maior.

O teor de cinzas encontrado na borra de café foi de 0,58%, valor inferior aos encontrados para as borras de café tratadas. Scully *et al.* (2016), que investigaram a utilização da borra de café como fonte de compostos bioativos e os açúcares importantes para indústria, obtiveram um teor de cinzas igual a 0,70%, se assemelhando ao encontrado no presente

estudo. No entanto, esses valores encontram-se abaixo da faixa (0,80-3,50%) encontrada por Cruz *et al.* (2012), bem como o valor encontrado por Ballesteros *et al.* (2014), o qual foi 1,30%. O baixo teor de cinza deve-se as condições severas adotadas durante o preparo da bebida, alta temperatura e pressão (MUSSATTO *et al.*, 2011).

Entretanto, o teor de cinzas obtido para as borras de café tratadas variou de 6,46-16,29%, valor maior do que o relatado para o café torrado (4,6%). Vilela *et al.* (2016) que estudaram o efeito do tratamento com peróxido de hidrogênio na borra de café, retrataram que o teor de cinzas aumenta proporcionalmente a concentração do peróxido de hidrogênio, ou seja, o teor de cinzas aumenta quanto mais agressivo é o tratamento aplicado. Essa elevação pode ser atribuída ao fato que o teor de cinzas é medido em relação à massa seca de cada amostra, e os pré-tratamentos ocasionam a solubilização de lignina e hemicelulose, reduzindo a massa mais do que ocorre a remoção do conteúdo de mineral, desse modo, obtendo maiores valores de teor de cinzas.

Examinando os elementos que compõem as cinzas da borra de café, encontra-se potássio, magnésio, cálcio, manganês, cobre, sódio, ferro e zinco (ODISI, 2013; SCULLY *et al.*, 2016). Portanto, a amostra BPP, apresentou teor muito maior quando comparada com as demais devido à precipitação de íons  $Mn^{2+}$  e  $K^+$  oriundos do permanganato de potássio que contribuem para o aumento da concentração de manganês e potássio nas cinzas da borra de café.

Por sua vez, os teores de carboidrato determinado para a borra de café sem nenhum tratamento foi 67,38% m/m. Esse valor corrobora os resultados apresentados por Passos & Coimbra (2013), Simões *et al.* (2013), Zarrinbakhsh *et al.* (2016), em que os teores de carboidratos variaram de 60-74,2% (m/m) para borra de café *espresso*. No entanto, o teor de carboidrato encontrado para a amostra BPP foi de 56,91%, valor inferior aos obtidos para os demais pré-tratamentos. Esse valor pode ser justificado pela solubilização de outros componentes durante os pré-tratamentos, além da lignina e da hemicelulose (Ravidran *et al.*, 2017b).

#### 4.2.2 Determinação dos Açúcares Neutros

Como visto no item anterior, os açúcares são os principais componentes da borra de café. A composição desses açúcares na borra varia de acordo com a origem do café, processamento e processo de extração.

Para análise da borra de café e das frações ricas em polissacarídeos oriundas dos pré-tratamentos, utilizou-se a hidrólise com ácido sulfúrico e as subsequentes etapas da derivação de acetato de alditol, descritas no item 3.5.7. Os resultados estão expostos na Tabela 3.

**Tabela 3 - Composição dos monossacarídeos da borra e das amostras tratadas BPHA, BHS e BPP.**

<b>Composição de monossacarídeos (%mol)</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Manose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Glicose</b>
<b>Borra</b>	12,02	48,36	22,50	17,12
<b>BPHA</b>	3,96	53,89	28,84	13,31
<b>BHS</b>	9,12	52,55	23,54	14,79
<b>BPP</b>	3,77	56,08	23,73	16,41

Mussatto *et al.* (2011) encontraram composição monossacarídica para borra de café *espresso* semelhante ao do atual estudo, correspondendo a 46,8% de manose, 30,4% de galactose, 19,0% de glicose e 3,8% de arabinose. Outro trabalho que apresentou resultados similares aos do presente trabalho foi o de Simões *et al.* (2013), sendo esses 46% de manose, 27% de galactose, 20% de glicose e 6% de arabinose. Esses valores também são comparáveis com os reportados por Ballesteros *et al.* (2014), nos quais a borra foi constituída por 37,03% de manose, 31,90% de galactose, 24,08% de glicose e 6,99% de arabinose. O alto teor de arabinose constatado na borra de café *espresso* do presente estudo é oriundo das arabinogalactanas tipo II, desse modo, infere-se que a quantidade de arabinogalactanas na borra de café em estudo é bem maior do que normalmente encontra-se nas borras de café. Contudo, valores mais altos de arabinose, entre 8 e 9% foram encontrados por Tian *et al.* (2014), que analisaram o potencial prebiótico dos oligossacarídeos na bebida e na borra de café.

Batista (2017) encontrou 65,45% de manose, 17,48% de galactose, 13,89% de glicose e 3,18% de arabinose para borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino na mesma concentração que a utilizada no presente estudo. Os valores foram bem semelhantes aos aqui apresentados, porém, os teores de manose e galactose se distanciaram devido à composição inicial da borra empregada.

A BPP apresentou composição semelhante à BPHA, com teor de arabinose igual a 56,08% de manose, 23,73% de galactose, 16,41% de glicose e 3,77% de arabinose (Tabela 3). No entanto, o teor de manose foi maior para o tratamento com permanganato de potássio alcalino que o para tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, porém a fração hemicelulósica que compreende manose e galactose foi maior para a BPHA, comprovando

que o permanganato de potássio degrada parte polissacarídeos, sendo a fração hemicelulósica a mais atingida. Segundo Ravindran *et al.* (2017), o pré-tratamento com permanganato de potássio preserva os açúcares mais do que o tratamento alcalino, principalmente quando se trata da fração celulósica.

Por sua vez o tratamento com hidróxido de sódio associado ao banho ultrassônico, resultou em uma fração rica em polissacarídeos composta de 52,55% de manose, 23,54% de galactose, 14,79% de glicose e 9,12% de arabinose. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em outros trabalhos, como o de Simões *et al.* (2009) que trataram a borra de café com NaOH 4M com o objetivo de extrair galactomananas, e obtiveram uma composição monossacarídica igual a 60% de manose, 20% de galactose, 14% de glicose e 5% de arabinose. Todavia, Ballesteros *et al.* (2015), que caracterizaram os polissacarídeos extraídos da borra de café por meio de tratamento alcalino, obtiveram 60,27% de galactose, 19,93% de arabinose, 15,37% de glicose e 4,43% de manose. As diferenças encontradas nos resultados podem ser justificadas pela análise de Ballesteros *et al.*(2015) ter sido realizada no sobrenadante e não na própria borra de café, e, possivelmente, grande parte da manose ficou aderida à borra.

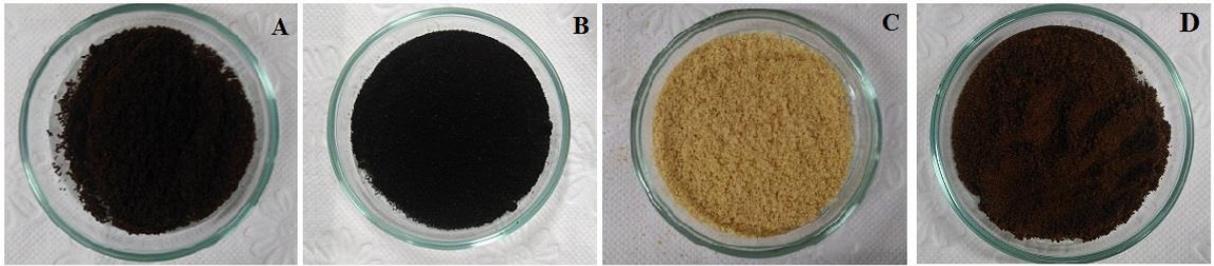
Portanto, nota-se que o pré-tratamento com NaOH não afetou demasiadamente as arabinoses, removendo metade do que foi removido nos outros tratamentos. Em contrapartida, os teores de manose e de galactose foram inferiores quando comparados aos de outros tratamentos empregados BPHA e BPP. Além disso, também houve a remoção de parte da celulose, visto que o teor de glicose reduziu de 17,12% mol para 14,79% mol. Desse modo, infere-se que o pré-tratamento alcalino afeta tanto a fração hemicelulósica quanto a fração celulósica. Além disso, a associação ao banho ultrassônico pode ter potencializado o pré-tratamento, resultando na remoção parcial dos polissacarídeos.

Assim sendo, os resultados obtidos corroboram os de outros estudos, os quais mostram que os principais polissacarídeos da borra de café são constituídos por manose, galactose, arabinose e glicose. Dentre esses, os majoritários são manose e galactose. Ademais, os tratamentos removeram a lignina e afetaram as porções monossacarídicas, porém, não de modo severo.

#### 4.2.3 Análise Colorimétrica

Diante dos variados pré-tratamentos que a borra de café foi submetida, cada amostra apresentou coloração diferente, como mostrado na Figura 12.

**Figura 12- Gravura ilustrativa da borra de café e dos materiais provenientes desta: A = Borra de café; B= BPP; C= BPHA; D=BHS.**

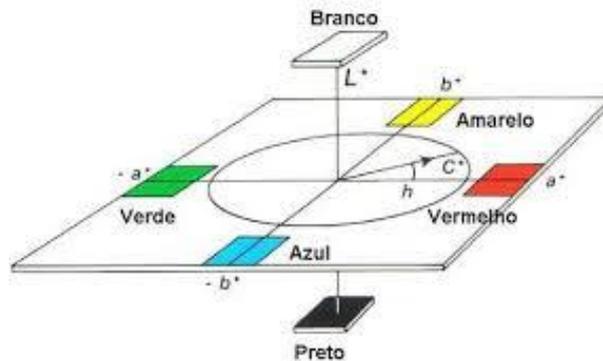


Fonte: elaborado pelo autor.

A cor de um objeto depende da iluminação que este é submetido. Além disso, a percepção das cores é um processo psico-visual, sendo assim, a interpretação desta é subjetiva. Portanto, existem variadas técnicas utilizadas para quantificar e descrever a cor dos materiais (OLIVEIRA, 2006).

No presente estudo, empregou-se o sistema CIE com o uso do espaço de cor CIELAB (Figura 13).

**Figura 13 - Espaço de cor CIELAB.**



Fonte: HunterLab, 1983.

Os resultados obtidos para as borras tratadas e não tratada foram expressos pelas coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4- Resultados dos parâmetros  $L^*$ ,  $b^*$  e  $a^*$  das amostras de borra, BPP, BPHA, BHS, e amostras tratadas enzimaticamente.**

Amostras	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Borra	24,45±0,01 <sup>a</sup>	8,53± 0,07 <sup>a</sup>	10,91± 0,06 <sup>a</sup>
BPP	17,16± 0,06 <sup>b</sup>	1,86± 0,10 <sup>b</sup>	0,63± 0,13 <sup>b</sup>
BPHA	68,98± 0,30 <sup>c</sup>	8,32± 0,15 <sup>a</sup>	37,07± 0,13 <sup>c</sup>
BHS	26,70 ± 0,02 <sup>e</sup>	8,14± 0,05 <sup>c</sup>	12,67± 0,09 <sup>e</sup>

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

A coordenada  $L^*$  indica luminosidade, quanto maior o valor de  $L^*$  mais claro é o material, e quanto menor o valor de  $L^*$ , mais escuro é o material. Desse modo, supõe-se que a amostra mais escura é a BPP visto que esta apresenta menor valor de  $L^*$ , igual a 17,16. A amostra BPHA apresenta maior valor de  $L^*$ , 68,98, apresentando, portanto, coloração mais clara que as demais.

Analisando não somente a coordenada  $L^*$  que indica luminosidade, mas também as coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$ , nota-se que a borra de café sem nenhum tratamento e a BHS apresentam colorações semelhantes. Isto pode ser comprovado pelos valores similares das coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . A BPHA tende à tonalidade amarelada e apresenta coloração moderada. Os valores da coordenada  $b^*$  explicam essas características, visto que valor de  $b^*$  está entre 30-40, e a escala varia de 0-60.

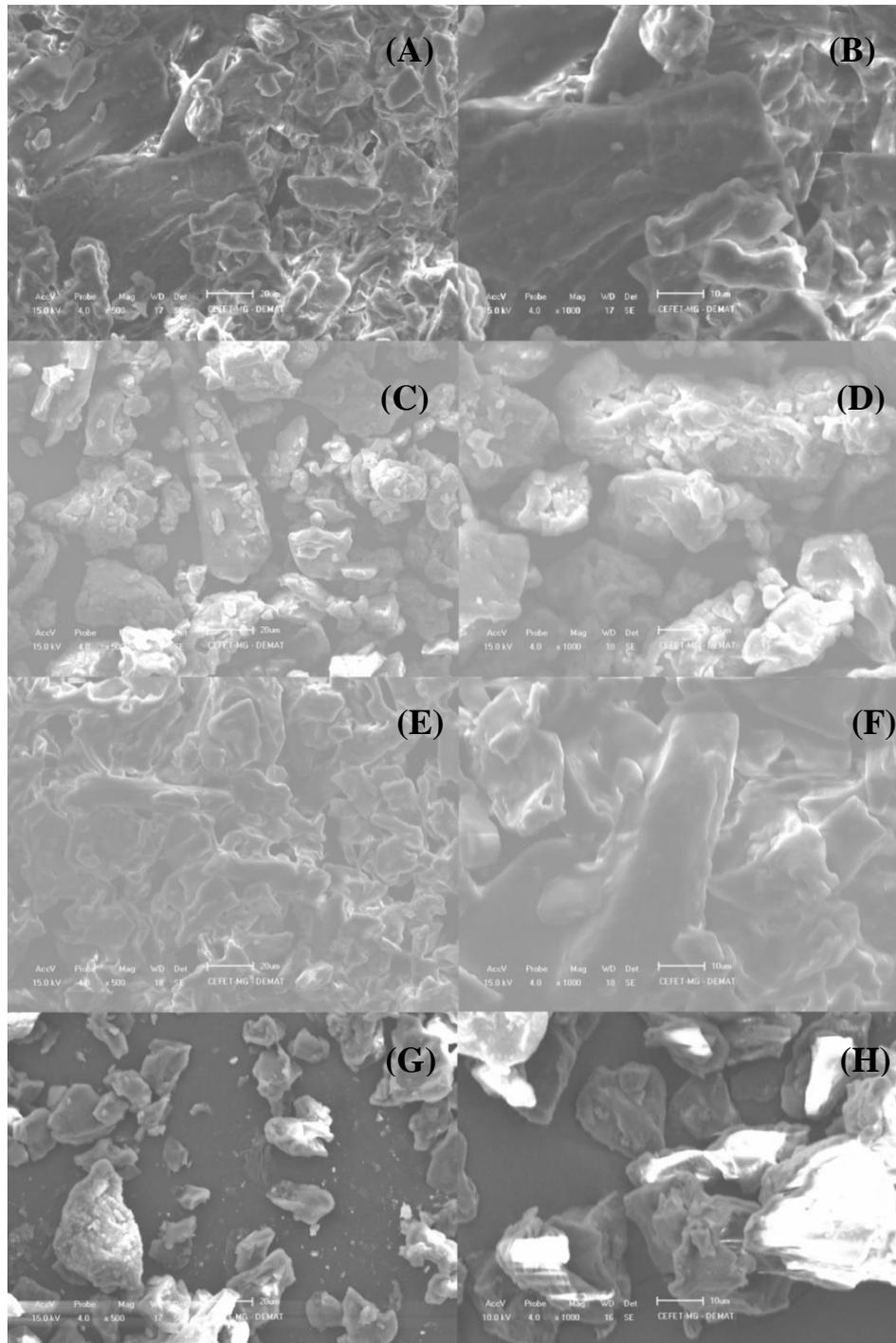
Por sua vez, a borra tratada com permanganato de potássio apresenta valores das coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  pequenos, próximos do centro do plano cartesiano, indicando uma coloração escura, tendendo para o preto.

#### 4.2.4 Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma vez que a borra de café foi submetida a vários pré-tratamentos, tornou-se interessante o emprego da técnica de microscopia eletrônica de varredura com intuito de analisar as mudanças estruturais causadas pelos tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino, permanganato de sódio alcalino e hidróxido de sódio.

A borra de café é diferente de outros materiais lignocelulósicos em relação ao tamanho, formato e natureza das partículas. Esta apresenta uma estrutura semelhante a uma folha com poros grandes e não fibrilares (BALLESTEROS *et al.*, 2014). Na Figura 14, são mostradas as micrografias da borra sem tratamento e das borras submetidas aos pré-tratamentos, com ampliação de 500 vezes e de 1000 vezes. Analisando as Figuras 14A e 14B, relativas à borra de café sem tratamento, nota-se uma estrutura com partículas maiores e mais lisas, que poderia ser recalcitrante ao ataque enzimático resultando em menor conversão enzimática dessa superfície (SUBHEDAR & GOGATE, 2014).

**Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura: A) Borra de café 500x B) Borra de café 1000x C) BPP 500x D) BPP 1000x E) BPHA 500x F) BPHA 1000x G) BHS 500x H) BHS 1000x**



**Fonte: elaborado pelo autor.**

No entanto, mudanças morfológicas significativas ocorreram após os tratamentos. Nas Figuras 14C, 14E, 14G, notam-se partículas menores, principalmente, decorrentes da quebra da lignina. Analisando as imagens com maior ampliação, em 14D, 14F e 14H, percebe-se que alguns complexos possivelmente de lignina foram condensados na superfície da biomassa,

formando camadas e pequenas partículas sobrepostas. De acordo com Ravindran *et al.* (2017b), o principal efeito dos tratamentos nas estruturas da borra é a redução do tamanho. Essa redução pode ser atribuída à remoção de lignina e hemicelulose, que dificultam a absorção da enzima; e, também, ao efeito de cavitação causado pelas ondas ultrassônicas conjugadas no tratamento do permanganato de potássio alcalino e hidróxido de sódio (RAVINDRAN *et al.*, 2017a). Isso mostrou que os pré-tratamentos foram eficientes para romper e dissolver tanto a lignina quanto algumas regiões amorfas constituídas por hemicelulose, alterando a estrutura interna da borra de café.

Desse modo, o tratamento com permanganato de potássio alcalino apresenta maior uma deposição na superfície da biomassa, que pode ser lignina bem como o dióxido de manganês formado pelo uso de permanganato em pH alcalino. O tratamento com peróxido de hidrogênio alcalinou resultou em partículas pequenas, no entanto o tratamento com hidróxido de sódio foi o que mais reduziu o tamanho das partículas, possivelmente devido à associação do banho ultrassônico.

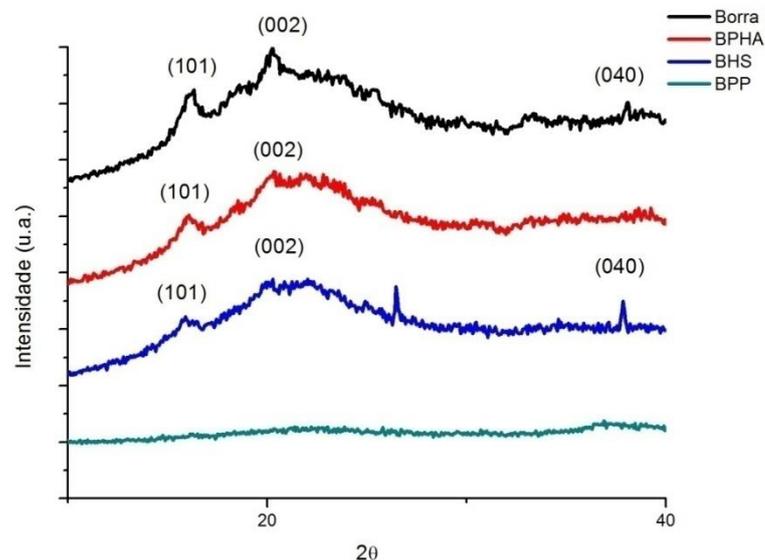
Em outros estudos, diferentemente da borra de café, as biomassas apresentam estruturas lamelares, as quais, após a remoção da lignina e hemicelulose, ocorre distorção de estruturas, remoção de fibras, formação de superfícies porosas, e são formadas pequenas superfícies (RAGHAVI *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2015).

Portanto, o objetivo dos pré-tratamentos aplicados não era apenas deslignificar a biomassa, mas também aumentar a área superficial disponível, aumentando a acessibilidade das enzimas à fração de celulose.

#### 4.2.5 Cristalinidade

A difração de raio X foi empregada para determinar as porções cristalinas e amorfas presentes nas amostras, bem como analisar as mudanças estruturais causadas pelos pré-tratamentos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15.

**Figura 15 - Difratoograma da borra in natura e das borras tratadas. BPHA = Borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino; BHS = Borra de café tratada com hidróxido de sódio; e BPP= borra de café tratada com permanganato de potássio alcalino.**



Fonte: elaborado pelo autor.

Analisando os resultados obtidos (Figura 15) pela difração de Raios X, todas as amostras foram determinadas ser semi-amorfas com diferentes graus de cristalinidade (SUN *et al.*, 2014), ilustradas pelas curvas com picos de diferentes amplitudes. Os difratogramas apresentam os picos referentes aos planos cristalinos característicos dos materiais lignocelulósicos, entre os quais observa-se que a reflexão (002) é a mais intensa em 22° referente a celulose do tipo cristalina, e dois picos em 16° (plano 101) e 35-37° (plano 040), relacionados à parte amorfa presente nas microfibrilas que consiste em hemicelulose, lignina, pectina e celulose amorfa, com exceção do difratograma relativo a borra de café tratada com permanganato de potássio alcalino (MIRANDA *et al.*, 2015; MU *et al.*, 2018).

A celulose apresenta regiões amorfas e cristalinas. As regiões cristalinas são responsáveis pela maior resistência da molécula, visto que são definidas por interações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose, tornando-as menos acessíveis a ataques químicos e microbiológicos. Entretanto, não são todos os polimorfos de celulose que contribuem para essa característica de cristalinidade. Esses são originados de variações no ângulo diédrico entre a ligação  $\beta$ -(1→4) do anel glicosídico e o grupo hidroximetil exocíclico. Os polimorfos são classificados de acordo com as características estruturais: celulose tipo I, celulose tipo II e celulose tipo III. A celulose tipo I apresenta cadeias cristalinas, ou seja, a direção das extremidades redutoras e não redutoras é a mesma, representando a parcela

cristalina. A celulose tipo II, geralmente, é oriunda de processos de mercerização ou regeneração, em que os átomos na posição O6 ficam próximos, resultando em ligações de hidrogênio intra e inter moleculares. Logo, a celulose tipo II é constituída por duas cadeias antiparalelas, em que as extremidades redutoras e não redutoras se encontram em direções opostas. Já a celulose tipo III são obtidas quando a celulose tipo I é submetida a tratamentos com amônia ou amina, produzindo cadeias com extremidades paralelas semelhantes à celulose tipo I, porém, com conformação tridimensional assim como a celulose tipo II (KIM *et al.*, 2013).

Os índices de cristalinidade calculados para as amostras tratadas e não tratadas, de acordo com Segal *et al.* (1959), ratificam a mudança da cristalinidade da estrutura em conformidade com o pré-tratamento empregado (Tabela 5).

**Tabela 5 - Índice de cristalinidade (IC) da borra de café in natura e pré-tratamentos.**

<b>Material</b>	<b>IC do material (%)</b>
Borra de café in natura	30,62
BPP	26,91
BPHA	34,47
BHS	31,94

A BPP apresentou reflexão somente no plano (040) em 35°, mostrando ser composta, majoritariamente, por fração amorfa, com índice de cristalinidade igual a 26,91%. Assim sendo, infere-se que o tratamento com permanganato de potássio alcalino promove o rompimento das ligações de hidrogênio altamente ordenadas nas fibras de celulose cristalina, resultando na diminuição do índice de cristalinidade, de modo semelhante ao observado por Lee *et al.* (2009) no pré tratamento da farinha de madeira de bordo (“maple wood”) com líquido iônico. Além disso, essa remove grande parte da porção amorfa, como a lignina, uma vez que os picos relacionados a esta apresentam menor intensidade ou não são evidentes.

Em contrapartida, a BHS apresentou índice de cristalinidade de 31,94%, valor um pouco superior ao encontrado para borra in natura. Estudos mostram que o tratamento alcalino na biomassa lignocelulósica provoca a remoção da celulose, reduzindo a cristalinidade. No entanto, concomitantemente, ocorre a remoção significativa da lignina, que é o objetivo do pré-tratamento, aumentando a concentração da fração de celulose em relação ao conteúdo total das amostras. Assim sendo, o índice de cristalinidade na borra tratada com hidróxido de sódio alcalino é maior do que na borra sem tratamento (SUBHEDAR & GOGATE, 2014). De acordo com Mu *et al.* (2018), o tratamento com NaOH favorece a exposição do hidrogênio da microfibrila nas superfícies cristalinas e não cristalinas, resultando em ligações de hidrogênio

que mantêm a região amorfa próxima da região cristalina, e assim, aumentando a largura das microfibrilas celulósicas cristalinas das paredes celulares.

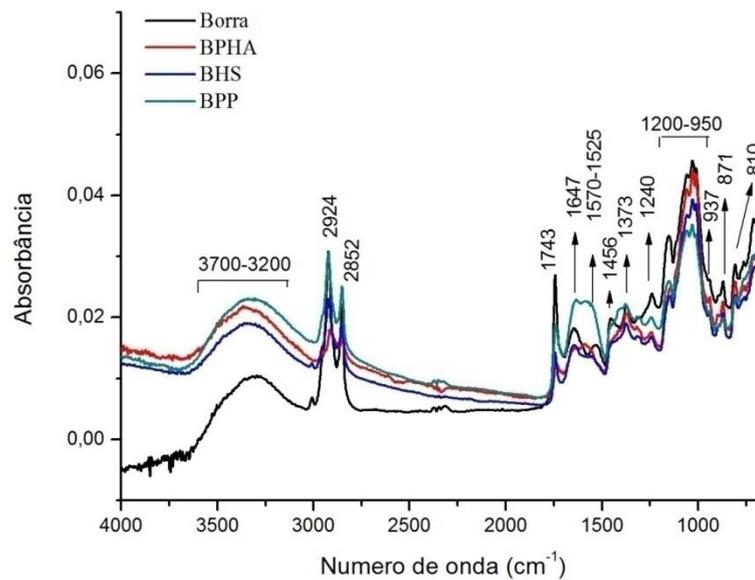
Por sua vez, o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino promoveu um aumento da cristalinidade de 30,62% para 34,47% em relação à borra de café sem nenhum tratamento. Tal resultado também foi constatado por Su *et al.* (2015) que aplicaram o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para fracionamento do material lignocelulósico da espiga de milho, no qual o índice de cristalinidade aumentou de 32,1% para 39,3%. Esse aumento da cristalinidade pode ser atribuído à desordem causada pelo pré-tratamento na estrutura da microfibrila, removendo os componentes amorfos, como lignina e hemicelulose (SUN *et al.*, 2014; RAVINDRAN *et al.*, 2017b).

Assim sendo, o pré-tratamento mais efetivo aplicado à borra de café foi o com peróxido de hidrogênio (PHA), removendo grande quantidade da fração amorfa do material, aumentando assim o índice de cristalinidade do mesmo. Tais resultados ratificam os resultados obtidos pela análise do teor de lignina na amostra descrita no item 4.1 (tabela 1), em que o tratamento com peróxido de hidrogênio removeu 72,49 % de lignina.

#### 4.2.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 16, são mostrados os espectros FT-IR obtidos por amostragem direta da borra não tratada e das amostras BPHA, BHS e BPP, utilizando o acessório ATR com leitura na região de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ . Estes apresentam absorção em bandas características de materiais lignocelulósicos, as quais variam de acordo com a matéria-prima.

**Figura 16 - Espectros da borra de café e das amostras BPHA, BHS e BPP.**



**Fonte: elaborado pelo autor.**

Dentre as bandas vibracionais registradas, pode-se destacar a banda entre 3700-3200  $\text{cm}^{-1}$ , característica de deformações axiais de ligações O-H, que pode ser associada à presença de água na amostra. Além disso, essa banda pode representar a deformação axial da ligação N-H (BARBOSA, 2007). Observa-se no espectro que essa banda é larga e apresenta baixa intensidade em todas as amostras, logo, infere-se que há uma umidade residual nestas. No entanto, a borra não tratada apresenta uma banda de maior intensidade quando comparada às das demais amostras, e a BPHA a de menor intensidade.

Na região do espectro entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , verificaram-se duas bandas, 2924  $\text{cm}^{-1}$  e 2852  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem às deformações axiais C-H de carbonos saturados (-CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>) de alcanos e grupos alquilas (BARBOSA, 2007). Reis *et al.* (2016) atribuíram essas bandas a lipídios saturados e insaturados presentes no café, corroborando o relatado por Belchior *et al.* (2016). Esse resultado ratifica o apresentado na tabela 2, em que todas as borras de café apresentaram um valor significativo de lipídios. Além disso, Mata *et al.* (2018), que estudaram a borra de café oriunda da preparação da bebida pela indústria e em residências para obtenção de produtos de valor agregado, relataram que o teor de lipídios encontrado em borras de café varia de 10 a 20%.

Entretanto, a banda em 2852  $\text{cm}^{-1}$  pode ser associada às vibrações de estiramento assimétrico de C-H do grupo metil (-CH<sub>3</sub>) da cafeína, visto que essa molécula apresenta três grupos metil na estrutura cíclica (Reis *et al.*, 2013). Estudos que utilizaram a técnica FT-IR

para a análise de bebidas contendo cafeína (chá, café, coca-cola), reportaram bandas em aproximadamente  $2852\text{ cm}^{-1}$ , que foram usadas para desenvolver modelos para quantificação da cafeína (PARADKAR & IRUDAYARAJ, 2002). Ademais, Cruz *et al.* (2012) quantificaram a cafeína em 50 mostras de borra de café provenientes de diferentes cafeterias e de marcas diferentes, obtendo valores que variaram de 194 a 788 mg por 100 g em base seca. Assim sendo, infere-se que as amostras analisadas no presente estudo também contêm cafeína.

Em todas as amostras, identificou-se uma banda de absorção em  $1743\text{ cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos axiais C=O, que pode ser atribuída a ésteres e a ácidos carboxílicos. De acordo com Su *et al.* (2015), que aplicaram o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino na espiga de milho para o fracionamento do material lignocelulósico, bandas em  $1730\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$  representam ligações éster de hemiceluloses ou complexos de hemiceluloses e lignina. A banda desta região do espectro da borra de café apresenta intensidade de absorbância significativamente superior às das demais amostras, de forma que se entende que parte desses compostos, lignina e hemicelulose, foram removidos durante o tratamento das amostras BPHA, BPP e BHS.

A região que compreende a faixa de  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  está associada aos ácidos clorogênicos e à cafeína (RIBEIRO *et al.*, 2010). Todas as amostras, incluindo borra de café in natura, apresentaram uma banda em  $1647\text{ cm}^{-1}$ . Esta tem maior intensidade na BPP do que na borra de café sem tratamento, enquanto BPHA e BHS apresentaram bandas com menor intensidade. A maior intensidade da banda na amostra BPP pode ser justificada pela remoção de outros compostos, concentrando a cafeína e os ácidos clorogênicos. Já a menor intensidade da banda mostra que os tratamentos aplicados provavelmente removeram parte desses compostos.

As bandas de absorção entre  $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao estiramento da ligação C=O e C-N e, também, à deformação angular da ligação N-H caracterizando moléculas de proteínas (BARBOSA, 2007). Dessa forma, as bandas presentes entre  $1647$  e  $1525\text{ cm}^{-1}$  também podem ser devido à presença de proteína, anteriormente relatada (item 4.2.1).

Segundo Ravindran *et al.* (2017b), as bandas de absorção entre  $1425\text{-}1465\text{ cm}^{-1}$  indicam deformação angular na ligação C-H da lignina, assim sendo, mudanças nessas regiões podem indicar degradação ou remoção desta. Observando o espectro obtido, nota-se que somente a borra de café apresenta banda em  $1456\text{ cm}^{-1}$ . Logo, deduz-se que os pré-tratamentos aplicados na borra de café foram capazes de degradar significativamente a lignina.

Além disso, encontra-se a banda em  $1373\text{ cm}^{-1}$ , de baixa intensidade, que é característica de vibrações C-H de celulose e hemicelulose, as quais geralmente estão presentes em torno de  $1374\text{ cm}^{-1}$  (PANDEY & THEAGARAJAN, 1997). Analisando os espectros, percebe-se que o pré-tratamento com hidróxido de sódio afetou consideravelmente as ligações C-H de celulose e hemicelulose, provavelmente devido à remoção de hemicelulose, corroborando os resultados encontrados nas análises de açúcares neutros (tabela 3).

De acordo com Reis *et al.* (2016), a região que compreende  $1450\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ , também pode ser atribuída a ácidos clorogênicos, como o ácido quínico e o ácido cinâmico, principalmente pela deformação angular da ligação O-H e da ligação éter C-O-C.

Diferentemente dos ácidos clorogênicos, dos lipídios e das proteínas, os carboidratos absorvem, majoritariamente, na região de  $1500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$  (REIS *et al.*, 2016), assim sendo, é esperado que essa faixa do espectro modifique de acordo com cada pré-tratamento aplicado. Dentro dessa faixa de absorção, encontra-se a região *fingerprint* ( $1500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ ) (ZARRINBAKHSH *et al.*, 2016). As bandas de absorção presentes nessa região são representadas por vibrações das ligações C-H, C-O e C-N (KIZIL *et al.*, 2002).

As bandas entre  $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$  são características de vibrações da ligação C-O-H, como as ligações glicosídicas. Conforme Figueiro *et al.* (2004), essas podem ser associadas à presença de galactomananas. A banda de absorção em torno de  $1035\text{ cm}^{-1}$  indica vibração das ligações C-O, C=O e C-C-O, que são características da ligação entre polissacarídeos e lignina. Nota-se, nos espectros, que a borra de café apresenta banda de maior intensidade nessa região, seguida pela banda da BPHA, BHS e BPP. Esse resultado mostra que todos os pré-promoveram a quebra entre as ligações lignina e polissacarídeos (Ravindran *et al.*, 2017b).

Bandas presentes entre  $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  representam regiões de celulose (Raghavi *et al.*, 2016), como ligações O-H de celulose e hemicelulose ( $1200\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramento das ligações assimétricas C-O-C de celulose e hemicelulose ( $1160\text{ cm}^{-1}$ ) (Xu *et al.*, 2013). A notável redução da banda nas amostras tratadas em relação à borra de café in natura pode ser atribuída à quebra das ligações de hidrogênio entre celulose e hemicelulose (Ravindran *et al.*, 2017a). Dessa forma, nota-se que a banda presente no espectro, em aproximadamente,  $1156\text{ cm}^{-1}$  é maior para borra de café in natura, seguida pela BPP, BPHA e BHS. Esse dado mostra que, apesar do tratamento com permanganato de potássio ter atuado efetivamente nas ligações entre lignina e polissacarídeo, foi o que menos degradou hemicelulose e celulose. E o tratamento com hidróxido de sódio, além de atuar nas ligações entre lignina e polissacarídeos,

também atingiu as ligações hemicelulose e celulose, provocando a perda parcial dos polissacarídeos.

Por sua vez, a região ( $950-700\text{ cm}^{-1}$ ), em torno  $875\text{ cm}^{-1}$  apresenta uma banda de absorção relativa a ligação glicosídica de hemicelulose (Xu *et al.*, 2013), a qual no espectro encontra-se em  $871\text{ cm}^{-1}$  com maior intensidade para borra sem tratamento, seguida pela BPHA, com valores iguais para BPP e BHS. Assim sendo, fica demonstrado que o tratamento BPHA preserva mais as ligações glicosídicas entre as hemiceluloses do que os demais pré-tratamentos aplicados. De acordo com Ballesteros *et al.* (2017), que analisaram polissacarídeos extraídos da borra de café por FT-IR, a presença de ligações  $\beta$ -glicosídicas e  $\alpha$ -glicosídicas oriundas de unidades de  $\beta$ -D-manopirranose e  $\alpha$ -D-galactopirranose, implica bandas de absorção em  $884$  e  $778\text{ cm}^{-1}$ , as quais foram observadas nos espectros em torno de  $871$  e  $810\text{ cm}^{-1}$ . Após  $800\text{ cm}^{-1}$ , ocorre a sobreposição de bandas dificultando a atribuição de um componente específico a cada banda de absorção.

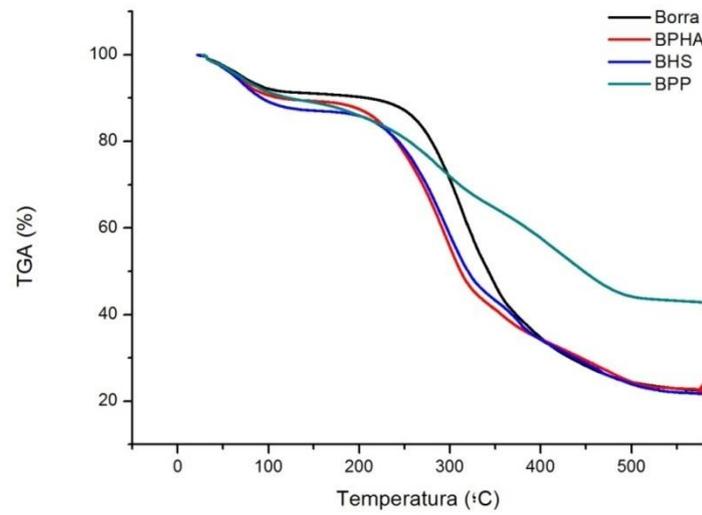
Por conseguinte, os tratamentos aplicados na borra de café influenciaram na composição desta, principalmente, na fração amorfa. Apesar do item 4.1 ter mostrado que o BPHA contém menor quantidade de lignina insolúvel, infere-se que o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino não afetou tanto o conteúdo de celulose e hemicelulose presente na borra quanto os tratamentos com hidróxido de sódio e com permanganato de potássio.

#### 4.2.7 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA, apresentadas na Figura 17, demonstram a perda de massa da borra de café e das amostras submetidas a diferentes tratamentos em função da temperatura. Para tal análise, a borra de café e as amostras BPHA, BHS e BPP foram expostas a aquecimento até  $580^{\circ}\text{C}$ , sob atmosfera de nitrogênio.

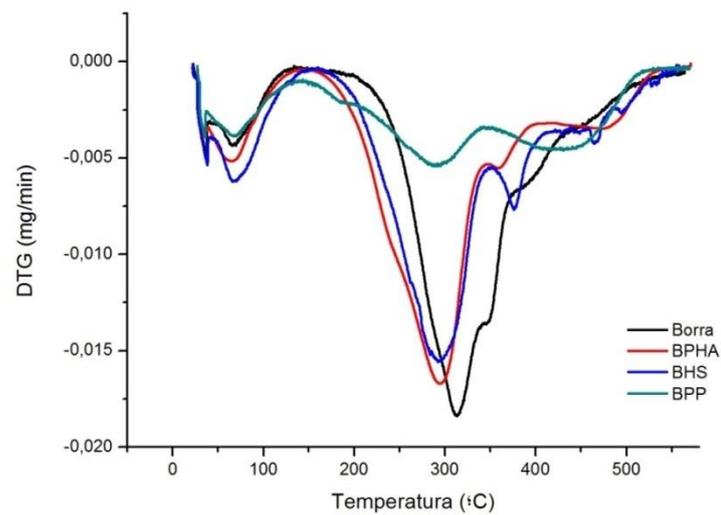
Observando as curvas de TGA (Figura 17), é notório que a borra de café in natura apresentou comportamento diferente das amostras tratadas, sendo que a BPHA e a BHS se comportaram de forma semelhante e a BPP destoou das demais amostras tratadas e da borra de café não tratada. Esse comportamento foi confirmado pelas curvas de DTG (Figura 18).

**Figura 17 - Curvas de TGA das amostras de borra de café, BPHA, BHS e BPP.**



Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 18 - Curvas de DTG das amostras de borra de café, BPHA, BHS e BPP.**



Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados extraídos das curvas de TGA e DTG se encontram dispostos na Tabela 6.

**Tabela 6- Dados das curvas TGA e DTG das amostras de borra de café, BPHA, BHS e BPP.**

<b>Grupo</b>	<b>Estágio</b>	<b>Temp.(°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>	<b>Resíduo (%)</b>	<b>Picos relacionados às perdas DTG (°C)</b>
<b>Borra de café</b>	1°	32,85-114,13	7,50		67,20
	2°	114,13-355,50	46,96	23,71	313,02
	3°	355,50-379,72	21,83		346,71
<b>BPHA</b>	1°	32,06-125,43	9,84		63,86
	2°	125,43-325,23	44,08	23,02	294,37
	3°	325,23-369,08	7,77		358,40
	4°	369,08-579,72	15,29		481,17
<b>BHS</b>	1°	31,95-125,17	11,87		67,20
	2°	125,17-329,30	40,51	22,19	292,70
	3°	329,30-380,79	9,95		375,10
	4°	380,79-578,85	15,48		466,14
<b>BPP</b>	1°	32,04-119,12	9,37		67,20
	2°	119,12-355,69	26,37	43,21	291,03
	3°	355,69-579,68	21,05		437,46

A borra de café apresentou uma curva com três estágios de perda de massa bem definidos (Figura 18). Inicialmente, observa-se perda de massa de 7,50% na faixa de 32,85-114,13°C que pode ser associada à perda de água e materiais voláteis contidos na borra de café. O segundo estágio encontra-se entre 114,13-355,50°C com perda de massa de 46,96%, devido às reações de despolimerização e decomposição dos polissacarídeos e de alguns óleos (BALLESTEROS *et al.*, 2014). No último estágio, a degradação inicia em 355,50°C até aproximadamente a temperatura final, com perda de massa de 21,83%, associada a degradação da lignina (ZHANG *et al.*, 2014). A temperatura final da análise foi 580°C, e a massa restante de borra de café correspondeu a 23,71% da massa inicial.

A degradação da BPHA e BHS resultou em curvas de perda de massa bem semelhantes com quatro estágios, descritos na Tabela 6. No primeiro estágio, a perda de massa é resultante da desidratação das amostras, equivalente a 9-12% de massa. No estágio seguinte, ocorre a maior parte da perda de massa resultante de reações de despolimerização da hemicelulose, entre 125-330°C (GÁRCIA-GÁRCIA *et al.*, 2015). A BPHA apresentou uma perda de

44,08%, e a BHS a perda de massa foi de 40,51%. O terceiro estágio que ocorre entre 325-380°C é caracterizado pela degradação de celulose (GÁRCIA-GÁRCIA *et al.*, 2015), no qual a perda de massa da BPHA foi de 7,77% e da BHS de 9,95%. No quarto e último estágio, a BPHA perdeu 15,29% de massa, ao passo que a BHS perdeu 15,48% de massa, devido principalmente a degradação da lignina (GÁRCIA-GÁRCIA *et al.*, 2015). Em torno de 580°C, restaram 23,17 % da BPHA e 22,19% da BHS (Tabela 6). Esse perfil de curva TGA foi encontrado por Tarazona (2017) para a borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.

A hemicelulose é mais susceptível a degradação térmica que a celulose e a lignina por ser composta por uma estrutura amorfa e rica em ramificações. Em contrapartida, a celulose é constituída por uma longa cadeia polimérica de glicose, sem muitas ramificações, sendo mais resistente. Por sua vez, a lignina é formada por anéis aromáticos com várias ramificações. Os anéis aromáticos a tornam mais resistente, no entanto, as inúmeras ramificações ampliam a faixa de degradação desta molécula devido a diferentes tipos de ligações químicas (YANG *et al.*, 2007).

A curva de degradação de BPP, diferentemente das anteriores, apresenta três estágios pouco definidos (Figura 18). No primeiro estágio, verifica-se a perda de 9,37% de massa, correspondendo a evaporação de água e voláteis. No segundo estágio, que compreende a faixa de temperaturas de 119,12 a 355,69°C, a perda de massa foi de 26,37%, atribuída à decomposição da holocelulose (celulose e hemicelulose). No último estágio, a perda de massa foi 21,05% em 355,69 a 579,68°C, resultante da quebra da lignina. A massa residual foi de 43,12% (Tabela 6).

Comparando todas as amostras, nota-se que a borra de café apresentou menor perda de massa no primeiro estágio, associada à desidratação, 7,5% enquanto nas demais amostras foram de 9-12% (Tabela 6). Esses resultados podem ser atribuídos à vulnerabilidade das partículas, visto que as amostras submetidas aos pré-tratamentos apresentam a estrutura lignocelulósica degradada devido à remoção parcial da lignina e de outros componentes amorfos (BELTRAMI *et al.*, 2014). Além disso, no segundo estágio, é observado o deslocamento das curvas das amostras BPHA, BHS e BPP em aproximadamente 20°C para esquerda. Esse deslocamento é mais facilmente visualizado quando analisado os dados obtidos por DTG, em que a borra de café apresenta o pico de maior intensidade na temperatura de 313°C enquanto nas amostras tratadas o pico é localizado na faixa de temperaturas de 290-295°C (Tabela 6). De acordo com Zhang *et al.* (2014), materiais lignocelulósicos não tratados contêm celulose tipo I, com estrutura cristalina. Quando esses

materiais são submetidos a tratamentos químicos, a celulose é transformada em uma associação de celulose tipo II e celulose amorfa (KIM *et al.*, 2013). As estruturas amorfas são mais facilmente degradadas do que as estruturas cristalinas (BALLESTEROS *et al.*, 2014). Assim sendo, os materiais lignocelulósicos tratados são degradados em temperaturas menores, e o pico de máxima intensidade se desloca para menor temperatura, como foi observado no presente estudo.

Também foi constatado que o último estágio das amostras tratadas (BPHA, BHS e BPP), entre 350-580°C (Tabela 6), associado à degradação da lignina, apresentou uma redução considerável em relação a borra de café sem tratamento, o que era esperado considerando o objetivo dos pré-tratamentos aplicados (APRELINI, 2016). Esse resultado corrobora o encontrado na determinação de lignina, em que a BPHA apresenta menor teor de lignina.

O comportamento diferente apresentado pela BPP pode ser justificado pelo conteúdo de matéria orgânica. A borra de café e as amostras BPHA e BHS contêm maior quantidade de matéria orgânica, fazendo com que essa seja facilmente decomposta em altas temperaturas, por isso ocorre grande perda de massa no segundo estágio (GETACHEW *et al.*, 2018). Quando a borra é tratada com permanganato de potássio, a reação é dada em pH entre 11 e 12, promovendo a formação de outros compostos oriundos do íon permanganato como Mn (IV) e Mn (VII). Além disso, pode formar o composto marrom  $MnO(OH)_2$  proveniente da oxidação do  $Mn(OH)_2$  (ROCHA e AFONSO, 2012). Dessa forma, a BPP não é constituída somente de matéria orgânica o que leva a maior resistência a degradação térmica, justificando a menor perda de massa no segundo estágio (Tabela 6).

Diante dos resultados obtidos nas análises, nota-se que o tratamento com peróxido de hidrogênio (PHA) foi o que removeu a lignina, reduzindo a recalcitrância do material lignocelulósico, sem afetar significativamente a fração hemicelulósica. O tratamento com hidróxido de sódio (HS) apresentou um rendimento intermediário, no entanto afetou consideravelmente os polissacarídeos. Por sua vez, o tratamento com permanganato de potássio (PP), alcançou um alto rendimento devido à deposição de outros compostos, e degradou grande parte da matéria orgânica. Assim sendo, a BPHA foi submetida ao tratamento enzimático, com o intuito de remover a celulose, de modo a se obter uma fração composta predominantemente por galactomananas.

### 4.3 Hidrólise Enzimática

Conforme descrito anteriormente (item 3.4), o estudo da hidrólise enzimática foi realizado em duas etapas: a primeira etapa consistiu em testes para avaliar o efeito de três tratamentos precedente à adição de enzima, objetivando maior atividade enzimática e aumento da remoção da celulose; e, na segunda etapa, foi verificado qual o melhor tempo de incubação em que ocorreria a maior remoção de celulose. Para determinar a quantidade de açúcares hidrolisados em cada etapa, foi empregado o método colorimétrico fenol-sulfúrico.

Na hidrólise enzimática, assim como para os testes, foram utilizados frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL da solução tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e 5% m/v de amostra, os quais foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

A enzima utilizada neste estudo foi oriunda do microrganismo *Trichoderma reesei* ATCC 26921 com atividade enzimática de 46,25 unidades por papel de filtro (FPU) mL. A cellulase do *Trichoderma reesei* é um complexo enzimático amplamente utilizado, que possui uma quantidade substancial de  $\beta$ -glicosidase (HALDAR *et al.*, 2018).

Os tratamentos precedentes à adição da enzima foram identificados de acordo com o Quadro 4, para facilitar a compreensão.

#### Quadro 4 - Codificação e descrição dos tratamentos precedentes a hidrólise enzimática.

Tratamento	Sigla
Aplicação do banho ultrassônico (UniqueUSC-1650A) durante 55 minutos na frequência de 25 kHz, 150 W.	US
Aplicação do forno micro-ondas na potência 800W, durante 60 segundos.	MW
Aplicação da autoclave durante 20 minutos com frasco Erlenmeyer aberto, com pressão 1atm e temperatura 120°C.	AC

Analisando os resultados (Tabela 7) relativos aos tratamentos descritos no Quadro 4, nota-se que a remoção de açúcares foi maior quando se utilizou o banho ultrassônico (US) durante 55 minutos, visto que a quantidade de açúcar encontrado no sobrenadante foi de 133,08 mg/mL. Esse resultado não foi significativamente diferente do encontrado para a AC, no entanto foi diferente do tratamento com MW. Assim sendo, a melhoria da hidrólise enzimática poderia ser alcançada com os tratamentos US e AC.

**Tabela 7 - Análise de tratamentos precedentes a hidrólise enzimática.**

Amostra	Concentração de glicose ajustada ( $\mu\text{g/mL}$ )
Padrão	$80,48 \pm 2,12^a$
AC	$117,00 \pm 8,66^{b,c}$
US	$133,08 \pm 8,06^b$
MW	$104,00 \pm 13,50^{a,c}$

Valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

No tratamento com banho ultrassônico, ocorre a formação e o crescimento de pequenas bolhas em líquidos, que colapsam e induzem efeitos mecânicos, como divisão das moléculas em fragmentos menores e redução do tamanho das partículas. A formação dessas bolhas é justificada pelas flutuações de pressão e cavitação acústica (TABASSO *et al.*, 2015). Esse tratamento quando conjugado a outro é atrativo visto que reduz o tempo de reação por acelerar a transferência de massa (ADULKAR & RATHOD, 2014). Atualmente, tal tratamento é utilizado em inúmeros estudos que aplicam a hidrólise enzimática, já que as ondas do ultrassom alteram a estrutura da matéria prima, promovendo a ruptura de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CHEN *et al.*, 2011).

De forma semelhante, o tratamento térmico associado a altas pressões aumenta o rendimento da hidrólise enzimática da biomassa devido à quebra da estrutura química, assim como promove a solubilização de compostos, como compostos fenólicos, óleos e proteínas (RAVINDRAN *et al.*, 2017b). Nesse pré-tratamento, o substrato é exposto à alta temperatura e pressão (121°C, 1 atm) durante certo tempo, e, subsequentemente, quando o vapor é expelido acompanhado da redução brusca de pressão, ocorre a ruptura de células (ONUMAEGBU *et al.*, 2018). No entanto, esse tratamento não apresenta resultados significativos quando comparado com a explosão a vapor que envolve temperaturas superiores a 200°C. Dessa forma, o resultado intermediário obtido no presente estudo pode ser justificado pelo tratamento térmico a vapor ter sido realizado em autoclave com temperatura de 121°C (CHIYANZY *et al.*, 2015).

O tratamento com micro-ondas, diferentemente dos anteriores, baseia-se na transferência volumétrica de calor ocasionada pela interação entre o substrato aquecido e o campo eletromagnético aplicado. Quando tal método é aplicado em materiais lignocelulósicos, este atua na parte mais polar criando regiões quentes com materiais não homogêneos. Dessa forma, ocorre uma “explosão” causando o rompimento de estruturas,

principalmente, as recalcitrantes da fração lignocelulósica (HU & WEN, 2008). A irradiação por micro-ondas tem sido amplamente utilizada por ser uma técnica rápida, de fácil operação e promove um aquecimento eficiente. Além disso, pode ser conjugada a outras reações, como enzimáticas e químicas, resultando em maior rendimento destas (ZHU *et al.*, 2006).

De acordo com McMillan *et al.* (2013), micro-ondas é uma técnica efetiva e rápida para promover a ruptura de células quando comparada a outros métodos. Corroborando esse dado, Koberget *et al.* (2011) compararam os efeitos do micro-ondas com os do ultrassom como pré-tratamentos na produção de lipídios a partir de microalgas (*Nannochloropsis*), em que o ultrassom foi empregado em uma frequência de 20kHz por 5 minutos, e o micro-ondas na frequência de 2,45 GHz por 5 minutos. Os resultados mostraram que rendimento obtido após tratamento com micro-ondas foi o dobro quando comparado com o do banho ultrassônico. De maneira semelhante, Zheng *et al.* (2014) compararam cinco pré-tratamentos na produção de biodiesel: autoclave a 125°C com pressão 1,5 MPa por 5 minutos; forno micro-ondas a 100°C com frequência de 2450 MHz por 5 minutos; beadbeating com diâmetro de 0,1 mm e velocidade de 2800 rpm por 5 minutos; banho ultrassônico com frequência 10KHz por 5 minutos; e choque osmótico usando solução NaCl 10% com vortex por um minuto, mantido por 48 horas. Os resultados mostraram que o maior rendimento foi obtido com o forno micro-ondas.

No entanto, Hu & Wen (2008) citam que o micro-ondas aumenta a digestão da hemicelulose presente na biomassa proveniente de gramíneas. E Kumar *et al.* (2009) estudaram vários pré-tratamentos para biomassa lignocelulósica, mostrando que tratamentos como explosão a vapor ou semelhantes podem provocar a degradação da hemicelulose e transformação da lignina.

Logo, esses estudos mostram que o forno micro-ondas é a técnica mais eficiente diante de todos os tratamentos, aumentando o acesso a celulose e gerando melhores rendimentos na hidrólise enzimática. Porém, para que seja eficaz esse deve ser realizado em temperaturas superiores a 160°C (CHEN *et al.*, 2017).

Os materiais lignocelulósicos são matrizes complexas, apresentando enorme diversidade de constituição, estrutura e que podem variar de acordo com a origem, espécie, local de cultivo, dentre outros fatores. Essa estrutura heterogênea é um dos principais fatores que influenciam nas reações decorrentes dos pré-tratamentos, gerando resultados diferentes em cada matriz (CHEN *et al.*, 2017). Além disso, as condições empregadas nos pré-tratamentos como temperatura, tempo, pressão intervêm nos resultados, e essas devem ser estipuladas de acordo com o objetivo final específico de cada estudo, visto que, dependendo da condição,

pode-se degradar os polissacarídeos, promover a quebra de ligações ou degenerar compostos ativos.

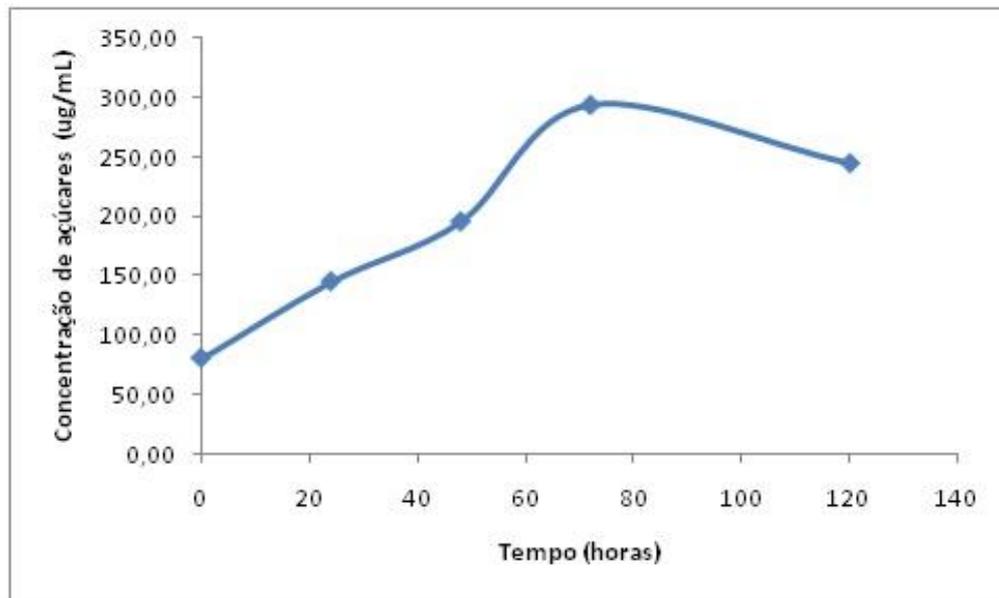
Portanto, no presente estudo, o tratamento com banho ultrassônico apresentou melhores resultados, com melhores benefícios para os procedimentos posteriores, em que o intuito era preservar a matriz hemicelulósica. De acordo com Lee *et al.* (2010), o ultrassom é um método pouco efetivo, causando pouca ruptura das células quando comparado com outros métodos, todavia, conserva a estrutura dos polissacarídeos mais susceptíveis como a hemicelulose.

Assim como é importante associar um pré-tratamento à hidrólise enzimática para aumentar o rendimento, também são necessárias condições ótimas da reação como pH, atividade enzimática, concentração do substrato, temperatura e o tempo de incubação (LACERDA, 2012).

Para isso, investigou-se o tempo que resultava em maior rendimento, retirando alíquotas após 24, 48, 72 e 120 horas de incubação. Os resultados são expostos na Figura 19. Analisando tal Figura, pela inclinação da curva de concentração de açúcares por tempo, percebe-se que a taxa de hidrólise no período inicial foi alta, aumentando ainda mais após 48 horas. Na fase inicial da hidrólise, a menor concentração de açúcares solúveis oferece menor competição com o substrato, justificando a maior taxa de hidrólise (SINGH *et al.*, 2019).

De acordo com Ryu & Lee (1986), a alta taxa inicial de hidrólise é proporcional a quantidade de enzima absorvida. No caso de materiais lignocelulósicos, essa absorção está relacionada com a cristalinidade da celulose, quanto menor a quantidade de celulose cristalina, maior é a absorção da enzima. Dessa forma, é necessária menor concentração de enzima para alcançar altas taxas de hidrólise, e a concentração ótima da enzima deve ser determinada, com base no grau de cristalinidade, a fonte do material lignocelulósico e a concentração no substrato de celulose.

**Figura 19 - Curva de concentração de glicose por tempo de incubação (horas).**



**Fonte: elaborado pelo autor.**

Além disso, nota-se que, após 72 horas de incubação, houve uma redução da taxa de hidrólise. Essa redução pode ser atribuída a inúmeros fatores, como a transformação da estrutura da celulose em uma forma mais resistente ao ataque enzimático, a inibição da enzima devido a produtos da hidrólise e a diminuição da extensão da enzima adsorvida (LEE &FAN, 1983).

A transformação da celulose na forma estruturalmente menos digerível pode ser explicada por mudanças no índice de cristalinidade e na área superficial, mas também pode ser atribuída à acessibilidade a área superficial (grau de ramificação da molécula) e ao grau de polimerização da molécula. Lee & Fan (1983) observaram que o índice de cristalinidade aumentou após 72 horas de hidrólise. Esse aumento mostrou que a enzima celulase degrada facilmente a região amorfa. Assim sendo, à medida que a cristalinidade aumenta, a celulose torna-se cada vez mais resistente à hidrólise.

Fora as transformações que ocorrem na estrutura das moléculas de celulose, a degradação desta pela ação do complexo enzimático gera oligossacarídeos (formados por poucas unidades de glicose), glicose livre e celobiose, devido à ação de cada tipo de enzima celulósica em uma parte da molécula de celulose (ZANCHETTA, 2012). Apesar de serem produtos da hidrólise enzimática, a glicose e a celobiose apresentam efeito inibitório significativo a esta reação, diminuindo a taxa de hidrólise com o aumento do tempo de incubação (LEE &FAN, 1983).

Durante a hidrólise enzimática também pode ocorrer a agregação enzimática, resultando no aumento da inibição da difusão do substrato, e assim levando à saturação da taxa de reação (NOMAN *et al.*, 2018). Logo, a digestão da celulose na hidrólise enzimática ocorre devido à adsorção (do tipo quimiossorção) da enzima nas partículas de celulose, e esses fatores desativam a enzima adsorvida ou dificultam essa adsorção, diminuindo a taxa de hidrólise (LEE & FAN, 1983).

Por último, foi observado no gráfico que o maior rendimento foi obtido com 72 horas de incubação, sendo a concentração de glicose na solução três vezes maior que o valor inicial da solução sem ação enzimática.

Yang *et al.* (2015), com o objetivo de remover a celulose da casca de carvalho *Quercus acutissima*, realizaram a hidrólise enzimática e também obtiveram maiores quantidades de glicose e xilose com 72 horas de hidrólise. Todavia, com 24 horas de reação, 90% de glicose e xilose já haviam sido liberados. O estudo desenvolvido por Dotsenko *et al.* (2018), em que analisaram a ação da celulase mutante na hidrólise enzimática em celulose microcristalina e na madeira da árvore álamo-trémulo, corrobora os resultados citados anteriormente, atingindo maior concentração de glicose com 72 horas de reação. Assim como os demais, Nitsos *et al.* (2019) obtiveram maior concentração de glicose com 72 horas de hidrólise enzimática, realizada na biomassa lignocelulósica oriunda da planta *Fagus* submetida a diferentes pré-tratamentos.

Esses resultados indicam que a hidrólise enzimática realizada em biomassa lignocelulósica apresenta maior velocidade até 24 horas de incubação, mas a remoção de celulose continua ocorrendo até 72 horas de incubação alcançando o rendimento máximo, e após isso, a reação reduz ou se mantém constante. No entanto, os resultados podem variar, visto que a hidrólise enzimática é influenciada por inúmeros fatores, como concentração e características estruturais do substrato que consiste em teor de lignina, cristalinidade, grau de polimerização, área superficial; concentração e natureza das enzimas, bem como seus mecanismos e interações; e condições da reação como pH, temperatura e agitação (PRATTO *et al.*, 2016).

#### **4.4 Caracterização da Fração Rica em Galactomananas**

##### **4.4.1 Determinação e Quantificação dos Monossacarídeos**

Os resultados obtidos para determinação e quantificação de monossacarídeos foram apresentados na Tabela 8.

A borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e submetida a hidrólise enzimática foi identificada por BPHAE.

**Tabela 8 - Concentração de monossacarídeos na BPHA e BPHAE em função do tempo de hidrólise enzimática.**

TRATAMENTO ENZIMÁTICO					
AMOSTRA	Celobiose (g/100g)	Glicose (g/100g)	Manose (g/100g)	Galactose (g/100g)	Arabinose (g/100g)
BPHA	4,54	25,74	37,17	16,90	15,66
T 24h	9,95	22,54	36,49	15,58	15,43
T 48h	16,63	21,40	33,41	14,28	14,28
T 72h	16,28	20,51	34,13	14,59	14,49
T 120h	13,00	24,36	33,32	14,24	15,07

Analisando a concentração dos monossacarídeos nas amostras após diferentes tempos de hidrólise enzimática (24, 48, 72 e 120 horas), nota-se que a menor concentração de glicose foi alcançada em 72 horas de hidrólise, com remoção de 20,32% quando comparado com a amostra sem tratamento enzimático (BPHA), corroborando os resultados apresentados no item 4.3. No entanto, infere-se que, em 72 horas de hidrólise, ocorre maior quebra da celulose, resultando em um aumento consideravelmente na concentração de celobiose.

Embora o tratamento enzimático durante 24 horas não foi o mais eficiente, removendo em torno de 12% de celulose, este resultou em maior quantidade de manose e galactose, próxima da quantidade inicial da BPHA, que são os principais monossacarídeos constituintes da galactomananas. Como um dos objetivos do trabalho era obter uma fração predominantemente composta por galactomananas, escolheu-se o tratamento enzimático durante 24 horas.

Após a definição dos parâmetros adotados antes e durante o tratamento enzimático, de acordo com os objetivos do estudo, estes foram aplicados na borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, obtendo a fração denominada BPHAE, que apresentou 7,73g/100g de celobiose, 8,81g/100g de glicose, 60,95g/100g de manose, 17,27g/100g de galactose e 5,25g/100g de arabinose. Comparando as frações BPHA e BPHAE, nota-se que a combinação do tratamento enzimático com a pré etapa, na qual utilizou-se o banho ultrassônico durante 55 minutos, resultou em alta remoção de celulose, equivalente a 66%. Essa remoção foi interpretada pelo aumento da concentração de unidades de celobiose e redução das unidades de glicose, visto que a maior parte da glicose permaneceu no sobrenadante.

A enzima aplicada no atual estudo é um conjunto de enzimas que atuam na celulose: endoglucanase (EC 3.2.1.4), celobiohidrolase (EC 3.2.1.176) e a  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21).

A endoglucanase atua nas porções amorfas da celulose, quebrando aleatoriamente as ligações glicosídicas, produzindo oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização. A celobiohidrolase quebra a celulose em celobiose. E, por último, a  $\beta$ -glicosidase age nos terminais não redutores removendo unidades de glicose e também nas celobioses quebrando-as e formando mais unidades de glicose (Maitan-Alfenas *et al.*, 2015).

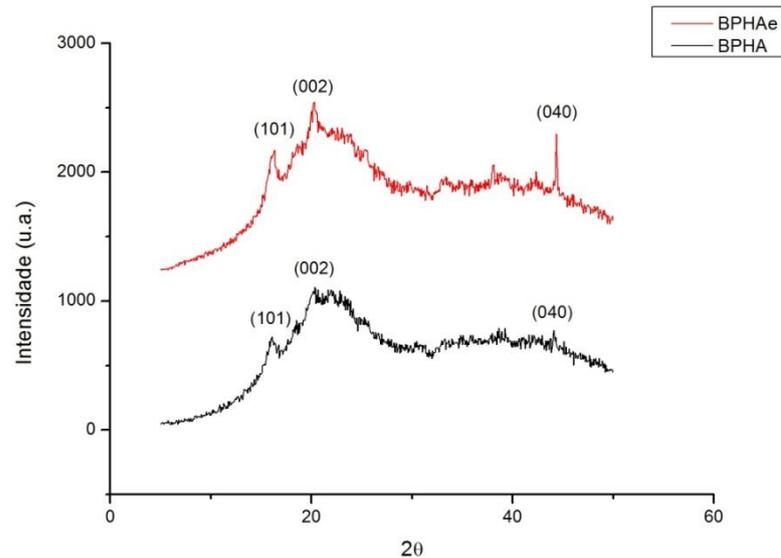
Segundo Holtzaple *et al.* (1990) a celobiose é o principal produto desse sistema de enzimas e esta é considerada um inibidor das enzimas celulasas. Vários estudos relatam que, assim como as unidades de celobiose atuam como inibidores, as unidades de glicose e xilose também (GONZALES *et al.*, 1989, ZHANG *et al.*, 2012). No entanto, a celulase oriunda do microrganismo *Trichoderma reesei* é predominantemente inibida por unidades de celobiose. Os monossacarídeos se ligam a sítios regulatórios (alostéricos) na enzima, promovendo uma mudança conformacional na enzima e alterando as propriedades catalíticas, desse modo, inibindo-as de forma não competitiva (HOLTZAPPLE *et al.*, 1990).

Com a remoção da celulose, as concentrações de manose e galactose se tornam maior em relação ao conteúdo total de monossacarídeos. Além disso, houve uma alteração na concentração de arabinose, provavelmente devido à ação do banho ultrassônico. De acordo com Simões *et al.* (2014), as arabinogalactanas são mais suscetíveis a tratamentos térmicos e químicos dentre os polissacarídeos presentes na borra do café, e essas são compostas por unidades de galactose e arabinose. A desramificação das arabinogalactanas ocorre rapidamente diante de uma hidrólise (OOSTERVELD *et al.*, 2003), sendo intensificada com auxílio de tratamentos físico-químicos.

#### 4.4.2 Cristalinidade

A análise de difração de raios-X foi realizada com o intuito de determinar as modificações ocorridas nas porções cristalinas e amorfa da borra tratada com peróxido de hidrogênio após hidrólise enzimática. O resultado obtido é apresentado na Figura 20.

**Figura 20 - Difratoograma da borra BPHA = Borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino; e da BPHAe = Borra de café tratada com peróxido de hidrogênio e submetida ao tratamento enzimático.**



**Fonte: elaborado pelo autor.**

Os difratogramas apresentam três picos com reflexão (002) em 22° referente à celulose do tipo cristalina, e outros dois picos em 16° (plano 101) e em 35-37° (plano 040), os quais são referentes à parte amorfa presente nas microfibrilas que consiste em hemicelulose, lignina, pectina e celulose amorfa (MIRANDA *et al.*, 2015; MU *et al.*, 2018), como citado no item 4.2.5.

Os resultados mostram que o tratamento enzimático afetou o grau de cristalinidade. As duas borras apresentaram o pico em torno de 16°, com intensidade bem próxima. No entanto, o pico em 22° relativo à celulose cristalina é maior na amostra tratada enzimaticamente. As enzimas celulase atuam primeiramente nas partes amorfas da celulose, que são mais facilmente hidrolisadas (ZHANG & LYND, 1988; SUN *et al.*, 2016). Essas fazem com que a celulose cristalina fique mais exposta, porém, dependendo da enzima que se está utilizando, a atividade enzimática da mesma pode ser influenciada pela presença de celulose cristalina. Por exemplo, a enzima celobiohidrolase presente no complexo enzimático proveniente do microrganismo *Trichoderma reesei*, em contato com celulose cristalina, reduz a atividade enzimática em até 70% (BELDMAN *et al.*, 1988). Por isso, a amostra BPHAe apresenta maior quantidade de celulose cristalina que celulose amorfa, resultando em um pico de maior intensidade em 22°. Além disso, observa-se o aumento da intensidade no pico (040) com 2θ entre 35-37° graus. Esse aumento se deve à remoção da celulose, concentrando outros

componentes na borra como a fração hemicelulósica, que é formado por unidades de galactose e manose.

Embora o pico em  $22^\circ$  foi maior para BPHAE que para BPHA, o índice de cristalinidade (IC), calculado de acordo com Segal *et al.* (1959) (Tabela 9), mostra que a amostra BPHA é mais cristalina que a BPHAE. Portanto, conclui-se que a hidrólise enzimática remove majoritariamente a celulose amorfa, porém, também age sobre a celulose cristalina. Isso indica que hidrólise enzimática foi efetiva, removendo parte da celulose e, conseqüentemente, aumentando a concentração da fração hemicelulósica, que é considerado o conteúdo amorfo majoritário da borra de café.

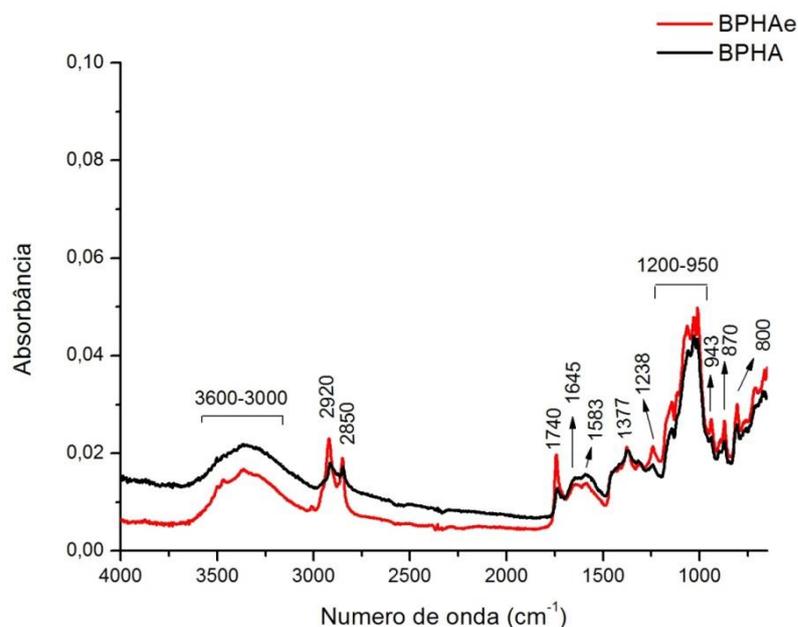
**Tabela 9 - Índice de cristalinidade da borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (BPHA) e após o tratamento enzimático (BPHAE).**

Material	IC do material (%)
BPHA	34,47
BPHAE	29,34

#### 4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 21, são mostrados os espectros obtidos da análise da fração rica em galactomananas das amostras de BPHA e de BPHA enzimaticamente hidrolisada.

**Figura 21 - Espectro FT-IR das amostras BPHA e BPHAE.**



**Fonte: elaborado pelo autor.**

A banda entre  $3600-3000\text{ cm}^{-1}$  é referente a vibrações da ligação O-H. Segundo Yang *et al.* (2007), que analisaram isoladamente a celulose, hemicelulose e lignina, a maior

intensidade nessa região foi obtida para celulose. Posteriormente, o espectro apresenta duas bandas, uma em  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , relativas à vibração simétrica e assimétrica da ligação C-H de CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> de alcanos e alquilas (MENDES *et al.*, 2017), que pode ser relacionada juntamente com a banda em torno de  $1017\text{ cm}^{-1}$  (C-OH) à celulose (THIAGAMANI *et al.*, 2017). Nessas três regiões, as bandas da BPHAE apresentaram maior intensidade que as bandas da BPHA, e isso pode ser justificado pela remoção da celulose amorfa pelo tratamento enzimático, restando majoritariamente a celulose cristalina (LENGOWSKI, 2012).

Segundo Ahola *et al.* (2008), a atividade enzimática depende das propriedades do substrato como morfologia, grau de polimerização, composição e cristalinidade. Desse modo, celuloses cristalinas são mais difíceis de serem degradadas do que a porção amorfa, por isso, a hidrólise enzimática na celulose cristalina é muito mais lenta, uma vez que essa porção não afeta a adsorção da enzima, mas sim a efetividade da celulase (YANG *et al.*, 2011).

A região entre  $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de estiramento simétrico e assimétrico da carbonila livre (C=O) (REN *et al.*, 2014) e vibração do anel aromático da lignina (PANDEY & THEAGARAJAN, 1997). Portanto, nota-se que a BPHA sem tratamento enzimático contém mais lignina que a BPHAE, indicando que a remoção de celulose pode ter ocasionado a remoção de lignina ligada a essa última, mesmo após a aplicação dos pré-tratamentos.

A banda em  $1740\text{ cm}^{-1}$  pode ser relacionada a ésteres e ao estiramento da ligação C=O presentes em hemicelulose (XU *et al.*, 2013). Como a BPHAE apresenta maior teor de hemicelulose, a banda foi mais intensa para essa amostra que para BPHA.

Quando a amostra apresenta baixa cristalinidade, as bandas entre  $900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  quase desaparecem (SYNYTSYA & NOVAK, 2014). Isso comprova que a amostra BPHAE apresenta maior cristalinidade que a BPHA, visto que as bandas nessa região são mais intensas para BPHAE que para BPHA.

A banda em  $1377\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde à vibração e deformação da ligação C-H de celulose e hemicelulose, mostrou-se com intensidade semelhante para as duas amostras, uma vez que ambas contêm celulose e hemicelulose.

Por sua vez, as bandas entre  $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$  podem ser relacionadas com as vibrações de C-O, a vibração torsional de CH<sub>2</sub> (MENDES *et al.*, 2017) ou também com a vibração das ligações glicosídicas das cadeias de polissacarídeos (BALLESTEROS *et al.*, 2017). De modo semelhante, a banda em torno de  $1150\text{ cm}^{-1}$  é atribuída às vibrações assimétricas de C-O-C de ligações glicosídicas de hemicelulose e celulose (FIGUEIRÓ *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2013).

Tal banda apresenta maior intensidade na BPHAE que na BPHA. Apesar de ter ocorrido a remoção parcial da celulose após hidrólise enzimática, também ocorreu o aumento da concentração de hemicelulose consideravelmente, influenciando na quantidade de ligações glicosídicas, como foi visto no item 4.4.1.

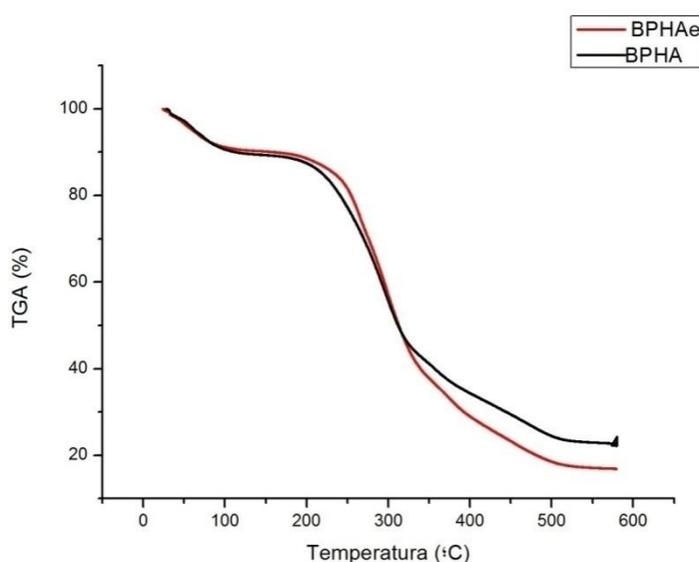
Enfim, as bandas em torno de 778 e 884  $\text{cm}^{-1}$ , que nesses espectros aparece em 800 e 870  $\text{cm}^{-1}$ , são relacionadas à presença de ligações glicosídicas  $\alpha$  e  $\beta$  referentes às unidades de galactose e manose (CERQUEIRA *et al.*, 2011c; FIGUEIRÓ *et al.*, 2004). No espectro relativo a BPHAE, essas bandas são levemente mais intensas quando comparadas com as do espectro da BPHA, visto que o primeiro apresenta maior teor de hemicelulose, especialmente galactomananas, que são compostas por unidades de galactose e manose.

Assim sendo, as maiores modificações ocorreram na região *fingerprint*, bem como as bandas relacionadas com celulose, devido a mudança na cristalinidade e na remoção parcial da celulose.

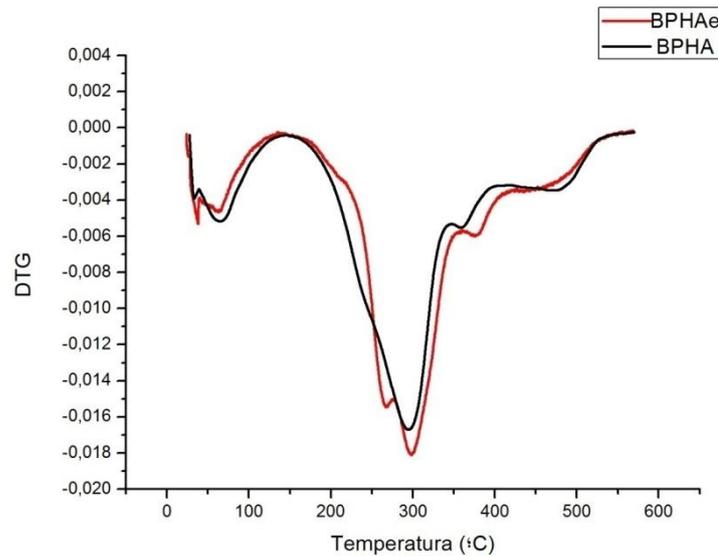
#### 4.4.4 Análise Térmica

A borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (BPHA) e a BPHA com posterior tratamento enzimático (BPHAE) foram submetidas a análise térmica (TGA). Os resultados são apresentados nas Figuras 22 e 21 na forma de curvas de perda de massa em função da temperatura, e os dados extraídos dos gráficos organizados na Tabela 10.

**Figura 22 - Curvas de TGA das amostras BPHA e BPHAE.**



**Fonte: elaborado pelo autor.**

**Figura 23 - Curvas de DTG das amostras BPHA e BPHAe.**

Fonte: elaborado pelo autor.

A BPHA apresentou uma curva com quatro estágios de perda de massa, já descritos no item 4.2.7, e a amostra BPHAe mostrou um comportamento bastante semelhante.

**Tabela 10 - Dados das curvas TGA e DTG das amostras de BPHA e BPHAe.**

Grupo	Estágio	Temp.(°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
<b>BPHA</b>	1°	32,06-125,43	9,84	
	2°	125,43-325,23	44,08	23,02
	3°	325,23-369,08	7,77	
	4°	369,08-579,72	15,29	
<b>BPHAe</b>	1°	25,62-120,57	9,18	
	2°	120,57-348,62	52,44	17,22
	3°	348,62-404,64	9,71	
	4°	404,64-576,40	11,46	

Analisando a Tabela 10, verifica-se que o primeiro estágio das duas amostras corresponde à perda de umidade ou desidratação das amostras, que ocorre entre 25 até 130°C. O segundo estágio, que vai de 120 até 370°C, pode ser relacionado com a despolimerização da hemicelulose. Nota-se que, para a BPHAe, esse estágio inicia antes que para a BPHA, além de ocorrer uma maior perda de massa, equivalente a 52%. Isso ocorre porque foi removida parte da celulose da BPHA e esta é, portanto, constituída majoritariamente por hemiceluloses,

que são menos resistentes a altas temperaturas. Segundo Simões *et al.* (2014), as arabinogalactanas são os polissacarídeos mais vulneráveis presentes no café, sendo grande parte degradada durante a torrefação. A galactomanana e a celulose são mais resistentes que a arabinogalactana. As galactomananas degradam, geralmente, em torno de 315°C, enquanto a celulose degrada em torno de 355°C (YANG *et al.*, 2007). Com isso, o terceiro estágio pode ser atribuído à degradação térmica da celulose, entre 350-430°C. Nesse estágio, a BPHA e a BPHAE sofrem perdas em quantidades semelhantes, entre 7-10%.

Por último, no quarto estágio que inicia a 430°C, ocorre a degradação das estruturas mais complexas, como a da lignina. Assim sendo, conclui-se que BPHA apresenta maior teor de lignina que a BPHAE, uma vez que a perda na BPHA foi de 15,45% e na BPHAE foi de 11,46%. Isso reafirma os dados obtidos pela análise de FTIR, discutida no item 4.4.3, mostrando que, concomitantemente à remoção da celulose, parte da lignina remanescente também é removida.

#### **4.5 Desenvolvimento e Caracterização dos Filmes**

Os filmes foram desenvolvidos de acordo com a metodologia adotada por Batista (2017). A borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e a borra submetida ao tratamento enzimático foram dissolvidas usando cloreto de zinco 67% (m/m) (XU *et al.*, 2016). O método adotado foi inversão de fase com precipitação por imersão. Para isso, a solução filmogênica foi feita à temperatura de 65°C. O banho de coagulação foi feito com álcool etílico, a 8°C, por meia hora. Na etapa seguinte, o não-solvente utilizado foi a água, e o banho de imersão em água foi feito a 65°C, durante 3-5 minutos. Por fim, os filmes foram deixados a temperatura ambiente para secagem.

Para caracterizar os filmes foram feitas análise colorimétrica, microscopia de varredura eletrônica, difração de raio X, análises térmicas como TGA/DSC, análise de espectroscopia no infravermelho médio, análise de permeabilidade ao vapor de água e análise de propriedades mecânicas de tração.

##### **4.5.1 Análise Colorimétrica**

Os filmes foram analisados no colorímetro obtendo os resultados expostos na Tabela 11, que expressam a cor por meio de valores numéricos. Confirmando a diferença entre os filmes observada a olho nu (Figura 24), os parâmetros luminosidade ( $L^*$ ),  $a^*$  e  $b^*$  mostraram ser significativamente diferentes entre si.

**Tabela 11- Resultados dos parâmetros de cor L\*, a\* e b\* das amostras dos filmes.**

<b>Amostras</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
Filme BPHA	52,21 ± 0,011 <sup>a</sup>	17,57 ± 0,02 <sup>a</sup>	45,63 ± 0,03 <sup>a</sup>
Filme BPHAE	68,59 ± 0,03 <sup>b</sup>	7,57 ± 0,02 <sup>b</sup>	46,60 ± 0,03 <sup>b</sup>

Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Analisando o parâmetro L\*, nota-se que o filme formado pela borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino associado à hidrólise enzimática (filme BPHAE) apresenta maior valor de L\* que o filme BPHA. O parâmetro L\* varia de 0 a 100 e representa a escala de claro e escuro, assim sendo, quanto mais próximo de 100 for o L\*, mais clara é a amostra (MINOLTA, 2007). Portanto, o filme BPHAE é mais claro que o filme composto somente pela BPHA.

O parâmetro a\* representa a gama de cor que vai do verde ao vermelho. De acordo com Figura 13, do item 4.2.3, quando a\* é positivo tende para o vermelho, e quando a\* é negativo tende para cor verde. Ambos os filmes apresentaram valor de a\* com intensidade fraca, visto que a escala varia de 0-60. No entanto, o filme BPHA tende mais para coloração vermelha que o filme BPHAE. Por isso, a olho nu o filme BPHA tem coloração mais amarronzada quando comparado com o filme BPHAE (Figura 24).

Apesar dos filmes serem significativamente diferentes, estes exibem coloração que tendem para o amarelo. Com base no círculo cromático CIELAB (Figura 13, item 4.2.3), o parâmetro b\* expressa a gama de cor que varia do azul (-b\*) para o amarelo (b\*), com escala variando de 0-60. Os valores b\* para os filmes são bem próximos, positivos e variam 30-40, indicando que ambos tendem para coloração amarela, com intensidade alta.

**Figura 24 - Filmes desenvolvidos: filme superior a partir da BPHA e filme inferior a partir da BPHA enzimaticamente tratada.**

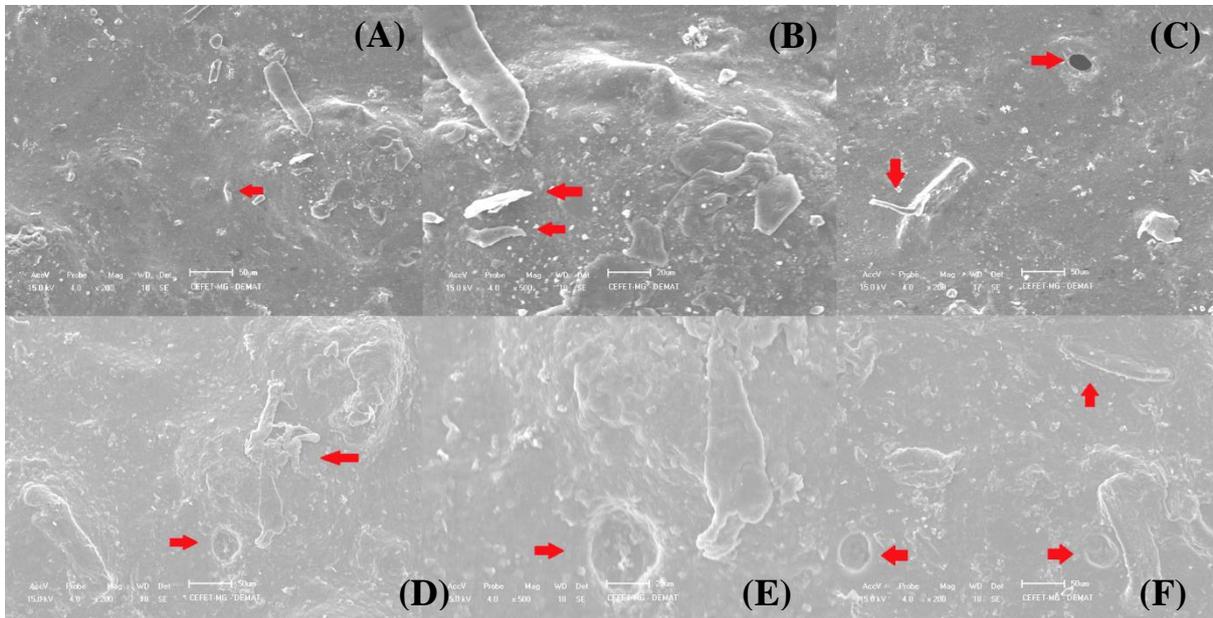


Além da coloração dos filmes, é notória a opacidade em ambos. A opacidade é uma característica importante na proteção contra a luz, principalmente, quando se aplica para alimentos (BALLESTEROS *et al.*, 2017). Essa opacidade pode ser relacionada com o entrelaçamento das cadeias durante a formação de filme, reduzindo a mobilidade da cadeia e quase extinguindo os espaços vazios no filme (NAFCHI *et al.*, 2017), ou também pode ser atribuída a concentração de lipídeos na BPHA, a qual apresentou valor considerável (14,36 % m/v) (YANG & PAULSON, 2000).

#### 4.5.2 Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens contidas na Figura 25 foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico de varredura (com ampliação de 200 vezes e 500 vezes) e correspondem à morfologia dos filmes elaborados com borra de café, sem e com tratamento enzimático.

**Figura 25 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura filmes: (A) Filme BPHA 200x B) Filme BPHA 500x C) Filme BPHA 200x D) Filme BPHA tratamento enzimático 200 x E) Filme BPHA tratamento enzimático 500 x F) Filme BPHA tratamento enzimático 200x**



É possível observar que ambos os filmes são bastante heterogêneos, com a presença de rugosidade, discontinuidades, ondulações e cumes. A heterogeneidade do filme pode ser decorrente da presença de regiões cristalinas ou devido a incompatibilidade das substâncias em solução aquosa. Ademais, o aspecto superficial do filme pode ser influenciado pelas condições de formação deste, como espessura do filme e taxa de secagem. Se a secagem ocorre em curto tempo, originam regiões em que os componentes se encontram pouco agregados, porém, se a taxa de secagem é menor e essa ocorre em tempo maior, não altera significativamente a superfície do filme (RINDLAV-WESTLING & GATENHOLM, 2003).

Nas Figuras 25A, 25B e 25C, observa-se que o filme produzido a partir da borra sem tratamento enzimático apresenta muitas estruturas fibrilares de celulose, em escala micrométrica, ao longo da matriz. Embora o filme constituído pela borra pós-hidrólise enzimática ainda contenha estruturas fibrilares de celulose, estas estão presentes em menor quantidade. A presença de estruturas fibrilares de celulose é esperada para o filme com a borra sem tratamento enzimático, já para os filmes com a borra tratada enzimaticamente, verifica-se que o tratamento enzimático não foi capaz de remover todas as fibras, e torná-las partículas nanométricas (LACERDA, 2012).

Além disso, as imagens relativas aos dois filmes apresentam pequenas bolinhas que podem ser grumos formados por galactomananas, que podem ser formados durante a secagem

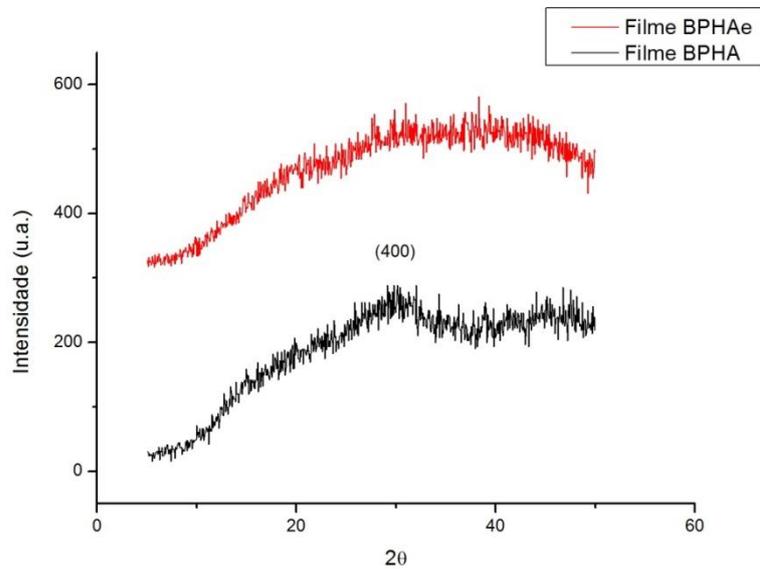
do filme ou na produção do filme (CRUZ, 2014). De acordo com Rodriguez *et al.* (2017), outros polissacarídeos, como a goma carragena apresentam fases insolúveis, e os filmes formados a partir dessas são rugosos.

Outra característica observada em ambos os filmes são os poros, presentes majoritariamente no filme oriundo da borra enzimaticamente tratada. Tais poros são formados na superfície devido ao processo de produção do filme. Na inversão de fases com precipitação por imersão, os filmes são colocados no banho com o não solvente. O solvente presente no filme migra para o banho com certo fluxo (F1), e o não-solvente migra para o filme com fluxo diferente (F2). Essa troca ocorre até alcançar a estabilidade termodinâmica. Se o fluxo F1 é maior do que o fluxo F2 são formados poros na membrana de 10-300 Å, porém se o fluxo F1 é igual a F2, são formados poros entre 0,2-0,5 µm (LALIA *et al.*, 2013). A presença dos poros pode explicar o aumento da permeabilidade ao gás e o teor de umidade dos filmes (NAFCHI *et al.*, 2017). Além disso, a presença de imperfeições, como os poros, modifica o mecanismo de transferência de vapor de água (DÍAZ-SOBAC *et al.*, 2002).

#### 4.5.3 Cristalinidade

A difração de raio X foi empregada para analisar as transições estruturais dos filmes produzidos com a borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, bem como o filme oriundo da borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e submetida a hidrólise enzimática para remoção de celulose. Em filmes, a presença de regiões cristalinas e regiões não cristalinas pode influenciar as propriedades de barreira ao oxigênio. Filmes com maior cristalinidade apresentam maior barreira ao oxigênio devido à estrutura formada por ligações de hidrogênio (CÁZON *et al.*, 2017). Os resultados das análises por difração de Raios-X para os filmes produzidos são apresentados na Figura 26.

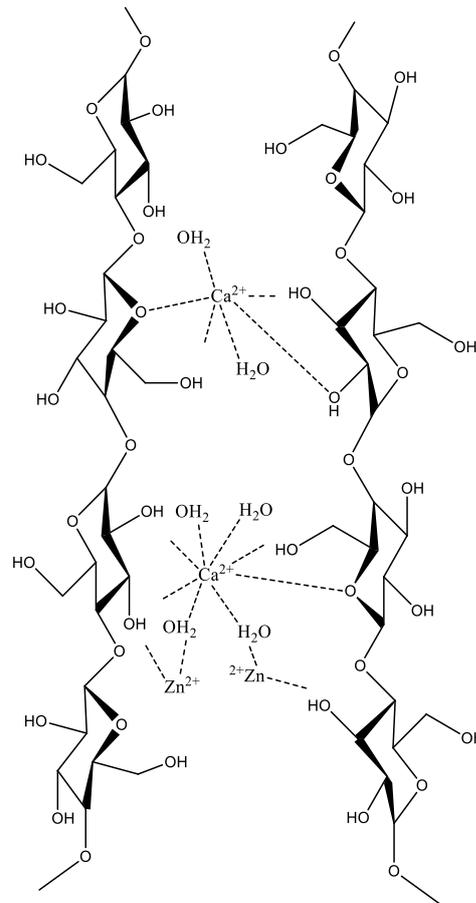
**Figura 26 - Difratoograma para filmes produzidos com BPHA, e outro com BPHA e hidrólise enzimática. BPHA=borra tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.**



Fonte: elaborado pelo autor.

Analisando a Figura 26, o filme produzido com BPHA mostra-se semicristalino com um pico em torno de  $2\theta = 30^\circ$ , o qual é característico de compostos com carbonato de cálcio (SANTOS *et al.*, 2014) que não aparece no filme produzido com BPHAe. Desta maneira, conclui-se que no filme BPHA houve maior interação entre o íon  $\text{Ca}^+$  e a matriz da amostra, provavelmente com a celulose, formando ligações cruzadas (crosslinking) e tornando o filme mais resistente à tração e impactos (XU *et al.*, 2016). No entanto, com a remoção parcial da celulose, o filme com BPHAe interagiu de modo menos efetivo com os íons de cálcio, formando ligações entre as moléculas de galactomanana mais fortes que as ligações da celulose com os íons de zinco e cálcio (Figura 27).

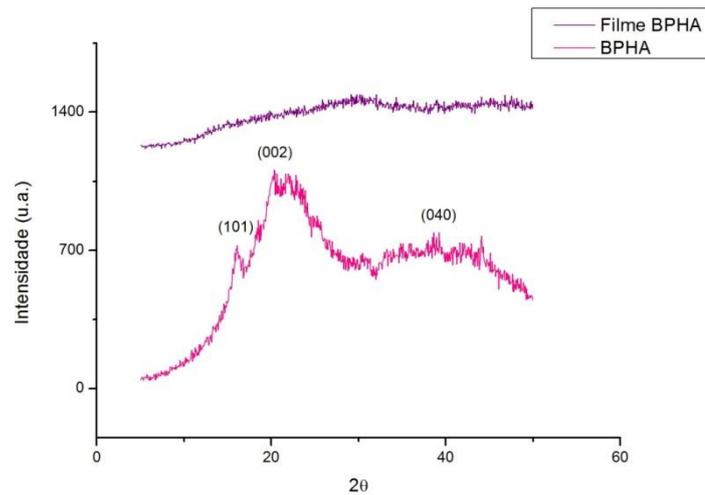
**Figura 27 - Crosslinking entre cadeias de celulose e íons  $\text{Ca}^{2+}$ .**



**Fonte: XU *et al.*, 2016, modificada.**

Nota-se que, após a formação do filme, a BPHA sofre uma mudança estrutural, em que os picos desaparecem em aproximadamente  $2\theta=16^\circ$  e  $2\theta= 21-24^\circ$  (Figura 28). Esse resultado mostra que houve uma redução da cristalinidade. Resultados similares foram observados por Martins *et al.* (2012) em um filme composto por goma de alfarroba (galactomananas).

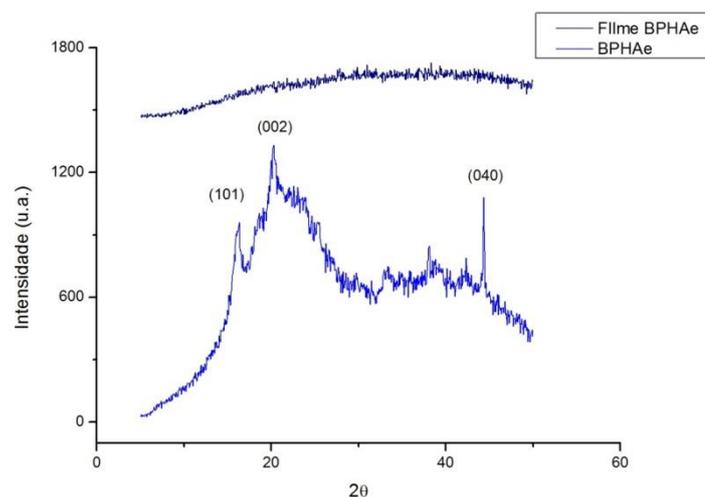
**Figura 28 - Comparação entre BPHA e filme BPHA.**



Fonte: elaborado pelo autor.

De modo semelhante, o filme produzido pela BPHAE é predominantemente amorfo (Figura 29), visto que os picos presentes em  $2\theta = 16^\circ$  e  $21-24^\circ$  referentes à celulose tipo I e tipo II, e  $35-37^\circ$  (plano 040), relacionados à parte amorfa presente nas microfibrilas, que consiste em hemicelulose amorfa (MIRANDA *et al.*, 2015; MU *et al.*, 2018), são inexistentes no difratograma do filme, além de não apresentarem alargamento de banda próximo de  $2\theta = 30^\circ$ .

**Figura 29 - Comparação entre BPHAE e filme BPHAE.**



Fonte: elaborado pelo autor.

A mudança estrutural causada quando ocorre a formação do filme pode ser justificada pela interação com a água que induz a transição estrutural de cristalina para amorfa. Desse modo, provoca um impacto na mobilidade molecular e, também, nas propriedades funcionais (YAKIMETS *et al.*, 2007). Além disso, a perda da cristalinidade da celulose pode ter sido

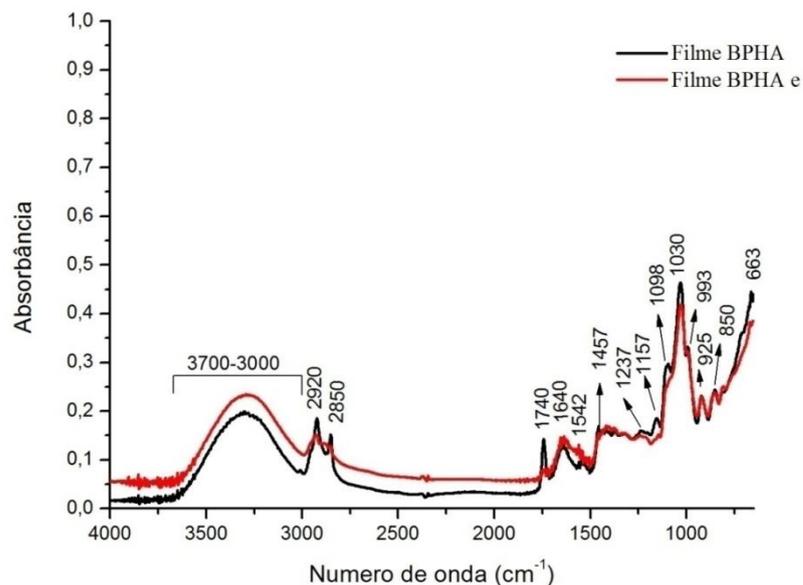
ocasionada pela interação dos íons  $Zn^{2+}$  com cadeias de celulose por meio de ligação de hidrogênio na formação do filme (Xu *et al.*, 2016).

Ballesteros *et al.* (2017) analisaram filmes de carboximetil celulose (CMC) acrescidos de borra de café, a qual foi submetida ao pré-tratamento alcalino e outra a autohidrólise, obtendo um resultado semelhante aos dos filmes do presente estudo, em que, ao formar o filme, ocorre uma mudança na cristalinidade da matéria-prima. Contudo, ao analisar as borras de café tratadas com álcali ou submetidas à auto-hidrólise, estas demonstraram ser predominantemente amorfas e, quando associada à CMC, ocorre uma interação aumentando a cristalinidade do filme.

#### 4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 30, são mostrados os espectros obtidos para os filmes procedentes da borra de café tratada com peróxido de hidrogênio (BPHA) e borra de café tratada com peróxido de hidrogênio e associada à hidrólise enzimática (BPHAe).

**Figura 30 - Espectros dos filmes desenvolvidos BPHA e BPHAe.**



Comparando o espectro obtido para os filmes (Figura 30) e o espectro obtido para as borras utilizadas para o desenvolvimento dos filmes (Figura 21, item 4.4.3), percebe-se que as maiores mudanças ocorreram em 1600-800  $cm^{-1}$ . Essa zona apresenta um padrão complexo de bandas associadas aos polissacarídeos, mostrando-se sensível a mudanças conformacionais (BARBOSA, 2007; CASTAÑO *et al.*, 2017). Outra diferença observada foi na intensidade dos picos depois da formação do filme, que pode ser explicada pelas interações químicas e

físicas com outros compostos da matriz (BALLESTEROS *et al.*, 2018). O cloreto de zinco, usado para dissolver a borra de café, interage com a celulose por meio de ligações de hidrogênio e, conseqüentemente, promove a quebra das ligações de hidrogênio intermoleculares dos polissacarídeos (XU *et al.*, 2016).

A banda entre 3700-3000  $\text{cm}^{-1}$  é referente às vibrações das ligações -OH e possivelmente foi intensificada devido ao uso de glicerol durante a produção dos filmes. Os plastificantes, como o glicerol, diminuem a força molecular entre as cadeias poliméricas, resultando em maior absorção de água (CUNHA *et al.*, 2019). As bandas entre 2920 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações assimétricas e simétricas da ligação C-H (ANTONIOU *et al.*, 2014). Observa-se que estas foram mais intensas para o filme BPHA que para o filme BPHAE, possivelmente devido a maior mobilidade dos polissacarídeos no primeiro filme, enquanto no segundo as ligações entre as galactomananas são mais fortes e rígidas.

Além disso, são evidentes, na região entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ , diferenças existentes entre o filme BPHA e o BPHAE. O BPHA apresenta uma banda com absorção em 1457 $\text{cm}^{-1}$ , quase inexistente no filme BPHAE, a qual está relacionada com o estiramento das ligações C-O-H (CAO *et al.*, 2018), correspondentes às ligações de hidrogênio que ocorrem majoritariamente entre as moléculas de celulose e que são intensificadas com a presença do  $\text{ZnCl}_2$  e do  $\text{CaCl}_2$  (BARBOSA, 2007; XU *et al.*, 2016). Como visto na análise de difração de raio X, essa interação é mais efetiva no filme BPHA.

Do espectro, também são observadas diferenças nas bandas em 1157 e 1030  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem ao estiramento das ligações glicosídicas C-O presentes nas cadeias dos polissacarídeos (BALLESTEROS *et al.*, 2018). O espectro do filme BPHA apresenta bandas com maior intensidade nessa região, porém, a diferença em relação ao espectro do filme BPHAE não é extrema, podendo ser justificada pela diferença na quantidade de celulose nos filmes.

Em suma, foram observadas pequenas modificações em relação aos espectros obtidos para as borras utilizadas para o desenvolvimento dos filmes e os filmes, bem como no estudo de Batista (2017), as quais supõem serem ocasionadas pelas interações dos cátions  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  com as hidroxilas dos polissacarídeos presentes na matriz do filme (XU *et al.*, 2016).

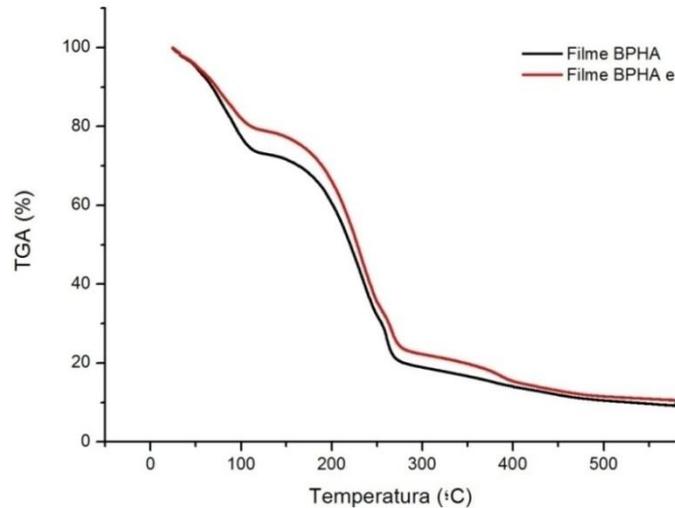
#### 4.5.5 Análise Térmica

##### 4.5.5.1 Análise por Termogravimetria (TGA)

Como objetivo de avaliar a estabilidade térmica dos filmes, foram feitas análises termogravimétricas destes. Quando os filmes foram expostos ao aquecimento até 580°C, em

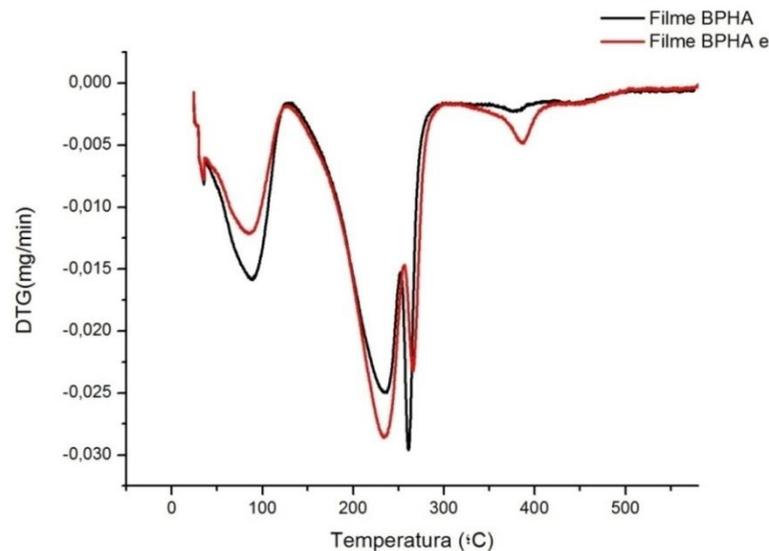
atmosfera inerte, estes degradaram em quatro estágios diferentes com perfis bem semelhantes como mostrados nas Figuras 31 e 32.

**Figura 31 - Análise termogravimétrica dos filmes - Curvas de TGA.**



Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 32 - Análise termogravimétrica dos filmes - Curvas da DTG.**



Fonte: elaborado pelo autor.

Dados específicos foram extraídos das curvas e são apresentados na Tabela 12. O primeiro estágio (32-123°C) consiste na perda de umidade. O filme BPHA teve uma perda de massa de 24,88%, sendo esta aproximadamente 6% maior que a perda de massa do filme BPHAE, que foi de 19,01%. Esse comportamento pode ser justificado pela maior concentração de celulose, que, por sua vez, adsorve mais água. O segundo estágio, que

ocorreu entre 121 e 255°C, com a maior perda de massa, que pode ser relacionado com a degradação da fração hemicelulósica, que é termicamente menos resistente que a celulose (YANG *et al.*, 2007). No filme formulado com BPHAE, a perda de massa nesse estágio foi maior que para o filme BPHA. A maior perda de massa do filme BPHAE ocorreu devido a maior quantidade de hemicelulose presente na borra tratada utilizada para produzir o filme. Além disso, essa perda de massa foi relacionada com a evaporação do glicerol (CERQUEIRA *et al.*, 2012).

O estágio posterior (246-279°C) é associado à degradação da celulose. No filme produzido com BPHA, a perda de massa foi de 11,26% nesse estágio, enquanto o filme BPHAE perdeu 9,96%. Esse último teve menor perda uma vez que a hidrólise enzimática agiu retirando parte da celulose constituinte da BPHA.

Por fim, o estágio 4, que vai de 266 a 579°C é relativo à degradação da lignina e matéria inorgânica (MENDES *et al.*, 2017), que corresponde a 13,63 % no filme BPHA e 13,13% no filme BPHAE. Desse modo, o resíduo das amostras foi de 10,95% e 12,38% para as amostras do filme BPHA e filme BPHAE, respectivamente.

**Tabela 12 - Dados das curvas TGA e DTG dos filmes BPHA e BPHAE.**

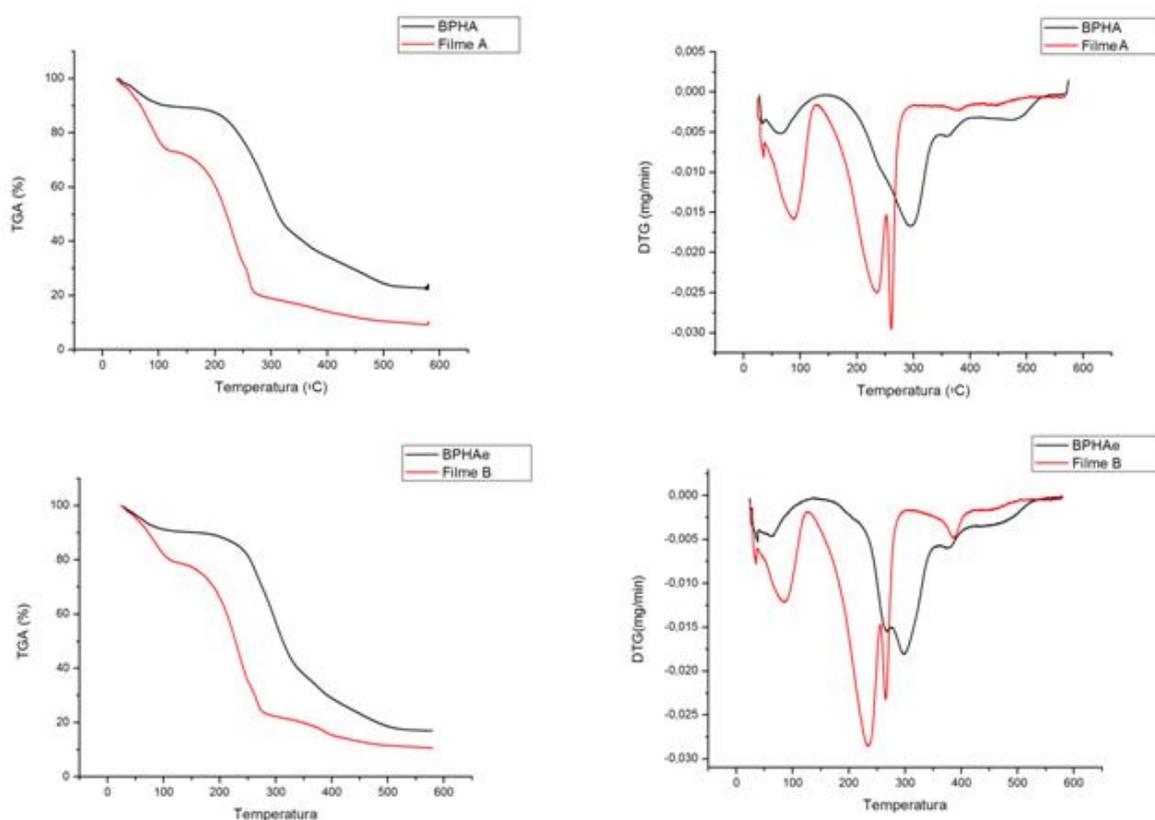
<b>Grupo</b>	<b>Estágio</b>	<b>Temp.(°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>	<b>Resíduo (%)</b>
<b>Filme BPHA</b>	1°	32,82-123,25	24,88	
	2°	123,25-246,02	39,29	
	3°	246,02-266,00	11,26	10,95
	4°	266,00-571,73	13,63	
<b>Filme BPHAE</b>	1°	33,05-121,07	19,01	
	2°	121,07-254,55	45,53	
	3°	254,55-278,98	9,96	12,38
	4°	278,98-578,98	13,13	

Braga (2018), que utilizou a hemicelulose extraída do bagaço de cana para o desenvolvimento de filmes poliméricos, obteve resultados semelhantes aos do atual trabalho, diferenciando apenas em relação às faixas de temperatura em que ocorrem as degradações. As curvas térmicas obtidas apresentaram quatro estágios, em diferentes temperaturas de acordo com a concentração de hemicelulose utilizada para cada filme. O primeiro estágio, a perda de massa relacionada à umidade das amostras ocorreu em torno de 50°C para algumas amostras e a 73°C para outra. No segundo estágio, houve a perda de massa entre 35-40%, relativa à

galactomananas e xiloglucanas, com pico em 315°C. Já no terceiro estágio, a perda de massa foi relacionada com a celulose residual extraída juntamente com a fração hemicelulósica, ocorrendo entre 400-490°C. E, por último, o quinto estágio correspondeu à degradação de moléculas com massa molecular mais elevada como a lignina.

Ademais, foi analisado o comportamento térmico da fração predominantemente constituída de polissacarídeos e os filmes, obtendo os gráficos mostrados na Figura 33.

**Figura 33- Comparação da análise das frações ricas em polissacarídeos e os filmes (a) Curvas de TGA BPHA e filme BPHA; (b) Curvas da DTG BPHA e filme BPHA; (c) Curvas de TGA BPHAE e filme BPHAE; (d) Curvas de DTG BPHAE e filmes BPHAE.**



Fonte: elaborado pelo autor.

Da Figura 33, nota-se que, quando as amostras utilizadas para os preparos dos filmes e os filmes preparados são expostos a altas temperaturas, esses apresentam comportamentos diferentes. Os filmes iniciam a perda de massa em temperaturas inferiores quando comparados com os materiais ricos em polissacarídeos. A maior perda de massa dos filmes ocorre em aproximadamente 100°C, antes que a maior perda de massa das amostras BPHA e BPHAE.

Essa diferença de comportamento pode ser justificada pela interação das amostras empregadas no preparo de filme e o cloreto de zinco. O  $ZnCl_2$  solubiliza as amostras pela

quebra de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares dos polissacarídeos, com isso, aumentando a distância entre os polímeros e reduzindo a coesão (BAKER, 2012; XU *et al.*, 2016). Além disso, quando o  $ZnCl_2$  dissolve os polissacarídeos, esse pode provocar a degradação parcial dos mesmos, dependendo das condições empregadas (LU & SHEN, 2011).

Sen *et al.* (2016) descreveram a ação do  $ZnCl_2$  na dissolução da celulose em água e constataram que a celulose regenerada, após a dissolução com o cloreto de zinco hidratado, apresentou uma variação na temperatura de degradação térmica, sendo menos estável termicamente do que a celulose inicial. De modo semelhante, Lin *et al.* (2016) estudaram o efeito do cloreto de zinco na dissolução do amido e verificaram que degradação do amido era maior em maiores concentrações e temperaturas mais elevadas. Com o uso do  $ZnCl_2$  67%, a temperatura de degradação térmica reduzia em quase  $100^\circ C$  para amostra regenerada, assim como foi observado no presente estudo.

Essa interação da fração rica em polissacarídeos com o cloreto de zinco também justifica a diferença de temperatura na degradação dos filmes encontrada nesse estudo quando comparada com outros estudos que desenvolveram filmes com polissacarídeos, em que a degradação dos polissacarídeos se iniciou em torno de  $300^\circ C$  (MENDES *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2018; THIAGAMANI *et al.*, 2017).

#### 4.5.5.2 Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A partir da análise DSC, obteve-se as temperaturas de transição vítrea dos filmes desenvolvidos, expostas na Tabela 13. Os termogramas da análise DSC dos filmes são apresentados nos Anexos A e B.

**Tabela 13 - Temperatura de transição vítrea dos filmes.**

<b>Amostra</b>	<b>Tg (<math>^\circ C</math>)</b>
Filme BPHA	-9,80
Filme BPHAE	-3,05

Os dois filmes apresentaram uma única temperatura de transição vítrea. De forma semelhante, Batista (2017), que tratou a borra de café com diversas concentrações de peróxido de sódio alcalino, obteve uma única temperatura de transição vítrea para o filme com borra tratada com peróxido alcalino em concentração semelhante à do atual estudo (35%). Essa foi negativa e com valor ( $-2,26^\circ C$ ) próximo ao do encontrado para o filme BPHAE.

De acordo com Al-Hassan & Norziah (2012), quando o filme apresenta somente um evento de Tg, significa que todos os componentes (matéria-prima, plastificante, aditivos) são compatíveis. Dessa forma, os constituintes utilizados nos filmes do presente estudo são

compatíveis. Assim sendo, o estudo da Tg fornece informações em relação à miscibilidade e compatibilidade dos constituintes da matriz (CORRADINI *et al.*, 1999).

Além disso, o valor de Tg pode ser relacionado com o melhor desempenho do filme quanto à permeação de gases ou vapor d'água, uma vez que à temperaturas mais altas que a Tg, o arranjo das moléculas se encontra no estado vítreo (HORNUNG *et al.*, 2017). No entanto, como ambos os filmes apresentam Tg negativa, se utilizados como embalagem para alimentos, estes devem ser acondicionados à temperatura de 0 a 10°C, para evitar prejuízo da qualidade da embalagem (MANZALLI, 2006).

Comparando o valor de Tg encontrado para os filmes, observou-se que, com a hidrólise enzimática, ou seja, com a remoção parcial da celulose, a Tg foi aumentada. Segundo Chaires-Martínez *et al.* (2008), a razão M/G e a estrutura das cadeias dos polímeros exerce grande influência na Tg. Portanto, estudos mostraram que, quanto maior a razão M/G, menor o valor de Tg (MIKKONEN *et al.*, 2007). Em contrapartida, a distribuição de galactoses na cadeia de manana pode influenciar na interação entre as cadeias de galactomananas e afetar o valor de Tg. Assim sendo, galactomananas com alta razão M/G podem proporcionar o aumento de Tg (BRESOLIN *et al.*, 1998; CHAIRES-MARTÍNEZ *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2015). Isso justifica o maior valor de Tg encontrado para o filme BPHAE.

Baseando na teoria clássica dos polímeros polares, a água e os plastificantes podem diminuir a Tg de polímeros semicristalinos ou amorfos. Estes formam ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos polímeros, se alocando entre as cadeias e aumentando o volume livre entre estas (JANJARASSKUL & KROCHTA, 2010). Desse modo, diminuem a viscosidade, e conseqüentemente, aumentam a mobilidade e reduzem o valor da Tg (BERTAN, 2008). Comparando o valor da Tg dos filmes com a Tg do café (59°C) (RIVERA *et al.*, 2011), nota-se que ocorreu uma significativa diminuição no valor. Essa modificação pode ter sido ocasionada pela umidade e/ou adição de glicerol e sais durante o desenvolvimento do filme. Além disso, a parede celular intacta do café apresenta uma organização mais coesa das moléculas.

#### 4.5.6 Análise de Permeabilidade dos Filmes ao Vapor de Água

A permeabilidade dos filmes é uma das propriedades mais importantes para a aplicação destes, que consiste na permeabilidade ao vapor d'água e a gases, como o CO<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub> (BERTAN, 2008). Essa propriedade funcional consiste na quantificação do quanto um material é permeável de um lado para o outro do filme, quando este é submetido à diferença

de concentração destes gases e vapores. Para quantificar a permeabilidade, é necessário conhecer a área do filme exposto bem como a respectiva espessura (BATISTA, 2004).

Os dados apresentados na Tabela 14 representam os valores obtidos de permeabilidade ao vapor d'água para os filmes.

**Tabela 14- Espessura e valor de permeabilidade ao vapor de água (PVA) dos filmes desenvolvidos BPHA e BPHAE.**

Amostra	Espessura (mm)	PVA (gmm/m <sup>2</sup> hkPa)	PVA (g/mmsPa)
Filme BPHA	0,275 ± 0,062 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,32 × 10 <sup>-11</sup>
Filme BPHAE	0,259 ± 0,056 <sup>a</sup>	3,34 ± 0,52 <sup>b</sup>	9,35 × 10 <sup>-11</sup>

Valores médios ± desvio padrão (n =4)

Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Analisando os resultados, nota-se que o filme BPHAE é mais permeável ao vapor d'água que o filme BPHA. Segundo Nafchi *et al.* (2017), os filmes constituídos de polissacarídeos formam fracas barreiras ao vapor d'água, dado que os polissacarídeos são hidrofílicos.

Os filmes são considerados fracas barreiras ao vapor de água quando apresentam valor de PVA entre 0,4 e 4,2 gmm/m<sup>2</sup>hkPa; são barreiras moderadas quando os valores de PVA variam de 0,004 a 0,4 gmm/m<sup>2</sup>hkPa; e são considerados boas barreiras quando PVA se encontra entre 4×10<sup>-3</sup> e 4×10<sup>-4</sup> gmm/m<sup>2</sup>hkPa (KROCHTA & MULDER-JOHNSON, 1997). Desse modo, os filmes analisados são considerados barreiras fracas ao vapor d'água.

De acordo com Dos Santos *et al.* (2015), que analisaram a relação das propriedades dos filmes constituídos de galactomananas com a razão manose/galactose (M/G), os filmes formados com galactomananas com baixa razão M/G apresentam maior PVA, uma vez que a redução das unidades de galactose promove uma melhor hidratação e difusão de água, devido às lacunas entre as cadeias dos polissacarídeos (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1998). No entanto, filmes formados com galactomananas com razão M/G acima de 3 apresentam menor permeabilidade ao vapor d'água por aumentar a força intermolecular entre as unidades de manose (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

O filme desenvolvido por Dos Santos *et al.* (2015), utilizando goma de alfarroba, exibiu PVA igual a 9,16 × 10<sup>-11</sup> g/mm.s.Pa, valor semelhante ao filme BPHAE aqui obtido (9,35 × 10<sup>-11</sup>g/mmsPa), que possibilita inferir que a BPHAE apresenta razão M/G semelhante a da goma de alfarroba. O melhor resultado mostrado pelo filme BPHA pode ser justificada pela

efetiva interação entre a celulose e os íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , formando um arranjo tridimensional (RHIM *et al.*, 1998). Com isso, os polissacarídeos ficam menos disponíveis para ligações com moléculas de água e, portanto, com menores valores de PVA. Todavia, no filme BPHAE, como as ligações com o  $\text{Ca}^{2+}$  não são tão eficientes, os polissacarídeos que são constituídos predominantemente de galactomananas se ligam fortemente, porém, apresentam quantidades apreciáveis de grupos OH disponíveis que absorvem as moléculas de água.

Costa *et al.* (2018), os quais desenvolveram filmes com alginato, verificaram que filmes sem adição de cloreto de cálcio apresentam PVA entre  $10,50 \times 10^{-11}$  g/mmsPa, enquanto com a adição de 1%, a PVA reduz para  $3,71 \times 10^{-11}$  g/mmsPa. O alginato forma ligações cruzadas com  $\text{CaCl}_2$ , deixando-o menos exposto, reduzindo, desta maneira, a adsorção de água.

Ademais, a concentração de glicerol utilizada na formulação do filme pode influenciar consideravelmente as interações intermoleculares entre as cadeias do polímero. Quanto maior a concentração de glicerol, menores as forças intermoleculares entre os biopolímeros, resultando no aumento do volume livre e do movimento entre os polissacarídeos. Dessa forma, ocorre maior difusão das moléculas de água com maior facilidade, fazendo com que a PVA seja maior (JOUKI *et al.*, 2013; SOTHORNVIT & KROCHTA, 2001).

#### 4.5.7 Análises das Propriedades Mecânicas

Assim como a permeabilidade ao vapor d'água, as propriedades mecânicas do filme são parâmetros importantes para o emprego de biofilmes como embalagens, para que estes não percam suas propriedades durante o manuseio e armazenamento. Dessa forma, biofilmes devem apresentar certa resistência à ruptura, e, também, flexibilidade, permitindo a deformação sem que ocorra ruptura (VICENTINI, 2003).

Dentre as propriedades mecânicas dos filmes, as principais são a resistência à tração e a porcentagem de alongação. A resistência a tração corresponde à tração máxima desenvolvida nos filmes até a ruptura destes, e a porcentagem de alongação representa a habilidade dos filmes de se estenderem, ou seja, o quanto o filme deforma até a respectiva ruptura (MACLEOD *et al.*, 1997; BERTAN, 2008).

As propriedades mecânicas podem ser relacionadas com a natureza do material que origina o filme e a coesão da matriz polimérica, bem como com a formulação e método adotado na produção deste (VIEIRA *et al.*, 2011). Assim sendo, a maneira como os polímeros se ligam, e o emprego de aditivos, como plastificantes, afetam consideravelmente as características do filme (CUQ *et al.*, 1998; MALI *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos para as análises das propriedades mecânicas dos filmes BPHA e BPHAE podem ser observados na Tabela 15. As curvas de força (N) por deformação (mm) foram incluídas nos anexos C e D.

**Tabela 15 - Propriedades mecânicas dos filmes BPHA e BPHAE.**

	<b>Resistência a tração (<math>\sigma</math>) (MPa)</b>	<b>Elongação na ruptura (<math>\epsilon</math>) (%)</b>	<b>Modulo de elasticidade (MPa)</b>	<b>Espessura (mm)</b>
Filme BPHA	0,2986 <sup>a</sup>	13,1814 <sup>a</sup>	4,7757 <sup>a</sup>	0,3043 <sup>a</sup>
Filme BPHAE	0,2057 <sup>a</sup>	5,2629 <sup>b</sup>	8,4886 <sup>b</sup>	0,2614 <sup>a</sup>

Valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=7).

Médias com letras diferentes em uma mesma coluna indicam que os valores apresentam diferença significativa entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Comparando as propriedades mecânicas dos dois filmes, percebe-se que estes exibem valores semelhantes para resistência a tração, os quais não apresentaram diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Em relação à elongação na ruptura, o valor encontrado para o filme BPHA foi igual a 13,18%, enquanto a para o filme BPHAE essa foi 5,26 %. Isso mostra que o filme BPHAE deforma menos em relação ao filme BPHA, quando é submetido a uma força de tração.

A partir dos resultados, infere-se que a remoção parcial da celulose resultou na menor capacidade de deformação quando uma força é aplicada sobre o filme. A remoção da celulose reduz as ligações cruzadas que ocorrem quando o íon cálcio se liga ao grupo COO- da celulose. Xu *et al.* (2016), que estudaram a interação da celulose com  $ZnCl_2$  e  $CaCl_2$  no desenvolvimento de filmes, encontraram valores de resistência a tração entre 0,069 e 0,088  $N/mm^2$ , enquanto o filme sem  $ZnCl_2$  e  $CaCl_2$  apresentou valor igual a 0,022  $N/mm^2$ , reafirmando que ligações cruzadas entre os polissacarídeos e o íon  $Ca^{2+}$  melhoram as propriedades do filme. No entanto, os valores obtidos foram inferiores aos valores do atual estudo.

Por último, verificou-se que o módulo de elasticidade dos dois filmes se distanciou bastante, sendo o módulo de elasticidade do filme BPHAE duas vezes maior do que o módulo do filme BPHA. Esse resultado mostra que o filme feito com a borra submetida ao tratamento enzimático é mais rígido do que o filme BPHA, por isso apresenta baixo valor de deformação na ruptura. A rigidez do filme é resultante da forte ligação entre as cadeias de galactomananas.

A ligação entre as galactomananas depende do grau de ramificação e da distribuição de galactose na cadeia principal de manose. As unidades de galactoses podem ser distribuídas em blocos, aleatoriamente ou em posições alternadas ao longo da cadeia de manose. Isso faz com

que as cadeias de galactomananas estabeleçam ligações inter e intramoleculares de maneiras diferenciadas, variando de acordo com a configuração das galactoses nas ramificações das cadeias de manose (RINAUDO, 2001). As regiões da cadeia principal de manose que não apresentam unidades de galactose podem formar fortes interações por meio da ligação de hidrogênio intermoleculares (MATHUR, 2011).

Além disso, nas moléculas de galactomananas, as hidroxilas presentes no carbono C2 e C3 assumem uma configuração *cis*, enquanto na celulose o par de hidroxilas, nos carbonos C2 e C3, exibe configuração *trans*. Embora a diferença entre a proximidade estérica seja pouca entre as hidroxilas da manose e da glicose, a posição dessas hidroxilas faz grande diferença nas interações estabelecidas por esses polissacarídeos (MATHUR, 2011).

De acordo com Wielinga (1990), a posição assumida pelas hidroxilas na manose, nos carbonos C2 e C3, permite que essas formem ligações de hidrogênio de dois ou três centros, originando ligações de hidrogênio tridimensionais. Assim sendo, quando as ligações de hidrogênio de três centros ocorrem sobre uma porção da cadeia de galactomananas, essa forma uma ligação semelhante a um zíper. Essas ligações têm maior energia e são mais duráveis quando comparadas com ligações simples de hidrogênio (MATHUR, 2011).

Desse modo, essas fortes interações entre galactomananas podem ser associadas a interações nas partes não ramificadas da cadeia, por meio de ligações de hidrogênio de três centros, adotando uma conformação espiralada aleatória.

Consequentemente, o filme BPHAE, por ser mais rígido, sofreu falhas frágeis (Figura 34B), enquanto o filme BPHA sofreu falhas dúcteis (Figura 34A). A fratura frágil consiste na ruptura de um material sem absorção de energia, ocorrendo pouca ou nenhuma deformação, com uma quebra rápida. De modo contrário, a fratura dúctil é caracterizada pela grande absorção de energia promovendo uma deformação ao redor da trinca, que vai aumentando de maneira lenta, e quase estável (CALLISTER, 2002).

**Figura 34 - Fraturas dos filmes: A = filme BPHA com fratura dúctil; B= filme BPHAE com fratura frágil.**

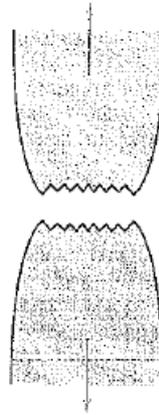


**Fonte: elaborado pelo autor.**

Embora o estudo de Xu *et al.* (2016) tenha mostrado filmes com propriedades mecânicas inferiores às do atual estudo, Dos Santos *et al.* (2015) obtiveram valores muito superiores de deformação na ruptura entre 36,58 a 69,72% e resistência a tração de 1,7 a 6,86 MPa para filmes constituídos de galactomananas de diferentes fontes. Batista (2017), que desenvolveu filmes semelhantes ao filme BPHA, com borra de café tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, apontou resistência a tração variando de 1,266 a 5,971 MPa de acordo com a concentração do  $H_2O_2$ . No entanto, o filme com borra de café tratada com  $H_2O_2$  35%, exibiu resistência a tração igual a 5,971 MPa, valor altamente diferente do obtido para o filme BPHA.

Todavia, de acordo com Liu *et al.* (2018), as propriedades de um filme constituído predominantemente por galactomananas podem ser afetadas não somente pela estrutura do polissacarídeo, mas também pelas microestruturas presentes na matriz do filme. A não uniformidade do filme devido à presença de inúmeras inclusões pode ter contribuído para variação dos resultados de resistência a tração e alongamento de ruptura do filme. As falhas presentes no filme BPHA podem ser originadas das inclusões, formando uma falha semelhante à da Figura 35, denominada fratura moderadamente dúctil.

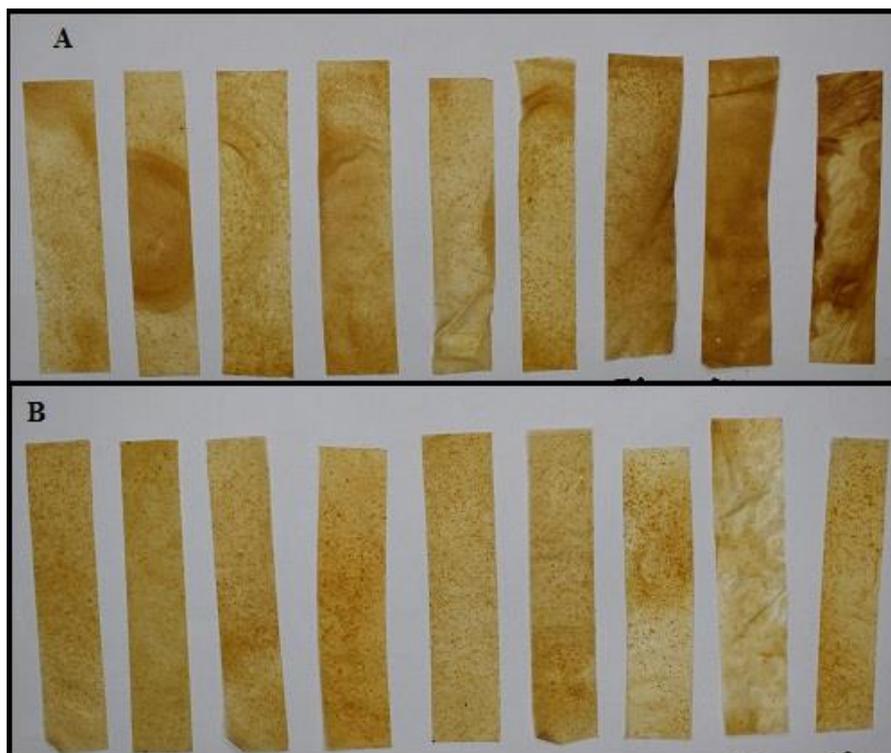
**Figura 35 - Representação de fratura dúctil moderada.**



Fonte: Callister, 2002.

Contudo, se observa da Figura 36 que as inclusões nos dois filmes BPHA e BPHAE encontram-se espalhadas de modo uniforme ao longo do filme. Além disso, utilizando o software IMAGEJ, foi feita a quantificação das inclusões ao longo do filme, o qual contém em média 1,01 inclusões por  $\text{mm}^2$  de filme. Portanto, como ambos os filmes apresentaram uma quantidade semelhante de inclusões ao longo da área destes, com distribuição uniforme, infere-se que as inclusões interferem nas propriedades mecânicas dos filmes. Estas, provavelmente, influenciam na coesão do filme, mas não são a causa das falhas do filme.

**Figura 36 - Corpos de prova utilizados na análise das propriedades mecânicas: A= filme BPHA; B= filme BPHAE.**



Outro fator que pode ter afetado as propriedades mecânicas do filme é o teor de lipídeos nas amostras utilizadas para o desenvolvimento destes. Segundo Yang & Paulson, (2000), os lipídeos que são moléculas apolares formam interações fracas com os polímeros polares.

Em trabalhos futuros seria interessante reduzir a granulometria das amostras utilizadas para o preparo do filme, com o intuito de obter um filme homogêneo e sem inclusões, bem como remover o lipídeo presente na borra de café tratada para melhorar as propriedades mecânicas do filme.

## 5 CONCLUSÃO

Filmes foram preparados com sucesso utilizando-se polissacarídeos extraídos de borra de café por diferentes tipos de tratamentos. Dentre os pré-tratamentos aplicados à borra de café *espresso*, o tratamento que apresentou os melhores resultados de acordo, com os objetivos do trabalho, foi o com peróxido de hidrogênio 35% alcalino. A borra resultante desse tratamento, denominada BPHA, alcançou o menor teor de lignina, 6,88%, permitindo que o tratamento enzimático posteriormente aplicado fosse executado de maneira efetiva.

O tratamento enzimático foi realizado nas condições otimizadas que foram: pH 4,8; concentração de enzima 0,3 mL/g de borra; 5% m/v de borra de café; com agitação de 150 rpm 50°C, durante 24 horas. Além disso, previamente o tratamento enzimático, o sistema constituído por solvente, borra, enzima foram mantidos no banho ultrassônico promovendo uma melhoria no tratamento enzimático. Essas condições resultaram na remoção de grande parte da celulose, concentrando consideravelmente as galactomananas.

Com a borra obtida após o tratamento alcalino e o tratamento enzimático, nomeada BPHAE, foi possível formar um filme biopolimérico com características diferentes do filme formado com BPHA. Desse modo, infere-se que a celulose exerce um papel importante nas propriedades mecânicas, como resistência a tração e deformação; e na permeabilidade a vapor d'água do filme.

No entanto, a remoção parcial da celulose, permite com que as moléculas de galactomananas se aproximem formando ligações mais fortes, e conseqüentemente, gerando um filme mais rígido. Assim sendo, o objetivo do trabalho foi atingido, visto que se esperava que pelas galactomananas presentes no café serem menos ramificadas e apresetarem cadeias longas, essas formariam ligações mais fortes entre elas.

Diante das propriedades apresentadas pelo filme formulado com a fração rica em galactomananas, as quais permeabilidade ao vapor d'água acima do relatado na literatura e rigidez considerável, esse podem ser aplicado como membrana para o tratamento de água ou membranas bioativas, visto que para isso os biofilmes devem apresentar propriedades mecânicas para serem manuseados e manter o composto ativo estável.

Além disso, podem ser promissores para embalagens para mudas uma vez que as hemiceluloses podem servir como substrato para as plantas.

## 6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Estes estudos iniciais evidenciaram o potencial da utilização do material rico em galactomananas oriundo de borras de café na formulação de filmes, os quais apresentaram características interessantes. Todavia, são necessárias outros testes e análises para o aprimoramento dos filmes, bem como avaliação da aplicação do filme em diferentes áreas.

Dessa forma, sugere-se:

- avaliar a o efeito de diferentes granulometrias do material rico em galactomananas nas propriedades do filme;
- aprimorar o método utilizado na obtenção dos filmes, buscando produzir filmes de espessura e superfície mais regulares;
- avaliar a biodegradabilidade dos filmes; e
- avaliar a possibilidade de associações de outras matérias-primas naturais ou oriundas de resíduos, com o intuito de melhorar as propriedades do filme.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNEY, B. and BAKER, J. Measurement of cellulose Activities: Laboratory Analytical Procedure (**Technical Report**). National Renewable Energy Laboratory, Colorado, 1996.

ADULKAR, T.V. and RATHOD, V.K. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. **Ultrasonics and Sonochemistry**, v.21, p., 1083-1089, 2014.

ALBUQUERQUE, P.B.S., CERQUEIRA, M.A., VICENTE, A.A., TEIXEIRA, J.A. and CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Immobilization of bioactive compounds in Cassia grandis galactomannan-based films: Influence on physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.96, p.727-735, 2017.

AL-HASSAN, A.A. and NORZIAH, M.H. Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p.108–117, 2012.

ALI, A., XIE, F., YU, L., LIU, H., MENG, L., KHALID, S. and CHEN, L. Preparation and characterization of starch-based composite films reinforced by polysaccharide-based crystals. **Composites Part B: Engineering**, v.133, p. 122-128, 2018.

ALOHA, S., TURON, X., OSTERBERG, M., LAINE, J. and ROJAS, O.J. Enzymatic hydrolysis of native cellulose nanofibrils and other cellulose model films: Effect of surface structure. **Langmuir**, v.24, p. 11592-11599, 2008.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M. and NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANDA. **Consumo de plástico mundial pode se tornar tão perigoso quanto mudanças climáticas**. 2017. Acesso em 15 de fevereiro de 2018 <<https://www.anda.jor.br/2017/07/consumo-de-plastico-mundial-pode-se-tornar-tao-perigoso-quanto-mudancas-climaticas/>>.

ANTONIOU, J., LIU, F., MAJEED, H., QAZI, H.J. and ZHONG, F. Physicochemical and thermomechanical characterization of tara gum edible films: effect of polyols as plasticizers. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 359-365, 2014.

ANTOSIK, A.K., WILPISZEWSKA, K. and CZECH, Z. Carboxymethylated polysaccharide-based films as carriers for acrylic pressure-sensitive adhesives. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 73, p. 75-79, 2017.

APRELINI, L.O. **Caracterização térmica, mecânica e morfológica de compósitos de polietileno de alta densidade com fibras da casca da semente da Moringa oleífera**. 83 p. Dissertação (mestrado)- Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto UFOP, 2016.

ARYA, M. and RAO, L.J.M. An impression of coffee carbohydrates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n.47, p.51-67, 2007.

ASHWORTH, G. S. et al. Coffee Processing Solid Wastes: Current Uses and Future Perspectives. In: **Agricultural Wastes**. [s.l: s.n.], p. 155-189, 2009.

ASTM D3418-12, **Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry**, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.

\_\_\_\_\_. **D618-13, Standard Practice for Conditioning Plastics for Testing**. West Conshohocken, PA 2013.

\_\_\_\_\_. **E96/E96M-15, Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials**, . West Conshohocken, PA 2015

\_\_\_\_\_. **D882-12 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting**. West Conshohocken, PA 2012.

AWAFO, V.A. Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. 1997. 255f. Tese de Doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos e Química Agrícola, McGill University, Canadá, 1997.

AZEREDO, H.M.C. and WALDRON, K.W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 52, p.109-122, 2016.

BAKER, R.W. **Membranes and modules**. Membrane Technology and Applications, Third edition, p. 97-178, 2012.

BALAGUER, M.P., GÓMEZ-ESTACA, J, GAVARA, R. and HERNANDEZ-MUNOZ, P. Functional Properties of Bioplastics Made from Wheat Gliadins Modified with Cinnamaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6689-6695, 2011.

BALDWIN, E.A., NISPEROS, M.O., CHEN, X. and HAGENMAIER, R.D. Lightly-processed horticultural products improving storage life of cut apple and potato with edible coating. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, n.2, p.151-163, 1996.

BALLESTEROS, L.F., CERQUEIRA, M.A., TEIXEIRA, J.A.; and MUSSATTO, S.I. Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p.347-354, 2015.

BALLESTEROS, L.F., TEIXEIRA, J.A. and MUSSATTO, S.I. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p. 3493–3503, 2014.

BALLESTEROS, L.F., TEIXEIRA, J.A. and MUSSATTO, S.I. Extraction of polysaccharides by autohydrolysis of spent coffee grounds and evaluation of their antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p. 258-266, 2017.

BALLESTEROS, L.F., CERQUEIRA, M.A., TEIXEIRA, J.A. and MUSSATTO, S.I. Production and physicochemical properties of carboxymethylcellulose films enriched with spent coffee grounds polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.106, p. 647-655, 2018.

BARBOSA, L.C.D.A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, v. 189, 2007.

BATISTA, M.J.P.A. **Desenvolvimento e caracterização de filmes derivados da borra de café submetida a tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino**. 107f. Dissertação (Mestrado)- Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

BELCHIOR, V., FRANCA, A.S. and OLIVEIRA, L.S. Potential of Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy and Chemometrics for Coffee Quality Evaluation. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, n. 1, 2016.

BELDMAN, G., VORAGEN, A.G.J., ROMBOUTS, F.M. and PILNIK, W. Synergism in cellulose hydrolysis by Endoglucanases and Exoglucanases cellulose purified from *Trichoderma viride*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, n.2., p. 173-178, 1998.

BELTRAMI, L.V.R., SCIENZA, C.L. and ZATTERA, A.J. Effect of the alkaline treatments of Curauá fiber on the properties of biodegradable matrix composites. **Polímeros**, v.24, n.3, p.388–394, 2014.

BERTAN, L.C. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes ativos à base de polímeros de fontes renováveis e sua aplicação no acondicionamento de pães de forma**. 188 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

BORGES, M.L.A., FRANCA, A.S., OLIVEIRA, L.S., CORRÊA, P.C. and GLÓRIA, M.B.A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torra em diferentes condições de Aquecimento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 5, p. 3-8, 2002.

BRAGA, R.S. **Desenvolvimento de filme polimérico à base de hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar**. 47f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade de Caxias do Sul, 2018.

BRESOLIN, T.M.B., MILAS, M., RINAUDO, M. and JLMS, G. Xanthan–galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, n.4, p.263–275, 1998.

CALLISTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. [s.l: s.n.]. p.130-143, 2002.

CAMPOS-VEGA, R., LOARCA-PIÑA, G., VERGARA-CASTAÑEDA, H.A. and OOMAH, B.D. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 24-36, 2015.

CAO, L., LIU, W. and WANG, L. Developing a green and edible film from Cassia gum: The effects of glycerol and sorbitol. **Journal of Cleaner Production**, v.175, p.276-282, 2018.

CARDOSO, G, SOUZA, F.D., BEREGENO, F.B. and NAKAMURA, M. Tendências do mercado de cafés em 2017. **Euromonitor Consulting**, 2017.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., SOUZA, M.P., TEIXEIRA, J.A. and VICENTE, A.A. Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Journal of Food Engineering**, v. 95, p.379-385, 2009.

CASTAÑO, J., GUADARRAMA-LEZAMA, A.Y., HERNÁNDEZ, J., COLÍN-CRUZ, M., MUÑOZ, M. and CASTILLO, S. Preparation, characterization and antifungal properties of polysaccharide–polysaccharide and polysaccharide–protein films. **Journal of Materials Science**, v.52, p.353-366, 2017.

CAZÓN, P., VELAZQUEZ, G., RAMÍREZ, J.A. and VÁZQUES, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v.68, p.136-148, 2017.

CERDA, A., ARTOLA, A., FONT, X., BARRENA, R., GEA, T. and SÁNCHEZ, A. Composting of food wastes: Status and challenges. **Bioresource Technology**, v.248, p.57-67, 2018.

CERQUEIRA, M.A., PINHEIRO, A.C., SOUZA, B.W.S., LIMA, A.M.P., RIBEIRO, C., MIRANDA, C., TEXEIRA, J.A., MOREIRA, R.A., COIMBRA, M.A., GONÇALVES, M.P. and VICENTE, A.A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrates Polymers**, v. 75, n. 3, p. 408-414, 2009a.

CERQUEIRA, M.A., LIMA, A.M., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, J.A., MOREIRA, R.A. and VICENTE, A.A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.4, p.1456-1462, 2009b.

CERQUEIRA, M. A., LIMA, A. M., TEIXEIRA, J. A., MOREIRA, R. A. and VICENTE, A. A. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. **Journal of Food Engineering**, v.94, p.372-378, 2009c.

CERQUEIRA, M.A., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C., MARTINS, J.T., SOUZA, B.W.S. and TEIXEIRA, J.A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p.662-671, 2011a.

CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., SIMÕES, J., TEIXEIRA, J.A., DOMINGUES, M.R.M., COIMBRA, M.A. and VICENTE, A.A. Structural and thermal characterization of

galactomannans from non-conventional sources. *Carbohydrate Polymers*, v.83, p.179-185, 2011b.

CERQUEIRA, M.A., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C., MARTINS, J.T., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, J.A. and VICENTE, A.A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. ***Carbohydrate Polymers***, v. 83, n. 1, p. 179-185, 2011c.

CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, J.A. and VICENTE, A.A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - a comparative study. ***Food Hydrocolloids***, v. 27, p. 175-184, 2012.

CHAIRES-MARTÍNEZ, L., SALAZAR-MONTOYA, J.A. and RAMOS-RAMÍREZ, E.G. Physicochemical and functional characterization of the galactomannan obtained from mesquite seeds (*Prosopis pallida*). ***European Food Research and Technology***, v.227, p. 1669–1676, 2008.

CHANDRASEKARAN, R., RADHA, A. and OKUYAMA, K. Morphology of galactomannans: An X-ray structure analysis of guaran. ***Carbohydrate research***, v. 306, n. 1, p. 243-255, 1998.

CHEN, H., LIU, J., CHANG, X., CHEN, D., XUE, Y., PING, L., LIN, H. and HAN, S.A Review on the pretreatment of lignocelluloses for high-value chemicals. ***Fuel Processing Technology***, v.160, p. 196-206, 2017.

CHEN, L., CHEN, J., REN, J. and ZHAO, M. Effects of Ultrasound Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolates and on the Emulsifying Properties of Hydrolysates. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, n. 59, p. 2600-2609, 2011.

CHEN, M., ZHAO, J. and XIA, L. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. ***Biomass Bioenergy***, v.33, p. 1381–1385, 2009.

CHIYANZY, I., BRIENZO, M., GARCÍA-APARICIO, M., AGUDELO, R. and GÖRGENS, J. Spent coffee ground mass solubilisation by steam explosion and enzymatic hydrolysis. ***Journal of Chemical Technology & Biotechnology***, v. 90, n 3, p.449-458, 2015.

CONFORTI, F.D. and TOTTY, J.A. Effect of three lipid/hydrocolloid coatings on shelf life stability of golden delicious apples. ***International Journal of Food Science & Technology***, v.42, p.1101-1106, 2007.

CORRADINI, E., PINEDA, E.A.G. and HECHENLEITNER, A.A.W. Lignin-poly (vinyl alcohol) blends studied by thermal analysis. ***Polymer Degradation and Stability***, Essex, v. 66, p. 199-208, 1999.

COSTA, M. J., MARQUES, A.M., PASTRANA, L.M., TEIXEIRA, J.A., SILLANKORVA, S.M. and CERQUEIRA, M.A. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of

ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids**, n. 81, p. 442-448, 2018.

CRINI, G. and BADOT, P.M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n.4, p.399–447, 2008.

CRUZ, R., CARDOSO, M.M., FERNANDES, L., OLIVEIRA, M., MENDES, E., BAPTISTA, P., MORAIS, S. and CASAL, S. Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 60, p. 7777–7784, 2012.

CUQ, B., GONTARD, N. and GUILBERT, S. Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production. **Cereal Chemistry Journal**, v.75, n.1, p.1–9, 1998.

DA CRUZ, M.R. **Filmes de gelatina e galactomanana incorporados com nanocelulose de fibra de Algaroba (*Prosopis juliflora*)**. 58 f. Tese (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2014.

DAHIYA, S., KUMAR, A.N., CHATTERJEE, J.S.S.S., SARKAR, O. and MOHAN, S.V. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v.248, p. 2-12, 2018.

PETKOWICZ, C.L.O. Polysaccharides in Coffee and Their Relationship to Health: An Overview. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l: s.n.], p. 163-171, 2014.

DEA, I.C.M., CLARK, A.H. and MCCLEARY, B.V. Effect of the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties — the role of unsubstituted sides. **Food Hydrocolloids**, v.1, n.2, p.129–140, 1986.

DEB, A., FERDOUS, J., FERDOUS, K., UDDIN, M.R., KHAN, M.R. and RAHMAN, MD.W. Prospect of castor oil biodiesel in Bangladesh: Process development and optimization study. **International Journal of Green Energy**, v.14, n.12, p.1063-1072, 2017.

DEGRUSON, M.L. **Biobased Polymer Packaging**. Reference Module in Food Science: Elsevier, 2016.

DELGADO, J.F., SCENI, P., PELTZER, M.A., SALVAY, A.G., LA OSA, O. and WAGNER, J.R. Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.36, p. 83-91, 2016.

DÍAZ-SOBAC, R., GARCÍA, H., BERISTAIN, C.I. and VERNON-CARTER, E.J. Morphology and water vapor permeability of emulsion films based on mesquite gum. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.26, n.2, p. 129–141, 2002.

DONG, H., CHENG, L., TAN, J., ZHENG, K. and JIANG, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. **Journal of Food Engineering**, v.64, n.3, p.355-358, 2004.

DOS SANTOS, V.R.F., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, J.A., VICENTE, A.A. and CERQUEIRA, M.A. Relationship between galactomannan structure and physicochemical properties of films produced thereof. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.12, p.8292-8299, 2015.

DOTSENKO, A.S., GUSAKOV, A.V., ROZHKOVA, A.M., VOLKOV, P.V., KOROTKOVA, O.G. and SINITSY, A.P. Enzymatic hydrolysis of Cellulose using mixes of mutant forms of cellulases from *Penicilliumverruculosum*. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v.73, n.2, p. 58-62, 2018.

DU, H., HU, Q., YANG, W., PEI, F., KIMATU, B.M., MA, N., FANG, Y., CAO, C. and ZHAO, L. Development, physicochemical characterization and forming mechanism of Flammulina velutipes polysaccharide-based edible films. **Carbohydrate Polymers**, v.152, p.214-221, 2016.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUTRA, E. D., SANTOS, F.A., ALENCAR, B.R.A., REIS, A.L.S., SOUZA, R.F.R., AQUINO, K.A.S., MORAIS JR, M.A. and MENEZES, R.S.C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p.1-10, 2018.

ESCALANTE, A., GONCALVES, A., BODIN, A., STEPAN, A., SANDSTRÖM, C., TORIZ, G. and GATENHOLM, P. Flexible oxygen barrier films from spruce xylan. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.2381-2387, 2012.

FAKHOURI, F.M., MARTELLI, S.M., CAON, T., VELASCO, J.I. and MEI, L.H.I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.109, p.57-64, 2015.

FAO, 2011. **Global food losses and food waste**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>. Acesso em 31 de maio de 2017.

FERNANDEZ-GOMEZ, B., RAMOS, S., GOYA, L., MESA, M.D., CASTILLO, M.D. and MARTÍN, M.A. Coffee silverskin extract improves glucose-stimulated insulin secretion and protects against streptozotocin-induced damage in pancreatic INS-1E beta cells. **Food Research International**, v.89, p.1015-1022, 2016.

FIGOLI, A., SIMONE, S. and DRIOLI, E. Polymeric membranes. In: **Membrane Fabrication**. Taylor & Francis Group, London, p. 1-44 (Chapter 1), 2015.

FIGUEIRÓ, S.D., GÓES, J.C., MOREIRA, R.A. and SOMBRA, A.S.B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan – collagen films. **Carbohydrate Polymers**, v.56, n.3, p. 313-320, 2004.

FISCHER, M., REIMANN, S., TROVATO, V. and REDGWELL, R.J. Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. **Carbohydrate Research**, v.330, p. 93–101, 2001.

FLORENCIO, C. Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. 2011.83f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

FRANCA, A.S. and OLIVEIRA, L.S. **Coffee processing solid wastes: current uses and future perspectives**. In: Agricultural wastes, Nova Publishers, New York, 2009.

GADERNAL, I. Processamento de casca do café rende aplicações. **Jornal da Unicamp**, n.552, 2013.

GARCÍA, M.A., MARTINO, M.N. and ZARITZKY, N.E. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria ananassa*) quality and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.9, p.3758-3767, 1998.

GARCIA-GARCIA, D., CARBONELL, A., SAMPER, M.D., GARCIA-SANOQUERA, D., and BALARTH, R. Green composites based on polypropylene matrix and hydrophobized spent coffee ground (SCG) powder. **Composites Part B: Engineering**, v.78, p.256–265, 2015.

GELLERSTEDT, G. **Chemical degradation methods: permanganate oxidation**. In *Methods in Lignin Chemistry*; Lin, S. Y., Dence, C. W., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, p. 322- 333, 1992.

GETACHEW, A.T., CHO, Y.J. and CHUN, B.S. Effect of pretreatments on isolation of bioactive polysaccharides from spent coffee grounds using subcritical water. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.109, p.711-719, 2018.

GHANBARZADEH, B., ALMASI, H. and ENTEZAMI, A.A. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. **Innovative food science & emerging technologies**, v.11, n.4, p. 697-702, 2010.

GINJUPALLI, K., SHAVI, G.V., AVERINENI, R.K., BHAT, M., UDUPA, N. and UPADHYA, P.N. Poly( $\alpha$ -hydroxy acid) based polymers: A review on material and degradation aspects. **Polymers Degradation and Stability**, v.144, p.520-535, 2017.

GIRALDO, L.F.B. **Extraction and characterization of polysaccharides and phenolic compounds from spent coffee grounds and their incorporation into edible films/coatings for food applications**. 237 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2016.

GIROTTI, F., PIVATO, A., COSSU, R., NKENG, G.E. and LAVAGNOLO, M.C. The broad spectrum of possibilities for spent coffee grounds valorization. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v.20, n.1, p.695-701, 2018a.

GIROTTI, F., LAVAGNOLO, M.C. and PIVATO, A. Spent Coffee Grounds Alkaline Pre-treatment as Biorefinery Option to Enhance their Anaerobic Digestion Yield. **Waste and Biomass Valorization**, v.9, n.2, p.2565-2570, 2018b.

GOMIDE, J.L. and DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso. O papel, 1986.

GONZÁLEZ, G., CAMINAL, G., DE MAS, C. and LOPEZ-SANTÍN, J. A kinetic model for pretreated wheat straw saccharification by cellulase. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 275–288, 1989.

GORGULHO, C.F. Radar Tecnológico – Série Embalagens. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI**, v.1, p.1-20, 2018

GOULD, J.M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, n.1, p.46-52, 1984.

GOULD, J.M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n.3, p. 225-231,1985.

GOULD, J.M. and FREER, S. High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 6, p. 628-631,1984.

GUILLEN, G. R., RAMON, G.Z., KAVEHPOUR, H.P., KANER, R.B. and HOEK, E.M.V. Direct microscopic observation of membrane formation by nonsolvent induced phase separation. **Journal of Membrane Science**, v.413, p.212-220, 2013.

GUO, T. X., ZHAO, Y., MA, S. and LIU, S. Decomposition Characteristics of Hydrogen Peroxide in Sodium Hydroxide Solution. **Advanced Materials Research**, v. 610-613, p. 359-362, 2013.

HALDAR, D., SEN, D. and GAYEN, K. Enzymatic hydrolysis of banana stems (*Musa acuminata*): Optimization of process parameters and inhibition characterization. **International Journal of Green Energy**, v. 15, n.6, p. 406-413, 2018.

HANSEN, N.M.L. and PLACKETT, D. Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. **Biomacromolecules**, v. 9, p.1493–1505, 2008.

HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Chemistry and Molecular Organization of Plant Cell Walls. In: **Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy**. [s.l: s.n.]. p. 61-85, 2009.

HOLTZAPPLE, M., COGNATA, M., SHU, Y. and HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v.36, p.275-287,1990.

HORN, S. J., VAAJE-KOLSTAD, G., WESTERENG, B. and EIJSINK, V.G.H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, v.45, p. 1-13, 2012.

HORNUNG, P.S., LAZZAROTTO, S.R.S., BARBI, R., LAZZAROTTO, M. and RIBANI, R.H. **Propriedades calorimétricas do biofilme de amido de araruta (*Maranta arundinaceae*) com diferentes concentrações de nanocelulose de *Pinus elliottii***. VIII Simpósio de Análise Térmica, 2017.

HU, Z. and WEN, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n.3, p. 360-378, 2008.

HUNTERLAB. **The science and technology of appearance measurement**. Hunter Associates Laboratory, Inc. Reston, VA, 1983.

IRIONDO-DEHOND, A., GARCÍA, N.A., FERNANDEZ-GOMEZ, B., GUI SANTES-BATAN, E., ESCOBAR, F.V., BLANCH, G.P., SAN ANDRES, M.I., SANCHEZ-FORTUN, S. and CASTILLO, M.D. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.51, p. 194-204, 2019.

JANJARASSKUL, T. and KROCHTA, J.M. Edible packaging materials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 415-448, 2010.

JOUKI, M., KHAZAEI, N., GHASEMLOU, M. and HADINEZHAD, M. Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p.39–46, 2013.

JUNG, K. W., CHOI, B.H., HWANG, M., JEONG, T. and AHN, K. Fabrication of granular activated carbons derived from spent coffee grounds by entrapment in calcium alginate beads for adsorption of acid orange 7 and methylene blue. **Bioresource Technology**, v.219, p.185-195, 2016.

KARMEE, S.K. A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants and biocomposites. **Waste Management**, v.72, p. 240-254, 2018.

KATARE, B., SEREBRENNIKOV, D., WANG, H.H. and WETZSTEIN, M. Social-optimal household food waste: Taxes and government incentives. **American Journal of Agricultural Economics**, n.2, v.99, p. 499-509, 2017.

KIM, S.H., LEE, C.M. and KAFLE, K. Characterization of crystalline cellulose in biomass: Basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.30, n.12, p. 2127-2141,2013.

KIZIL, R., IRUDAYARAJ, J. and SEETHARAMAN, K. Characterization of irradiated starches by using FT-Raman and FTIR spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3912-3918, 2002.

KOBERG, M., COHEN, M., BEN-AMOTZ, A. and GEDANKEN, A. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. **Bioresource Technology**, v.102, n.5, 4265–426, 2011.

KOURMENTZA, C., ECONOMOU, C.N., TSAFRAKIDOU, P. and KORNAROS, M. Spent coffee grounds make much more than waste: Exploring recent advances and future exploitation strategies for the valorization of an emerging food waste stream. **Journal of Cleaner Production**, v.172, p.980-992, 2018.

KOVALCIK, A., OBRUCA, S. and MAROVA, I. **Valorization of spent coffee grounds: A review** **Food and Bioproducts Processing**, v.110, p. 104-119, 2018.

KROCHTA, J.M. and MULDER-JOHNSON, C. Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. **Food technology**, v. 51, p. 61-74, 1997.

KULKARNI, A. and DASARI, H. Current status of methods used in degradation of polyesters: a review. **MATEC Web of Conferences**, v. 144, p.1-11, 2018.

KUMAR, P., BARRETT, D.M., DELWICHE, M.J. and STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.48, p.3713-3729, 2009.

LABCONCO, C. A guide to Kjeldahl nitrogen determination methods and apparatus. **Labconco Corporation: Houston, TX, USA**, 1998.

LACERDA, T.M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais**. 258 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2012.

LACROIX, M. Mechanical and permeability properties of edible films and coatings for food and pharmaceutical applications. **Edible Films and Coatings for Food Applications**, p.347-366, 2009.

LALIA, B. S., KOCHKODAN, V.; HASHAIKEH, R. and HILAL, N. A review on membrane fabrication: Structure, properties and performance relationship. **Desalination**, v. 326, p.77-95, 2013.

LATIMORE, Z. The amazing opportunities in coffee pulp recycling. **Ground to ground**, 2015. Disponível em: <https://groundtoground.org/2015/02/03/the-amazing-opportunities-in-coffee-pulp-recycling/>. Acesso 11 de junho de 2019.

LE, H. T., CHAFFOTTE, A.F., DEMEY-THOMAS, E., VINH, J., RIGUET, B. and MARY, J. Impact of Hydrogen Peroxide on the Activity, Structure, and Conformational Stability of the Oxidized Protein Repair Enzyme Methionine Sulfoxide Reductase A. **Journal of Molecular Biology**, v.393, n.1, p.58-66, 2009.

LEE, J.Y., YOO, C., JUN, S.Y., AHM, C.Y. and OH, H.M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 575 -577, 2010.

LEE, S. H., DOHERTY, T.V., LINHARDT, R.J. and DORDICK, J.S. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.5, p.1368-1376, 2009.

LEE, Y. and FAN, L.T. Kinetic Studies of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Cellulose: (II). Analysis of Extended Hydrolysis Times. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 939-966, 1983.

LENGOWSKI, 2012 - LENGOWSKI, E.C. **Caracterização e predição da cristalinidade da celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada**. 109f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Engenharia Agrária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LI, H. and YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n.2, p.269-274, 2001.

LI, Z. and PAN, X. physicochemical properties of hemicelluloses from biorefinery and paper industry for packaging material. **Environmental Science Biotechnology**, v.17, p.47-69, 2018.

LIMA, A.M., CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S., SANTOS, E.C.M., TEIXEIRA, J.A. and MOREIRA, R.A. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits e influence on fruits gas transfer rate. *Journal of Food Engineering*, v. 97, p. 101-109, 2010.

LIMA, E.S. and ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37,n.3,p.293-303, set./dez. 2001.

LIN, M., SHANG, X., LIU, P., XIE, F., CHEN, X., SUN, Y. and WAN, J. Zinc chloride aqueous solution as a solvent for starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 266-273, 2016.

LIU, F., CHANG, W., CHEN, M., XU, F., MA, J. and ZHONG, F. Film-forming properties of guar gum, tara gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids (Accepted manuscripts)**, 2019.

LU, X. and SHEN, X. Solubility of bacteria cellulose in zinc chloride aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 1, p. 239-244, 2011.

LYND, L.R., WEIMER, P.J., ZYL, W.H. and PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.

MA, L., CUI, Y., CAI, R., LIU, X., ZHANG, C. and XIAO, D. Optimization and evaluation of alkaline potassium permanganate pretreatment of corncob. **Bioresource Technology**, v.180, p.1-6, 2015.

MACDONALD, D.G., BAKHSHI, N.N., MATHEWS, J.F., ROYCHOWDHURY, A., BAJPAI, P., and MOOYOUNG, M. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioenergy**, v.25, n.8, p. 2067-2076, 1983.

MACLEOD, G.S., FELL, J.T. and COLLETT, J.H. Studies on the physical properties of mixed pectin/ethylcellulose films intended for colonic drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.157, p.53-60, 1997.

MADEIRA JR, J.V., CONTESINI, F.J., CALZADO, F., RUBIO, M.V., ZUBIETA, P., LOPES, D.B. and DE MELO, R.R. **Agro-industrial residues and microbial enzymes: an overview on the eco-friendly bioconversion into high value-added products**. In: Brahmachari, G., Demian, A.L., Adrio, J. (Eds.), *Biotechnology of microbial enzymes – Production, biocatalysis and industrial applications*. Academic Press, pp. 475- 511, 2017.

MAITAN-ALFENAS, G.P., VISSER, E.M., GUIMARÃES, V. and RIA, M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v.1, p. 44-49, 2015.

MALI, S., GROSSMANN, M.V.E., GARCÍA, M.A., MARTINO, M.M. and ZARITZKY, N.E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 129-135, 2004.

MANZALLI, P.V. **Manual para Serviços de Alimentação: Implementação, Boas Práticas, Qualidade e Saúde**. São Paulo: Metha, p.191, 2006.

MARTINEZ-SAEZ, N., GARCÍA, A.T., PÉREZ, I.D., REBOLLO-HERNANZ, M., MESÍAS, M., MORALES, F.J. and MARTÍN-CABREJAS, M.A., CASTILLO, M.D. Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. **Food Chemistry**, v. 216, p.114-122, 2017.

MARTINS, J.T., CERQUEIRA, M.A., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C., SOUZA, B.W.S. and VICENTE, A.A. Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, v.29, p. 280-289, 2012.

MATA, T. M., MARTINS, A. A. and CAETANO, N. S. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. **Bioresource Technology**, v. 247, p.1077-1084, jan. 2018.

MATHUR, N.K. **Industrial galactomannan polysaccharides**. Nova York: CRC Press, p. 5-38, 2011.

MCMILLAN, J.R., WATSON, I.A., ALI, M. and JAAFAR, W. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. **Applied Energy**, v.103, p. 128-134, 2013.

MELTON, L. D. and SMITH, B. G. Cell Wall Polysaccharides. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**: John Wiley & Sons, 2001. p.E3.2.1-E3.2.13.

MENDES, F.R.S., BASTOS, M.S.R., MENDES, L.G., SILVA, A.R.A., SOUSA, F.D., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. CHENG, H.N., BISWAS, A. and MOREIRA, R.A. Preparation and evaluation of hemicellulose films and their blends. **Food Hydrocolloids**, v.70, p.181-190, 2017.

MIKKONEN, K.S., RITA, H., HELÉN, H., TALJA, R.A., HYVÖNEN, L., and TENKANEN, M. Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. **Biomacromolecules**, v.8,p.3198-3205, 2007.

MINOLTA, K. Entendendo o Espaço de cor L\*a\*b\*. **Japan: Konica MinoltaSensingInc**, 2013.

MINOLTA, K. Precise color communication: Color control from perception to instrumentation. **Japan: Konica Minolta Sensing Inc**, 2007.

MODENBACH, A.A. and NOKES, S.E. Effects of Sodium Hydroxide Pretreatment on Structural Components of Biomass. **Transactions of the ASABE**, v. 57, n. 4, p. 1187-1198, 2014.

MONTE, J.R., BRIENZO, M. and MILAGRES, A.M.F. Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. **Applied Energy**, v. 88, n. 1, p. 403-408, 2011.

MORANA, A, MAURELLI, L., IONATA, E., LA CARA, F. and ROSSI, M. Cellulases from Fungi and Bacteria and their Biotechnological Applications, in: Golan, A. E. (Ed.) Cellulase: types and action, mechanism, and uses, Nova Science Publishers, New York, 2011, 1-80.

MORRIS, E. R. **Mixed Polymer Gels**. In: Food Gels; Harris, P., Ed. Elsevier, U.K.,p. 291-359, 1990.

MURTHY, P.S. and NAIDU, M.M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review. **Resources, conservation and recycling**, v.66, p.45-58, 2012.

MUSSATTO, S.I., CARNEIRO, L.M., SILVA, J.P.A., ROBERTO, I.C. and TEIXEIRA, J.A. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.368-374, 2011a.

MUSSATTO, S.I., BALLESTEROS, L.F., MARTINS, S. and TEIXEIRA, J.A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 173-179, 2011b.

MUSSATTO, S.I., , E.M.S., MARTINS, S. and TEIXEIRA, J.A. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, n.4, p.661-672, 2011c.

MUSSATTO, S.I. Generating Biomedical Polyphenolic Compounds from Spent Coffee or Silverskin. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l: s.n.]. 2014.

MUSSATTO, S.I. and ROBERTO, I.C. Optimal Experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production. **Biotechnology Progress**, v.20, n.1, p. 134-139, 2004.

MUSSATTO, S.I. and TEIXEIRA, J. A. Coffee. In: **Engineering Aspects of Food Biotechnology**. [s.l: s.n.].p.413-428, 2013.

NAFCHI, A.M., OLFAT, A., BAGHERI, M., NOURI, L., KARIM, A.A. and ARIFFIN, F. Preparation and characterization of a novel edible film based on Alyssum homolocarpum seed gum. **Food Science Technology**, India, v.54, n.6, p.1703-1710, 2017.

NG, T. B. and CHEUNG R. C. F. Cellulase: types, actions, mechanisms and uses, in: Golan, A. E. (Ed.) Cellulase: types and action, mechanism, and uses, Nova Science Publishers, New York, 2011, 251-263.

NGUYEN, Q.A., CHO, E., TRINH, L.T.P., JEONG, J. and BAE, H. Development of an integrated process to produce D-mannose and bioethanol from coffee residue waste. **Bioresource Technology**, v.224, p. 1039-1048, 2017.

NIGLIO, S., PROCENTESE, A., RUSSO, M.E., SANNIA, G. and MARZOCHELLA, A. Ultrasound-assisted Dilute Acid Pretreatment of Coffee Silverskin for Biorefinery Applications. **Chemical Engineering Transactions**, v.57, p. 109-114, 2017.

NISTOS, C., LAZARIDIS, P., MACH-AIGNER, A., MATIS, K. and TRIANTAFYLLIDIS, K. Enhancing Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Hydrothermal Pretreatment, Extraction of Surface Lignin, Wet Milling and Production of Cellulolytic. **Chemistry & sustainability: energy & materials**, v.12, p.1-18, jan.2019.

NUNES, F.M., REIS, A., DOMINGUES, M.R.M. and COIMBRA, M.A. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3428-3439, 2006.

NUNES, F. M. and COIMBRA, M. A. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 171-185, 2010.

NUNES, F. M., DOMINGUES, M. R. and COIMBRA, M. A. Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. **Carbohydrate Research**, v.304, p.1689-1698, 2005.

ODISI, E.J. **Sacarificação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio adicionado de álcali ou cinzas**.115f. Dissertação (Mestrado) -

Programa de pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

OIC, **Organização Internacional do Café**, 2018. Disponível em: [http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/relatorio\\_oic\\_d\\_ezembro\\_2018.pdf](http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_d_ezembro_2018.pdf). Acesso em 03 de abril de 2019

OLIVEIRA, D.F. **Confiabilidade Metrológica e Validação de Procedimentos Espectroradiométricos para medição de fontes luminosas**. 166f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Metrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

OLIVEIRA, L.S. and FRANCA, A.S. Low-cost adsorbents from agri-food wastes, **In: Food Science and Technology: New Research**. Greco, L. V. and Bruno, M. N., New Publishers: New York, USA, Chapter 3, p.171-209, 2008.

OLIVEIRA, L.S. and FRANCA, A.S. From solid biowaste to liquid biofuel. **In: Agricultural wastes**. Ashworth, G.S. and Azevedo, P., Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, Chapter 11, p.265-289, 2009.

ONUMAEGBU, C., MOONEY, J., ALASWAD, A. and OLABI, A.G. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalga e biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n.93, p 16-26, 2018.

OOSTERVELD, A., HARMSSEN, J. S., VORAGEN, A. G. J. and SCHOLS, H. A. Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted Coffea arabica beans. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 285–296, 2003.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC). **Relatório sobre o mercado cafeeiro**, 2017. Disponível em: <http://www.ico.org/documents/cy2017-18/cmr-1217-p.pdf>. Acesso em 03 de abril de 2019.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC). **Relatório sobre o mercado cafeeiro**, 2018. Disponível em: [http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/relatorio\\_oic\\_d\\_ezembro\\_2018.pdf](http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_d_ezembro_2018.pdf). Acesso em 03 de abril de 2019.

P.C. SRINIVASA and R.N. THARANATHAN. Chitin/Chitosan — Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses. **Food Reviews International**, v. 23, n.1, p.53-72, 2007.

PANDEY, K. K. and THEAGARAJAN, K. S. Analysis of wood surfaces and ground wood by diffuse reflectance (DRIFT) and photoacoustic (PAS) Fourier transform infrared spectroscopic techniques. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 55, n. 6, p. 383-390, 1997.

PARADKAR, M. M. and IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR–ATR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 261-266, 2002.

PASCHOALATO, C.F.P.R. **Efeito da pré-oxidação, coagulação, filtração e pós-cloração na formação de subprodutos orgânicos halogenados em águas contendo substâncias húmicas.** Dissertação (Doutorado)- Programa de pós-graduação em Engenharia Civil. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

PASSOS, C. P. and COIMBRA, M. A. Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 626-633, 2013.

PEARSON, R.S. and GEORGE, A. Manganese color reactions. **Journal of Chemical Education**, v.65, n.5, 451-452, 1988.

PELLEGRINO, L. **Embalagem.** Associação Brasileira de Embalagem (ABRE), 2008. Disponível em : <<http://www.abre.org.br/setor/apresentacao-do-setor/a-embalagem/>>. Acesso em 26 de maio de 2019.

PENG, X., REN J., ZHONG, L. and SUN, R. Nanocomposite films based on xylan-rich hemicelluloses and cellulose nanofibers with enhanced mechanical properties. **Biomacromolecules**, v. 12, p.3321–3329, 2011.

PINHEIRO, A. C, CERQUEIRA, M.A., SOUZA, B.W.S, MARTINS, J.T., TEIXEIRA, J.A. and VICENTE, A.A. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de biotecnologia**, p.18-28, 2010.

POURFARZAD, A., MAHDAVIAN-MEHR, H. and SEDAGHAT, N. Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v.50,n.2, p.599-606, 2013.

PRAJAPATI, V.D., JANI, G.K., MORADIYA, N.G., RANDEIRA, N.P., NAGAR, B.J., NAIKWADI, N.N. and VARIYA, B.C. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharideInternational. **Journal of Biological Macromolecules**, v.60, p.83-92, 2013.

PRATTO, B., SOUZA, R.B.A., SOUSA JR, R. and CRUZ, A.J.G. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi- Mechanistic Modeling. **Application Biochemistry and Biotechnology**, v.178, p. 1430-1444, 2016.

QI, X. M. et al. Enhanced mechanical performance of biocompatible hemicelluloses-based hydrogel via chain extension. **Scientific Reports**, v.6, n. 33603, p.1-10, 2016.

RABELO, S.C., FONSECA, N.A.A., ANDRADE, R.R., MACIEL FILHO, R. and COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2600-2607, 2011.

RAGHAVI, S., SINDHU, R., BINOD, P., GNANSOUNOU, E. and PANDEY, A. Development of a novel sequential pretreatment strategy for the production of bioethanol from sugarcane trash. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 202-210, 2016

RATHINAVELU, R. and GRAZIOSI, G. Potential alternative use of coffee wastes and by-products. **Coffee Organization**, v.942, p.1-4, 2005.

RAVINDRAN, R., JAISWAL, S., ABU-GHANNAM, N. and JAISWAL, A.K. Evaluation of ultrasound assisted potassium permanganate pre-treatment of spent coffee waste. **Bioresource Technology**, v.224, p.680-687, 2017a.

\_\_\_\_\_. Two-step sequential pretreatment for the enhanced enzymatic hydrolysis of coffee spent waste. **Bioresource Technology**, v.239, p. 276-284, 2017b.

RAVINDRAN, R. and JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, V.199, P92-102, 2016.

RAWLINS, J.W., and MENDON, S.K. Coatings, Adhesives, and Laminates. in: **Polymer Grafting and Crosslinking**, p.273–318,chapter 11, 2008.

REIS, N., FRANCA, A.S. and OLIVEIRA, L.S. Concomitant Use of Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflectance Spectroscopy and Chemometrics for Quantification of Multiple Adulterants in Roasted and Ground Coffee. **Journal of Spectroscopy**, p. 1-7, 2016.

REIS, N., FRANCA, A. S. and OLIVEIRA, L. S. Quantitative evaluation of multiple adulterants in roasted coffee by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics. **Talanta**, v. 115, p. 563-568, 2013.

REN, J. and WANG, R. Preparation of Polymeric Membranes. In: **Membrane and Desalination Technologies**. [s.l: s.n.]. p.47-95, 2011.

REN, L., HEMAR, Y., PERERA, C.O., LEWIS, G., KRISSENSSEN, G.W. and BUCHMAN, P.K. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v.3, n.2, p.41-51, 2014.

RHIM, J. W., GENNADIOS, A., WELLER, C. L., CEZEIRAT, C. and HANNA, M. A. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products**, v.8, n.3, p.195-203, 1998.

RIBEIRO, J. S., SALVA, T. J. and FERREIRA, M. Chemometric studies for quality control of processed Brazilian coffees using DRIFTS. **Journal of Food Quality**, v. 33, n. 2, p. 212-227, 2010.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.433-440, 2001.

RINDLAV-WESTLING, Å., & GATENHOLM, P. Surface Composition and Morphology of Starch, Amylose, and Amylopectin Films. **Biomacromolecules**, Göteborg, v.4, n.1, p.166–172, 2003.

RIVERA, W.; VELASCO, X.; GÁLVEZ, C.; RINCÓN, C.; ROSALES, A.; ARANGO, P. Effect of the roasting process on glass transition and phase transition of Colombian Arabic coffee beans. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 385-390, 2011.

ROCHA, C.P. Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ROCHA, R.A.; AFONSO, J.C. Manganês (Elemento Químico). **Química Nova**, v. 34, n.2, p. 103-105, 2012.

RODRIGUEZ VALENCIA, N.; ZAMBRANO FRANCO, D. Los subproductos del café: fuente de energía renovable. **Avances Técnicos Cenicafé**, v.393, p. 1-8, 2010.

RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; MUSSATTO, S. I.; PASTRANA, L.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **Journal of applied phycology**, v.25, n.1, p.31-39, 2013.

ROSSI, B. et al. Characterization of aerogels from chemo-enzymatically oxidized galactomannans as novel polymeric biomaterials. **European Polymer Journal**, v.93, p.347-357, 2017.

RUY, D.D.Y.; LEE, S.B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: determination of kinetic parameters. **Chemical Engineering Communications**, v. 45, n.1-6, p. 119-134, 1986.

SALEMDEEB, R. et al. Environmental and health impacts of using food waste as animal feed: a comparative analysis of food waste management options. **Journal of Cleaner Production**, v.140, p.871-880, 2017.

SAMOGGIA, A.; RIEDEL, B. Coffee consumption and purchasing behavior review: Insights for further research. **Appetite**, v. 129, p.70-81, 2018.

SANTOS, M. C., LIMA, E. R. L., ABREU D. H. S., LOURENÇO, R.M., LHAMAS, E.L., BORGES, L.P., MACHADO, N.T. Craqueamento termocatalítico da borra de neutralização do óleo de palma em escala de bancada. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis, 2014.

SARTORI, T., MENEGALLI, F.C. Development and characterization of unripe banana starch films incorporated with solid lipid microparticles containing ascorbic acid. **FoodHydrocolloids**, v.55, p. 210-219, 2016.

SCULLY, D.; JAISWAL, A.; ABU-GHANNAM, N. An Investigation into Spent Coffee Waste as a Renewable Source of Bioactive Compounds and Industrially Important Sugars. **Bioengineering**, n.3, v.33, p.2-13, 2016.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E. & CONRAD, C M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, Princeton, v.29, n.10, p.786-794, 1959.

SEN, S.; LOSEY, B. P.; GORDON, E. E.; ARGYROPOULOS, D. S.; MARTIN, J. D. Ionic Liquid Character of Zinc Chloride Hydrates Define Solvent Characteristics that Afford the Solubility of Cellulose. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 6, p. 1134-1141, 2016.

SHARADA, R. et al. Applications of Cellulases – Review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, v.4, n.2, p. 424-437, 2014.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: 2002, p. 235.

SILVA, L.M. **Estudo da potencialidade dos resíduos do Umbu, Manga e Goiaba como bioadsorventes**. 63f.Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.

SILVA, M.A.; NEBRA, S.A.; MACHADO, M.J. and SANCHEZ, C.G. The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. **Biomass and Bioenergy**, v.14, n. 5/6, p. 457-467, 1998.

SIMÕES, J. et al. Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments. **Carbohydrate Polymers**, v.97, n.1., p.81-89, 2013.

SIMÕES, J. et al. Immunostimulatory properties of coffee mannans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.53, p.1036-1043, 2009.

SIMÕES, J. et al. Thermal stability of spent coffee ground polysaccharides: Galactomannans and arabinogalactans. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 256-264, 2014.

SIMÕES, J., NUNES, F. M., MARIA DO ROSÁRIO, M. D. and COIMBRA, M. A. Structural features of partially acetylated coffee galactomannans presenting immunostimulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.397–402, 2010.

SINGH, T.P., SIDDIQI, R.A.and SOGI, D.S. Statistical optimization of enzymatic hydrolysis of rice bran protein concentrate for enhanced hydrolysate production by papain. **Food Science and Technology**, v. 99, p. 77-83, 2019.

SIRACUSA, V., ROCCULI, P., ROMANI, S. ROSA, M.D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.19, p. 634-643, 2008.

SOARES, T.E. **Reducing food waste in Brazil – A Brazilian-italian legislative cooperation initiative**. Global public policy network (GPPN), 2017. Disponível em <<https://www.gppnetwork.org/single-post/2017/06/07/Reducing-Food-Waste-in-Brazil-A-Brazilian-Italian-Legislative-Cooperation-Initiative>>, acesso em 14 de novembro de 2017.

SOTHORNVIT, R. and KROCHTA, J.M. Plasticizer effect on mechanical properties of b lactoglobulin films. **Journal of Food Eng ineering**, v.50, p.149–155, 2001.

SOTO, J. O plástico no planeta. **Cartilha Braskem**, p. 16, 2015.

SOUSA, M.S.B., VIEIRA, L.M., SILVA, M.J.M. and DE LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e agrotecnologia**, v.35, n.3, p. 554-559, 2011.

SRINIVASA, P.C. and THARANATHAN, R.N. Chitin/Chitosan — Safe, Ecofriendly Packaging Materials with Multiple Potential Uses. **Food Reviews International**, v.23, n. 1, p. 53-72, 2007.

SU, Y., DU, R., GUO, H., CAO, M., WU, Q., SU, R., QI, W. and HE, Z. Fractional pretreatment of lignocelluloses by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. **Food and Bioproducts Processing**, v.94, p.322-330, 2015.

SUBHEDAR, P.B. and GOGATE, P.R. Alkaline and ultrasound assisted alkaline pretreatment for intensification of delignification process from sustainable raw-material. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.21, n.1, p. 216–225, 2014.

SUBHEDAR, P.B. and GOGATE, P.R. Use of Ultrasound for pretreatment of biomass and subsequent hydrolysis and fermentation. In: **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**, p.127-149, chapter 6, 2016.

SUN, N., PARTHASARATHI, R., ROSHA, A.M., SHI, J., ZHANG, S., STAVILA, V., SALE, K.L., SIMMONS, B.A. and SINGH, S. Understanding pretreatment efficacy of four cholinium and imidazolium ionic liquids by chemistry and computation. **Green Chemistry**, v.16, p.2546-2557, 2014.

SUN, S., SUN, S., CAO, X. and SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, V.199, P.49-58, 2016.

SYNYTSYA, A., and NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v.2, n.2, p.1-14, 2014.

TABASSO, S., CARNAROGLIO, D., GAUDINO, E.C. and CRAVOTTO, G. Microwave, ultrasound and ball Mill procedures for bio-waste valorisation. **Green Chemistry**, n.17, p. 684-693, 2015.

TAHERZADEH, M. and KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TARAZONA, E.R.T. **Aproveitamento da fibra de borra de café como material de reforço em compósitos com matriz de resina epóxi preparada a partir de óleo de cozinha usado**. 106f. Tese (Doutorado)- Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

THIAGAMANI, S.M.K., NAGARAJAN, R., JAWAID, M., ANUMAKONDA, V. and SIENGCHIN, S. Utilization of chemically treated municipal solid waste (spent coffee bean

powder) as reinforcement in cellulose matrix for packaging applications. **Waste Management**, v.69, p. 445-454, 2017.

TIAN, X., WANG, Z., ZHAO, S., LI, S., WANG, J. and WANG, S. The influence of the nonsolvent intrusion through the casting film bottom surface on the macrovoid formation. **Journal of Membrane Science**, v.464, p.8-19, 2014.

TOKIMOTO, T., KAWASAKI, N., NAKAMURA, T., AKUTAGAWA, J. and TANADA, S. Removal of lead in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 281, p. 56-61, 2005.

UPPUGUNDLA, N., SOUSA, L.C., CHUDANWAT, S.P.S., YU, X., SIMMONS, B., SINGH, S., GAO, X., KUMAR, R., WYMAN, C.E., DALE, B.E. and BALAN, V. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX™ pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v.7, n.1,p.1-14, 2014.

VALENCIA, N.R. and FRANCO, D.A.Z. Los subproductos del café: fuente energia renovable. **Avances técnicos – Cenicafé**, v.393, p. 1-8, 2010.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 198f. Tese (Doutorado) -Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, 2003.

VIEIRA, M. G. A., DA SILVA, M. A., DOS SANTOS, L. O. and BEPPU, M. M. Natural based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v.47, n.3, p. 254-263, 2011.

VILARÓ, P., BENNADJI, Z., BUDELLI, E., MOYNA, G., PANIZZOLO, L. and FERREIRA, F. Isolation and characterization of galactomannans from *Prosopis affinis* as potential gum substitutes. **Food Hydrocolloids**, v.77, p. 711-719,2018.

VILELA, W. F., LEÃO, D. P., FRANCA, A. S. and OLIVEIRA, L. S. Effect of Peroxide Treatment on Functional and Technological Properties of Fiber-Rich Powders Based on Spent Coffee Grounds. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, n. 1, 2016.

WIELINGA, W. C. **Production and applications of seed gums**. In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, G. O. PHILLIPS, P. A. WILLIAMS, and D. J. WEDLOCK, eds., IRL Pressat Oxford University Press, Oxford, p. 383–403, 1990.

XU, F., LI, Y., GE, X., YANG, L. and LI, Y. Anaerobic digestion of food waste – Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v.247, p. 1047-1058, 2018.

XU, F., YU, J., TESSO, T., DOWELL, F. and WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, v.104, p.801-809, 2013.

XU, H., LI, B. and MU, X. Review of alkali-based pretreatment to enhance enzymatic saccharification for lignocellulosic biomass conversion. **Industrial & engineering chemistry research**, v.55, p. 8691-8705, 2016.

XU, Q., CHEN, C., ROSSWURM, K., YAO, T.; JANASWAMY, S. A facile route to prepare cellulose-based films. **Carbohydrate polymers**, v. 149, p. 274-281, 2016.

YAKIMETS, I., PAES, S. S., WELLNER, N., SMITH, A. C., WILSON, R. H. and MITCHELL, J. R. Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: a comparative study. **Biomacromolecules**, v.8, p.1710-1722, 2007.

YANG, B., DAI, Z., DING, S. and WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, v.2, n.4, p.421-450, 2011.

YANG, B.; JIANG, Y.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, L. Effects of ultrasonic extraction on the physical and chemical properties of polysaccharides from longan fruit pericarp. **Polymer Degradation and Stability**, v.93, n.1, p. 268-272, 2008.

YANG, H., YAN, R., CHEN, H., LEE, D.H. and ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v.86, p.1781-1788, 2007.

YANG, J., JIANG, J., ZHAG, N., MIAO, C., WEI, M. and ZHAO, J. Enhanced enzyme saccharification of Sawtooth Oak shell using dilute alkali pretreatment. **Fuel**, v. 139, p 102-106, 2015.

YANG, L. and PAULSON, A. T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, v. 33, n. 7, p. 571-578, 2000.

YE, Z., MA, P., TANG, M., LIX., ZHANG, W., HONG, X., CHEN, X. and CHEN, D. Interactions between calcium alginate and carrageenan enhanced mechanical property of a natural composite film for general packaging application. **Polymer Bulletin**, v.74, p. 3421-3429, 2017.

YOUSUF, B., QADRI, O.S. and SRIVASTAVA, A.K. Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. **Food Science and Technology**, v. 89, p. 198-209, 2018.

ZABANIOTOU, A. and KAMATEROU, P. Food waste valorization advocating Circular Bioeconomy - A critical review of potentialities and perspectives of spent coffee grounds biorefinery. **Journal of Cleaner Production**, v.211, p.1553-1566, 2019.

ZANCHETTA, A. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica**. 88f. Dissertação (mestrado) -Microbiologia. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista, São José do Ribeirão Preto, 2012.

ZARRINBAKHS, N., WANG, T., RODRIGUEZ-URIBE, A., MISRA, M. and MOHANTY, A.K. Characterization of wastes and coproducts from the coffee industry for composite material production. **BioResources**, v.11, n.3, p.7637-7653, 2016.

ZENEBON, O., PASCUET, N. S. and TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: Instituto Adolfo Lutz**, p. 1020, 2008.

ZHANG Y-H.P and LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of purified from *Trichoderma viride*. **Biotechnology Bioenergy**. v. 13, p. 173-178, 1988.

ZHANG, H., HUANG, S., WEI, W., ZHANG, J. and XIE, J. Investigation of alkaline hydrogen peroxide pretreatment and Tween 80 to enhance enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v.12, n.107, p.1-9, 2019.

ZHANG, J., FENG, L., WANG, D., ZHANG, R., LIU, G. and CHENG, G. Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment. **Bioresource Technology**, v.153, p. 379-382, 2014.

ZHANG, J., TANG, M. and VIKARI, L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. **Bioresource Technology**, v.121, p.8-12, 2012.

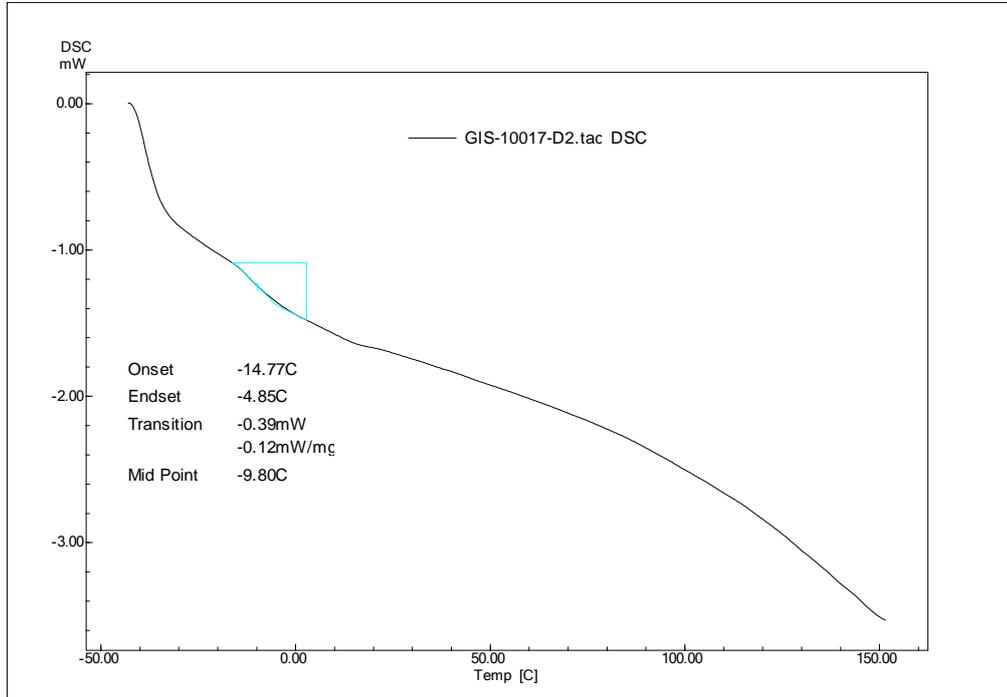
ZHANG, Y.H.P., HIMMEL, M.E. and MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ZHENG, Y., ZHAO, J., XU, F. and LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, n.42, p. 35-53, 2014.

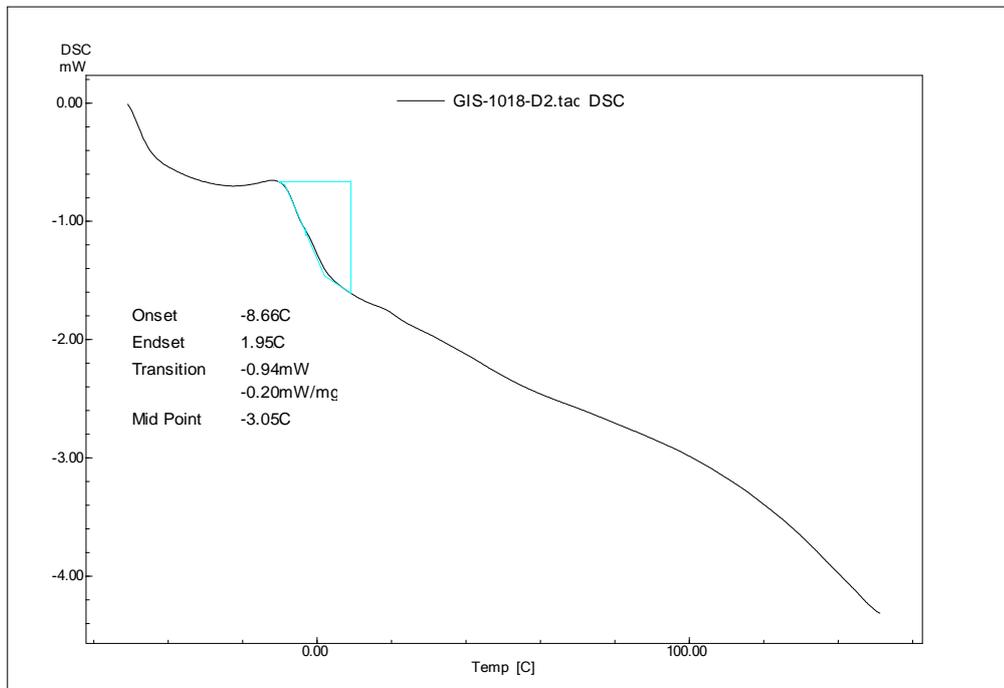
ZHU, S., WU, Y., YU, Z., CHEN, Q., WU, G., YU, F., WANG, C. and JIN, S. Microwave-assisted Alkali Pre-treatment of Wheat Straw and its Enzymatic Hydrolysis. **Biosystems Engineering**, n. 94, v.3, p.437-442, 2006.

## ANEXOS

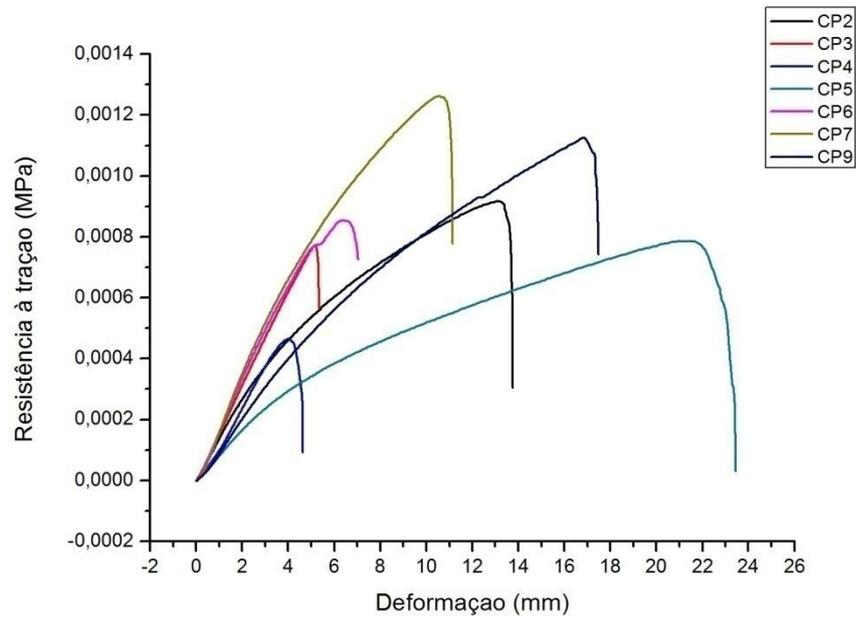
### ANEXO A – TERMOGRAMA DA TG DO FILME BPHA.



### ANEXO B – TERMOGRAMA DA TG PARA O FILME BPHAE.

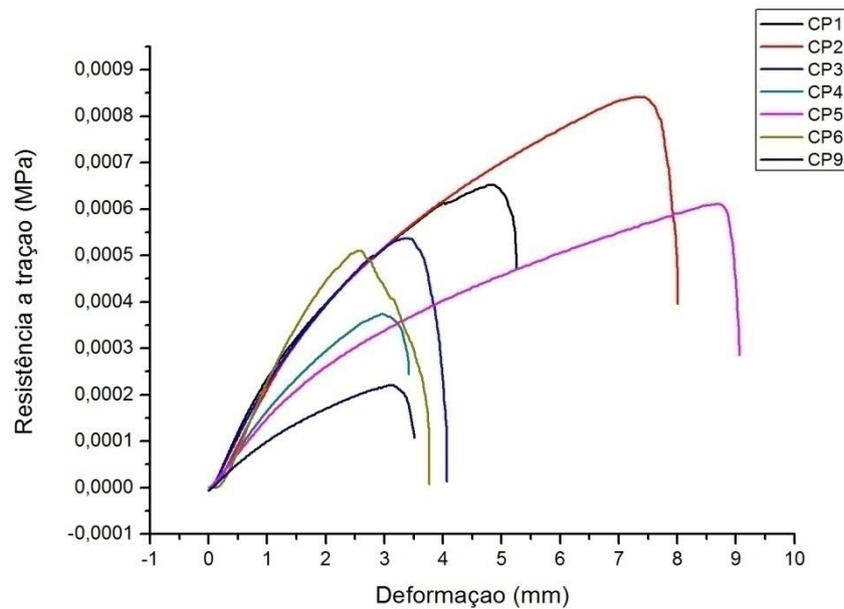


### ANEXO C- CURVAS DA RESISTÊNCIA A TRAÇÃO VERSUS DEFORMAÇÃO DO FILME BPHA



Fonte: elaborado pelo autor.

### ANEXO D - CURVAS DA RESISTÊNCIA A TRAÇÃO VERSUS DEFORMAÇÃO DO FILME BPHAE



Fonte: elaborado pelo autor.