

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

**IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* POR
ADSORÇÃO EM CASCA DE CAFÉ TRATADA COM DIFERENTES MÉTODOS**

Bruna Luiza Ferreira Pralon

Orientador: Boutros Sarrouh

Ouro Branco
Novembro/2016

IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* POR
ADSORÇÃO EM CASCA DE CAFÉ TRATADA COM DIFERENTES MÉTODOS

Bruna Luiza Ferreira Pralon

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: Boutros Sarrouh

Ouro Branco
Novembro/2016

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

**IMOBILIZAÇÃO DE LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* POR
ADSORÇÃO EM CASCA DE CAFÉ TRATADA COM DIFERENTES MÉTODOS**

Bruna Luiza Ferreira Pralon

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

Boutros Sarrouh - Orientador

Alessandra Costa Vilaça – examinadora 1

Flávia Donária Reis Gonzaga – examinadora 2

Ouro Branco, 29/11/2016

RESUMO

A imobilização de células é uma conveniente maneira de se reciclar células do meio fermentativo em bioprocessos industriais. O uso de biomassa lignocelulósica para essa finalidade tem mostrado uma crescente importância, dada a alta disponibilidade e baixo custo desses materiais. Para se aumentar a capacidade adsorviva desses materiais, é comum realizar-se previamente uma ou mais etapas de tratamento visando abrir a estrutura do material ou modificar suas características eletrostáticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar quatro diferentes métodos de tratamento em casca de café para seu uso como suporte de imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*. Os métodos testados foram o tratamento alcalino com NaOH 4%*m/v*, tratamento ácido diluído com H₂SO₄ 4%*m/v*, tratamento a vapor com etanol a 1,5 kgf/cm² e tratamento oxidativo com H₂O₂ 1% em meio alcalino. O critério usado para comparação foi a massa seca de células adsorvidas em g de células/g de suporte. O tratamento mais bem sucedido foi o tratamento com NaOH 4%, que atingiu um máximo de $0,109 \pm 0,009$ gramas por grama de suporte, valor 55,7% superior ao encontrado para a casca sem tratamento. Os valores encontrados estão coerentes com os encontrados em pesquisas similares. A casca de café tratada pelo método alcalino se mostrou um suporte promissor para ser usado para imobilização de células.

Palavras-chave: Imobilização de células, aproveitamento resíduos lignocelulósicos, casca de café.

ABSTRACT

Cell immobilization is a convenient way of recycling cells from the medium in industrial bioprocesses. The use of lignocellulosic biomass as support for cell immobilization have been gaining importance due to the high availability and low cost of these materials. In order to increase the cell adsorption capacity of these materials, it is common to do one or more pretreatment steps to open its structure or modify its electrostatic properties. This study aimed to evaluate four different treatment methods in coffee husks to be used as supports for *Saccharomyces cerevisiae* cell immobilization. The methods tested were alkaline treatment with NaOH 4%*m/v*, dilute acid treatment with H₂SO₄ 4%*m/v*, steam treatment with ethanol at 1,5 kgf/cm² and oxidative treatment with H₂O₂ 1% in alkaline conditions. The criterion used for comparison was dry mass of adsorbed cells per gram of support. The most successful treatment method was NaOH 4%, which yielded a maximum value of 0,109 ± 0,009 grams per gram of support, 55,7% more than the value found for non-treated husks. The values found are coherent with the ones found in the literature in similar research. Coffee husks treated by the alkaline method were shown to be a promising support for cell immobilization.

Keywords: Cell immobilization, use of lignocellulosic residues, coffee husk.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 Importância da imobilização	9
3.2 Métodos de imobilização	9
3.2.1 Imobilização por confinamento.....	10
3.2.2 Imobilização por ligação covalente	10
3.2.2 Imobilização por adsorção	10
3.3 Características e eficiência da imobilização celular por adsorção.....	11
3.4 Suportes de imobilização	12
3.4.1 Materiais naturais	13
3.5 Métodos de tratamento	16
3.5.1 Tratamento alcalino.....	16
3.5.2 Tratamento com ácido diluído	16
3.5.3 Tratamento com vapor.....	16
3.5.4 Tratamento oxidativo	17
3.6 Aplicações de células imobilizadas.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Suporte de imobilização	20
4.2 Tratamentos empregados para a casca de café.....	20
4.2.1 Tratamento alcalino com hidróxido de sódio	20
4.2.2 Tratamento com vapor.....	20
4.2.3 Tratamento com ácido diluído	21
4.2.4 Tratamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino	21
4.3 Meio de cultivo	21
4.4 Imobilização celular	22

4.5 Determinação de células imobilizadas	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	31
7 PROSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

A imobilização celular permite a fácil separação e reuso do biocatalisador do meio de cultivo em um sistema de bateladas repetidas. Além disso, em fermentações contínuas, permite o uso de reatores bastante distintos dos tradicionais reatores de tanque agitado. As mais importantes configurações são reatores de leito fixo ou reatores de leito fluidizado. Além disso, permitem maiores velocidades de processamento e operação de reatores contínuos a vazões superiores à velocidade de crescimento das células (PRADELLA, 2001).

No entanto, para que a imobilização seja efetiva e com ganhos econômicos, alguns fatores devem ser observados. O material escolhido para imobilização deve ser barato e disponível em grandes quantidades, o processo de imobilização deve ser simples e eficiente, o catalisador imobilizado deve apresentar alta eficiência catalítica e seu manuseio no processo deve ser simples (KLEIN; ZHIER, 1990). Nesse contexto, há uma constante busca por materiais alternativos para imobilização de vários tipos de células para diversas aplicações.

Atualmente existe uma crescente preocupação acerca da destinação adequada de resíduos industriais. Dentre esses resíduos, destacam-se os resíduos lignocelulósicos. Esses resíduos são geralmente provenientes de atividades agroindustriais e são gerados em grandes quantidades, o que leva à necessidade de uma destinação adequada, sem que haja danos ambientais. Diversas soluções foram propostas para o aproveitamento desses resíduos, buscando associar o ganho econômico à proteção ambiental por meio do desenvolvimento de produtos e processos a partir desses materiais. Uma das aplicações emergentes para esses resíduos é o uso como suporte para imobilização. Eles atendem aos requisitos de baixo custo, alta disponibilidade, facilidade de imobilização celular por adsorção, são reutilizáveis, esterilizáveis pelo calor e apresentam estabilidade química, biológica e mecânica (BRÁNYIK et al., 2005).

O café é um dos mais importantes produtos do Brasil e do mundo. A associação Brasileira da Indústria de café (ABIC) estima uma produção de 21 milhões de sacas em 2016 (ABIC, 2015). Tendo em vista a necessidade de encontrar um destino apropriado para esse resíduo, esse trabalho avaliará a possibilidade de utilizar as cascas de café como suporte para imobilização celular para uso em processos biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de imobilização da casca de café utilizando diferentes tratamentos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o tratamento alcalino, ácido, térmico e oxidativo da casca de café;
- Realizar a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em casca de café tratada;
- Determinar a massa seca de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em casca de café com diferentes tratamentos;
- Comparar a eficiência dos diferentes técnicas de tratamento considerando a massa seca de levedura imobilizada por massa de suporte.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância da imobilização

Biorreatores contínuos avançados requerem uma maneira de manter as células microbianas no reator de modo que não ocorra sua lavagem. Isso pode ser feito através da imobilização das células em um suporte sólido. As células imobilizadas se tornam mais densas do que em seu estado livre, dessa forma, se mantêm retidas no reator. Nesses sistemas, uma alta concentração de biomassa, de até 10 vezes superior aos sistemas com células livres, leva a um tempo de residência mais curto no reator, o que leva a uma produção volumétrica superior (BRANYIK et al., 2005).

De acordo com Pradella (2001), as principais vantagens dos sistemas com células imobilizadas em relação aos sistemas com células livres são as seguintes:

- a) possibilidade de uso de altas concentrações celulares, levando a maiores velocidades de reação;
- b) operação de sistemas contínuos a vazões específicas de alimentação superiores à velocidade específica máxima de crescimento da célula;
- c) eliminação da necessidade de ciclos externos de células por meio de centrifugação, filtração e centrifugação;
- d) possibilidade de obtenção de maiores fatores de conversão;
- e) possibilidade de uso de projeto de biorreatores mais adequados à cinética do sistema utilizado;
- f) maior proteção ao sistema biológico em relação ao estresse ambiental, causado por fatores como grandes concentrações de substratos e pH.

3.2 Métodos de imobilização

Segundo Pradella (2001), existem basicamente três métodos de imobilização de células em suportes. São eles: o confinamento celular, a adsorção e a ligação covalente. A diferença entre esses métodos está nos mecanismos de interação célula-suporte.

3.2.1 Imobilização por confinamento

A imobilização por confinamento consiste no aprisionamento das células em uma matriz polimérica porosa. Os substratos a serem consumidos pelas células e os metabólitos gerados por elas fluem através de poros presentes na matriz. A imobilização por confinamento é a mais utilizada para a imobilização de células vivas devido à baixa toxicidade e à alta capacidade de retenção celular (PRADELLA, 2001). Alguns exemplos de polímeros que podem ser utilizados são poliacrilamida, alginatos, carragenana e ágar (WOODWARD, 1988).

3.2.2 Imobilização por ligação covalente

No método da ligação covalente, os suportes são funcionalizados para conter um grupamento químico, que será responsável pela ligação da célula ao suporte (PRADELLA, 2001). Essa técnica requer a existência de um grupo reativo na superfície da célula e de um grupo reativo na superfície do suporte. As vantagens desse método é aliviar a dependência de fatores como temperatura, pH e força iônica, que têm um papel significativo em ligações não covalentes (SHRIVER LAKE et al., 2012).

Shriver Lake et al. (2012) demonstraram que células de *E. coli* podem ser imobilizadas em esferas de vidro SiranTM tratadas com glutaraldeído. Segundo os autores, o suporte é considerado ideal para uso em colunas devido à sua estabilidade física e química e sua habilidade de manter altas vazões na coluna. A grande limitação dessa metodologia para imobilização de células vivas é a potencial toxicidade do sistema devido à presença do glutaraldeído (PRADELLA, 2001).

3.2.2 Imobilização por adsorção

A imobilização de células microbianas por adsorção é um método antigo e bem estabelecido que tem sido usado por muitos anos (KLEIN; ZIEHR, 1990). O método de adsorção trata-se da adesão de células a suportes que não foram especificamente funcionalizados para a ocorrência de ligação covalente. Nesse caso, a adesão pode ocorrer por meio de interações eletrostáticas entre cargas opostas de

parede celular e superfície do suporte, a formação de ligações iônicas entre grupos amínicos e carboxílicos da parede celular e um grupo reativo da superfície do suporte e a formação de ligações covalentes parciais entre grupos amínicos da parede celular e grupo hidroxila ou silano (SiO-) da superfície do suporte (PRADELLA, 2001). Microrganismos aderem naturalmente a diversos materiais, como vidros, cerâmicas e materiais lignocelulósicos. Esse método também pode ser usado em colunas de troca iônica, como DEAE-celulose (KLEIN; ZIEHR, 1990).

A principal desvantagem da técnica é a suscetibilidade às condições ambientais devido a características do meio de tais como, concentração iônica, pH e idade da população celular que se deseja imobilizar (PRADELLA, 2001). No entanto, é um método simples, de baixo custo, com uma grande disponibilidade de suportes para imobilização, podendo inclusive ser utilizados resíduos agroindustriais para esse fim. Diversos estudos da produção de etanol com imobilização de leveduras por adsorção em resíduos lignocelulósicos demonstraram que esse método gera produtividades superiores à de sistemas com células imobilizadas por encapsulamento ou com células livres (PACHECO; GONDIM; GONÇALVES, 2010; SINGH et al., 2013; YU, ZHANG; TAN 2007). Esses suportes podem ainda ser submetidos a tratamentos superficiais visando a obtenção de estruturas macroporosas, incrementando sua capacidade de retenção (PRADELLA, 2001).

3.3 Características e eficiência da imobilização celular por adsorção

Alguns critérios devem ser levados em conta para se avaliar o processo de imobilização por adsorção. Klein e Ziehr (1990) destacam os seguintes aspectos:

- a) Quantidade de biomassa;
- b) Força da adesão;
- c) Retenção da atividade do biocatalisador;
- d) Efetividade/Transferência de massa/Engenharia
- e) Estabilidade operacional.
- f) Características do microrganismo, especialmente sua superfície e composição;
- g) Características físicas do fluido.

Segundo Klein e Ziehr (1990), quantidades de 200 mg de células/g de suporte são consideradas normais para processos de adsorção. Kumar et al. (2011) reportaram 120 mg de células de *Kluyveromyces* por grama de suporte em bagaço de cana. Moo-Young, Lamptey e Robinson (1980) obtiveram 188 mg/g de suporte para a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em lascas de madeira. Yu, Zhang e Tan (2007), ao imobilizar *Saccharomyces cerevisiae* em bagaço de sorgo obtiveram altas quantidades de biomassa, com um máximo de 0,61 g de células/g de suporte. Segundo os autores, isso se deve ao fato de o material ter uma grande quantidade de células porosas, nas quais as células penetraram e se fixaram em seu interior. Vasconcelos, Lopes e de França (2004) também obtiveram altas quantidades de biomassa imobilizadas em bagaço de cana de açúcar, com um máximo de 0,4776 g de células /g de bagaço. Santos et al. (2008) obtiveram valores máximos de cerca de 0,3 g de células /g de suporte em bagaço de cana.

Alguns autores também observam uma correlação positiva entre o tamanho dos suportes e a quantidade de células imobilizadas. Yu, Zhang e Tan (2007), ao avaliarem a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em bagaço de sorgo, observaram um crescente aumento da massa de células com o aumento do tamanho do suporte de imobilização. Provavelmente, esse resultado se deve a não redução da quantidade de poros intactos presentes no suporte *in natura*. No entanto, Moo-Young, Lamptey e Robinson (1980) encontraram uma correlação oposta entre quantidade de biomassa e tamanho dos suportes ao testar a imobilização de leveduras em lascas de madeira. Os mesmos autores atribuíram a influencia positiva da redução do tamanho do suporte no aumento da área superficial disponível para a imobilização das células. Portanto, cada suporte se comporta de maneira diferente e é necessário testar cada um separadamente.

3.4 Suportes de imobilização

A imobilização geralmente é feita através do contato com as células a serem imobilizadas com um material, denominado suporte, sob condições ambientais controladas. De acordo com Pradella (2001), as principais características de um suporte para a imobilização de células vivas são as seguintes:

- a) não ser tóxico às células;

- b) ter alta capacidade de retenção celular;
- c) ser resistente ao ataque químico e microbiano;
- d) ter pouca sensibilidade a solicitações mecânicas, tais como, compressão por peso, tensões de cisalhamento ou eventuais pressões internas e externas de gases;
- e) ter alta difusividade de substratos e produtos.

A técnica também precisa ser de baixo custo e fácil implementação em larga escala (ESCOBAR; ÁLVAREZ; PEÑUELA, 2012). Os suportes para imobilização podem ser classificados como orgânicos, inorgânicos, naturais e sistemas de membranas.

3.4.1 Materiais naturais

Materiais naturais são usados com pouco ou nenhum tratamento, como madeira, serragem, pedaços de frutas, etc. O uso de materiais naturais, como materiais celulósicos deslignificados são eficientes e apresentam um bom aumento nas taxas de fermentação em comparação com células livres. Esses suportes são de pureza de grau alimentar, baratos e abundantes e são facilmente aceitos pelos consumidores, podendo ser aplicados na indústria de alimentos e bebidas (KORKOUTAS et al., 2004). Dessa forma, esses materiais têm recebido mais atenção que géis de encapsulamento. Além disso, materiais celulósicos são reutilizáveis, esterilizáveis pelo calor, quimicamente e biologicamente estáveis em condições de fermentação e mecanicamente estáveis (BRANYIK et al., 2005).

3.4.4.1 Materiais lignocelulósicos como suportes de imobilização

Os materiais lignocelulósicos são de origem vegetal, normalmente gerados como resíduos de atividades agroindústrias. Esses materiais tem ganhado bastante destaque nos últimos anos por serem considerados como recurso natural e renovável com potencial de ser convertido em inúmeros produtos, como combustíveis e diversas moléculas orgânicas de valor agregado.

Esses materiais possuem três componentes principais: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Os teores desses compostos variam de acordo com o tipo de material. No entanto, tipicamente, a maior parte dos resíduos lignocelulósicos é

composta de aproximadamente 10-25% de lignina, 20-30% de hemicelulose e 40-50% de celulose. A celulose é um polímero altamente estável formado por monômeros de glicose ligados por meio de ligações β -1,4 gerando cadeias de até 12000 resíduos. Essas moléculas formam ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que torna a celulose altamente resistente e insolúvel. A hemicelulose é formada por outros açúcares, como xilanos, mananos e glucanos. Já a lignina é a fração mais complexa e em menor quantidade, que é formada por unidades de fenilpropano (ANWAR; GULFRAZ; ISHRAD, 2014). A lignina age como uma proteção da celulose e hemicelulose contra a degradação. (CHATURVEDI; VERMA, 2013).

Diversos materiais lignocelulósicos têm sido avaliados para a imobilização de leveduras, tais como, bagaço de cana de açúcar, folhas de milho, espiga de milho e aparas de madeira (ESCOBAR; ÁLVAREZ; PEÑUELA, 2012), bagaço de sorgo (YU; ZHANG; TAN, 2007) e cascas de frutas como uva e caju (MALLOUCHOS et al., 2002; PACHECO; GONDIM; GONÇALVES, 2010).

Singh et al. (2013) avaliaram a produção de etanol por levedura imobilizada em bagaço de cana de açúcar tratado com NaOH, alginato de sódio e agar-agar, no qual foram realizadas bateladas repetidas utilizando as três matrizes. Ao fim de cada batelada, o suporte era coletado do meio de fermentação, lavado com água estéril e transferido para um meio fresco. Dos três suportes, o bagaço de cana foi o que apresentou maior produção de etanol (15,4g/L), e esse valor permaneceu quase constante por 7 bateladas, e a partir do 7º ciclo foi observada uma redução na produtividade. Além disso, o uso de bagaço de cana apresenta a vantagem de ter um procedimento de preparação muito simples em comparação com a preparação das matrizes de encapsulamento.

Vasconcelos, Lopes e de França (2014) também testaram o bagaço de cana de açúcar, sem tratamento, como suporte de imobilização, em reator contínuo. Foram testadas taxas de diluição de $0,05\text{h}^{-1}$ a $3,0\text{h}^{-1}$. O sistema mostrou estabilidade operacional por até 60 dias e as concentrações de células obtidas foram de cerca de 10^9 células/g de bagaço de cana.

Pacheco, Gondim e Gonçalves (2010) avaliaram o bagaço de caju como suporte de imobilização. O suporte apresentou boa eficiência, com mais de 95% dos açúcares totais consumidos com 6 horas de fermentação. Os biocatalisadores imobilizados foram reutilizados por pelo menos 10 ciclos mantendo sua atividade

inicial. Segundo os autores, o material tem algumas vantagens, como o fácil manuseamento, o baixo custo e a boa estabilidade operacional.

Esses exemplos mostram que o uso de materiais celulósicos como suportes de imobilização por adsorção possuem vantagens em relação a outros métodos de imobilização ou ao uso de células livres. Como a maioria desses materiais são abundantes resíduos agroindústrias, de fácil aquisição e baixo custo, o processo se torna economicamente ainda mais favorável. Um exemplo de resíduo ainda pouco explorado como suporte de imobilização de células é a casca de café.

3.4.1.1.1 A casca de café

O café é uma das mais importantes commodities do mundo. O consumo de café no Brasil em 2015 foi de 20,508 milhões de sacas, apresentando um leve acréscimo em relação ao ano anterior, de 20,333 milhões de sacas. O consumo per capita também subiu, passando a 4,90 kg/habitante.ano de café torrado e moído, o que equivale a 6,12 kg/habitante.ano de café verde em grão. A Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) estima que a produção em 2016 atinja 21 milhões de sacas (ABIC, 2015). A casca de café representa cerca de 12% do fruto em peso seco (MURTHY; PAIDU, 2012). Dessa forma, considerando-se o consumo de café no Brasil em 2015, pode-se estimar que foram produzidos cerca de 147,658 milhões de kg de casca de café.

No entanto, o manejo dos resíduos da produção de café é um desafio para a indústria, devido à presença de cafeína, fenóis e taninos, que são tóxicos aos seres vivos. Dessa forma, o despejo desses resíduos no ambiente pode trazer danos ambientais (MURTHY; PAIDU, 2012). Dessa forma, faz-se necessário buscar alternativas tecnológicas para o tratamento ou reuso desses resíduos. Tradicionalmente, a casca de café tem tido aplicação limitada como fertilizantes, alimentação de gado e compostagem. Uma das possibilidades de aproveitamento desse resíduo é como suporte de imobilização de células e enzimas para aplicações industriais.

3.5 Métodos de tratamento

Com o intuito de aumentar a capacidade de imobilização celular dos suportes lignocelulósicos, os mesmos são submetidos a diferentes tratamentos químicos, físicos e mecânicos com o objetivo de criar uma estrutura mais porosa, aumentando dessa forma a sua capacidade de retenção das células.

3.5.1 Tratamento alcalino

No tratamento alcalino, o material é tratado com bases como hidróxidos de sódio, cálcio ou amônio, a temperaturas e pressões ambientais (CHATURVEDI; VERMA, 2013). O tratamento alcalino remove a lignina do material. A reação é baseada na saponificação das ligações éster intermoleculares entre xilanos e outros componentes, como a lignina. O processo também remove grupos acetil e ácido urônico da hemicelulose (HARMSEN et al., 2010). O processo é de baixo custo, no entanto, utiliza-se grandes quantidades de água para lavagem de sais de sódio e cálcio.

3.5.2 Tratamento com ácido diluído

Em tratamentos ácidos são utilizados ácidos como sulfúrico a concentrações altas ou baixas e temperaturas altas ou baixas. A hemicelulose é hidrolisada a altas temperaturas, aumentando a porosidade do material. No tratamento com ácido diluído, apenas a hemicelulose é hidrolisada, enquanto lignina e celulose permanecem intactas. Esse tratamento é barato, simples e efetivo para o tratamento de biomassa lignocelulósica (CHATURVEDI; VERMA, 2013).

3.5.3 Tratamento com vapor

O tratamento de explosão a vapor envolve o aquecimento do material a altas temperaturas e pressões seguido pela ruptura do material devido a uma queda brusca na pressão da reação. Durante a explosão a vapor, a lignina é principalmente degradada a partir da clivagem de ligações éter de derivados de cinamil-álcoois

(RAMOS, 2003). O tratamento com vapor é realizado com uso de temperatura de reação de 127° C, a uma pressão de 1,5 kgf por 35 minutos (COELHO, 2007).

3.5.4 Tratamento oxidativo

A deslignificação de materiais lignocelulósicos pode ser realizada por meio de um agente oxidativo, como o peróxido de hidrogênio. Isso se deve à reatividade do agente oxidativo com o anel aromático. Além de solubilizar a lignina, esse tratamento também causa a degradação de uma boa parte da hemicelulose. (HARMSEN et al., 2010). Quando o peróxido de hidrogênio é aumentado para pH 11,5, ele dissocia entre hidrogênio e o ânion hidroperóxil. Então, esse ânion reage com o peróxido restante para formar radicais hidroxila altamente reativos, conforme mostram as equações 3 e 4. A reação gera produtos de oxidação solúveis em água (GRAY, 2013):



A maior desvantagem desse tratamento é o alto custo do peróxido de hidrogênio (CHATURVEDI; VERMA, 2013).

3.6 Aplicações de células imobilizadas

Sistemas com células imobilizadas têm sido cada vez mais utilizados em diversos bioprocessos, incluindo a produção de alimentos, medicamentos, ácidos orgânicos, aminoácidos, combustíveis e tratamentos de resíduos. Alguns desses processos são bem estabelecidos na indústria, enquanto outros estão em fase laboratorial ou piloto com resultados promissores.

A Tabela 1 apresenta algumas leveduras de importância biotecnológica imobilizadas em diferentes tipos de suportes.

Tabela 1 - Leveduras imobilizadas em diversos suportes e suas aplicações biotecnológicas

Espécie	Suporte	Produto	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato de cálcio	Etanol	NAGASHIMA et al. (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sabugo de milho.DEAE	Etanol	SANG-EUN et al. (2012)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alginato, bagaço de cana, ágar-ágar	Etanol	SINGH et al. (2013)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bagaço de sorgo	Etanol	YU; ZHANG; TAN (2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cascas de uva	Vinho	MALLOUCHOS et al. (2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spezyme GDC	Cerveja (Maturação)	PAJUNEN; GRONQVIST; LOMMI (1989)
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Bagaço de malte	Cerveja (fermentação)	BRÁNYIK et al. (2002)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bucha, bagaço de cana	Açúcar invertido	URIOSTE; MEDEIROS; DE CASTRO (2002)
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Ágar	Açúcar invertido	TODA; SHODA (1975)
<i>Kluyveromyces sp.</i>	Bagaço de cana	Produção de etanol	KUMAR et al. (2011)
<i>Pichia pastoris</i>	Alginato de cálcio	Produção de acetaldeído	DUFF; MURRAY (2004)
<i>Candida guilliermondii</i>	Alginato	Produção de Xilitol	SANTOS et al. (2008) SARROUH; SILVA (2013)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Alginato	Probiótico	GRAFF et al. (2008)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Alginato de cálcio	Fermentação maloalcoólica em vinhos	LY; TSAY (1989)
<i>Candida tropicalis</i>	Casca de coco, Bucha	Biodegradação de polifenóis	SHAZRIENNA et al. (2015)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui a habilidade natural de aderir a superfícies inertes ou outras células, sendo esse último processo denominado floculação, que consiste na formação de flocos de células (VERBELEN et al., 2006).

No entanto, na adsorção das leveduras a suportes de imobilização, alguns autores propõem que ocorrem interações eletrostáticas e retenção em poros do material. Brányik et al. (2004) em seu estudo investigou esses mecanismos usando como objeto de estudo leveduras imobilizadas em bagaço de malte e encontrou evidências de que as forças eletrostáticas envolvidas na imobilização são predominantemente hidrofóbicas. Santos et al. (2008) ao acompanhar o pH no processo de imobilização da levedura *Candida guilliermondii* verificou que a eficiência de imobilização aumentou em valores de pH entre 4 e 5. Esse aumento foi devido à neutralização de grupos negativos, como ácidos carboxílicos na superfície da célula, reduzindo a repulsão eletrostática entre as células favorecendo dessa forma a imobilização celular. Os mesmos autores observaram que a eficiência de imobilização apresentou-se uma queda significativas em valores de pH maiores de 5 devido ao fato de que os grupos carboxílicos terem se tornado positivamente carregados, favorecendo a repulsão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Suporte de imobilização

Todos os experimentos foram realizados na Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). Neste estudo, o suporte escolhido para a imobilização celular foi a casca de café. A casca *in natura* foi lavada com água e seca a 80°C por 48h. Não foi realizada a moagem da casca, pois segundo Santos (2014) a etapa de moagem resulta na redução da capacidade de imobilização da mesma.

4.2 Tratamentos empregados para a casca de café

A casca de café foi submetida a quatro tratamentos diferentes. Os suportes tratados foram avaliados quanto as suas capacidades de imobilização celular.

4.2.1 Tratamento alcalino com hidróxido de sódio

Para o tratamento alcalino, foi usada a metodologia utilizada por Santos (2014). Um volume de 1,0 L de uma solução de NaOH 4% (p/v) foi adicionado a um béquer de 2000 L contendo 20 g de casca de café lavada e seca. A solução com o suporte foi mantida em um agitador magnético (DiagTech DT3120H) sob agitação máxima por 24 h. Em seguida, o suporte tratado foi lavada com água corrente até atingir pH 7. Após a lavagem, a casca tratada foi seca em estufa a 80°C por 48 h.

4.2.2 Tratamento com vapor

Para o tratamento com vapor foi usada a metodologia utilizada por Santos (2014). foram adicionados, em um Erlenmeyer de 500 mL, 20 gramas de casca de café lavada e seca e uma solução de etanol 70% na proporção de 1:1. A suspensão foi submetida ao tratamento com vapor em autoclave a uma pressão de 1,5 Kgf/cm², temperatura de 127°C por 30 minutos. Em seguida, a autoclave foi desligada e a válvula aberta rapidamente, provocando dessa forma uma queda brusca na pressão interna. O suporte tratado foi lavado e seco em estufa a 80°C por 48h.

4.2.3 Tratamento com ácido diluído

Para o tratamento com ácido, um volume de 1 L de uma solução de H_2SO_4 4% (p/v) foi adicionado a um erlenmeyer de 2000 L contendo 20 g de casca de café lavada e seca. A solução com o suporte foi mantida em um agitador magnético (DiagTech DT3120H) sob agitação máxima por 24 h. Em seguida, o suporte tratado foi lavado com água corrente até alcançar pH 7. Após a lavagem, a casca tratada foi seca em estufa a 80°C por 48 h.

4.2.4 Tratamento com peróxido de hidrogênio em meio alcalino

Para o tratamento com peróxido de hidrogênio, foi utilizada uma metodologia adaptada de Ayeni et al. (2013). Foram adicionados 20 g de casca de café lavada e seca a um volume de 1L de uma solução de H_2O_2 1% (v/v) corrigida com NaOH até alcançar pH de 11,5. Em seguida a suspensão foi mantida em um agitador magnético (DiagTech DT3120H) sob agitação máxima por 24 h. Depois de transcorrido o período de tratamento, a casca foi filtrada e lavada com água corrente até atingir pH 7. Após a lavagem, o suporte tratado foi seco em estufa a 80°C por 48 h.

4.3 Meio de cultivo

O meio de cultivo foi preparado com a seguinte composição: glicose 50 g/L, extrato de levedura 15 g/L; fosfato de potássio monobásico 7g/L, sulfato de magnésio 0,01g/L, fosfato de sódio monobásico 12g/L, sulfato de amônio 3g/L. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O microrganismo utilizado nos ensaios foi a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (marca Dona Benta), com uma concentração inicial de 1g/L.

4.4 Imobilização celular

A imobilização da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* na casca de café foi conduzida em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 1g (peso seco) do suporte não tratado ou tratado em 50 mL do meio de cultivo, preparado conforme o item 4.3. Os Erlenmeyers foram incubados em *shaker* a 180 rpm e temperatura de 28,5°C. Para cada tratamento foram realizados 12 ensaios de imobilização, com tempo total de fermentação de 96h, sendo retirados amostras a cada 24h em triplicata. Os ensaios foram realizados em triplicata para evitar grandes variações na metodologia decorrentes de perdas de pedaços de casca durante a pesagem ou filtragem.

4.5 Determinação de células imobilizadas

Para o cálculo da massa seca das células imobilizadas foram retiradas amostras a cada 24h foram. As mesmas foram filtradas a vácuo utilizando papel filtro de café (Melitta 103) previamente seco em estufa a 80°C por 48 h e pesado em balança analítica (Marte AY 220). O papel filtro contendo as cascas com as células imobilizadas foram secos a 80°C por 48h e pesados em balança analítica. A determinação do peso seco das células imobilizadas foi feita de acordo com a equação 1:

$$\text{Massa seca das células imobilizadas (g)} = \text{Massa seca total do suporte-células-papel filtro(g)} - \text{Massa seca do suporte sem células (g)} - \text{Massa seca do papel filtro (g)} \quad \text{Eq.3}$$

A relação entre a massa de células imobilizadas por massa de suporte foi determinada dividindo a massa seca das células imobilizadas (g) pela massa seca da casca de café (g).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os diferentes tratamentos foram comparados quanto à capacidade da casca de café como suporte de imobilização das células microbianas. A Figura 1 mostra o resultado da imobilização da casca de café não tratada *in natura* no decorrer de 96 horas de fermentação.

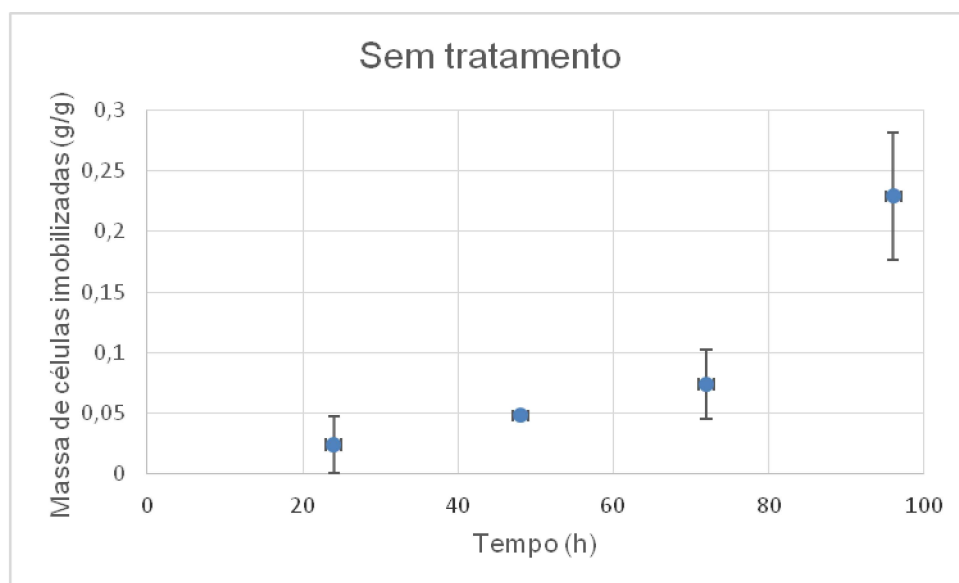


Figura 1. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café sem tratamento no decorrer de 96 horas.

Analisando-se os dados obtidos, observa-se que a quantidade de células imobilizadas teve um aumento gradual, atingindo valores de $0,02 \pm 0,03$ g/g após 24h, $0,048 \pm 0,001$ g/g após 48h, $0,07 \pm 0,03$ g/g após 72h e $0,22 \pm 0,05$ g/g após 96h. Do período de 72h para 96h notou-se um aumento na massa de células maior que no observado nos experimentos com a casca tratada. No entanto, durante a execução dos experimentos observou-se que em alguns ensaios houve problemas de entupimento do filtro, impossibilitando a total remoção do meio de cultivo rico em células livres. Tal fato provavelmente foi responsável pelo alto valor de massa seca imobilizada obtida após 96h de fermentação (Figura 1). Como a presença dessas partículas impediu que o meio de cultivo fosse totalmente removido, sendo assim os resultados obtidos com 96h contabilizaram não apenas as células imobilizadas, como também células livres presentes no meio de cultivo. Dessa forma, para fins de

análise mais precisa, os valores obtidos após 96h serão desconsiderados para a casca não tratada.

A Figura 2 mostra os resultados da imobilização utilizando a casca de café tratada com o método alcalino no decorrer de 96 horas de fermentação.

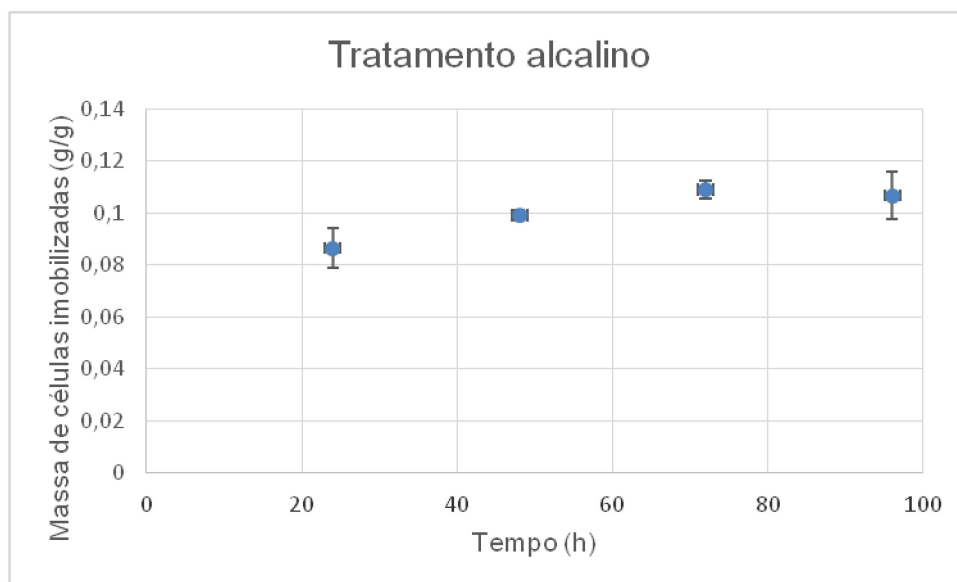


Figura 2. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café tratada com NaOH 4%p/v no decorrer de 96 horas.

Os ensaios com casca de café tratada pelo método alcalino apresentaram uma melhora gradual na imobilização microbiana no decorrer de 72 h. Obteve-se 0,087 ± 0,008 g/g após 24h, 0,099 ± 0,002 g/g após 48h, 0,109 ± 0,009 g/g após 72h e 0,106 ± 0,009 g/g após 96h. Segundo os resultados obtidos, observou-se que, houve um aumento de 106% e 55,7%, após 48h e 72h de fermentação respectivamente, na capacidade de imobilização da casca com tratamento alcalino em comparação com os valores obtidos utilizando a casca não tratada (Figuras 1 e 2). O tratamento alcalino provoca a remoção da lignina da estrutura lignocelulósica da casca de café (HARMSSEN et al., 2010), promovendo dessa forma um aumento considerável na superfície do suporte e como consequência um aumento na sua capacidade de imobilização microbiana.

A melhora proporcionada pelo tratamento alcalino também foi observada por Coelho (2007), que ao avaliar a adsorção de *Candida guilliermondii* em bucha vegetal, verificou que o tratamento com NaOH resultou num aumento considerável em relação ao controle. No referido estudo, a massa de células imobilizadas em

suporte tratado e moído foi de 0,34 g/g, contra 0,16 g/g para o suporte sem *in natura* e moído.

A Figura 3 apresenta os resultados de imobilização utilizando a casca tratada com vapor no decorrer de 96 horas de fermentação.

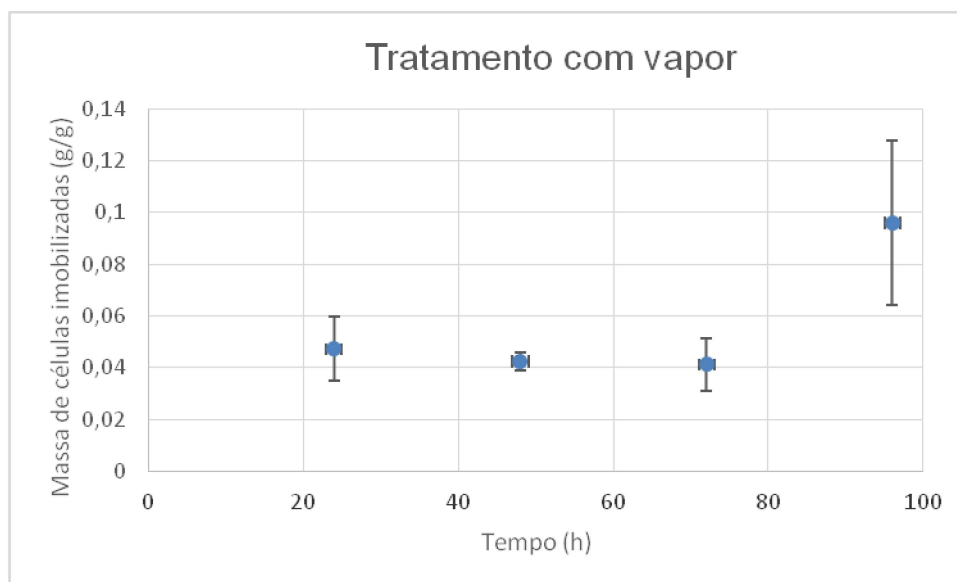


Figura 3. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café tratada com vapor no decorrer de 96 horas.

Os valores obtidos de massa seca por grama de suporte foram de $0,04 \pm 0,01$ g/g após 24h, $0,042 \pm 0,003$ g/g após 48h, $0,04 \pm 0,01$ g/g após 72h e $0,09 \pm 0,03$ após 96h. Observou-se que os resultados obtidos mostraram uma tendência de manterem-se aproximadamente constantes durante as primeiras 72h seguidas de um aumento significativo após 96h. O tratamento a vapor utilizado para a ativação do suporte sólido (casca de café) apresentou resultados de imobilização microbiana menores que no caso da casca não tratada e casca tratada com NaOH. Tal fato indicou que o uso de vapor não foi eficiente em aumentar a capacidade adsorptiva do suporte. Outro fator importante foi o aumento da carga negativa na superfície da casca, devido ao uso do vapor quente, provocando dessa forma uma baixa imobilização celular. Deve-se ressaltar que a carga da parede celular do microrganismo utilizado também possui cargas negativas (EDDY; RUDIN, 1958), resultando no surgimento de forças de repulsão entre a superfície ativada e as células.

No estudo de Coelho (2007), entretanto, foi constatado que o uso do tratamento a vapor teve um resultado positivo sobre a imobilização, tendo um resultado de 0,30 g/g de suporte, comparável com os 0,34 g/g de suporte obtidos com o suporte tratado com NaOH e maiores que os 0,16 g/g de suporte para a casca *in natura*. Vale ressaltar que o material usado no referido estudo foi bucha vegetal, material de composição diferente da casca de café. Dessa forma, é possível que a casca de café tenha em sua composição substâncias que sofreram ionização no processo que não estão presentes na bucha.

A Figura 4 mostra os resultados de imobilização utilizando casca tratada com ácido sulfúrico no decorrer de 96 horas de fermentação.

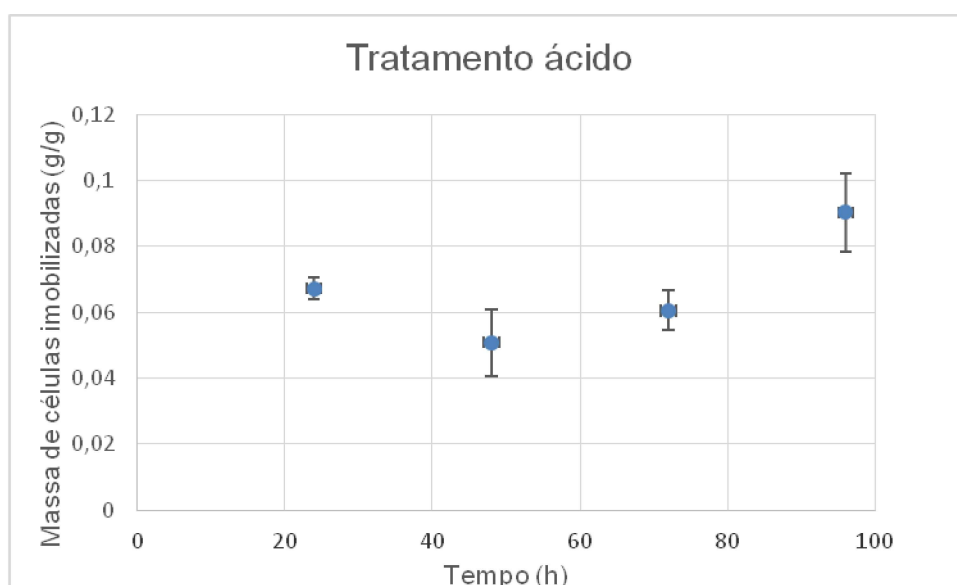


Figura 4. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café tratada com ácido sulfúrico 4% p/v no decorrer de 96 horas.

De acordo com os resultados obtidos na Figura 4, observou-se que o tratamento da casca com ácido 4% p/v mostrou-se um comportamento diferente do descrito para os tratamentos anteriores. Os valores de imobilização obtidos foram de $0,067 \pm 0,003$ g/g após 24h, $0,05 \pm 0,01$ g/g após 48h, $0,060 \pm 0,006$ g/g após 72h e $0,09 \pm 0,01$ g/g após 96h de fermentação. Notou-se que o tratamento da casca com ácido diluído não apresentou melhoras significativas em relação à imobilização celular para a casca não tratada e tratada com NaOH. Por outro lado, houve em aumento de 46,3 % na capacidade de imobilização em comparação com a casca tratada a vapor, no período de 72h de fermentação. Conclui-se que a hidrólise ácida

com a concentração estudada não foi eficiente em desestruturar a fibra da casca devido à remoção da fração hemicelulósica da mesma. O tratamento ácido em concentrações adequadas causa a ruptura na estrutura lignocelulósica da casca e dessa forma resulta em um aumento na área superficial do sólido (CHATURVEDI; VERMA, 2013) e consequentemente na capacidade adsortiva do mesmo. Por outro lado, o tratamento ácido não provocou aumento nas cargas negativas do suporte, tal fato foi observado nos resultados superiores obtidos em relação à casca tratada com vapor (Figuras 3 e 4). Uma possibilidade de se aprimorar esse tratamento é modificar a temperatura de reação ou a concentração de ácido usado. Uma outra possibilidade tratamento é combinar a etapa de tratamento ácido com uma etapa de tratamento alcalino, como o proposto por Brányik (2002). O método de Brányik, ao ser comparado com o método alcalino sem combinação por Melnikov (2007) apresentou uma maior capacidade de remoção de lignina e hemicelulose. Apesar de o referido estudo não ter comparado os métodos em termos de capacidade de adsorção celular, o resultado nele obtido mostra que o tratamento é promissor.

A Figura 5 apresenta os resultados de imobilização da casca de café tratada com peróxido de hidrogênio no decorrer de 96 horas de fermentação.

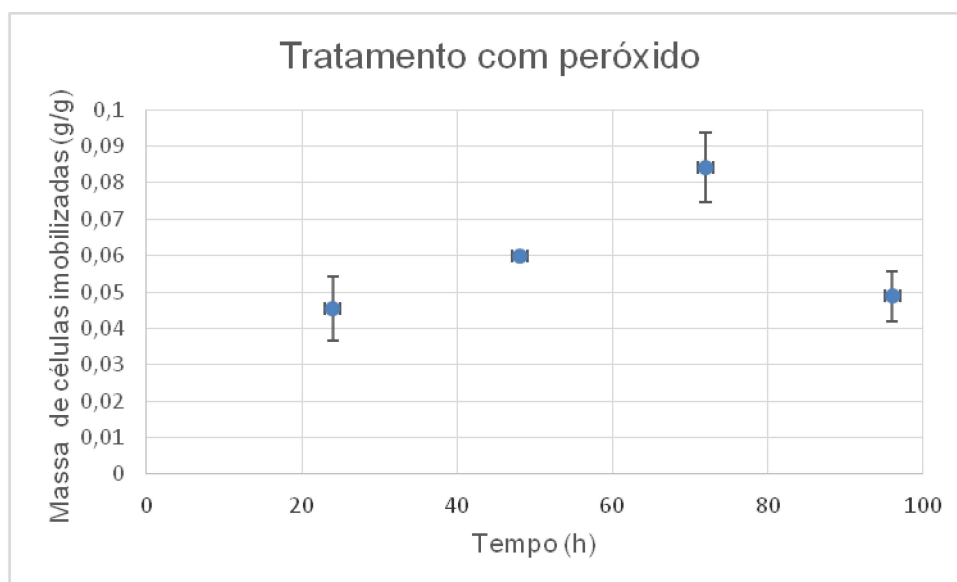


Figura 5. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café tratada com peróxido de hidrogênio 1% v/v no decorrer de 96 horas.

Segundo os resultados mostrados na Figura 5, observou-se que a massa de células imobilizadas teve um aumento gradual no decorrer de 72h de fermentação.

Os valores de imobilização foram de $0,045 \pm 0,008$ g/g após 24h, $0,0599 \pm 0,0004$ g/g após 48h, $0,08 \pm 0,01$ g/g após 72h e $0,049 \pm 0,007$ g/g após 96h de fermentação. Observou-se um aumento na imobilização celular de 24,7% após 48h e 14,3% após 72h em comparação com a casca não tratada. Da mesma forma houve um aumento de 33,3 % na imobilização celular em comparação com o tratamento ácido, após 72h de fermentação, mostrando dessa forma o potencial do uso do peróxido de hidrogênio na ativação da casca de café como suporte de imobilização. Por outro lado, o tratamento com NaOH 4% (p/v) mostrou-se mais eficiente que o tratamento com H₂O₂ 1% (v/v) (Figuras 2 e 5). O tratamento com peróxido de hidrogênio também visa remover a lignina da estrutura da casca promovendo uma melhoria na sua capacidade adsorptiva. Concluiu-se que, concentrações mais elevadas de H₂O₂ poderão provocar um aumento na capacidade adsorptiva da casca e consequentemente um aumento na imobilização celular.

Os valores observados estão de acordo com os encontrados por outros autores em trabalhos semelhantes com adsorção de leveduras, tais como Moo-Young, Lamptey e Robinson (1980) e Kumar et al. (2011). No entanto, existem descrições na literatura de valores superiores a 0,6 g/g de suporte (Yu, Zhang e Tan, 2007). No entanto, os mesmo autores utilizaram o bagaço de sorgo, um material altamente poroso, como suporte de imobilização. Suportes sólidos porosos possuem alta capacidade de adsorção em comparação com suporte pouco porosos ou cristalinos.

É importante também observar a influência do tempo de imobilização no processo. Coelho (2007) fez essa avaliação utilizando como suporte de imobilização a bucha vegetal tendo como microorganismo a levedura *Candida guilliermondii* e constatou que, para diferentes métodos de tratamento, a eficiência da imobilização atingia um máximo às 24h de incubação e caía em seguida. Santos et al. (2008) fizeram essa avaliação, para leveduras *Candida guilliermondii* em bagaço de cana, e constataram que o tempo de imobilização máxima foi às 21h do processo, caindo em seguida, resultados que os autores atribuem a alterações no pH durante o processo. Esses resultados diferem do encontrado no presente estudo para o tratamento alcalino, com peróxido e sem tratamento, nos quais foi observada uma tendência de aumento constante pelo menos até 72h decorridas do início do processo de imobilização. No entanto, as diferenças dos resultados podem ser explicadas pela diferença do microrganismo usado. É possível que os grupos negativamente carregados da parede celular da levedura *Candida guilliermondii* têm

um diferente pK_a dos da *Saccharomyces cerevisiae*, o que interfere na carga exibida por esses grupos em diferentes condições de pH, consequentemente interferindo nas interações célula-suporte, conforme já explicado anteriormente. Além disso, não apenas a carga da parede celular, como também o próprio pH ou força iônica do meio pode ter variado de forma diferente devido a diferenças na sua composição.

As Figuras 6 e 7 apresentam um comparativo das eficiências de imobilização de todos os tratamentos avaliados após 48h e 72h de fermentação.

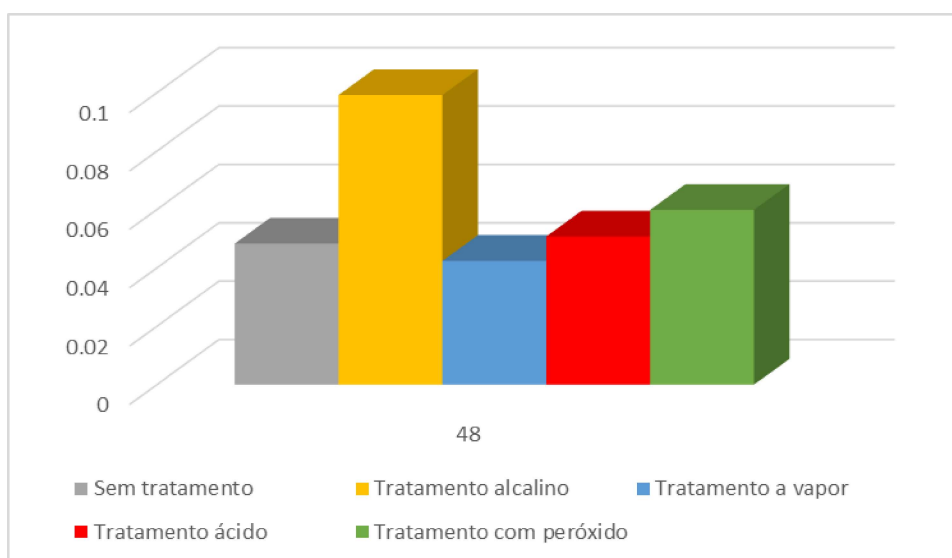


Figura 6. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café tratada com diferentes métodos após 48 horas.

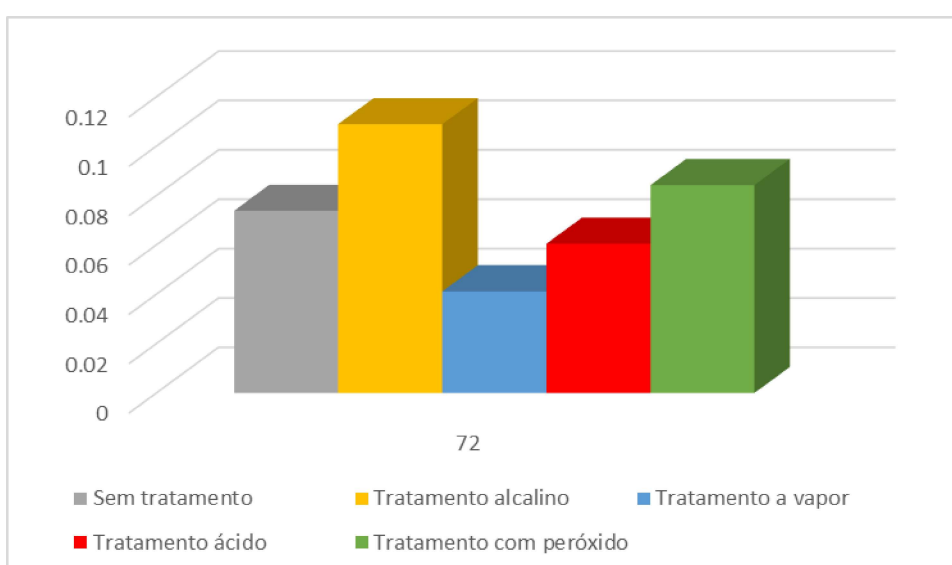


Figura 7. Avaliação da capacidade de imobilização celular em casca de café tratada com diferentes métodos após 72 horas.

Analisando-se os resultados obtidos, observou-se que a eficiência da imobilização não apresentou um comportamento similar nos tratamentos estudados. Essas variações podem ser originadas devido a valores de pH, quantidade de células livres no meio de cultivo e forças de atração iônica e eletrostáticas.

Segundo as Figuras 6 e 7, concluiu-se que o tratamento mais eficiente para a casca de café como suporte de imobilização foi o tratamento alcalino, que rendeu quantidades superiores de células imobilizadas em comparação com os demais tratamentos, no período de 48h e 72h de fermentação. O método de tratamento alcalino é de fato o mais extensivamente usado para tratamento de materiais lignocelulósicos para a imobilização de células, tendo sido reportado diversas vezes na literatura para essa finalidade, com resultados também promissores (COELHO, 2007; SANTOS et al., 2008; SINGH et al., 2013). Da mesma forma o tratamento com peróxido de hidrogênio 1% v/v apresentou resultados superiores aos obtidos nos tratamentos com ácido, vapor e também no caso da casca não tratada. Ambos os tratamentos atuam principalmente sobre a lignina do material, o que evidencia que essa é a porção da matéria lignocelulósica que mais causa impedimentos à imobilização celular e que, portanto, deve ser o principal alvo em estudos de novos tratamentos para aprimorar a capacidade de adsorção de suportes lignocelulósicos. O tratamento da casca com vapor apresentou os piores resultados de imobilização indicando a possibilidade do surgimento de forças de repulsão entre as células microbianas e o suporte em estudo. A casca tratada com H_2SO_4 4% m/v não mostrou capacidade eficiente de imobilização, o que reflete a necessidade de trabalhar com concentrações maiores do ácido com o objetivo de aumentar a sua eficiência na ruptura da estrutura fibrosa da casca de café, aumentando dessa forma a sua capacidade adsortiva.

6 CONCLUSÃO

A casca de café mostrou-se um suporte promissor para a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* por adsorção. Concluiu-se que o método de tratamento mais adequado para o aumento da capacidade de adsorção desse suporte é o tratamento alcalino com NaOH 4%*m/v*. A uma concentração inicial de 1 g de células/L de meio de cultivo observou-se que a maior eficiência foi obtida após tratar o suporte pelo método alcalino com um tempo de imobilização de 72 horas, obtendo-se um valor de $0,109 \pm 0,009$, 55,7% melhor que na casca sem tratamento. No entanto, o processo precisa ainda ser otimizado quanto às melhores condições de pH, temperatura e quantidade inicial de células. Além disso, um acompanhamento de características como pH e quantidade de células livres durante todo o processo ajudaria a ter uma melhor avaliação do processo.

7 PROSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS

Para futuros trabalhos propõe-se avaliar fatores relevantes que influenciam o processo de imobilização, tais como a força de adesão da célula ao suporte, transferência de massa e estabilidade operacional em processos de bateladas repetidas ou contínuos e otimização do tratamento alcalino, que apresentou os melhores resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**. v. 7, p. 163-173, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. 2015 Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#tabconsint2015>> Acesso em 15 de julho de 2016
- AYENI, A.O.; HYMORE, F.K.; MUDLIAR, S.N.; DESHMUKH, S.C.; SATPUTE, D.B.; OMOLEYE, J.A.; PANDEY, R.A. Hydrogen peroxide and lime based oxidative pretreatment of wood waste to enhance enzymatic hydrolysis for a biorefinery: Process parameters optimization using response surface methodology. **Fuel**. 2013
- BRÁNYIK, T. VICENTE, A.; CRUZ, J. M.; TEIXEIRA, J. Continuous primary beer fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains. **J. Inst. Brew.**, v.108, n.4, p.410–415, 2002.
- BRÁNYIK, T.; VICENTE, A.; DOSTÁLEK, P. TEIXEIRA, J. A. Continuous Beer Fermentation Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 653-663, mai. 2005
- BRÁNYIK, T.; VICENTE, A.; OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, J. Physicochemical Surface Properties of Brewing Yeast Influencing Their Immobilization Onto Spent Grains in a Continuous Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.88, n.1, p.84-93. Out. 2004
- CHATURVEDI, V.; VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. **Biotech**, v.3 p.415–431, 2013.
- COELHO, T. C. Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol. 90 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (2007).
- DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Comparison of free and immobilized *Pichia pastoris* cells for conversion of ethanol to acetaldehyde. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, n.8, p.790-795, 1988
- EDDY, A. A; RUDIN, A. D. The structure of yeast cell wall. I. Identification of charged groups at the surface. **Proceedings of the Royal Society**, v.148, n.932, p. 419-432, 1958.
- ESCOBAR, L. M. A.; ÁLVAREZ, U. S.; PEÑUELA, M. Yeast immobilization in lignocellulosic wastes for ethanol production in packed bed bioreactor. **Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia** n.62, p. 66-76, mar. 2012.

GRAFF, S.; HUSSIEN, S.; CHAUMEIL, J. C.; CHAURREAU, C. Increased Intestinal Delivery of Viable *Saccharomyces boulardii* by Encapsulation in Microspheres. **Pharmaceutical Research**, V.25, n.6, p.1290–1296, jun. 2008.

GRAY, M. K. **Alkaline hydrogen peroxyde pretreatment for its use in an on farm bioprocessing facility**. 2013. 178f. Tese (Master of Science in Biosystems and Agricultural Engineering). College of Engineering, University of Kentucky, Lexington, 2013.

HARMSSEN, P. F. H.; HUIJGEN, W. J. J.; LÓPEZ, L. M.; BAKKER, R. R. C. **Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass**. BioSynergy project . 49f. set. 2010

KLEIN, J.; ZIEHR H., Immobilization of microbial cells by adsorption. **Journal of Biotechnology**, v.16, p. 1-16, 1990

KORKOUTAS, Y.; BEKATORU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, v. 21 p. 377–397, 2004.

KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I. M. ADHIKARI, D. K. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. **Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels**, v. 2, n.1, p.1-6, Jan. 2011

LY, G.; TSAY, S. S. Maloalcoholic fermentation by immobilized *Schizosaccharomyces pombe*. **Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi**, v.22, n.4, p.229-41, nov. 1989.

MALLOUCHOS, A.; REPPA, P.; AGGELIS, G.; KANELAKI. M.; KOUTINAS, A. A.; KOMAITIS, M. Grape skins as a natural support for yeast immobilization. **Biotechnology Letter**, v. 24, p.1331–1335, 2002.

MELNIKOV, G. M. D. Fermentação primária para obtenção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte. 140 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (2007).

MOO-YOUNG, M.; LAMPTEY, J.; ROBINSON, C. W. Immobilization of yeast cells on various supports for ethanol production. **Biotechnology Letters**, v.2, n.12, p.541-548, dez. 1980.

MURTHY, P.S, 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.

NAGASHIMA, M.; AZUMA, M.; NOGUCHI, S.; INUZUKA, K.; SAMEJIMA, H. Continuous Ethanol Fermentation Using Immobilized Yeast Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXVI, p. 992-997, 1984.

PACHECO, A. M; GONDIM, D. R; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol Production by Fermentation Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Cashew Apple Bagasse. **Appl Biochem Biotechnol.** v.161, p. 209–217, 2010.

PAJUNEN, E.; GRONGVIST, A.; LOMMI, H. Continuous secondary fermentation and maturation of beer in an immobilized yeast reactor. Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly v. 26, n. 4, p. 147-151, 1989.

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

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coords). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. p. 355-372.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quim. Nova**, v. 26, n.6, p. 863-871, 2003.

SANG-EUN, L.; LEE, C. G.; KANG, D. H. LEE, H. Y.; JUNG, K. H.; Preparation of Corn cob Grits as a Carrier for Immobilizing Yeast Cells for Ethanol Production. **J. Microbiol. Biotechnol.** v.22, n.12, p.1673–1680, 2012.

SANTOS, A. O. Avaliação da casca de café como suporte alternativo para imobilização microbiana. 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos) – Universidade Federal de São João del-Rei. Ouro Branco. 2014.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **Journal of Food Engineering**, v.86, p.542–548, 2008

SARROUH, B.; DA SILVA, S. S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. **Appl Biochem Biotechnol.** v.169, p.2101–2110, 2013

SHRIVER-LAKE, L. C.; GAMMETER, W. B.; BANG, S. S.; PAZIRANDEH, M. Covalent binding of genetically engineered microorganisms to porous glass beads. **Analytica Chimica Acta**, v.470, p.71–78, 2002.

SINGH, A; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488-493, 2013.

TODA, K. SHODA, M. Sucrose inversion by immobilized yeast cells in a complete mixing reactor **Biotechnology and Bioengineering**, v.17, n.4, p. 481–497, abr.1975.

URIOSTE, D.; MEDEIROS, M. B. CASTRO, H. F. de. Imobilização de células de levedura do gênero *Saccharomyces* em matrizes alternativas para obtenção de

xarope de açúcar invertido. In: VI REUNIÃO REGIONAL DA SBBQ, 2002, Fortaleza. Fortaleza: SBBQ. Disponível em: <
<http://sbbq.ig.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Estendido/040.pdf>> acesso em 05 de outubro de 2016.

VASCONCELOS, J. N. de; LOPES, C. E.; FRANÇA, F. P. de. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 21, n.3, p. 357 - 365, Jul-Set. 2004.

VERBELEN, P. J.; SCHUTTER, D. P. de; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; DELVAUX, F. R. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnol Lett**, v.28, p.1515–1525, 2006.

WOODWARD, J. Methods of immobilization of microbial cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.8, p. 91-102, 1988.

YU, J.; ZHANG, X; TAN, T. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 415–420 , 2007.