

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MARINA JORDÃO WHITTLE

**É POSSÍVEL OBTER PROTEÍNAS E LIPASES DE CASCA DE CAFÉ SEM E COM
FERMENTAÇÃO?**

**BOTUCATU
2024**

MARINA JORDÃO WHITTLE

**É POSSÍVEL OBTER PROTEÍNAS E LIPASES DE CASCA DE CAFÉ SEM E COM
FERMENTAÇÃO?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientadora: Prof^a Associada Luciana Francisco Fleuri

**BOTUCATU
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Whittle, Marina Jordão.

É possível obter proteínas e lipases de casca de café sem e com fermentação? / Marina Jordão Whittle. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Luciana Francisco Fleuri

Capes: 20801017

1. *Aspergillus niger*. 2. Café. 3. Lipase. 4. Proteínas.

Palavras-chave: *Aspergillus sp.*; Café; Lipases; Proteínas.

É possível obter proteínas e lipases de casca de café sem e com fermentação?

Marina Jordão Whittle e Luciana Francisco Fleuri

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Botucatu/SP - CEP 18618-689.

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o resíduo de café (*Coffea arabica*) isolado e fermentado em FES quanto à quantidade de proteínas solúveis totais e atividade enzimática de lipase. O resíduo de café foi processado e liofilizado, originando o resíduo isolado. Para obtenção do resíduo fermentado, o resíduo de café foi utilizado como substrato em FES com o fungo *Aspergillus niger*, sendo posteriormente liofilizado e processado, gerando dois resíduos fermentados com diferentes volumes de água no sistema (A e B). Quanto aos resultados, a concentração de proteínas solúveis totais foi maior no resíduo fermentado A (210,58 mg/g), seguido do resíduo fermentado B (126,49 mg/g), e resíduo isolado (35,92 mg/g). Para atividade enzimática de lipase, não foram obtidos valores que diferem significativamente entre os tratamentos. Portanto, resíduos fermentados de café podem ser considerados mais promissores para obtenção de proteínas solúveis totais.

Palavras-chave: Café; Proteínas; Lipases; *Aspergillus* sp.

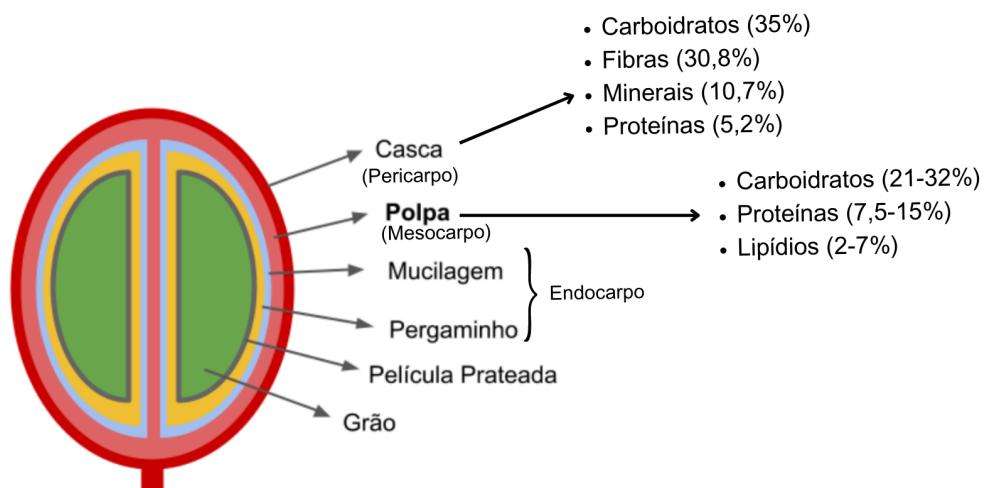


Figura 1 - Esquema das estruturas anatômicas do café contendo composição de macro e micronutrientes da casca (Brand et al., 2001) e polpa (Ulloa-Rojas et al., 2003). Figura adaptada de Montico et al. (2021) e (Esquivel et al., 2012).

SUMÁRIO

1. Introdução.....	6
2. Materiais e Métodos.....	8
2.1. Obtenção do resíduo de café e posterior obtenção do resíduo isolado.....	8
2.2. Fermentação em estado sólido com resíduo de café e obtenção do resíduo fermentado....	8
2.3 Determinação das análises bioquímicas dos resíduos.....	9
2.3.1 Proteínas Solúveis Totais.....	9
2.3.2. Atividade de Lipase.....	9
2.4. Análise de dados.....	10
3. Resultados e discussão.....	10
4. Conclusão.....	12
5. Agradecimentos.....	13
6. Referências.....	13

1. Introdução

O café é uma das bebidas mais consumidas no Brasil e no mundo em função das suas características aromáticas e gustativas, além do seu potencial estimulante (Santos et al., 2021).

Estima-se que a indústria nacional cafeeira atingiu um valor bruto de produção (VBP) de quase 56 bilhões de reais em 2022, ficando atrás apenas das lavouras de soja, milho e cana-de-açúcar (Consórcio Pesquisa Café, 2022). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), o consumo dos grãos para a preparação da bebida chegou a 21,3 milhões de sacas (de 60 kg) em 2022, ficando na segunda posição no ranking mundial de consumo de café, em que os Estados Unidos se encontram em primeiro lugar. Além disso, dentre os principais exportadores de café do mundo, o Brasil é responsável por quase 50% das exportações globais dos grãos (ICO, 2021), sendo assim um importante fornecedor no âmbito mundial e de grande importância econômica na indústria de alimentos.

A planta do café, o cafeeiro (*Coffea sp.*), pertence à família *Rubiaceae* e possui mais de 100 espécies. Dentre elas, as duas principais cultivadas são a *Coffea arabica* (que dá origem ao café conhecido como “café-arábica”) e a *Coffea canephora* (precursora do “café-robusta” ou “conilon”) (Pereira, 2019).

O fruto do café é composto por uma parte mais externa chamada de exocarpo (ou pele/casca), seguida do mesocarpo (correspondente à polpa/mucilagem), endocarpo (pergaminho) e endosperma (grão de café) (Santos et al., 2021; Durán et al., 2017). Para a obtenção do grão de café que é utilizado para a bebida, o fruto pode passar por dois tipos de processamento conhecidos como via seca e via úmida. Adicionalmente, também pode-se ter uma variante da via úmida conhecida como via semiúmida, também chamada de semiseca (Santos et al., 2021; Durán et al., 2017).

Independentemente de qual processo é escolhido, mundialmente são geradas toneladas de subprodutos do café, como casca, polpa e pergaminho. Estima-se que na colheita de 2020/2021 o processamento na indústria resultou em 11,4 milhões de toneladas de resíduo de café, sendo em sua grande maioria descartado (Silva, 2021). Dado essa grande quantidade de rejeito produzido, é vantajoso, comercial, ambientalmente e cientificamente, encontrar aplicações para esses resíduos, uma vez que eles podem ser utilizados como matéria-prima para produtos de interesse das indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

A casca do café é constituída majoritariamente por carboidratos (35%) e fibras (30,8%), além de minerais (10,7%), proteínas (5,2%) e polifenóis importantes, como os taninos (Brand et al., 2001). A polpa possui uma composição semelhante, sendo: 21-32% de

carboidratos, 7,5-15,0% de proteínas, e 2,0-7,0% de lipídios (Ulloa-Rojas et al., 2003). Com uma constituição orgânica diversa, os resíduos oriundos do processamento do café são ricos principalmente em ácidos fenólicos, alcaloides, flavonoides e xantonas, sendo ótima fonte de substâncias bioativas, como ácido clorogênico (estimulante do sistema nervoso central, antioxidante, entre outras propriedades), a cafeína, a quercetina e mangiferina (Silva, 2021) - todas substâncias com propriedades biológicas possivelmente interessantes para diferentes aplicações.

Resíduos de café são interessantes pelo seu alto teor de proteínas, macromoléculas de valor biológico e econômico para serem utilizadas na alimentação animal e humana, bem como também pela sua quantidade de lipídios e enzimas lipases (Iriondo-DeHond et al., 2020).

Por definição, as enzimas lipases, quando encontradas na interface orgânico-aquosa, atuam catalisando a hidrólise das ligações éster-carboxilato. Porém, quando em condições de baixa umidade, enzimas lipases são capazes de catalisar outras reações, como a esterificação (Barros et al., 2010; Pereira et al., 2003). Por sua alta eficiência e versatilidade, as enzimas lipases apresentam um alto interesse comercial. Podem ser empregadas na indústria de alimentos para o desenvolvimento de aromas e para fabricação de óleos e gorduras; na indústria farmacêutica como biocatalisadores para criação de novas moléculas alvo; e na indústria de detergentes (Villeneuve, 2003).

Quanto às proteínas, além de terem um interesse comercial para alimentação humana e animal, também levam a um reaproveitamento do alimento, diminuindo assim seu desperdício. O desperdício de alimentos não apenas implica em problemáticas econômicas para os países, como também se relaciona com o desperdício de recursos, como terra, água e fertilizantes usados na sua produção. Ademais, resíduos de alimentos podem ser descartados de forma incorreta, gerando maior poluição e gases tóxicos (Gupta et al., 2019). Com isso, a obtenção de proteínas a partir de resíduos vegetais pode diminuir esses impactos, além de terem uma possível aplicação em outros segmentos, como melhorar a qualidade nutricional de produtos já existentes na indústria alimentícia (Muniz et al., 2020).

Além disso, os resíduos de café também podem ser utilizados como substrato para fermentação em estado sólido (FES), promovendo o crescimento de fungos e obtenção de moléculas de interesse. Essa técnica se dá pelo crescimento e metabolismo desses microrganismos em resíduos úmidos, porém sem a presença de água livre no sistema. Dentre os diversos fungos estudados, o *Aspergillus niger* é bastante utilizado e conhecido por ser

grande produtor da enzima lipase (Falony et al, 2006) e por enriquecimento proteico de meios de fermentação (Yafetto, 2018).

A partir dessas premissas, este trabalho visa utilizar os resíduos do café de forma direta (utilizando o resíduo processado minimamente) e indireta (a partir da utilização dos resíduos como substrato para fermentação em estado sólido com o *A. niger*), a fim de obter proteínas e lipases.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção do resíduo de café e posterior obtenção do resíduo isolado

As cascas de café (*Coffea arabica*) foram obtidas de uma empresa cafeicultora no município de São Manuel, próximo à cidade de Botucatu (SP). Após a coleta, o material foi processado em processador doméstico com a finalidade de diminuir as partículas, e foi liofilizado a -96 °C por 48 horas a fim de retirar a água do sistema. Após a liofilização, o material foi novamente processado e, em seguida, foi congelado a -10 °C para ser posteriormente utilizado nas análises (Okino-Delgado e Fleuri, 2014 com adaptações). Este material foi denominado resíduo isolado.

2.2. Fermentação em estado sólido com resíduo de café e obtenção do resíduo fermentado

Com o intuito de usar a casca de café processada como substrato para fermentação em estado sólido (FES) para o crescimento fúngico, primeiramente foi feita a repicagem do *Aspergillus niger*. Para isso, foi utilizado o meio sólido ágar batata dextrose e *A. niger* armazenado sob refrigeração no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências (Unesp/Botucatu). O fungo foi raspado com auxílio de uma alça esterilizada e repicado para tubos de ensaio contendo meio sólido ágar batata dextrose inclinado em tubos de ensaio. Após esse procedimento, os fungos foram colocados em BOD a 30 °C por 96h para seu crescimento. Para sua preservação e utilização nos experimentos, foram mantidos nos respectivos tubos de ensaio sob camada de vaselina esterilizada, e colocados sob refrigeração a 5 °C.

Para a condução da FES, realizada como descrito por Athanázio-Heliodoro et al., (2018), foram realizados testes quanto à adição de água ao substrato (20 g de resíduo de café processado) utilizando diferentes volumes, sendo eles: 10 mL, 15 mL e 20 mL, para que a partir dos resultados obtidos fossem selecionados os que resultassem nas mais altas concentrações/atividades das biomoléculas

Após, foram utilizadas 20 g de casca de café e os volumes de água selecionados, separadamente, em reatores Erlenmeyers de 250 mL. Aos reatores foram inoculados o *A. niger* e a FES foi conduzida a 30 °C por 5 dias em BOD (Okino-Delgado e Fleuri, 2014). Posteriormente, o conteúdo resultante foi congelado, liofilizado e processado novamente em processador doméstico, para então ser mantido congelado a -10 °C até o momento das análises. Este material foi denominado resíduo fermentado.

2.3 Determinação das análises bioquímicas dos resíduos

Foram determinadas as concentrações de proteínas solúveis totais e da enzima lipase, tanto no resíduo isolado quanto no fermentado.

2.3.1 Proteínas Solúveis Totais

Para essa análise, realizada em tubos de ensaio de plástico, foi pesado 0,2 g de cada tipo de resíduo, aos quais foram acrescentados 5 mL de solução tampão fosfato de potássio pH 6,7 0,2 M em cada tubo. Em seguida, as amostras foram agitadas com o auxílio do vórtex para, depois, serem centrifugadas a 9.000 rpm por 10 minutos a 5°C.

Após esse tempo, foi coletado 0,5 mL do sobrenadante, e a esse volume foi adicionado 2,5 mL de reativo de Bradford, seguindo a metodologia de mesmo nome (Bradford, 1976).

Além desses, foram feitos os brancos de cada amostra, que consistiu em 0,5 mL da amostra centrifugada e 2,5 mL de água; e os brancos de reação, compostos por 0,5 mL de água e 2,5 mL de reativo Bradford. Todos esses brancos foram deixados em temperatura ambiente por 15 minutos para, em seguida, serem lidos no espectrofotômetro 595 nm, utilizando-se cubeta de plástico.

Para o cálculo, foi utilizada a curva padrão construída a partir de diferentes concentrações de caseína, sendo assim possível quantificar a quantidade de proteínas solúveis totais das amostras, sendo expressa em mg/g.

2.3.2. Atividade de Lipase

Para a determinação da atividade de lipase (Macedo, Park e Pastore, 1997, modificada por Athanázio-Heliodoro et al., 2018) foi pesado 0,5 g de cada resíduo, aos quais foram adicionados 3 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1M e 5 mL de emulsão. A emulsão utilizada consiste na mistura de $\frac{1}{4}$ de azeite de oliva com $\frac{3}{4}$ de goma arábica (7%) diluída no mesmo tampão. Em seguida, os sistemas de reação foram incubados em banho de agitação

recíproca com 130 opm, a 40 °C por 30 min. Passado esse tempo, foi adicionado 15 mL de solução paralisadora composta de etanol e acetona (1:1, v:v).

Para o preparo do branco da amostra, foram feitos os mesmos passos anteriormente descritos, porém a solução paralisadora foi adicionada antes da incubação.

Já para o branco do reagente, foram misturados 3,5 mL do tampão com 5 mL da emulsão. O sistema reacional foi deixado nas mesmas condições descritas para em seguida ser acrescido de 15 mL da solução paralisadora.

Ao fim desses procedimentos, foram acrescentadas 5 gotas do indicador fenolftaleína em cada Erlenmeyer e foi feita titulação com NaOH 0,05 M. Os resultados foram expressos em quantidade de enzima lipase necessária para que 1 μ mol de ácido graxo fosse liberado por minuto nas condições de ensaio (U/g).

2.4. Análise de dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos nos ensaios foram submetidos ao teste de normalidade e/ou à análise de variância e teste Tukey ($p > 0,05$).

3. Resultados e discussão

Em relação ao conteúdo de proteínas solúveis totais, os resíduos fermentados com dois volumes diferentes de água adicionados aos substratos apresentaram as maiores concentrações em relação ao resíduo isolado (Tabela 1).

Para fins de descrição, os resíduos com 15 mL e 20 mL de água foram chamados, respectivamente, de resíduo fermentado A e resíduo fermentado B. Quando comparados entre eles, o resíduo fermentado A apresentou os melhores resultados, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Proteínas solúveis totais nos resíduos isolado e fermentados

Análise	Resíduo Isolado	Resíduo Fermentado A (15 mL de água)	Resíduo Fermentado B (20 mL de água)
Proteínas solúveis (mg/g)	35,92a	210,58b	126,49c
		↑%586,25*	↑%352,14*

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente pela ANOVA, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey no nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

*Aumento em relação ao resíduo isolado

A concentração de proteínas solúveis totais foi maior nos resíduos fermentados, sendo 210,58 mg/g no resíduo fermentado A e 126,49 mg/g no resíduo fermentado B, enquanto no resíduo isolado foram obtidos 35,92 mg/g (Tabela 1). Esses resultados representam um incremento de mais de 500% e 300% quando se considera, respectivamente, os resíduos fermentados A e B em comparação com o isolado.

Os dados obtidos foram compatíveis com o descrito por Said et al. (2023) que verificaram um maior teor proteico em resíduo de café fermentado, quando comparado ao resíduo isolado, a partir da produção de *single cell protein* (SCP) por *A. niger*. Em estudo realizado por Ramírez et al. (2021), grãos de café fermentados por *Bacillus clausii* também geraram maiores quantidades de proteínas totais em relação aos não fermentados.

Até o momento, não foram encontrados outros estudos que demonstrem a relação de resíduos isolado e fermentados de café quanto ao teor de proteínas, empregando a metodologia de Bradford (1976), como foi realizado no presente trabalho. Apesar disso, análises feitas com outros resíduos vegetais corroboram com os resultados obtidos com o café, como é o caso de estudo feito por Iyayi e Losel (2001), que obteve maiores quantidades de proteína em resíduo de mandioca fermentado por *A. niger*, quando comparado ao resíduo isolado; e em estudo conduzido por Muniz et al (2020) com resíduo de goiaba e caju fermentados com *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo maior valor proteico nos resíduos fermentados.

Além disso, a diferença na concentração de proteínas entre os resíduos fermentados A e B pode ser explicada pelo excesso de água no segundo sistema, possivelmente inibindo a taxa de fornecimento de oxigênio para a superfície das células fúngicas, prejudicando seu crescimento e, conseqüentemente, a produção de conteúdo proteico (Said et al., 2023).

Quanto à atividade de lipase, foi obtido um maior valor absoluto no resíduo isolado (3,11 U/g), seguido do resíduo fermentado A (2,97 U/g) e do B (1,56 U/g), no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resíduos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade de lipase nos resíduos isolado e fermentados

Análise	Resíduo Isolado	Resíduo Fermentado A (15 mL de água)	Resíduo Fermentado B (20 mL de água)
Atividade enzimática de lipase (U/g)	3,11a	2,97a	1,56a

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem significativamente pela ANOVA, complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey no nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Em estudo realizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014) foi obtida uma atividade de 57,55 U/g em casca de laranja. Já em experimentos realizados por Suyanto et al. (2019) os autores observaram um aumento na atividade lipase em resíduo de polpa de coco fermentado por *A. niger*. Também, em análises feitas por Damaso et al. (2008) com farelo de trigo e sabugo de milho fermentados por *A. niger*, foram obtidas atividades máximas de lipase de 48,6 U/gds e 22,7 U/gds, respectivamente; enquanto em estudo realizado por Cordova et al. (1998) com resíduo de olivas fermentado por *Rhizopus rhizopodiformis* foi obtida atividade lipase de 79,6 U/g.

Os resultados de atividade de lipase obtidos no presente estudo mostram-se inferiores quando comparados a outros resíduos vegetais. Pode ser, no caso especialmente da FES, que o baixo teor de lipídios no resíduo de café não permitiu a produção de lipases pelo fungo, nas condições testadas.

Além disso, uma vez que as vias de obtenção do café e seus resíduos envolvem temperaturas elevadas, como a secagem dos frutos em terreiros abertos sob o sol, ou pelo uso de fornos (Durán et al., 2017), essas condições podem levar ao desnaturamento das enzimas lipases, prejudicando sua obtenção a partir dos resíduos.

4. Conclusão

Os resíduos de café isolados e fermentados são fontes de proteína, uma macromolécula de alto valor agregado, podendo ser utilizado para alimentação animal e humana ou em outros processos. Além disso, apesar de ter sido detectada atividade de lipase

no resíduo isolado, essa atividade foi inferior às da literatura e a fermentação não resultou em incremento da atividade enzimática.

5. Agradecimentos

À Milene S. Pereira, Gabriela C. Gomes e Giovana R. F. Monar pela colaboração no desenvolvimento da presente pesquisa e à empresa de café pela doação dos resíduos.

6. Referências

- Associação Brasileira de Indústria de Café. Indicadores da indústria de café, 2022. Disponível em: <https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2022/>. Acesso em: 10 de maio, 2023.
- Athanázio-Heliodoro, J. C. et al. (2018). Improvement of lipase obtaining system by orange waste-based solid-state fermentation: production, characterization and application. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 14: 1-9.
- Barros, M., Fleuri, L. F. & Macedo, G. A. (2010) Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 27: 15-29.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239: 70–76.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254.
- Brand, D. et al. (2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, 27: 127-133.
- Brand, D. et al. (2001). Packed Bed Column Fermenter and Kinetic Modeling for Upgrading the Nutritional Quality of Coffee Husk in Solid-State Fermentation. **Biotechnology Progress**, vol. 17 (6): 1065-1070.
- Brand-Williams, W. et al. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, 28: 25-30.
- Camargo, D. A. et al. (2022). Isolated and fermented orange and grape wastes: Bromatological characterization and phytase, lipase and protease source. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 77.

- Consórcio Pesquisa Café. Valor Bruto da Produção Dezembro/2022. Disponível em: http://www.consorciopesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2022/dezembro/VB_P_12_2022.pdf>. Acesso em: 10 de maio, 2023.
- Cordova, J. et al. (1998). Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 5: 75-78.
- Corrêa, C. et al. (2021). Enzymatic Technology Application on Coffee Co-products: A Review. **Waste and Biomass Valorization**, 12: 3521–3540.
- Damaso, M. C. T. et al. (2008). Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39 (4): 676-681.
- Durán, C. et al. (2017). Café: aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, 9 (1).
- Embrapa Café. Faturamento das lavouras dos Cafés do Brasil alcança R\$ 56 bilhões em 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/77921739/faturamento-das-lavouras-dos-cafes-do-brasil-alcanca-r-56-bilhoes-em-2022>>. Acesso em: 10 de maio, 2023.
- Esquivel, P.; Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, 46: 488-495.
- Falony, G. et al. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technol. Biotechnol.**, 44: 235-240.
- Gupta, N. et al. (2020). Fruit waste management by pigment production and utilization of residual as bioadsorbent. **Journal of Environmental Management**, 244: 138-143.
- Heath, R. L., & Packe, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 125: 189–198.
- International Coffee Organization (ICO). World coffee consumption. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>>. Acesso em: 10 de maio, 2023.
- Iriundo-Dehond, A., Iriundo-Dehond M. & Del Castillo, M. D. (2020). Applications of Compounds from Coffee Processing By-Products. **Biomolecules**, 10 (9).
- Iyayi, E. A. & Losel, D. M. (2001). Protein Enrichment of Cassava By-products Through Solid State Fermentation By Fungi. **The Journal of Food Technology in Africa**, 4: 116-118.
- Janissen, B., Huyn, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry byproducts: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, 128: 110-117.

- Macedo, G.A. et al. (1997). Partial Purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* Sp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, 28: 90-95.
- Mirón-Mérida, V. et al. (2019). Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. **LWT**, 101: 167-174.
- Montico, L. et al. (2021). Avaliação das Atividades Biológicas, *in vitro*, dos extratos do café. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, Campinas.
- Muniz, C. E. S. et al. (2020). Solid-state fermentation for single-cell protein enrichment of guava and cashew by-products and inclusion on cereal bars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 65.
- Murthy, P., Naidu, M. M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, 66: 45-58.
- Okino-Delgado, C. H., Fleuri, L. F. (2014). Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. **Food Chemistry**. Oxford: Elsevier Sci Ltd, 163: 103-107.
- Pereira, E. B., Zanin, G. M. & Castro, H. F. (2003). Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 20: 343-355.
- Pereira, I. **Otimização de processo de extração de café verde**. (2019). Tese (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp. Araraquara.
- Ramírez, K. et al. (2021). Fermentation of spent coffee grounds by *Bacillus clausii* induces release of potentially bioactive peptides. **LWT - Food Science and Technology**, 138.
- Re, R. et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26: 1231–1237.
- Rojas, J. B. U. et al. (2003). Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. **Bioresource Technology**, 89: 267-274.
- Rossetto, V.V. et al. (2009). Frequência de neoplasmas diagnosticados por exame citológico: estudo retrospectivo em um hospital-escola. **Semina: Ciências Agrárias**, 30: 189-200.
- Said, S. D. et al. (2023). Production of Single Cell Protein by *Aspergillus niger* Using a Mixture of Coffee Husk and Molasses as Substrate. **Journal of Applied Technology**, 10 37–43.
- Santos, E. M. et al. (2021). Coffee by-products in topical formulations: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 111: 280-291.

- Santos, M. D. D., & Blatt, C. T. T. (1998). Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers, de mata e de cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, 21 (2): 135–140.
- Shankaranand, V. S., Lonsane, B. K. (1994). Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 10: 165-8.
- Silva, M. (2021). **Caracterização metabólica de quinze subprodutos da cadeia produtiva do café: das fazendas aos processos industriais**. Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp. Botucatu.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299: 152-178.
- Soares, M. et al. (2000). Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, 35: 857-86.
- Suyanto, E. et al. (2019). Production and Optimization of Lipase by *Aspergillus niger* using Coconut Pulp Waste in Solid State Fermentation. **Journal of Physics: Conference Series**, 1374.
- Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 105: 308-317.
- Yafetto, L. (2018). Protein enrichment of cassava pulp by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. **Studies in Fungi**, 3: 7-18.