



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**AVALIAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ COMO SUPORTE ALTERNATIVO PARA
IMOBILIZAÇÃO MICROBIANA**

ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

Orientador: Prof. Boutros Sarrouh

Ouro Branco
2014

AVALIAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ COMO SUPORTE ALTERNATIVO PARA IMOBILIZAÇÃO MICROBIANA

ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado em cumprimento às exigências
do Curso de Bacharelado em Engenharia de
Bioprocessos da Universidade Federal de
São João del-Rei.

Orientador: Prof. Boutros Sarrouh

**Ouro Branco
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**AVALIAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ COMO SUPORTE ALTERNATIVO PARA
IMOBILIZAÇÃO MICROBIANA**

ANDRÉ OLIVEIRA SANTOS

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Boutros Sarrouh – Orientador

Antônio Helvécio Totola – Examinador 1

Bruno Meireles Xavier – Examinador 2

Ouro Branco, __/__/____

À minha família, principalmente aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram, aos meus amigos de Ouro Branco e São João del-Rei e ao professor Boutros Sarrouh pelo aprendizado, paciência e crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dotado de determinação nas horas difíceis da realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, por acreditarem no meu sucesso, por serem meu apoio e me ajudarem a trilhar os melhores caminhos. À minha irmã, cúmplice desde sempre. À Ludimilla, pelo companheirismo e presença constante.

À todos os amigos que fiz durante minha graduação e aos amigos de São João del-Rei, os quais levo para vida toda.

À querida República Algazarra, minha família de Ouro Branco, pela convivência, aprendizado e momentos de descontração.

Ao meu orientador Boutros Sarrouh, pela dedicação e carinho com que se empenhou neste estudo.

Aos professores do curso de Engenharia de Bioprocessos, pelos valiosos ensinamentos, oportunidades e apoio em todos os sentidos.

À UFSJ pelo ensino de qualidade.

Muito obrigado!

RESUMO

Recentemente, materiais lignocelulósicos têm ganhado importância como suporte alternativo para imobilização de enzimas e células, tendo em conta a sua disponibilidade econômica como subprodutos agroindustriais. Etapas de pré-tratamento são convenientes para alterar as dimensões macro e microscópicas desses materiais, tornando-os úteis para uso em bioprocessos. Como exemplo destes métodos, pode-se citar moagem, hidrólise alcalina, explosão a vapor e hidrólise ácida. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da casca de café, tratada ou não, como suporte renovável de imobilização microbiana. Segundo os resultados obtidos observou-se que os tratamentos físico-químicos aplicados à casca de café *in natura* induziram um aumento na sua capacidade de adsorção e conseqüentemente na eficiência de imobilização. O tratamento com explosão a vapor com etanol (1,5 Kgf/cm², a 127°C, por 35 minutos) determinou os melhores valores de imobilização celular, com valores de 210% superiores aos obtidos no caso da casca não tratada. Dessa forma, a utilização da casca de café, um biosuporte abundante e acessível, como suporte de imobilização de células microbianas mostrou-se possível e de fácil execução.

Palavras-chave: Biocatalisadores imobilizados; casca de café; bioengenharia; resíduos lignocelulósicos; fermentação.

ABSTRACT

Recently, lignocellulosic materials have gained importance as an alternative support for the immobilization of enzymes and cells in view of their economic availability as agro-industrial by-products. Pretreatment steps are convenient to change the macro- and microscopic dimensions of these materials, making them useful for use in bioprocesses. As an example of these methods, one can cite grinding, alkali hydrolysis, steam explosion and acid hydrolysis. Thus, this study aimed to evaluate the coffee husk capacity, treated or not, as renewable support for microbial immobilization. According to the obtained results, it was observed that physical and chemical pretreatments applied to coffee husk "in natura" induced an increase in its adsorption capacity and hence in the immobilization efficiency. The treatment with steam explosion with ethanol (1.5 kgf /cm² at 127°C for 35 minutes) determined the best cellular immobilization values of 210% higher than those obtained in the case of untreated husk. The use of coffee husk, an abundant and inexpensive biosupport, as microbial cell immobilization support proved to be possible and easy to perform.

Key words: Immobilized biocatalysts; coffee husk; lignocellulosic residues; fermentations; bioengineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O aumento no número de publicações com a palavra-chave "imobilização celular". (Fonte: Web of Science Data Base "online").....	3
Figura 2: Tipos de imobilização celular. (LAPA, 2003).....	6
Figura 3: Representação dos tipos de imobilizações de células. (COVIZZI et al., 2007).....	8
Figura 4: Reação de ativação do Suporte com Glicidol. (SANTOS, 2010).....	10
Figura 5: Reação de transformação do gliceril. (SANTOS, 2010).....	11
Figura 6: Imobilização celular em casca <i>in natura</i> e casca moída após 66 h de fermentação.....	25
Figura 7: Relação entre a massa microbiana imobilizada, nos suportes da casca <i>in natura</i> e moída, e o tempo de fermentação.....	26
Figura 8: Imobilização celular em casca <i>in natura</i> e casca moída tratadas com NaOH 4% p/v, após 66 h de fermentação.....	27
Figura 9: Relação entre a massa microbiana imobilizada, nos suportes da casca <i>in natura</i> e moída, tratadas com NaOH 4% p/v, e o tempo de fermentação.....	27
Figura 10: Imobilização celular em casca <i>in natura</i> e casca moída tratadas com descompressão térmica, após 66 h de fermentação.....	28
Figura 11: Relação entre a massa microbiana imobilizada, nos suportes da casca <i>in natura</i> e moída, tratadas com descompressão térmica, e o tempo de fermentação.....	29
Figura 12: Comparação da eficiência do suporte levando em conta somente casa <i>in natura</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição (%) de diferentes resíduos agrícolas. (Fonte: Adaptada de KUHAD e SINGH, 1993).....	14
Tabela 2: Composição da casca e da polpa de café em porcentagem (%) de peso seco. (Fonte: SOCCOL, 2000).....	15
Tabela 3: Composição bromatológica da casca de café e matéria seca. (Fonte: Adaptado de BARCELOS et al., 2001).....	15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Geral	5
2.2. Objetivos Específicos.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Métodos de Imobilização	6
3.2. Ligação à Superfícies por Adsorção.....	9
3.2.1. Suportes alternativos utilizados na imobilização microbiana	12
3.3. Casca de Café Como Suporte Lignocelulósico de Imobilização	13
3.4. Técnicas de Pré-Tratamentos empregados.....	16
3.5. Uso de Biocatalisadores Imobilizados em Processos Biotecnológicos..	17
3.6. Micro-organismo: <i>Sccharomyces cerevisiae</i>	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Suporte de imobilização.....	22
4.2. Pré-tratamentos empregados	22
4.2.1. Pré-tratamento físico.....	22
4.2.2. Tratamento com NaOH.....	22
4.2.3. Descompressão explosiva térmica com etanol 70%.....	23
4.3. Meio de fermentação e imobilização celular.....	23
4.4. Determinação de células imobilizadas.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Avaliação da capacidade de imobilização celular do suporte sob diferentes tratamentos.....	25
5.1.1. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca in natura e casca moída.....	25
5.1.2. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca in natura e casca moída pré-tratadas com NaOH (4% p/v).....	26
5.1.3. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca in natura e casca moída pré-tratadas com descompressão térmica com etanol 70%.....	28
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Um desempenho adequado em biotecnologia está associado a fatores diversos, dos quais podemos citar o estado morfológico e fisiológico do micro-organismo em questão como determinantes. Esses elementos estão associados ao meio de cultivo e este, por sua vez, pode exigir mudanças objetivando sempre uma melhor produtividade.

Uma das alternativas encontradas para aperfeiçoar a estrutura morfológica destes micro-organismos é a imobilização celular (IC), para aplicação tanto em escala de laboratório quanto industrial. A tecnologia da IC abrange principalmente a produção de metabólitos extracelulares e a utilização de micro-organismos como biocatalizadores. (KOURKOUTAS et al., 2004; PRASAD et al., 2005)

Segundo Cantarelli (1989), a imobilização é definida como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que a sua atividade catalítica não seja afetada. Tanto imobilização quanto encapsulação de micro-organismos são termos que descrevem as muitas formas com que as células podem ser aprisionadas em matrizes ou suportes. Existem dois tipos de leito para a imobilização de células, os que as aprisionam fisicamente e os que as aderem à superfície. No primeiro caso, são encapsuladas em glóbulos ou fibras feitas de polissacarídeos, de proteínas ou polímeros sintéticos. No segundo, as células são fixadas ao suporte de imobilização diretamente por ligações químicas (Iônicas ou covalentes). (MEERSMAN, 1992; LAPA, 2003)

A chamada imobilização natural é aquela definida por acontecer espontaneamente, não sendo necessárias reações induzidas para realizar a adsorção dos micro-organismos. Este tipo de adesão é comum na natureza e pode acontecer em praticamente todos os ambientes. Com a intervenção do ser humano torna-se possível a sua utilização para fins diversos em biotecnologia.

Em reações fermentativas a atividade fisiológica das células imobilizadas pode variar em função do método de imobilização empregado. Por exemplo, a auto agregação induzidas por agentes químicos modifica quimicamente a membrana celular, afetando o metabolismo e o crescimento; células adsorvidas podem apresentar propriedades de membrana diferentes e o acúmulo das mesmas em um

biofilme pode levar a limitações de transferência de massa. (GROBOILLOT et al., 1994).

Quanto às técnicas de aprisionamento em matrizes porosas, estas normalmente resultam em mudanças nas propriedades físico-químicas do microambiente no qual as células se encontram, influenciando o metabolismo celular. Estas variações na atividade fisiológica das células imobilizadas, dependentes também das características do suporte de imobilização utilizado, podem influenciar positiva ou negativamente o desempenho do processo fermentativo envolve mecanismos variados, ainda pouco caracterizados e compreendidos. (GROBOILLOT et al., 1994)

De uma maneira geral, efeitos determinados por componentes solúveis da matriz de imobilização, tolerância e/ou proteção a compostos tóxicos e tipo de metabolismo, entre outros, têm sido utilizados como justificativas para a melhora ou piora na atividade catalítica determinada pela imobilização. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende basicamente de dois fatores: das características peculiares do micro-organismo e das condições de uso do micro-organismo imobilizado. Face à variabilidade destes dois fatores, não existe um método e nem um suporte universal adequado para qualquer processo. O método e o tipo de suporte a serem empregados em um determinado processo devem ser estabelecidos empiricamente. (VITOLLO, 1988)

A imobilização dos biocatalizadores é uma alternativa que vem se mostrando cada vez mais viável e concreta no cenário industrial, pois contabiliza uma gama de vantagens, das quais a que mais se destaca é a possibilidade de recuperar a célula ou enzima utilizada. Beynum (1980) observou também que instabilidades e frequentes adequabilidades para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização.

Groboillot et al (1994) e Pradella (2001) citam a possibilidade de melhor controle das propriedades reológicas do meio, maior pureza e rendimento de produtos, não há necessidade de extração e purificação das enzimas e podem ser esperados resultados econômicos mais favoráveis. Além disso, observa-se melhora na resposta quanto à resistência mecânica do meio. O emprego de células livres não seria possível, sem a ajuda dos suportes, em meios de cultivo mais tóxicos.

Pesquisas na área de imobilização de células microbianas têm aumentado consideravelmente no setor de biotecnologia. O interesse por esta técnica pode ser avaliado pelo crescente número de artigos e resenhas publicados, citando-se a palavra-chave “imobilização celular”. (COVIZZI et al., 2007) Como mostra a Figura 1:

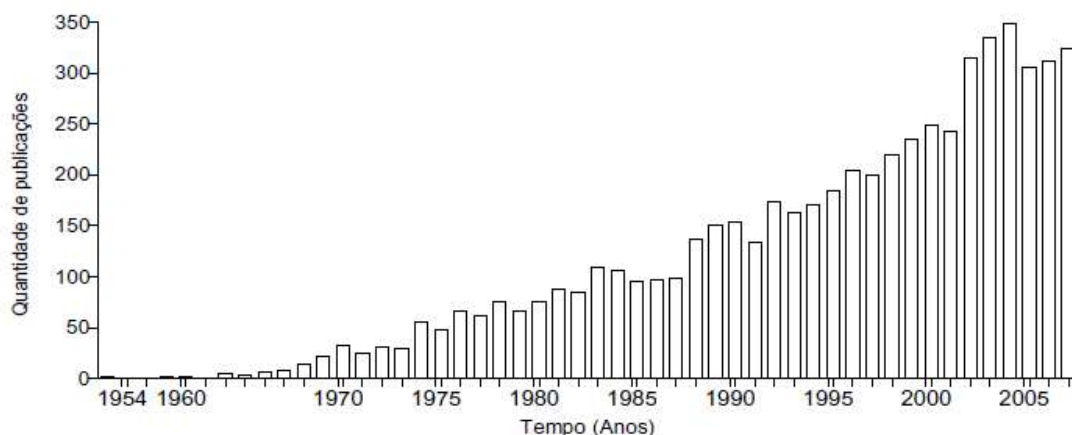


Figura 1: O aumento no número de publicações com a palavra-chave "imobilização celular". (Fonte: Web of Science Data Base "on-line")

O desenvolvimento de novos suportes de imobilização, aliado à utilização de técnicas de biologia molecular, possam contribuir para o desenvolvimento de novos processos em larga escala. Os conhecimentos adquiridos até o momento serão de fundamental importância para os progressos que venham a ser obtidos. (LAPA, 2003)

O maior domínio dessas técnicas, associado ao conhecimento dos mecanismos envolvidos nessas reações, resulta a cada dia no aparecimento de uma vertente promissora em bioprocessos, abrindo um amplo leque de possibilidades no campo. Aliado a esse crescimento, observa-se também, um enorme interesse na utilização de resíduos industriais (principalmente agrícolas) como fonte de matéria prima para interesses diversos. Nessa perspectiva, a utilização de micro-organismos imobilizados em suportes inertes e baratos é hoje um dos enfoques para a aplicação em diversos processos no país e no mundo. Avaliar a casca de café como suporte imobilizador é atraente nesse contexto.

O beneficiamento do café compreende diversas etapas, desde a colheita até a torrefação, e tem como objetivo separar a polpa do grão de café, de forma que

permaneçam as sementes as quais constituem o produto comercializável. (HALAL, 2008)

Após a colheita, o café pode ser preparado por duas vias distintas: a via seca e a via úmida. O processamento do café por via seca, modo de preparo de uso majoritário no país, gera aproximadamente 40% de casca. (PANDEY et al., 2000) Logo, é possível presumir a quantidade elevada desse resíduo que é gerada, ao se observar o volume de produção atual de café no país. (MAPA, 2013)

O fato da utilização da casca de café em bioprocessos representa uma forma de agregar valor a este resíduo abundante, solucionando o problema ambiental causado pelo seu acúmulo excessivo. (MAIA, 2014)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da casca de café, tratada ou não, como suporte alternativo de imobilização microbiana.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em casca de café *in natura* e submetida à técnica de pré-tratamento físico de moagem;
- Avaliar a eficiência da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em casca de café, moída e *in natura*, submetida à técnica de pré-tratamento por descompressão explosiva térmica com etanol;
- Avaliar a eficiência da imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em casca de café, moída e *in natura*, submetida à técnica de pré-tratamento de hidrólise alcalina com NaOH; 4%.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Métodos de Imobilização

Existem quatro princípios básicos para a imobilização de biocatalisadores (figura 2): Ligação a superfícies (adsorção), aprisionamento em matrizes porosas, contenção por membranas e auto agregação. (Gerbsch e Buchholz, 1995)



Figura 2: Tipos de imobilização celular. (LAPA, 2003)

A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá basicamente de dois fatores: 1- das características peculiares do material biológico; 2- das condições de uso do sistema imobilizado. Face à variabilidade destes fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal, adequados para qualquer processo. (CORCORAN, 1985; VITOLO, 1988)

Na literatura são citados inúmeros materiais inertes que podem ser usados como suportes. A natureza física destes suportes varia desde matérias geliformes (alginato, álcool polivinílico, carragena, etc) até superfícies sólidas (vidro poroso, Eupergit C, alumina, etc). Os suportes podem ser classificados em cinco tipos fundamentais: 1. Microporosos ou não porosos (vidro, sílica, nylon); 2. Microencapsulados (nitrocelulose, triacetato de celulose); 3. Polímeros com moderado grau de ligações cruzadas (poliacrilamida); 4. Polímeros com baixo grau

de ligações cruzadas (sephadex, DEAE celulose); 5. Macroporosos (sílica, alumina). (VITOLO, 1988; GERBSCH E BUCHHOLZ, 1995)

Os materiais utilizados como suportes deveriam idealmente ser encontrados com facilidade e abundância, custo viável, resultar em baixo custo de imobilização, facilidade de operação em grande escala, não apresentar toxidez as células, apresentar alta capacidade de retenção e ter resistência mecânica para uma longa vida operacional. (NAGASHIMA, 1984; PRADELLA, 2001) Os suportes inorgânicos são mais vantajosos que os orgânicos pela durabilidade, densidade, estabilidade e controle de porosidade. (NAGASHIMA, 1984) Segundo Moueddeb et al (1996) os materiais inorgânicos também apresentam como vantagem a facilidade de esterilização e limpeza.

O método de imobilização por meio de auto agregação envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural (uma propriedade de relativamente poucas células) ou artificialmente induzida. Desta forma, os biocatalizadores são ligados entre si sem a necessidade de uso de um suporte de imobilização. (CANILHA et al., 2006)

A prática da floculação é utilizada principalmente na indústria de bebidas, uma vez que a floculação das células de *Saccharomyces cerevisiae* afeta positivamente o tempo da fermentação, facilita a remoção das células e contribui para o aumento da qualidade da cerveja. (COVIZZI et al., 2007)

Agregados celulares naturais são geralmente instáveis e sensíveis a tensões de cisalhamento, sendo necessária a adição de agentes químicos que formam ligações cruzadas entre células, como glutaraldeído, durante a imobilização. (GROBOILLOT et al., 1994)

A imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas, como o alginato e a carragena, normalmente envolve a sintetização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Os poros da matriz formada são menores que as células contidas no interior. (PRADELLA, 2001) Este método tem sido extensivamente estudado para a imobilização de células viáveis, devido à possibilidade de uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização. (GROBOILLOT et al., 1994) Além disso, as células imobilizadas em um matriz hidrofílica podem ser protegidas de condições não adequadas de pH,

temperatura, solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio fermentativo. (PARK E CHANG, 2000)

Como a matriz de aprisionamento, que pode ser em forma de gel ou algum tipo de suporte pré-formado, geralmente resulta em limitações de transferência de massa, a imobilização na forma de esferas é geralmente preferida devido à elevada área superficial. (GROBOILLOT et al., 1994)

Pesquisas envolvendo micro-organismos imobilizados sugerem que os microambientes formados dentro dos hidrogéis sejam responsáveis pelas mudanças na fisiologia e no comportamento metabólico. Essa responsabilidade, aliás, não pode ser atribuída à natureza química ou física dos géis. (JAMAI et al., 2001) O uso deste método apresenta principalmente a baixa estabilidade mecânica e a reduzida longevidade do gel, o qual pode ser destruído devido a crescimento celular, quando da imobilização de células metabolicamente ativas e em crescimento, ou à liberação de CO₂. (COVIZZI et al., 2007). A figura 3 esquematiza todos os tipos de imobilizações:

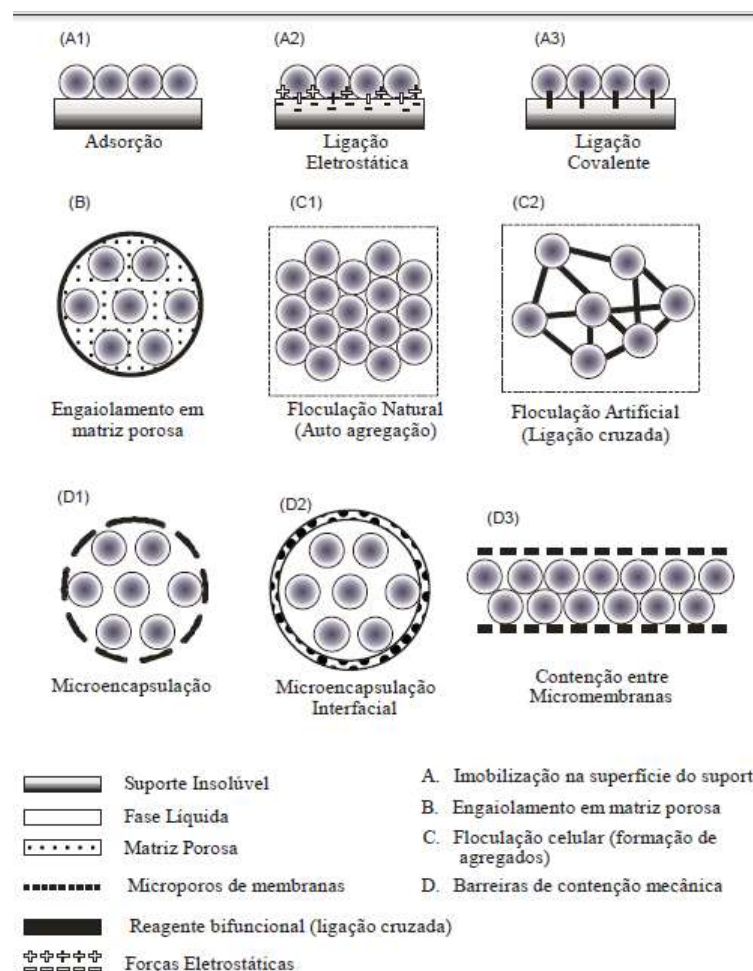


Figura 3: Representação dos tipos de imobilizações de células. (Fonte: COVIZZI et al., 2007)

O método de imobilização por meio de contenção por barreiras envolve a utilização de membranas pré-formadas ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas. (KAREL, LIBICKI e ROBERTSON, 1985) Este método está baseado na inclusão artificial das células, que ficam inseridas em uma malha rígida, ou semi-rígida, que impede a difusão destas para o meio de cultivo. Este aprisionamento do micro-organismo possibilita a troca de nutrientes, metabólitos, gases durante o processo fermentativo. A diferença entre este método e o de encapsulação é que, neste último, as células ficam apenas envoltas por uma membrana e não há uma malha entre as células por ela envolvidas. (CHAMPAGNE; LACROIX; SODINI-GALLOT, 1994; KRISHNAN et al., 2001)

O método de contenção por barreira tem sido utilizado como uma tecnologia alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas, uma vez que oferece vantagens como maior capacidade de contenção de células e prevenção da perda de células para o meio de fermentação. Devido à ausência de núcleo gelificado, as limitações à transferência de massa também são reduzidas. (PARK ; CHANG, 2000; CANILHA et al., 2006)

3.2. Ligação à Superfícies por Adsorção

O método mais antigo e simples para imobilização de biocatalisadores consiste na adsorção a um suporte sólido (ex. carvão, celite, vidro, madeira). A retenção do biocatalizador na matriz deve-se a ligações fracas, do tipo Van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas ou ligações de hidrogênio.

A técnica de adsorção consiste em um processo de transferência de massa do tipo sólido-fluido na qual se explora a capacidade de certos sólidos em concentrar na sua superfície determinadas substâncias existentes em soluções líquidas ou gasosas. (LEAL et al., 2003) Já a biossorção, outra técnica que tem sido empregada, é um processo muito semelhante à adsorção, porém a diferença é que neste caso se trabalha com biomassa, sendo um fenômeno que pode ocorrer em biomassa viva ou morta. O processo de biossorção envolve interações físico-químicas entre a superfície celular e o adsorvente, sendo assim, quanto maior a superfície de contato melhor será a capacidade de adsorção. (MORÃO, 2014)

Para que a imobilização ocorra basta colocar o biocatalisador em contato com a matriz, em condições selecionadas de pH, força iônica, natureza do tampão e temperatura. A sua aplicação é limitada dada a natureza reversível da ligação entre o catalisador e a matriz. A adsorção pode ser causada por alterações conformacionais de proteínas de membrana ou pelas condições hidrodinâmicas do sistema reacional. (PALMA, 2007)

A imobilização pode ocorrer espontaneamente por meio de interações naturais ou ser induzida, por exemplo quando as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes como glutaraldeído ou carbodiimida. A célula deve permanecer viável pois a eficiência do suporte no processo de IC é avaliada pela capacidade da matriz em alojar a maior quantidade de células vivas possível, sem limitar a transferência de massa entre o micro-organismo e o meio de cultivo. (COVIZZI et al., 2007)

Um exemplo de imobilização artificial é a ativação dos suportes com glicidol, descrito em Santos (2010), se dá em dois passos, no primeiro a biomassa adquire grupos ativos de glicerol depois de serem adicionados água destilada, NaOH 1,7mol. L-1 (gelado), NaBH₄ (boroidreto de sódio) e, sob agitação suave, glicidol (2,3- epóxi-propanol), como mostra a figura 4:

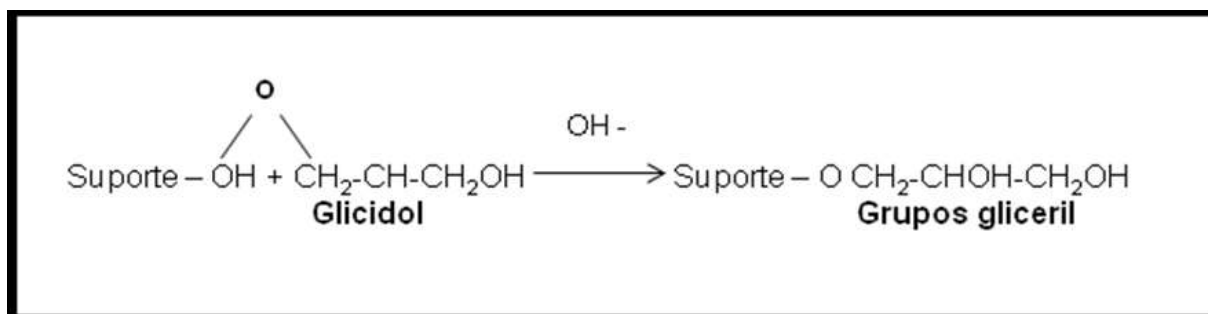


Figura 4: Reação de ativação do Suporte com Glicidol. (SANTOS, 2010)

No segundo passo ocorre a transformação do grupo gliceril em glioxil pela oxidação catalisada pelo periodato de sódio (NaIO₄) 100 mmol. L-1. (SANTOS, 2010) Após lavado abundantemente o suporte ativado pode servir tanto para imobilizações com células quanto enzimas.

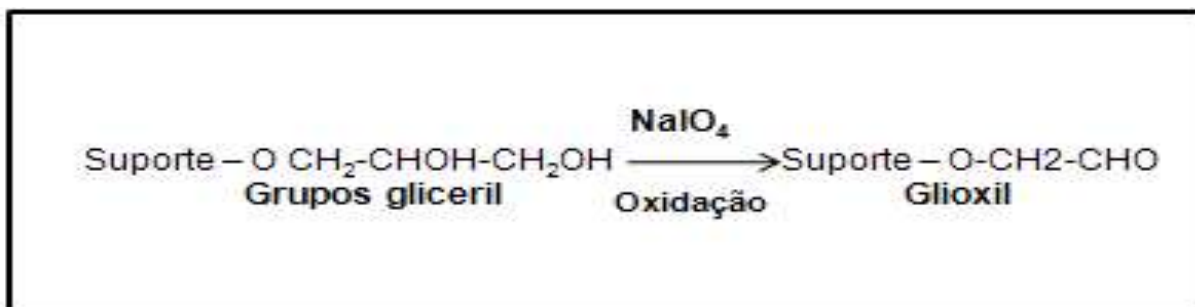


Figura 5: Reação de transformação do gliceril. (SANTOS, 2010)

Conforme mencionado, o método de imobilização por meio de ligação a superfícies pode ser realizado por meio de interações iônicas adsorptivas, ou através de ligações covalentes adsorptivas entre grupos reativos do suporte e do biocatalisador. A ligação por meio de adsorção natural é um método acessível, suportes porosos têm sido bastante utilizados permitindo a ligação do biocatalisador também à estrutura superficial interna. (GROBOILLOT et al., 1994; PRADELLA, 2001)

A escolha de uma matriz adequada para a imobilização das células é de fundamental importância para a obtenção do produto desejado, sendo esta escolha peculiar para cada micro-organismo e metabólito estudado. (PETRE et al., 1999) Para a IC de fungos, utilizam-se suportes porosos visto que ocorre adesão das células microbianas à superfície do suporte. Quando os poros são maiores, as células em crescimento penetram no suporte, preenchendo seu espaço interno. Este método de imobilização também se utiliza da habilidade dos micro-organismos produzirem e secretarem exopolissacarídeos (EPS). (PRASAD et al., 2005)

Um dos problemas deste tipo de imobilização está relacionado com o acúmulo de biofilme ou EPS sobre a superfície, o que dificulta a absorção de nutrientes devido às características heterogêneas do crescimento celular. Os produtos secretados para o meio extracelular têm sua difusão dificultada e a troca gasosa também pode ser comprometida. (XAVIER et al., 2003)

Alguns materiais alternativos têm sido empregados como suportes de imobilização microbiana por adsorção, como pedaços de maçã para imobilizar *Saccharomyces cerevisiae* em processos de vinificação. De acordo com Kourkoutas et al., (2001), essa técnica é uma alternativa de custo interessante e compatível com o aroma e sabor dos vinhos. Resíduos de peças de cerâmicas têm sido utilizados

como suporte de imobilização para *Candida tropicalis* no tratamento de resíduos ricos em carboidratos procedentes de indústrias alimentícias. Peneiras de aço inoxidável também têm sido utilizadas para imobilizar células de *P. chrysosporium*, visando à produção de peroxidases. (GERIN; ASTHER; ROUXHET, 1997).

Outros tipos de matrizes sólidas como DEAE-celulose, serragem, bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, esponja vegetal estão sendo estudadas como suportes. O desenvolvimento de novos suportes de imobilização, não tóxicos e ambientalmente corretos, pode contribuir para o desenvolvimento de novos processos em larga escala. Atualmente, materiais lignocelulósicos ganharam importância como suportes para imobilização de biocatalisadores, devido à sua disponibilidade econômica e por serem subprodutos agroindustriais. (D'SOUZA e GODBOLE, 2002)

3.2.1. Suportes alternativos utilizados na imobilização microbiana

Alguns materiais tem si sido amplamente estudados para IC, a terra de Kanuma, um solo proveniente do Japão, ocarvão ativado, a celulose em pó são exemplos de suportes alternativos usados porosos para imobilização de células de leveduras. (KUMAKURA, YOSHIDA e ASANO, 1992)

A crisolita, que se trata de um mineral constituído de silicato de magnésio bastante abundante no Brasil, pode ser usada como suporte mineral para células de levedura na fermentação alcoólica e possui uma série de vantagens comparada a vários outros suportes. Esta possui excelente estabilidade para uso em longos períodos, é resistente a tratamentos térmicos, possui custo atraente e estimula a produção de etanol pela levedura aumentando sua produtividade específica do processo. (ALEGRE et al., 2003)

O sabugo de milho também é considerado um suporte alternativo para imobilização celular. O mesmo é formado por quatro partes: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula. O pó de sabugo de milho é utilizado como suporte de imobilização de biocatalisadores devido às suas características de dureza e resistência à abrasão. (ZIGLIO et al., 2007)

Outro subproduto, também abundante no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar. O bagaço possui em torno de 50% de celulose, 25-35% de hemicelulose,

22% de lignina e em torno de 10% de outros compostos. (CUNHA, 2006) As fibras lignocelulósicas do bagaço são capazes de reagir com grupos funcionais polares, como, os presentes nas resinas fenólicas, por apresentarem hidroxilas reativas acessíveis. (TITA et al., 2002)

O bagaço de cana e o sabugo de milho apresentam hidroxilas livres reativas, podendo assim serem ligados a moléculas químicas com objetivo de distanciar o ligante, para imobilização das enzimas, produzindo suportes glioxil-bagaço de cana e/ou sabugo de milho, amino bagaço de cana e/ ou sabugo de milho, ou glutaraldeído bagaço de cana e/ ou sabugo de milho. (GUISÁN et al., 1997)

3.3. Casca de Café Como Suporte Lignocelulósico de Imobilização

Muitos materiais utilizados para imobilização são sintéticos e não biodegradáveis, gerando consequências para o meio ambiente após sua utilização. Outros, por sua vez, são tóxicos ou podem apresentar propriedades indesejáveis tais como cor, sabor e aroma, tornando impróprios para imobilização na indústria de alimentos. (HUSAIN et al., 1996; SANTOS, 2010)

Os resíduos agrícolas são materiais lignocelulósicos geralmente constituídos de celulose, hemicelulose, lignina. As proporções de todos os constituintes variam para cada espécie vegetal. (KUHAD; SINGH, 1993)

A celulose, o biopolímero mais abundante em nosso planeta, é formada por moléculas de glicose unidas por ligações β (1,4). A molécula de celulose é linear, ocorrendo ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. As ligações intramoleculares auxiliam na manutenção da rigidez da cadeia de celulose, enquanto as intermoleculares mantêm as cadeias em um arranjo firme e compacto. Duas regiões distintas são visualizadas na molécula: a região cristalina, que apresenta moléculas altamente orientadas e apresenta resistência à degradação microbiana, e a região amorfa, onde há uma menor orientação entre as moléculas, sendo, portanto, mais facilmente hidrolisada. (FENGEL; WEGENER, 1989)

Assim como a celulose, as hemiceluloses são polímeros que aparecem em grandes quantidades nos resíduos lignocelulósicos. São heteropolissacarídeos formados por cadeias lineares apresentando ramificações laterais, sendo compostas

por hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-xilose, L- e D-arabinose) e ácidos urônicos. (COELHO, 2007)

Devido ao baixo grau de polimerização e falta de cristalinidade, as estabilidades química e térmica desta fração são menores do que da celulose. A fração hemicelulósica é mais facilmente hidrolisável do que a celulose graças à heterogeneidade dos componentes e seu estado amorfo. (JEFFRIES, 1983) O que permite a utilização dos seus açúcares, como a D-xilose, para a produção de diferentes produtos de interesse, como, por exemplo, o xilitol. (CARVALHO, 2004; SANTOS et al., 2005a; SANTOS et al., 2005b)

A lignina é uma macromolécula mais complexa e segundo Adler (1977 apud PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000), a estrutura da lignina caracteriza-se como uma molécula aromática que é sintetizada a partir de precursores fenilpropanóicos e que pode pertencer a duas classes, como: a guaiacil-lignina e a guaiacil-siringuillignina, que diferem no esqueleto fenilpropanóico.

De estrutura polifenólica tridimensional, a lignina confere elevada rigidez ao vegetal e não é convertida em açúcares fermentescíveis. Sua degradação via hidrólise libera compostos fenólicos, como alcoóis aromáticos e aldeídos, caracterizados como inibidores do metabolismo microbiano. (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000)

A proporção entre celulose, hemicelulose e lignina, variam consideravelmente de acordo com a espécie, idade de colheita, condições de crescimento e a parte do vegetal (Tabela 1).

Tabela 1: Composição (%) de diferentes resíduos agrícolas. (Adaptada de KUHAD e SINGH, 1993)

Resíduos	Hemicelulose	Celulose	Lignina	Cinzas
Casca de Café	25	37	15	8
Bagaço de Cana-de-açúcar	33	30	29	4
Sabugo de Milho	42	39	14	2
Palha de Arroz	32	24	13	12
Casca de Arroz	36	15	19	20
Serragem	55	14	21	5
Palha de Sorgo	33	18	15	10
Palha de Trigo	30	24	18	10

A casca de café é uma matéria-prima lignocelulósica rica em diferentes biomoléculas, sendo os carboidratos constituintes de mais de 50% do seu peso seco, seguidos pelas pectinas e proteínas, respectivamente (Tabela 2). Em resíduos vegetais, os carboidratos predominantes são a celulose e a hemicelulose. (MAIA, 2014)

Tabela 2: Composição da casca e da polpa de café em porcentagem (%) de peso seco. (SOCCOL, 2000)

Componente	% peso seco
Carboidratos	57,8
Proteínas	9,2
Lipídeos	2,0
Cafeína	1,3
Taninos	4,5
Pectinas	12,4

A composição da casca de café pode variar com o processamento e sua eficiência, variedade do cultivar, e das condições de cultivo. Do ponto de vista bromatológico, Barcelos et al. (2001) analisaram três diferentes cultivares de café e encontraram os valores médios apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Composição bromatológica da casca de café e matéria seca. (Adaptado de BARCELOS et al., 2001)

Componentes	Casca (%)
Matéria Seca (MS)	88,37
Celulose	37,26
Hemicelulose	24,98
Proteína Bruta (PB)	9,92
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	77,19
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	52,20
Extrato Etéreo (EE)	10,18
Matéria Mineral	8,52

Estes componentes formam uma estrutura complexa e recalcitrante que dificulta sua degradação e consequentemente sua utilização em bioprocessos. Assim, faz-se necessário uma etapa de pré-tratamento que consiste na quebra da

ligação entre a lignina e a hemicelulose, bem como no rompimento da estrutura cristalina da celulose. (MAIA, 2014)

Uma das limitações para o aproveitamento da casca de café é a própria estrutura da biomassa. Geralmente, é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose ou a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento físicos e químicos ou a combinação entre elas. Diversos métodos têm sido empregados para hidrólise dos componentes dos materiais lignocelulósicos, (SUN et al., 2002) tornando-os úteis para uso em bioprocessos. Como exemplo destes métodos, pode-se citar moagem, hidrólise alcalina, explosão a vapor, hidrólise ácida, entre outros. (SILVA et al., 1994)

3.4. Técnicas de Pré-Tratamentos empregados

Etapas de pré-tratamento são convenientes para alterar as dimensões macro e microscópicas do resíduo e a sua estrutura, (LASER et al., 2002; MOSIER et al., 2005) liberando dessa forma a fração hemicelulósica para a hidrólise. Os processos de pré-tratamento neste trabalho se dividem em: mecânicos, como a moagem; físico-químicos (explosão a vapor); químicos (hidrólise alcalina).

Os processos mecânicos, como a moagem, reduzem o tamanho da partícula, reduzem a cristalinidade e causam a quebra de ligações de longas cadeias moleculares. (LASER et al., 2002) Sendo assim, esse processo auxilia no aumento da área superficial do suporte junto ao ligante, o que em tese pode facilitar a adsorção. (COELHO, 2007)

A explosão a vapor, um tratamento físico-químico, envolve o aquecimento do material lignocelulósico banhados em etanol, numa faixa de temperatura entre 120-260 °C, por segundos até alguns minutos, seguindo-se de rápida descompressão. Esta descompressão provoca quebras bem mais acentuadas na estrutura dos materiais lignocelulósicos.

A explosão a vapor promove abertura das fibras, solubilização da fração hemicelulósica em razão da hidrólise ocasionada pela ação de ácidos formados durante o tratamento, como o ácido acético, e despolimerização parcial da estrutura da lignina. Os fatores que afetam este processo são o tempo de residência,

temperatura, tamanho e conteúdo do material lignocelulósico. (DUFF; MURRAY, 1996)

O tratamento com soluções alcalinas, como hidróxido de sódio 4% (p/v), remove a parte da lignina e hemicelulose, causa modificações na estrutura cristalina de celulose, promove um inchamento das fibras, o que aumenta a área de superfície do material. (BISARIA, 1997) Na hidrólise ocorre o rompimento nas ligações ésteres entre hemicelulose e lignina, sendo que o efeito vai depender do conteúdo de lignina do material lignocelulósico. Observa-se que ocorre um aumento na porosidade do material quando as ligações éster são rompidas.

A hemicelulose é solúvel em baixíssimas concentrações de álcali e, nessas condições, a lignina sofre hidrólise básica. Esse tratamento aumenta a rugosidade da superfície da fibra, melhora a aderência mecânica, leva ao aumento na quantidade de celulose amorfa devido ao enfraquecimento da ligação hidrogênio na estrutura molecular da celulose. Outros fatores como temperatura e tempo de duração do tratamento também interferem no processo. (ALBIANTE, et al. 2013)

Os materiais lignocelulósicos *in natura*, devido as suas características, não permitem acessibilidade adequada aos seus componentes. Esses mesmos fatores afetam a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos, como a porosidade do material, a cristalinidade da celulose e os conteúdos de lignina e hemicelulose. (McMILLAN, 1994)

3.5. Uso de Biocatalisadores Imobilizados em Processos Biotecnológicos

A imobilização celular pode ser empregada na produção de metabólitos, na biodegradação de compostos xenobióticos e outros processos de biotransformação. A alta resistência à exposição a compostos tóxicos e ambientes hostis são características fundamentais das células imobilizadas para que possam ser usadas nestes processos. (GERBSCH e BUCHHOLZ, 1995) É possível encontrar na literatura um grande volume de publicações sobre imobilização de biocatalisadores, porém a aplicação desta tecnologia em escala industrial é ainda limitada. (GERBSCH e BUCHHOLZ, 1995)

Fungos ligninolíticos produtores das enzimas lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase, realizam a biodegradação de compostos aromáticos e não-

aromáticos. A imobilização celular é benéfica para estas enzimas, pois alguns fatores ambientais como a agitação e a aeração afetam significativamente a sua produção. (DEKKER, BARBOSA, 2001; ROGALSKI et al., 2005) A fase de secreção destas enzimas para o meio extracelular é prolongada pela imobilização. (MOREIRA et al., 1998)

Efluentes de indústrias têxteis são tratados através de processos químicos e/ou físicos, os quais não têm sido eficientes para a remoção da cor, além de apresentarem problemas de adoção pelas indústrias. Micro-organismos imobilizados têm sido estudados para o tratamento destes resíduos, com obtenção de resultados positivos de rendimento e reprodutibilidade. A taxa de descoloração de efluentes com células imobilizadas de *Funalia trogii*, permanece estável por sucessivos experimentos durante um período de 10 dias. (PARK et al., 2006)

Em processos de biodegradação, o uso da bactéria *Bacillus sp.* imobilizada em espuma de poluretano foi capaz de degradar o o-ftalato, onde a atividade catalítica continuou ativa durante 25 ciclos sucessivos. (PATIL et al., 2006)

A remoção de sulfatos de águas residuais por meio de bactérias sulfato-redutoras imobilizadas em espuma de poliuretano, carvão vegetal, polietileno de baixa densidade e cerâmicas baseadas em alumínio, favoreceram as condições anaeróbias necessárias ao desenvolvimento desses micro-organismos, além de aumentar a sua resistência às altas concentrações de sulfato encontradas. (SILVA et al., 2006)

A bioconversão de fenóis e derivados é limitada pela inibição do substrato e pequenas taxas de conversão. O uso de biorreatores combinado com biocatalisadores imobilizados em suportes sólidos permite a recirculação do resíduo aquoso a ser tratado, melhorando significativamente o processo, como no caso da remoção de hidrocarbonetos policíclicos pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. (VIGGIANI et al., 2006)

O desenvolvimento de tecnologias para a adsorção de metais pesados também tem sido beneficiada pelo uso de micro-organismos imobilizados, nestas condições o suporte é útil na estabilidade microbiana. (COSTA e FRANÇA, 1996)

O uso de um consórcio de bactérias halotolerantes no tratamento de águas salinas contaminadas por derramamento de óleo foi descrito no trabalho de Diaz et al. (2001). As células imobilizadas em fibras de polipropileno apresentaram maior

estabilidade e foram mais eficientes diante de incrementos de salinidade e apresentaram mais viabilidade celular e desempenho em altas concentrações de cloreto de sódio. (DIAZ et al., 2001)

A fermentação principal da cerveja em sistema contínuo com células imobilizadas pode se tornar uma realidade na cervejaria moderna em um curto espaço de tempo (PILKINGTON et al., 1998). De acordo com Linko et al. (1998), grandes cervejarias produzem milhões de litros de cerveja/ano. Estas cervejarias precisam ser eficientes para sobreviver em um mundo competitivo e globalizado, por isto investem altamente em tecnologias que possam otimizar o processo.

Grandes cervejarias em todo o mundo já vêm empreendendo esforços no sentido de implementar processos contínuos com células imobilizadas em escala industrial, podendo-se citar como exemplos: *Kirin Brewery Company*, Japão; *Labbat Breweries*, Canadá; *Meura Delta*, Bélgica; *Sapporo Breweries*, Japão; *Hartwall Plc*, Finlândia. (VIRKAJÄRVI, 2001)

Segundo Batista (2005), a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica tem como objetivo central o oferecimento de contribuição para o desenvolvimento de tecnologias alternativas na produção de etanol pela via biotecnológica. O mesmo autor, por meio de ensaios experimentais, observou que o tratamento das partículas com nitrato de alumínio resulta em *pellets* com satisfatória estabilidade mecânica e ótima atividade metabólica para a produção de etanol, atingindo valores de conversão de até 94% do rendimento. (BATISTA, 2005)

Da mesma forma, de acordo com o trabalho de Cassiola (2001), a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em crisolita se mostrou como um excelente biocatalisador no processo de produção de etanol, ocasionando um aumento de 26% no rendimento do processo quando comparada às células livres. Os trabalhos de Wendhausen et al., (1998) e Rigo (2001), também mostraram resultados similares, onde o aumento na produtividade do processo de produção de etanol com células imobilizadas em crisolita variou de 25 a 30% em relação ao sistema com células livres.

Quando comparados com células livres os biocatalisadores imobilizados são capazes de realizar biotransformações em ambientes hostis em menor tempo, além

de tolerar altas concentrações de substrato levando a um aumento no rendimento e produtividade do processo. (VELANKAR e HEBLE, 2003)

Segundo Sarrouh e Silva (2013), a imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI20037 para a produção de xilitol usando hidrolisado de bagaço de cana, em um sistema de fermentação em lotes repetidos, é uma alternativa atraente para a reutilização das células da levedura. Segundo os autores, as células imobilizadas em alginato de cálcio apresentaram ótimo desempenho durante seis bateladas sucessivas sem que ocorra perda no rendimento do xilitol. Entretanto, na sétima batelada, houve uma diminuição de 44% na concentração final de xilitol. Esta redução pode ser explicada devido ao acúmulo de substâncias insolúveis dentro do suporte, ocasionando limitação por difusão.

3.6. Micro-organismo: *Saccharomyces cerevisiae*

Desde os primórdios da fabricação de produtos biotecnológicos, na mesopotâmia, anos antes de cristo, seres humanos já tinham uma próxima relação com a *Saccharomyces cerevisiae* mesmo desconhecendo sua existência, isso porque essa levedura que estava presente na sua forma nativa acabava participando do processo de fabricação de pães e cerveja de maneira acidental, gerando ótimos resultados.

De maneira geral, leveduras são fungos unicelulares pertencentes a um grande grupo heterogêneo de organismos eucarióticos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é tipicamente gemulante a suas cepas são utilizadas no processo de fermentação para produção de bebidas alcoólicas e combustíveis como o etanol, são em geral de forma elipsoidal, com dimensões características de 6 a 8µm de largura. (PELCZAR et al., 2004)

A levedura Reprodz assexuadamente por brotamento e durante o processo, o núcleo divide-se por “estrangulamento” onde uma parte dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é lacrada pela confecção de novo material de parede celular. (BATISTA,2005)

Alcazar (2000), estudando a atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* sob diferentes condições de estresse e o efeito do aprisionamento em gel alginato

de cálcio, relata que, além de exibirem maiores teores de glicogênio, as células imobilizadas apresentam uma menor sensibilidade tanto ao estresse salino quanto ao estresse alcoólico durante a fermentação, pois a matriz de alginato no sistema de fermentação contribui na tolerância ao etanol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Suporte de imobilização

Para a realização dos experimentos utilizou-se casca de café "*in natura*" provenientes do Sítio Santa Clara, localizado no município de Oliveira no Estado de Minas Gerais. O Sítio conta com 50.000 pés de café e uma produção média de 410 sacas de 60 Kg de café beneficiado. A casca após a pesagem foi lavada com água destilada e seca em estufa à 100°C por 24 horas.

4.2. Pré-tratamentos empregados

O suporte foi submetido a diferentes tipos de tratamentos, sendo seu desempenho avaliado quanto à capacidade de imobilização em ensaios fermentativos conduzidos em meio sintético. Quantidades equivalentes a 1,0 g de suporte *in natura* foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL e submetidos aos seguintes tratamentos:

4.2.1 Pré-tratamento físico

A casca *in natura* seca foi triturada em liquidificador (Philips Walita) por 5min e em seguida classificada em peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA) com abertura de 14 mesh (1,2 mm). O pó fino assim obtido foi utilizado no processo de imobilização. Somente a fração da casca igual ou inferior a 14 mesh foram utilizados no experimento.

4.2.2 Tratamento com NaOH

Um volume de 50 mL de uma solução de NaOH 4% (p/v), é adicionado aos frascos Erlenmeyer contendo 1g de casca *in natura* e também moída. Os frascos permaneceram sob agitação a 120 rpm por 24 h. Em seguida, os suporte passaram pelas seguintes etapas: lavagem com água destilada, esterilização a 120 °C por 20 minutos e secagem a 100°C por 24 h.

4.2.3 Descompressão explosiva térmica com etanol 70%

Este pré-tratamento, também conhecido como explosão a vapor, foi realizado utilizando autoclave com vapor de 1,5 Kgf/cm². Os frascos com os suportes anteriormente descritos (casca *in natura* e moída) foram alimentados com 1,0 mL de etanol 70% e submetidos ao tratamento com vapor de 1,5 Kgf/cm², a 127 °C por 35 minutos. Após este período a autoclave foi desligada, e a válvula aberta rapidamente, deixando o vapor sair com consequente queda brusca na pressão interna da autoclave. Os materiais assim “explodidos” foram lavados, filtrados e em seguida, secos a 100 °C por 24 h.

4.3 Meio de fermentação e imobilização celular

O meio sintético foi preparado para cultivo da levedura comercial *S. cerevisiae* (fermento de padaria) em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio composto por: Extrato de levedura 15 g.L⁻¹; fosfato de potássio monobásico 7g/L, sulfato de magnésio 0,01g/L, fosfato de sódio monobásico 12g/L, sulfato de amônio 3g/L; esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos; e adicionado glicose esterilizada 50 g.L⁻¹. Não foram feitas avaliações do efeito da alteração da composição do meio sobre a imobilização.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 50 ml de meio de fermentação, 1,0 g de suporte tratado e esterilizado e 10 g.L⁻¹ de células, sendo estes frascos mantidos em incubadora de movimento rotatório sob agitação de 185 rpm e temperatura de 29 °C. O tempo total de fermentação foi de 66 h e amostras foram retiradas a cada 22 h para posteriores análises.

4.4 Determinação de células imobilizadas

Para determinar a massa de células imobilizadas nos suportes estudados, realizou-se uma análise gravimétrica por diferença da massa seca dos suportes antes e após o contato com as células no meio de fermentação. A cada 22 h de

fermentação os suportes foram filtrados para a retirada do excesso de meio de fermentação e em seguida, lavados com água destilada. Estes suportes foram colocados em uma estufa a 100°C até massa constante, sendo então realizada a análise gravimétrica, conforme mostrado na seguinte expressão: *Massa células imobilizadas (g) = Massa suporte seco com células (g) – Massa suporte seco (g)*.

Como o número de sólidos dissolvidos no meio é alto, é importante lembrar que alguma parte desta massa possa ser associada à estes sólidos, mas como os micro-organismos estão constantemente consumindo essas partículas, fica difícil fazer com que um controle negativo forneça números para uma base de cálculos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da capacidade de imobilização celular do suporte sob diferentes tratamentos

As cascas tratadas de diferentes maneiras, inclusive a casca em *natura*, foram avaliadas e comparadas de acordo com os seus desempenhos. Em todos os casos, a casca moída e in natura tiveram resultados particulares mostrando a variabilidade de possibilidades no uso deste resíduo.

5.1.1 Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca *in natura* e casca moída

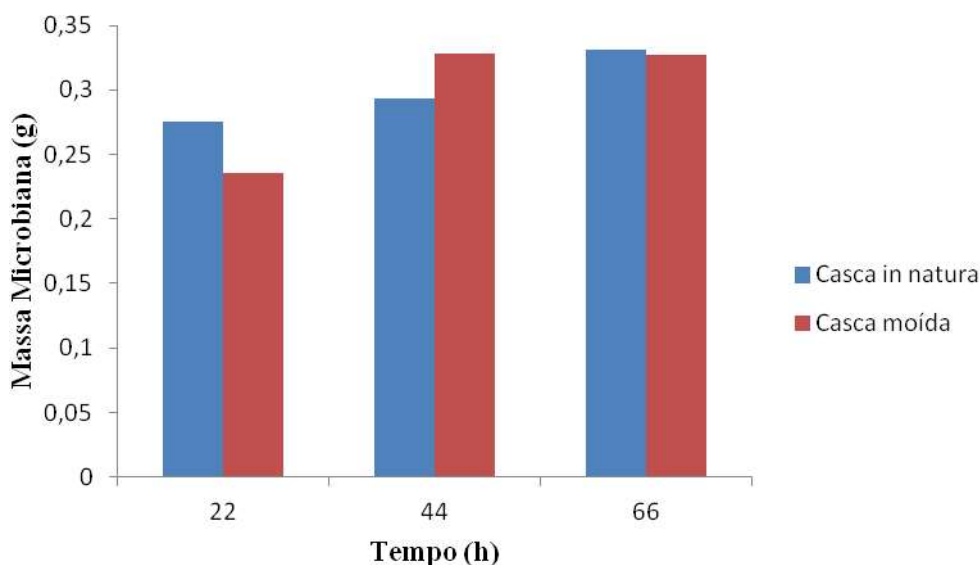


Figura 6: Imobilização celular em casca *in natura* e casca moída após 66 h de fermentação.

Observou-se, na Figura 6, que o tratamento mecânico, moagem, da casca de café não teve influencia positiva na eficiência da imobilização celular quando comparado com a casca *in natura*.

Conforme mostrado na Figura 7, as massas de células imobilizadas em suportes de casca *in natura* e casca moída foram de 0,33g e 0,327g respectivamente, após 66h de fermentação.

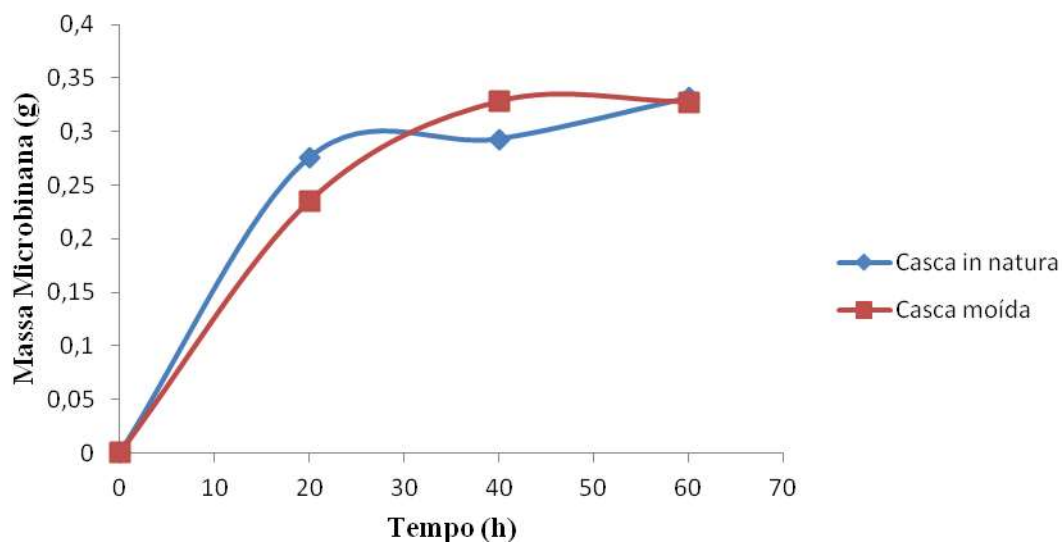


Figura 7: Relação entre a massa microbiana imobilizada, nos suportes da casca *in natura* e moída, e o tempo de fermentação.

Os resultados obtidos indicam que a estrutura da casca de café *in natura* é propícia a imobilização celular eliminando dessa forma a necessidade de uma etapa prévia de pré-tratamento por moagem.

5.1.2 Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca *in natura* e casca moída pré-tratadas com NaOH (4% p/v)

Após o pré-tratamento com NaOH (4% p/v) observou-se uma mudança visível na estrutura da casca tanto moída como *in natura*. O material lignocelulósico passou a ter uma coloração de marrom claro em vez de marrom escuro, parecida com a serragem. Este fato é devido à remoção parcial da lignina e hemicelulose na estrutura fibrosa do material.

Conforme observado na Figura 8, o tratamento com NaOH influenciou positivamente a capacidade da casca, *in natura* e moída, na imobilização de células microbianas. Entretanto a eficiência de imobilização em casca *in natura* foi superior que em casca moída, ambas tratadas com NaOH 4% p/v (Figura 7).

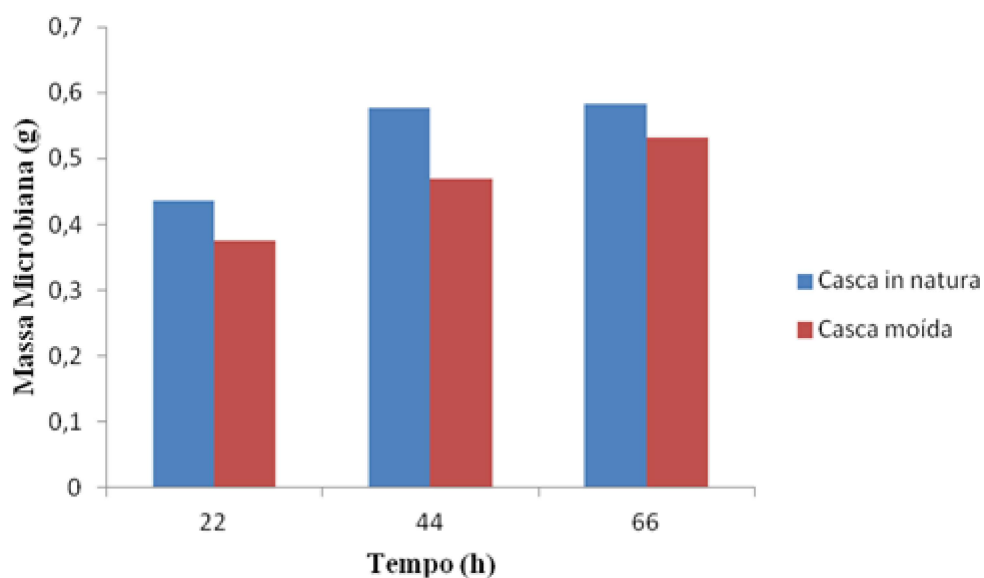


Figura 8: Imobilização celular em casca *in natura* e casca moída tratadas com NaOH 4% p/v, após 66 h de fermentação.

Segundo a Figura 9 as massas de células imobilizadas em casca *in natura* e casca moída, tratadas com NaOH 4% p/v, foram de 0,58 g e 0,53g respectivamente, após 66 h de fermentação. Tais resultados mostraram um aumento de 10% capacidade de imobilização da casca *in natura* em comparação com a casca moída, tratadas com NaOH 4% p/v.

Da mesma forma, observou-se um aumento de 75% na capacidade de imobilização da casca *in natura* tratada com NaOH em comparação com a casca *in natura* não tratada.

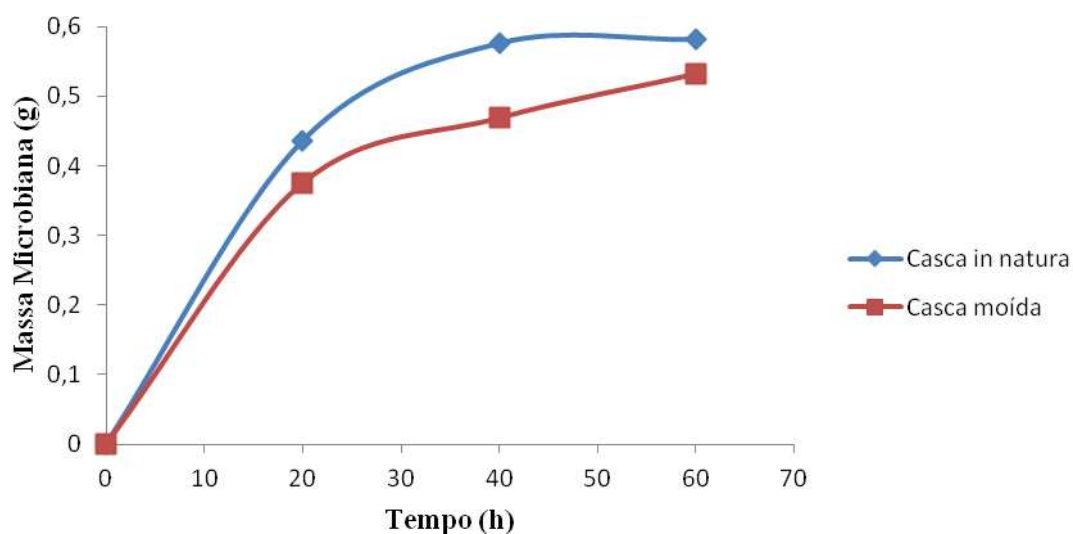


Figura 9: Relação entre a massa microbiana imobilizada, nos suportes da casca *in natura* e moída, tratadas com NaOH 4% p/v, e o tempo de fermentação.

5.1.3 Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca *in natura* e casca moída pré-tratadas com descompressão térmica com etanol 70%

Este método consiste na expansão de estrutura fibrosa da casca de café *in natura* e moída, aumentando dessa forma a superfície de contato e, consequentemente, a capacidade de adsorção desses suportes.

Assim como o que se observou no tratamento com NaOH, houve um aumento na eficiência de imobilização celular ao longo da fermentação, evidenciando a melhoria no mecanismo de adsorção, para as duas formas do biosuporte (Figura 10). Ainda nesta Figura, observou-se que a eficiência da imobilização celular na casca *in natura* foi 39% maior que na casca moída, ambas tratadas com descompressão térmica (explosão a vapor).

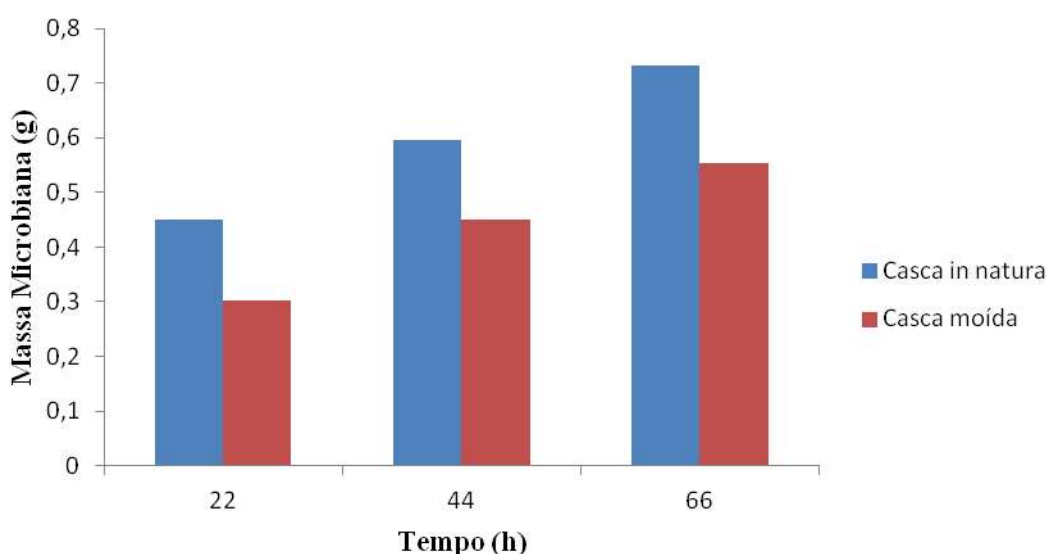


Figura 10: Imobilização celular em casca *in natura* e casca moída tratadas com descompressão térmica, após 66 h de fermentação.

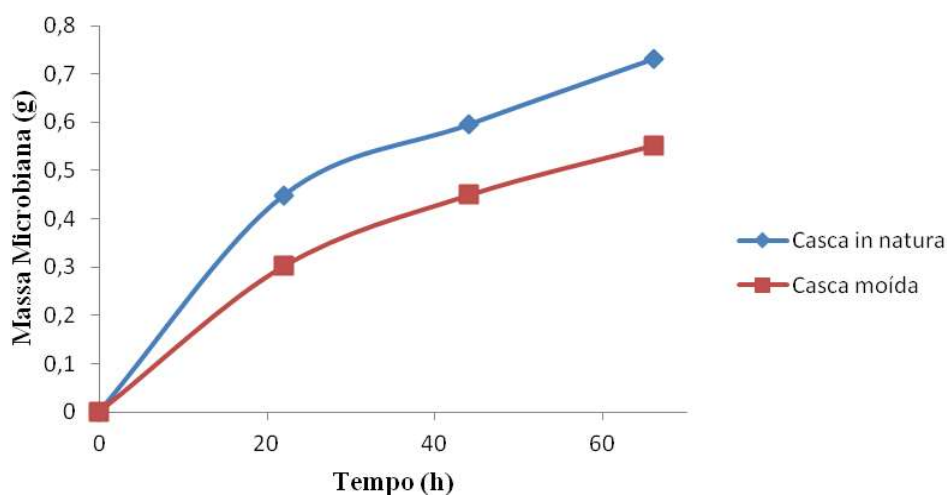


Figura 11: Relação entre a massa microbiana imobilizada, nos suportes da casca *in natura* e moída, tratadas com descompressão térmica, e o tempo de fermentação.

Conforme mostrado na Figura 11, as massas de células imobilizadas em casca *in natura* e casca moída, tratadas por descompressão térmica com etanol 70%, foram de 0,73 g e 0,55g respectivamente, após 66 h de fermentação

Da mesma forma, observou-se um aumento de 210% e 26% na capacidade de imobilização da casca *in natura* tratada com explosão a vapor em comparação com a casca *in natura* não tratada e tratada com NaOH 4%, respectivamente.

6. CONCLUSÃO

A utilização da casca de café, um biosuporte abundante e residual, mostrou-se eficaz como suporte de imobilização de células microbianas, além das características químicas e físicas da biomassa serem favoráveis, o processo também é de fácil execução.

A casca de café *in natura* apresentou taxas de imobilização superiores à da casca moída nos pré-tratamentos químicos aplicados. Esta informação sugere que alguns fatores propiciaram essa superioridade, como o formato côncavo da casca, disposição das fibras de um comparado ao outro. O gráfico a seguir mostra a diferença de imobilização das cascas *in natura*.

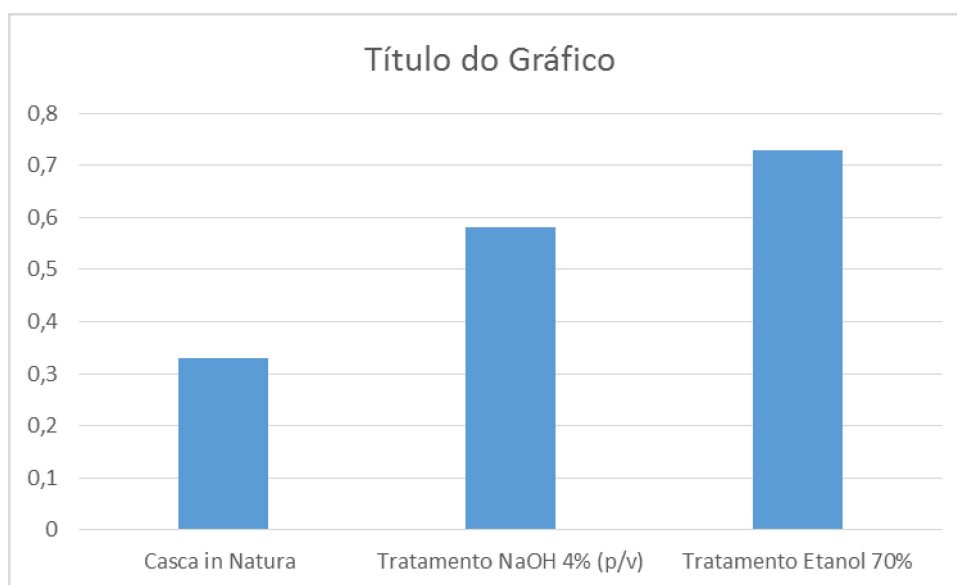


Figura 12: Comparação da eficiência do suporte levando em conta somente casca *in natura*.

O tratamento com vapor de $1,5 \text{ Kgf/cm}^2$, a 127°C , por 35 minutos, aplicado à casca *in natura*, determinou os melhores valores de imobilização celular, com valores de 26% superiores aos do tratamento com NaOH (4% p/v).

Deve-se ressaltar que em todos os experimentos apenas uma amostra foi retirada em cada ponto, portanto, não exclui-se a possibilidade destes estarem representando uma amostra fora de padrão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, E. Lignin chemistry: past, present and future. **Wood Science Technology**. v. 11, p. 169-218, 1977.

ALBINANTE, S. R; PACHECO, É. B. A. V.; VISCONTE, L. L. Y. REVISÃO DOS TRATAMENTOS QUÍMICOS DA FIBRA NATURAL PARA MISTURA COM POLIOLEFINAS. *Quim. Nova*, v. 36, n. 1, p. 114-122, 2013.

ALEGRE, R. M.; RIGO, M.; JOEKES, I.; “Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile”; *Brazilian Archives of Biology and Technology*; v.46; n.4; pp.751-757, 2003.

BARCELOS, A.F.; PAIVA, P.C.A.; PÉREZ, J.R.O.; SANTOS, V.B. e CARDOSO, R.M. Fatores Antinutricionais da Casca e da Polpa Desidratada de Café (*Coffea arabica* L.) Armazenadas em Diferentes Períodos. *Rev. Bras. de Zootec.*, Vol. 30, n. 4. Viçosa, 2001.

BATISTA, M. A.; Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia, 2005.

BEYNUM, G.M.A. Immobilized biocatalysts. *Biotechnology Letters*. v.2, p.127-132, 1980.

BISARIA, V. S. Bioprocessing of agro-residues to value added products. In: MARTIN, M **Bioconversion of Waste materials to Industrial Products**, 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998, 556p.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n.36, p.48-57, 2006.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. *Journal of Food Science*, n. 3, p.3-20, 1989.

CARVALHO, W. Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, p.110, 2004.

CASSIOLA, F.M. Crisotila como suporte para *Saccharomyces cerevisiae*: Origem físico-química da preservação da vitalidade (Tese de doutorado), Campinas-Sp, 2001.

CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C.; SODINI-GALLOT, I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 109-134, 1994.

COELHO, T. C. Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando à produção de xilitol. 90 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (2007).

CORCORAN, E. *The production and use of immobilized living microbial cells*. In: WISEMAN, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. England: Ellis Horwood. v.10, p.12-50, 1985.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Revista Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

CUNHA, M.A.A. Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana- de- açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico. 2006. 120f. Tese de doutorado (Doutorado em

Biotecnologia Industrial) Escola de engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

D'SOUZA, S.F.; GODBOLE, S.S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal. Biochemical and Biophysical Methods**, v.52, p.59-62, 2002.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 28, n. 1, p. 81-88, 2001.

DÍAZ, E.; FERNÁNDEZ, A.; PRIETO, M. A.; GARCÍA, J. L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 65, n. 4, p. 523-569, 2001.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613p.

GERBSCH, N.; BOCHHOLZ, R. New processes and actual trends in biotechnology. *FEMS Microbiology Review*, v.16, p. 259-269, 1995.

GERBSCH, N; BUCHHOLZ, R. *New processes and actual trends in biotechnology*. *FEMS Microbiology Reviews*. v.16, p.259-269, 1995.

Gerin, P. A.; Asther, M.; Rouxhet, P. G. Peroxidase production by the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium* in relation to immobilization in "filtering" carriers. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 20, n. 4, p. 294-300, 1997.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.K; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.14, p.75-107, 1994.

GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G.F. *Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa: Humana Press, 1997. c. 30, p. 261-275.

HALAL, S.L.M. **Composição, Processamento e Qualidade do Café**. Univ. Fed. de Pelotas. Dep. de Ciênc. dos Alim. Pelotas, 2008.

HUSAIN, S.; JAFRI, F.; SALEEMUDDIN, M. Effects of chemical modification on the stability of invertase before and after immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 275-280, 1996.

JAMAI, L; SENDIDE, K; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M. A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.204,n.2,p.375-379, 2001.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xilose by bacteria, yeast and fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 27, p. 1-32, 1983.

KAREL, SF; LIBICKI, SB; ROBERTSON, CR. *The immobilization of whole cells: Engineering principles*. **Chemical Engineering Science**. v.40, p.1321-54, 1985.

KOURKOUTAS, Y.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELAKI, M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 49, n. 3, p. 1417-1425, 2001.

KOURKOUTAS, Y.; MCERLEAN, C.; KANELAKI, M.; HACK, C. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 112, n. 1, p. 25-35, 2004.

KRISHNAN, A. S.; LALITHA, R. G. A.; MISRA, A. M. C.; KARANTH, N. G. Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum ncim 2084* cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnology*, New York, v. 15, n. 3, p. 193-202, 2001.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. A lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.72, p. 151-172, 1993.

KUMAKURA, M.; YOSHIDA, M. ASSANO, M. Preparation of immobilized yeast cells with porous substrates. *Process Biochemistry*, v.27, p225-229, 1992.

LAPA, K.R. Avaliação de desempenho do reator anaeróbio em batelada sequencial (ASBR), contendo biomassa imobilizada em pedra pome, para tratamento de esgoto sanitário. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2003.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL Jr., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.

LEAL, I.R., M. Tabarelli & J.M.C. Silva. 2003^a. Ecologia e conservação da Caatinga. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

LINKO, M; HAIKARA, A; RITALA, A; PENTTILÄ, M. *Recent advances in the malting and brewing industry*. **Journal of Biotechnology**. v.65, p.85-98, 1998.

MAIA, C. C. R. Estudo sobre o isolamento de fungos filamentosos com atividade lignocelulolítica a partir do grão de café em coco. Trabalho de conclusão de curso (Egenharia de Bioprocessos). Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, Universidade Federal de São João Del Rei (2014).

MAPA, Departamento do Café. FUNCAFÉ: **Relatório de Atividades 2012**. Brasília, 2013.

MC MILLAN, J. D. conversion of hemicellulose Hydrolysates to Ethanol, In:HIMMEL, M. e. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. American Chemical Society Symposium. Série 566, 1994, p. 411-437.

MEERSMAN, E. Use of monolayer carrier in brewery. *Cerevisiae and Biotechnology*, v.17, p.55-56, 58-59, 1992.

MORÃO, L. G. Biossorção do corante DR 23 por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em serragem de peroba (*Aspidosperma polyneuron*) tratada com PEI (polietilenoimina). Dissertação (Mestrado em Ciencias Biológicas e Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (2014).

MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; FEIJOO, O.; LEMA, J. M. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 1, n. 66, p. 27-39, 1998.

MOSIER, N; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MOUEDDEB, H.; SANCHEZ, J.; BARDOT, C.; FICK, M. Membrane bioreactor for lactic acid production. *Journal of Membrane Science*, v.114, p.59-71, 1996.

NAGASHIMA, M. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, v.21, p.49-58, 1984.

PALMA, R. C. G. D. A biotecnologia no ensino das ciências do 3º ciclo: desenvolvimento de experiências didáticas utilizando a acção de biocatalisadores imobilizados (2007).

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. e ROUSSOS, S. **Biotechnological Potential of Coffee Pulp and Coffee Husk for Bioprocesses**. *Biochem. Eng. J.*, 6:153–162. 2000.

PARK, C.; LEE, B.; HAN, E-G.; LEE, J.; KIM, S. Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 39, n. 3, p. 371-374, 2006.

PARK, JK; CHANG, HN. *Microencapsulation of microbial cells*. **Biotechnology Advances**. v.18, p.303-319, 2000.

PATIL, N. K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M.; NAYAK, S.; KAREGOUDAR, T. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Barking, v.57, n. 2, p. 82-87, 2006.

PETRE, M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. *Resources, Conservation and Recycling*, Amsterdam, v. 27, n. 4, p. 309-332, 1999.

PILKINGTON, PH; MARGARITIS, A; MENSOUR, NA. *Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes*. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 18, p. 237-55, 1998a.

PILKINGTON, PH; MARGARITIS, A; MENSOUR, NA; RUSSELL, I. *Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review*. **Journal of the Institute of Brewing**. v.104, p.19-31, 1998b.

PRADELLA, J.G.C. Ratores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Ed. Edgard Blücher. 2001. cap.16, p.355-372.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 43, n. 3, p. 301-307, 2005.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; JANUSZ, G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresource Technology*, Essex, v. 97, n. 3, p. 469-476, 2005.

SANTOS, A. F. Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Araraquara. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição –Universidade Estadual Paulista 2010.

SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATTO, S. I.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 113-118, 2005a.

SANTOS, J. C.; MUSSATTO, S. T.; DRAGONE, G.; CONVERTI, 1.; SILVA, S. S. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 1-9, 2005b.

SARROUH, B.; SILVA, S.S., Repeated Batch Cell-Immobilized System for the Biotechnological Production of Xylitol as a Renewable Green Sweetener. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, p. 1-12, 2013.

SILVA, C.J.S.M.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, L.C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench reactor. *Journal of Food Engineering*. V.75, p.115-119, 2006.

SILVA, S. S. Produção de xilitol por via biotecnológica: Estudo de sistemas de biorreatores e parâmetros fermentativos. São Paulo: USP/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Tese de Doutorado), 219, 1994.

SOCCOL, C.R. **Resíduo de Café um Substrato Promissor para a Produção Industrial de Bioprodutos com Alto Valor Agregado**. I Simp. de Pesq. dos Cafés do Brasil. Poços de Caldas, 2000.

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

TITA, S.P.S.; PAIVA, J.M.F.; FROLLINI, E. Resistência ao impacto e outras propriedades de compósitos lignocelulósicos: matrizes termofixas fenólicas reforçadas com fibras de bagaço de cana-de-açúcar. *Ciência e Tecnologia*, vol. 12, no 4, p. 228-239, 2002.

VELANKAR, H. R.; HEBLE, M. R. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. *Electronic Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 90-103, 2003.

VIGGIANI, A.; OLIVIERI, G.; SIANI, L.; DIDONATO, A.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P.; BARBIERI, P.; GALLI, E. An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 123, n. 4, p. 464-477, 2006.

VIRKAJÄRVI, I. Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. 2001. 137 f. Tese (Doutorado em Tecnologia) – Helsinki University of Technology, Helsinki, Finlândia.

VITOLO, M. Imobilização e células e enzimas. *Biotecnologia*. N.11, p.2, janeiro, 1998.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; A, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. V. Monitorização e modelação da estrutura de biofilme. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 2-13. 2003.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 524-530, 2000.

ZIGLIO, B.R.; BEZERRA, J.R.M.V.; BRANCO, I.G.; BASTOS, R.; RIGO, M. Elaboraões de pães com sabugo de milho. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, vol. 9, p. 117-128, 2007.