



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE
MALTE (BSG) VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

NICOLE RIBEIRO MAIONE

Goiânia, GO – Brasil

Fevereiro de 2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Nicole Ribeiro Maione

Título do trabalho: Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte (BSG) visando a produção de etanol de segunda geração

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 02 / 04 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

NICOLE RIBEIRO MAIONE

**PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE MALTE
(BSG) VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos.

Orientadora: Profa. Dra. Inti Doraci Cavalcanti Montano

Co-Orientadora: Dasciana de Sousa Rodrigues

Goiânia, GO – Brasil

Fevereiro de 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro Maione, Nicole

Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte (BSG) visando a produção de etanol de segunda geração / Nicole Ribeiro Maione. - 2019. 54 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Inti Doraci Cavalcanti Montano; co orientadora Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Celulose. 2. Hemicelulose. 3. Grau de Severidade. 4. Cinética de Reação. I. Doraci Cavalcanti Montano, Inti, orient. II. Título.

CDU 66.0



UFG

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Química

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

Aos dias 26 (vinte e seis) de fevereiro do ano de 2019 (dois mil e dezenove), com início às 14:00 hs (quatorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelas seguintes doutoras: Prof^ª. Dr^ª. Inti Doraci Cavalcanti Montañó, Prof^ª. Dr^ª. Dasciana de Sousa Rodrigues, Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Freitas e Prof^ª. Dr^ª. Priscila da Silva Delabona, sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Nicole Ribeiro Maione intitulada: "Pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte (BSG) visando a produção de etanol de segunda geração" como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química. A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof^ª. Dr^ª. Inti Doraci Cavalcanti Montañó: Aprovada
Prof^ª. Dr^ª. Dasciana de Sousa Rodrigues: _____
Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Freitas: Fernanda Freitas - aprovada
Prof^ª. Dr^ª. Priscila da Silva Delabona: Aprovada

A seguir, na presença do público e da candidata, a presidente da Banca Examinadora declarou que Nicole Ribeiro Maione, candidata ao título de mestre em Engenharia Química foi:

Aprovada ; Reprovada ().

Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Caio Augusto Damiano Franco, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 26 de fevereiro de 2019.

Inti D. Cavalcanti

Prof^ª. Dr^ª. Inti Doraci Cavalcanti Montañó (UFG)

Dasciana

Prof^ª. Dr^ª. Dasciana de Sousa Rodrigues (Embrapa)

Fernanda Ferreira Freitas

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Freitas (UFG)

Priscila da S. Delabona

Prof^ª. Dr^ª. Priscila da Silva Delabona (UFG)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a força e foco para completar essa etapa.

Aos meus pais, Edna e Deuselio, e ao meu irmão, Lucas, por terem estado ao meu lado, sempre me apoiando, encorajando e acreditando no meu potencial.

Ao Ighor, por ser não só um companheiro, mas um grande amigo, me incentivando a sempre buscar o meu melhor.

Aos meus amigos pelas horas distrações e risadas largas. Em especial à Jessika, Lívia, Gaby e Karol por sempre estarem comigo e à Mariana, por ter compartilhado comigo os sofrimentos de estar longe de casa.

Ao Bruno, por ter tanto me ensinado, apoiado e aconselhado durante esse projeto, e à sua amizade.

Aos técnicos da Embrapa Agroenergia, especialmente a Thályta, Diogo, Thais e Wesley, por terem muito me ensinado e ajudado durante minha estadia na Embrapa.

Às minhas orientadoras, Inti e Dasci, que fizeram muito mais que uma simples orientação, foram conselheiras e amigas. Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês.

A todos os professores do PPGEQ da UFG por terem me guiado no ensino e beneficiado o meu crescimento como estudante e pesquisadora.

À Universidade Federal de Goiás e à Capes por terem apoiado financeiramente e fornecerem os recursos necessários para a integralização desse projeto.

Finalmente, a todos aqueles aqui não citados, mas que de alguma forma, tornaram mais simples e completa essa etapa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo e o bagaço de malte (BSG) é o principal resíduo dessa indústria. Por ser um material lignocelulósico disponível e de baixo custo, tornou-se uma alternativa atraente para a produção de biocombustíveis e outros produtos químicos. Para poder aproveitar o BSG como matéria prima este deve passar primeiro por processo de pré-tratamento. O pré-tratamento hidrotérmico permite retirar a fração de hemicelulose presente no material lignocelulósico e quebrar a cristalinidade da lignocélula. Neste trabalho, inicialmente foi realizada a caracterização do BSG *in natura*, obtendo 25,1% de celulose, 20,9% de hemicelulose, 20,3% de lignina e 28,0% de proteínas. Avaliando o efeito da temperatura e do tempo do pré-tratamento hidrotérmico, o melhor resultado obtido foi a 160°C e 60 min, com rendimento de celulose de 64,8% e remoção de hemicelulose de 62,0%. Em um segundo experimento, a temperatura e quantidade de sólidos do pré-tratamento e seu efeito na hidrólise enzimática foram analisadas e se obteve melhor rendimento de glicose, 74,1%, na hidrólise enzimática do pré-tratado a 180°C e 40 g de BSG seco, apresentando 0,020 g de furfural, 0,062 g HMF e 0,902 g ácido acético (por 100 g de BSG seco) que são inibidores do processo de fermentação. Como o presente estudo visa a produção de etanol 2G por via fermentativa, a condição de 160°C utilizando 80 g de BSG foi escolhida para o estudo cinético de pré-tratamento, uma vez que apresentou um rendimento de glicose alto, 66,3%, e menor concentração de inibidores do processo de fermentação com 0,020 g Furfural 0,020 g HMF e 0,444 g ácido acético (por 100 g de BSG seco). Em uma segunda condição foi realizada a cinética de pré-tratamento por motivos de comparação (200°C/80g). Amostras foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 20, 40 e 60 min. Resultados obtidos apontaram que o tempo reacional de 10 min obteve melhor rendimento de celulose na fração sólida para a temperatura de 160°C e para a temperatura de 200°C o maior rendimento de celulose foi em 5 min. Na fração líquida, as concentrações de oligômeros não sofreram grandes alterações ao se variar o tempo reacional na temperatura de 160°C, enquanto na temperatura de 200°C houve um aumento considerável de oligômeros em 5 minutos. As quantidades de glicose liberadas nos processos estudadas não foram satisfatórias o suficiente para considerar o pré-tratamento hidrotérmico ao BSG como viável para a produção de etanol de segunda geração.

PALAVRAS CHAVE: celulose, hemicelulose, grau de severidade, cinética de reação.

ABSTRACT

Brazil is the third largest producer of beer in the world and brewer's spent grain (BSG) is the main residue of this industry. As a low-cost, available lignocellulosic material, it has become an attractive alternative for the production of biofuels and other chemicals. To be able to take advantage of BSG as a raw material it must first be pre-treated. Hydrothermal pre-treatment allows the removal of the fraction of hemicellulose present in the lignocellulosic material and brake the lignocellular crystallinity. In this work, initially was performed the characterization of the BSG in natura, obtaining 25.1% of cellulose, 20.9% of hemicellulose, 20.3% of lignin and 28.0% of proteins. Evaluating the effect of temperature and time of hydrothermal pretreatment, the best result was at 160°C and 60 min, with cellulose yield of 64.8% and removal of hemicellulose of 62.0%. In a second experiment, the temperature and solids content of the pretreatment and its effect on the enzymatic hydrolysis were analyzed, obtained better glucose yield, 74.1%, in the enzymatic hydrolysis of the pretreated at 180°C and 40 g of dry BSG, containing 0.020 g furfural, 0.062 g HMF and 0.902 g acetic acid (per 100 g dry BSG) which are inhibitors of the fermentation process. As the present study aimed at the production of 2G ethanol by fermentation, the condition of pretreatment 160 °C, 80 g was chosen for the pretreatment kinetic study, since it presented a high glucose yield, 66.3%, and a lower concentration of inhibitors of the fermentation process with 0.020 g Furfural 0.020 g HMF and 0.444 g acetic acid (per 100 g dry BSG). In a second condition, pretreatment kinetics were performed for comparison reasons (200°C / 80g). Samples were withdrawn at times 0, 5, 10, 20, 40 and 60 min. Results showed that the reaction time of 10 min obtained better cellulose yield in the solid fraction at 160°C and at 200°C the highest yield of cellulose was in 5 min. In the liquid fraction, the concentrations of oligomers did not change significantly when varied the reaction time at 160°C, while in the temperature of 200°C there was a considerable increase of oligomers in 5 minutes. The amounts of glucose released in the processes studied were not satisfactory high to consider hydrothermal pretreatment to BSG as feasible for the production of second generation ethanol.

KEYWORDS: cellulose, hemicellulose, severity factor, reaction kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da celobiose - unidade que se repete na estrutura da celulose (O'SULLIVAN, 1997).	5
Figura 2: Estrutura proposta para a lignina por Adler (1977).	7
Figura 3: Diagrama esquemático da produção de etanol por sacarose, amido e lignocelulose (HASUNUMA, YAMADA e KONDO, 2014).	8
Figura 4: Representação gráfica do efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica (BALAT, 2011).	9
Figura 5: Principais reações que ocorrem durante o pré-tratamento hidrotérmico (YAO et al., 2017).	10
Figura 6: Mecanismo de atividade das enzimas sobre a celulose (BHAUMIK & DHEPE, 2015).	11
Figura 7: Imagem do reator Parr de 1L de capacidade utilizado para a realização dos pré-tratamentos hidrotérmicos.	13
Figura 8: Fluxograma de análises feitas durante o estudo apresentado neste trabalho.	15
Figura 9: Bagaço de malte (a) sem pré-tratamento e (b) pré-tratado a 200°C durante 60 minutos.	25
Figura 10: Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na composição da fração sólida recuperada em base de BSG processado.	28
Figura 11: Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na composição da lignina total, LIA e LSA.	30
Figura 12: Efeito do grau de severidade do pré-tratamento hidrotérmico na concentração de celulose e hemicelulose na fase líquida.	32
Figura 13: Diagrama simples do processo realizado no PExA.	33
Figura 14: Concentrações de glicose, celulose e hemicelulose em função do grau de severidade (log R ₀)	36
Figura 15: Composição do sólido pré-tratado em função do tempo de pré-tratamento a 160°C.	41
Figura 16: Concentrações de celulose e hemicelulose na fração sólida do pré-tratado em função do tempo de pré-tratamento a temperatura de 200°C.	42

Figura 17: Concentrações de oligômeros em função do tempo de pré-tratamento, na condição de 160°C.....	45
Figura 18: Concentrações de oligômeros em função do tempo de pré-tratamento, na condição de 200°C.....	46
Figura 19: Caminhos de reação da hemicelulose durante a hidrólise. Modelo I: hidrólise monofásica da hemicelulose; Modelo II, hidrólise bifásica da hemicelulose (PRONYK & MAZZA, 2010) .	47
Figura 20: Vias de reação da hidrólise da celulose. GN são as frações de glucanas de rápida e lenta degradação, GOS os glucooligosacarídeos, G glicose e DP os produtos de degradação (BORREGA et al., 2011).	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do BSG em estudos variados.....	4
Tabela 2: Fatores e níveis realizados durante o planejamento experimental A.	16
Tabela 3: Fatores e níveis realizados no planejamento experimental B.	17
Tabela 4: Composição da matéria sem processamento.	23
Tabela 5: Composição da biomassa, em g/100g de BSG pré-tratado, obtida a partir da hidrólise ácida realizada em tempos diferentes.....	24
Tabela 6: Composição do BSG pré-tratado em cada condição do PExA, em g/100g de BSG pré-tratado.	26
Tabela 7: Rendimento mássico, em g / 100 g de BSG pré-tratado, de cada ensaio realizado no PExA19.	26
Tabela 8: Grau de severidade ($\log R_0$) para cada condição estudada no PExA.	28
Tabela 9: Composição da fase líquida de pré-tratamento, em g/100g de BSG pré-tratado.	31
Tabela 10: Concentrações de glicose, celulose e hemicelulose obtidas após hidrólise enzimática de BSG pré-tratado segundo as condições descritas em PExB, em g por 100 g de BSG pré-tratado.	34
Tabela 11: Graus de severidade ($\log R_0$) do PExB.	35
Tabela 12: Rendimento mássico da glicose em função da máxima conversão de celulose em glicose.	37
Tabela 13: Composição de lignina e carboidratos, em g/100g de BSG pré-tratado, obtida pela caracterização do sólido durante os ensaios a 160°C.	40
Tabela 14: Composição de lignina e carboidratos, em g/100g de BSG pré-tratado, obtida pela caracterização do sólido durante os ensaios a 200°C.	40
Tabela 15: Concentrações de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido do pré-tratamento de 160°C.	43
Tabela 16: Concentração de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido do pré-tratamento de 160°C após a hidrólise ácida.	43
Tabela 17: Concentrações de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido do pré-tratamento de 200°C.	44

Tabela 18: Concentração de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido de pré-tratamento de 200°C após a hidrólise ácida.44

LISTA DE ABREVIATURAS

LIA	Lignina insolúvel em ácido
LSA	Lignina solúvel em ácido
BSG	<i>Brewer's spent grain</i> ou bagaço de malte
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Cinética de pré-tratamento
HMF	Hidroximetilfurfural
MS	Massa seca
PExA	Planejamento Experimental A
PExB	Planejamento Experimental B

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão de literatura	3
2.1	Biorrefinarias	3
2.2	Bagaço de malte (BSG)	3
2.3	Composição dos resíduos lignocelulósicos.....	4
2.3.1	Celulose	5
2.3.2	Hemicelulose	5
2.3.3	Lignina.....	6
2.4	Produção Etanólica	7
2.5	Pré-tratamento	8
2.5.1	Pré-tratamento hidrotérmico.....	9
2.6	Hidrólise Enzimática da celulose	10
3	Materiais e Métodos.....	12
3.1	Material de estudo	12
3.2	Planejamento Experimental	14
3.2.1	Planejamento Experimental A	15
3.2.2	Planejamento Experimental B	16
3.2.3	Cinética de pré-tratamento	17
3.3	Pré-tratamento hidrotérmico	12
3.4	Hidrólise Enzimática.....	13
3.5	Análises	17
3.5.1	Massa seca e cinzas	17
3.5.2	Compostos orgânicos e Lignina	18
3.5.3	Proteínas	20
3.5.4	Cálculo do Fator de Severidade	20
3.5.5	Calculo do Rendimento de Celulose (Rcel).....	21
3.5.6	Calculo da remoção de hemicelulose.....	21
4	Resultados e discussões	23
4.1	Matéria in natura	23
4.1.1	Avaliação da metodologia de caracterização	24

4.2	Planejamento Experimental A.....	24
4.2.1	Fase Sólida	25
4.2.2	Fase Líquida.....	31
4.2.3	Balanço de massa.....	33
4.3	Planejamento Experimental B.....	34
4.4	Cinética de pré-tratamento.....	38
5	Conclusões	49
6	Referências Bibliográficas.....	50

1 INTRODUÇÃO

Há vários indícios de que a humanidade está no início de uma terceira revolução cultural e econômica – a revolução de sustentabilidade – que deverá ser completada ainda nesse século e assim como as duas revoluções anteriores (revolução agrária e revolução industrial), a mudança de fonte de recursos e meio de produção mudará a vida e o dia a dia das pessoas e muitos aspectos das organizações sociais (LYND, 2013). A revolução de sustentabilidade, fruto da decadência da fonte de recursos atual, é dependente das biomassas renováveis, que podem oferecer uma economia mais verde e maior independência energética, já que por ser um bio-recurso renovável mais abundante no planeta, as biomassas possuem um potencial cinco vezes maior ao consumo de energia mundial e essa abundância, diminui o déficit econômico entre países importadores e exportadores de energia (CHEN e ZHANG, 2015).

A produção de bioenergia a partir de biomassa, mesmo sendo a grande tendência de crescimento econômico previsto pela revolução de sustentabilidade, ainda é um desafio por não ser economicamente competitivo com os combustíveis fósseis, que ainda possuem valores baixos de comercialização (BUDZIANOWSKI, 2016).

As biorrefinarias são sistemas industriais emergentes nesse cenário. O seu desígnio é a utilização eficiente e sustentável de biomassa, com a valorização dos seus potenciais de uso, produzindo diversos bioprodutos e bioenergia. Entre os bioprodutos possíveis, o etanol gera grande interesse por ser combustível com grande potencial de comercialização e já fazer parte de programas bem-sucedidos de substituição de combustíveis fósseis, assim como o brasileiro (originado do pró-alcool) (BUSZIANOWSKI, 2016; LOPES et al., 2016).

Etanol pode ser obtido diretamente de sacarose por amido ou a partir de biomassas lignocelulósicas. A complexidade do processo depende da matéria-prima escolhida, podendo ser processos diretos, como a fermentação de açúcares simples, ou processos mais elaborados, como pela conversão de lignocelulose por multiestágios (HASUNUMA, YAMADA e KONDO, 2014).

A conversão de lignocelulose é feita por meio da quebra da estrutura lignocelular e liberação de celulose e hemicelulose. Esses quando quebrados liberam por sua vez os açúcares simples glicose e xilose. Esses açúcares podem ser então transformados em etanol e outros bioprodutos por meio de fermentação. A fonte de

matéria lignocelulósica é vasta e de composição variada. Quanto maiores os teores de celulose e/ou hemicelulose presentes na matéria, maior será o seu potencial para a produção de etanol (MICHELIN & TEIXEIRA, 2016).

O coproduto da indústria cervejeira, conhecido como bagaço de malte, é um material lignocelulósico com grande disponibilidade. Este coproduto tem como destinação majoritária a alimentação de ruminantes, apresentando baixo valor agregado. Além de seu valor financeiro, outro atrativo dessa biomassa são suas características químicas, sendo muito rica em carboidratos (MUSSATTO et al., 2008).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o bagaço de malte como matéria prima para produção de etanol de segunda geração. Essa avaliação foi feita por meio da caracterização do produto sem processamento, pré-tratado hidrotermicamente e após a hidrólise enzimática e por meio da avaliação da cinética reacional do pré-tratamento, analisando a sua composição na fração sólida e líquida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIORREFINARIAS

As biorrefinarias são indústrias que realizam a conversão de biomassas para produção de combustíveis, energia, calor e outros produtos químicos com alto valor agregado. O objetivo das biorrefinarias é otimizar o uso de recursos e diminuir o volume de rejeitos e com isso maximizar os benefícios e a rentabilidade da produção (KOKOSSIS et al., 2015).

Os bio-produtos, produzidos com materiais lignocelulósicos, seus derivados e coprodutos, substituem os produtos de fonte fóssil, possibilitando uma grande gama de novos produtos. Os produtos petrolíferos são limitados pela sua composição química, enquanto os bio-produtos geram uma possibilidade muito maior de desenvolvimento de novos produtos por serem provenientes de bio-recursos variados que podem oferecer vários tipos de composição (MENON & RAO, 2012).

Cada constituinte do bio-recurso (biomassa) pode ser utilizado para produzir vários tipos de subprodutos, e para isso é necessário tecnologias específicas para desenvolvimento do processo de conversão química ou bioquímica. Além disso, há necessidade da integração de vários processos químicos e bioquímicos para a conversão das biomassas (KOKOSSIS et al., 2015).

2.2 BAGAÇO DE MALTE (BSG)

O resíduo da indústria cervejeira, conhecido como bagaço de malte ou BSG (do inglês *Brewer's spent grain*), é o coproduto mais abundante na produção cervejeira. A sua destinação, em grande parte, é para a alimentação de ruminantes, em especial de bovinos. A indústria cervejeira gera entre 14 e 20 kg de bagaço de malte de cevada por litro de cerveja produzida (CORDEIRO et al., 2012). A produção de cerveja no Brasil em 2017 foi estimado de 140.000 mil hL, sendo o terceiro maior produtor do mundo (BARTH-HASS GROUP, 2017). Portanto, a produção de BSG de cevada é aproximadamente $2,38 \times 10^8$ toneladas de bagaço por ano.

A composição do BSG tem uma grande variação entre os estudos reportados, sugerindo que as condições do processo de fabricação da cerveja afetam diretamente na composição desse bagaço (MENESES et al., 2013; CARVALHEIRO et al., 2004; MUSSATTO & ROBERTO, 2006). Os principais constituintes do BSG são as partes

insolúveis do malte, assim como cascas, farelos e resíduos de endosperma da semente germinada. Também é rica em polissacarídeos (arabinoxilanas e celulose), proteína e lignina e pequenas quantidades de lipídeos (OHRA-AHO et al., 2016). A Tabela 1 expõe os valores obtidos na literatura em seis BSGs de diferentes cervejarias.

Tabela 1: Composição do BSG em estudos variados.

	BSG1 ¹	BSG2 ¹	BSG3 ¹	BSG4 ¹	BSG5 ²	BSG6 ³
Lignina	11,9	7,9	5,1	5,9	15,8	19,57
Celulose	21,8	23,8	20,0	17,4	24,5	20,56
Hemicelulose	29,9	30,8	38,7	36,3	23,8	25,97
Proteínas	24	25	24	25	*	19,57

1 BOUGRIER et al., 2018

2 KLÍMEK et al., 2017

3 QIN et al., 2018

* Valor não fornecido

Quando comparado com outros resíduos industriais, o BSG possui quantidades menores de celulose e maiores de hemicelulose, com quantidades de lignina semelhantes (MUSSATO, 2014). É rica também em proteínas e fibras dietéticas sendo muitas vezes usado e estudado para o uso em alimentação humana (PIERRE et al., 2011).

Uma das grandes inviabilidades das biorrefinarias frente as refinarias de petróleo é a disponibilidade sazonal de biomassas. O BSG oferece vantagem sobre outras biomassas já que é um coproduto de uma produção intermitente, de larga escala e sem regionalização de indústrias (MENON & RAO, 2012; CHEN & ZHANG, 2015).

2.3 COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os resíduos lignocelulósicos como o bagaço de malte e outros resíduos agrícolas são formados em sua maioria de celulose, hemicelulose e lignina, que são os principais constituintes das plantas. A quantidade de cada composto na lignocelulose varia de acordo com o tipo de planta, o cultivo e a idade (YANG et al., 2006). A composição química do material lignocelulósico é um dos principais fatores

que afetam o processo de disponibilização dos açúcares provenientes das frações de celulose e hemicelulose (BALAT, 2011).

2.3.1 CELULOSE

A celulose é um polissacarídeo biodegradável e renovável mais encontrado na natureza (SUHAS et al., 2016). Está presente na maioria das plantas em aproximadamente 30% da sua composição total (KAMIDE, 2005). É insolúvel e rígido, devido a sua estrutura molecular que possui pontes de hidrogênio entre os monossacarídeos. Pela conformação alongada, possui a característica de ser fibroso e ter a temperatura de fusão muito alta (ODIAN, 2004).

A molécula é resistente ao ataque enzimático e por essa razão é necessária uma etapa de pré-tratamento. É formado por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β 1-4 com alto grau de polimerização. A molécula de celulose é composta por três unidades principais: anidroglicose ou anidroglicopiranosose (unidade que se repete dentro da cadeia polimérica), extremidade redutora e a extremidade não redutora (EYLEY & THIELEMANS, 2014). A junção de duas unidades de anidroglicopiranosose dá origem a unidade de celobiose (ADITIYA, et al., 2016). A estrutura da celobiose é mostrada na Figura 1.

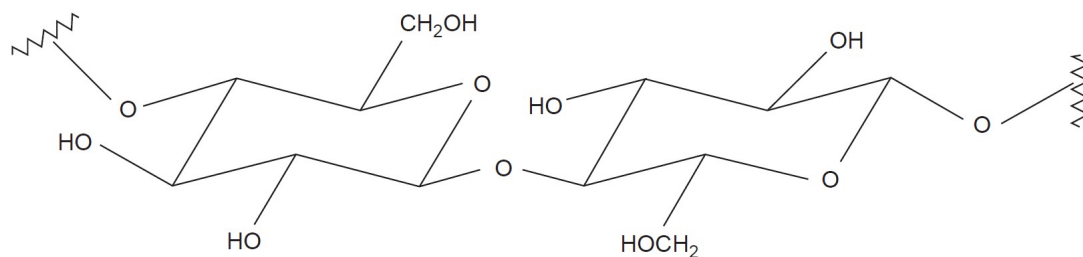


Figura 1: Representação esquemática da celobiose - unidade que se repete na estrutura da celulose (O'SULLIVAN, 1997).

Um crescente interesse na celulose é a produção de biocombustíveis, devido a seu grande potencial, oferta e sustentabilidade (YANG et al., 2006). Quando hidrolisada dá origem a moléculas de açúcar (glicose) e água, esse processo é conhecido como sacarificação (BALAT, 2011).

2.3.2 HEMICELULOSE

A hemicelulose está presente na maioria das biomassas e em grande quantidade. É um heteropolissacarídeo, composto por pentoses, hexoses e/ou ácidos urônicos. Especificamente, a hemicelulose possui xilose e arabinose (pentoses)

galactose, glicose e manose (hexoses) (SANTOS, et al., 2012). Tem um menor grau de polimerização que a celulose e maior acessibilidade aos ácidos minerais, isso faz com que sua molécula seja mais susceptível à hidrólise. Por ter um grande número de ramificações, se integram facilmente à molécula de celulose, o que gera uma maior estabilidade nas paredes lignocelulósicas. A hemicelulose pode ser mais facilmente hidrolisada quando comparada à celulose devido a sua estrutura amorfa e ramificada (BALAT, 2011).

2.3.3 LIGNINA

Os polissacarídeos que estão contidos na biomassa são protegidos pela lignina. É o segundo biopolímero mais abundante na natureza, participando de 15-25% da biomassa seca. É constituído basicamente por três unidades de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico unidos por ligações de éter, aril ou carbono-carbono (ZENG et al., 2014; SANTOS, et al., 2012). A diferença da conformação da lignina nas paredes celulares é resultado das diferentes formas de sintetização da lignina durante o desenvolvimento da planta e que podem ser afetadas por estresses ocasionado pelo ambiente (ZENG et al., 2014). A Figura 2 é uma representação da lignina.

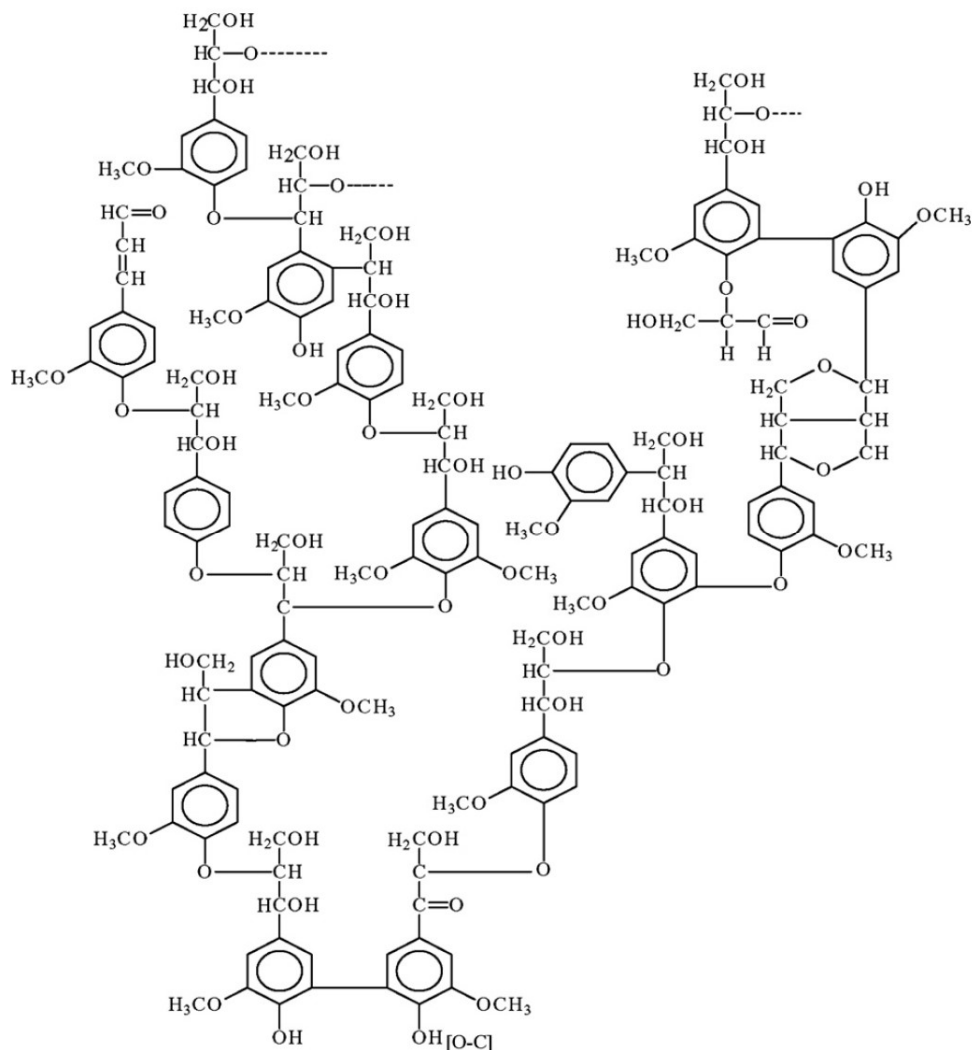


Figura 2: Estrutura proposta para a lignina por Adler (1977).

A recalcitrância oferecida pela biomassa é devida à lignina. A lignina torna a biomassa resistente a degradação biológica e química, que na natureza oferece vantagem por aumentar a resistência de toda matéria lignocelulósica à decomposição (BALAT, 2011). A lignina limita o acesso à celulose e hemicelulose formando uma barreira física durante os processos de hidrólise enzimática, além de adsorver improdutivamente as enzimas, limitando a ação dessas (KO et al., 2014).

2.4 PRODUÇÃO ETANÓLICA

O etanol pode ser obtido por vários meios: via açúcares simples, como a produção de etanol a partir de cana de açúcar, via amido, como é o etanol de milho e

via matéria lignocelulósica, como o etanol de segunda geração. Na Figura 3 é apresentado um diagrama de processos para a produção de etanol.

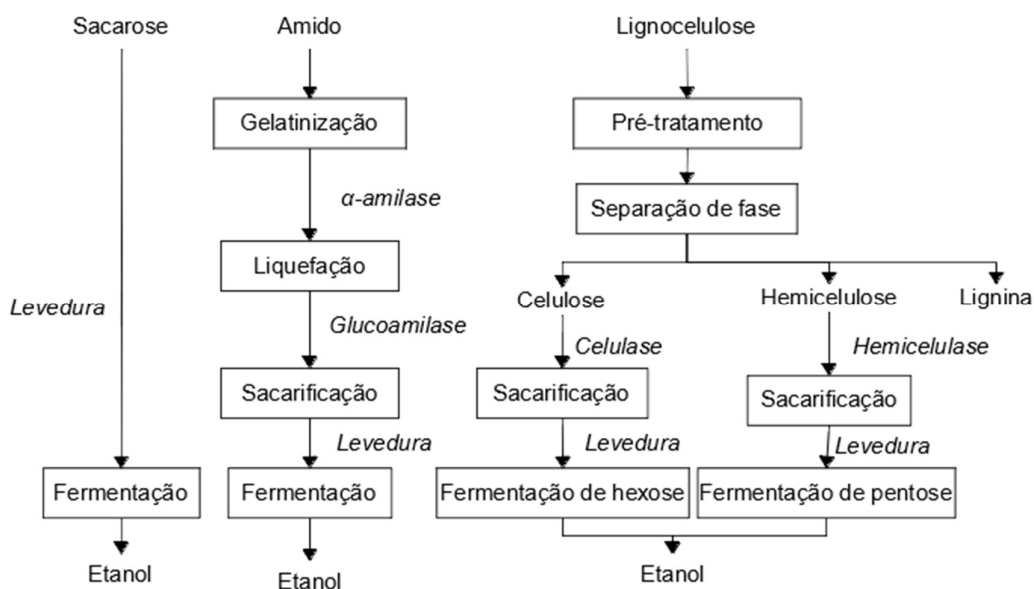


Figura 3: Diagrama esquemático da produção de etanol por sacarose, amido e lignocelulose (HASUNUMA, YAMADA e KONDO, 2014).

O etanol produzido por biomassa lignocelulósica é certamente mais complexo que os outros processos de obtenção de etanol por passar por etapas de pré-tratamento em que são promovidas a separação da celulose, hemicelulose e lignina. Após a separação das fases, os polissacarídeos passam por hidrólise enzimática de forma semelhante ao processo de produção a partir do amido, e após transformado em açúcares simples (sacarificação) e fermentado à etanol.

O processo de pré-tratamento é responsável pela quebra da cristalinidade da lignocelulose, tornando acessível a celulose e hemicelulose. É nesse ponto que podem ser liberados inibidores dos processos consequentes, e portanto um dos processos mais sensíveis da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

O enfoque deste trabalho é utilizar a biomassa lignocelulósica para a produção de etanol, sendo por tanto de grande interesse o estudo da etapa do pré-tratamento como abordado a seguir.

2.5 PRÉ-TRATAMENTO

O pré-tratamento é um processo onde a estrutura da biomassa lignocelulósica é quebrada. A quebra da estrutura e a perda da cristalinidade é um processo necessário para o melhor acesso das enzimas presentes na fase seguinte (hidrólise

enzimática) à celulose e hemicelulose (BALAT, 2011). A Figura 4 representa a quebra da estrutura lignocelulósica que ocorre durante o pré-tratamento.

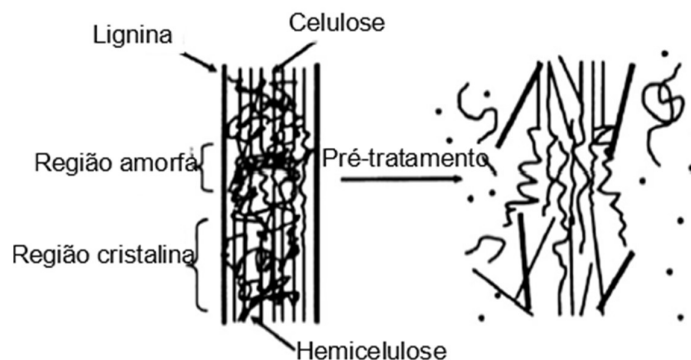


Figura 4: Representação gráfica do efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica (BALAT, 2011).

Há vários tipos de pré-tratamentos: químicos, que utilizam agentes químicos para auxiliar na degradação e separação da biomassa, biológicos, que utilizam agentes biológicos, como bactérias e enzimas, físico e físico-químicos, que utilizam temperatura e pressão para promover a separação (RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016).

2.5.1 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

O pré-tratamento hidrotérmico é um dos mais antigos pré-tratamentos aplicados industrialmente, e. g. na indústria de celulose (BALAT, 2011). O procedimento é realizado expondo a biomassa a alta temperatura (160 a 230°C) e pressão (RABEMANOLONTSOA & SAKA, 2016). Não há necessidade de reagentes perigosos ou de alto custo, é somente usado água, já que a altas temperaturas e pressões a água se comporta como um solvente. Também não há necessidade de reatores de alto custo, já que as pressões de operação não são tão elevadas e a liberação de vapor é lenta (KUDAKASSERIL KURIAN et al., 2013).

A Figura 5 apresentada a seguir contém o comportamento da celulose durante o pré-tratamento hidrotérmico.

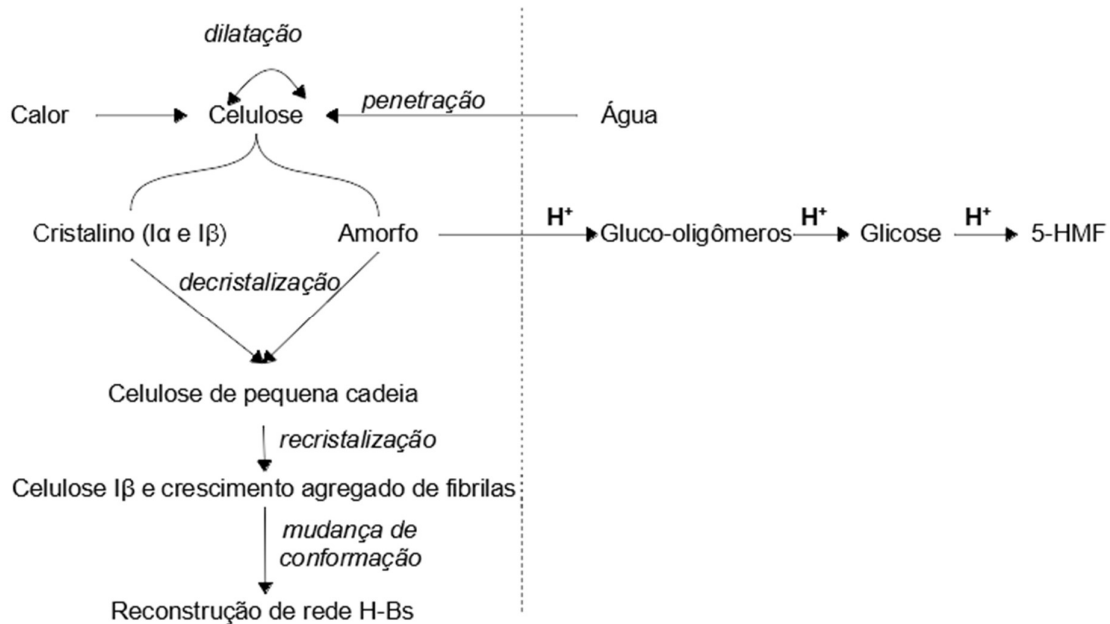


Figura 5: Principais reações que ocorrem durante o pré-tratamento hidrotérmico (YAO et al., 2017).

O lado esquerdo da figura representa o sólido (biomassa) e a parte direita, a fração líquida (água). O calor penetra a celulose, e inicia a quebra de cristalinidade (conformação original) da lignocelulose. A celulose amorfa se transforma em gluco-oligômeros, glicose e hidroximetilfurfural na presença de um baixo pH (YAO et al., 2017).

A hemicelulose por sua vez apresenta uma solubilidade maior em água que os outros compostos lignocelulósicos. Por essa razão, o pré-tratamento hidrotérmico tem ação de solubilização da hemicelulose, e, por conseguinte, a quebra de cristalinidade da lignocélula (BOBLETER, 1994)

2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

A hidrólise enzimática é realizada pelas enzimas celulases (não exclusivamente) transformando a celulose em glicose. As celulases são uma mistura de várias enzimas, entre as principais estão três que participam ativamente do processo: β -1-4-endoglucanase, que atua na região de baixa cristalinidade da fibra de celulose, disponibilizando as extremidades da cadeia polissacarídea, β -1-4-exoglucanase, que degrada a molécula, liberando celobiose das extremidades da cadeia e β -glucosidase que hidrolisa a celobiose em glicose (MUSSATTO et al., 2008). O mecanismo mostrado na Figura 6 ilustra a ação da endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase sobre a celulose.

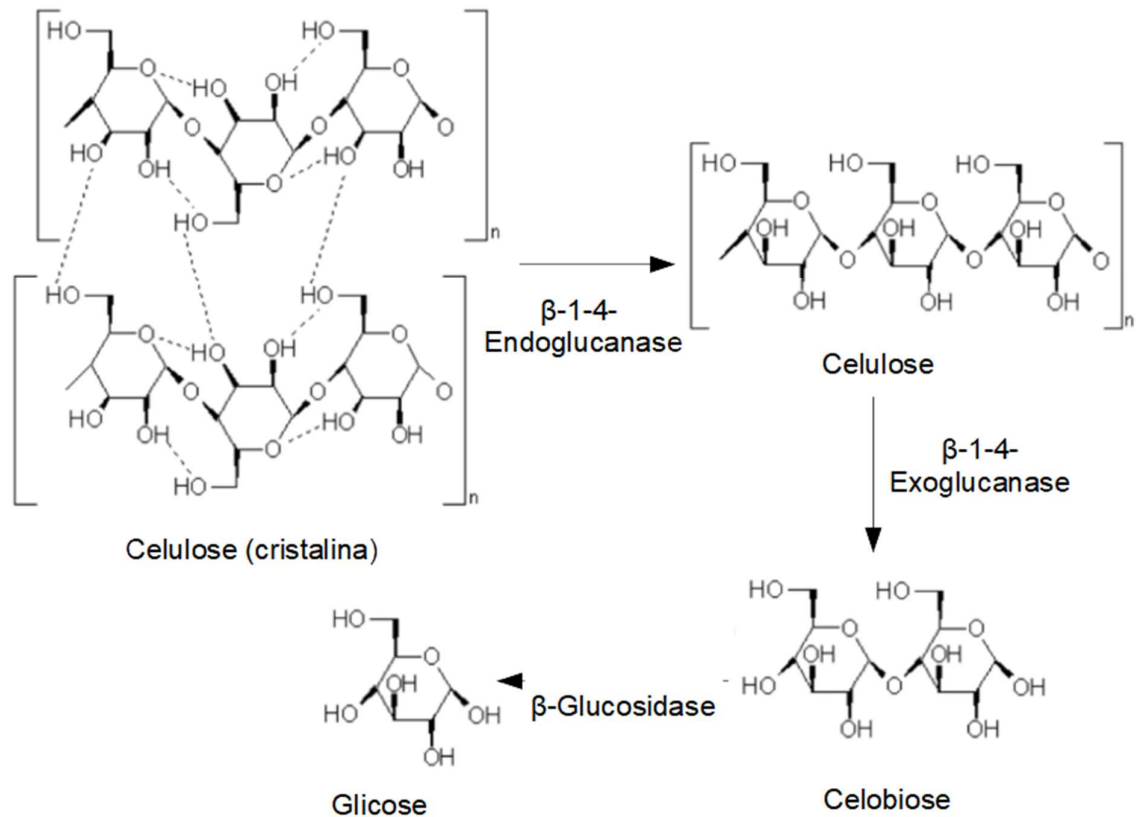


Figura 6: Mecanismo de atividade das enzimas sobre a celulose (BHAUMIK & DHEPE, 2015).

Por ser um processo enzimático, vários compostos podem se apresentar como inibidores. Estes são originados principalmente durante a etapa de pré-tratamento, como a celobiose, xilooligosacarídeos e vários produtos de degradação, como o furfural e HMF (SUN et al., 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

O bagaço de malte foi doado para estudo pela indústria Goyaz, localizada em Aparecida de Goiânia, Goiás, Brasil. A coleta foi feita na própria indústria, logo após a finalização do processo de filtração da cerveja. Este foi então transportado para o laboratório da Embrapa Agroenergia localizado em Brasília, Distrito Federal, Brasil.

O material coletado apresentava umidade elevada, o que o torna suscetível ao ataque de microrganismos, sendo necessária a secagem para preservar as características do material. O BSG foi distribuído em bandejas de um secador com fluxo de ar forçado a 45°C durante 48 horas contínuas. Após seco, com uma umidade de aproximadamente 8%, foi armazenado em sacos plásticos e acondicionado dentro do Laboratório de Processos Bioquímicos da Embrapa Agroenergia.

3.2 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

O pré-tratamento foi realizado em um reator da marca Parr (Moline, IL, USA), equipado com controlador de agitação e temperatura (C), bacia de aço inoxidável de capacidade máxima de 1L (A) e manta de aquecimento elétrica (B) (Figura 7). O reator tinha como temperatura máxima de operação de 200°C – acima dessa temperatura, a chance de desgaste e deterioração de peças e borrachas aumentavam. A agitação foi feita por impelidores simples (D) de eixo único e centralizado em relação a cuba horizontalmente, permitindo até 1700 rpm.

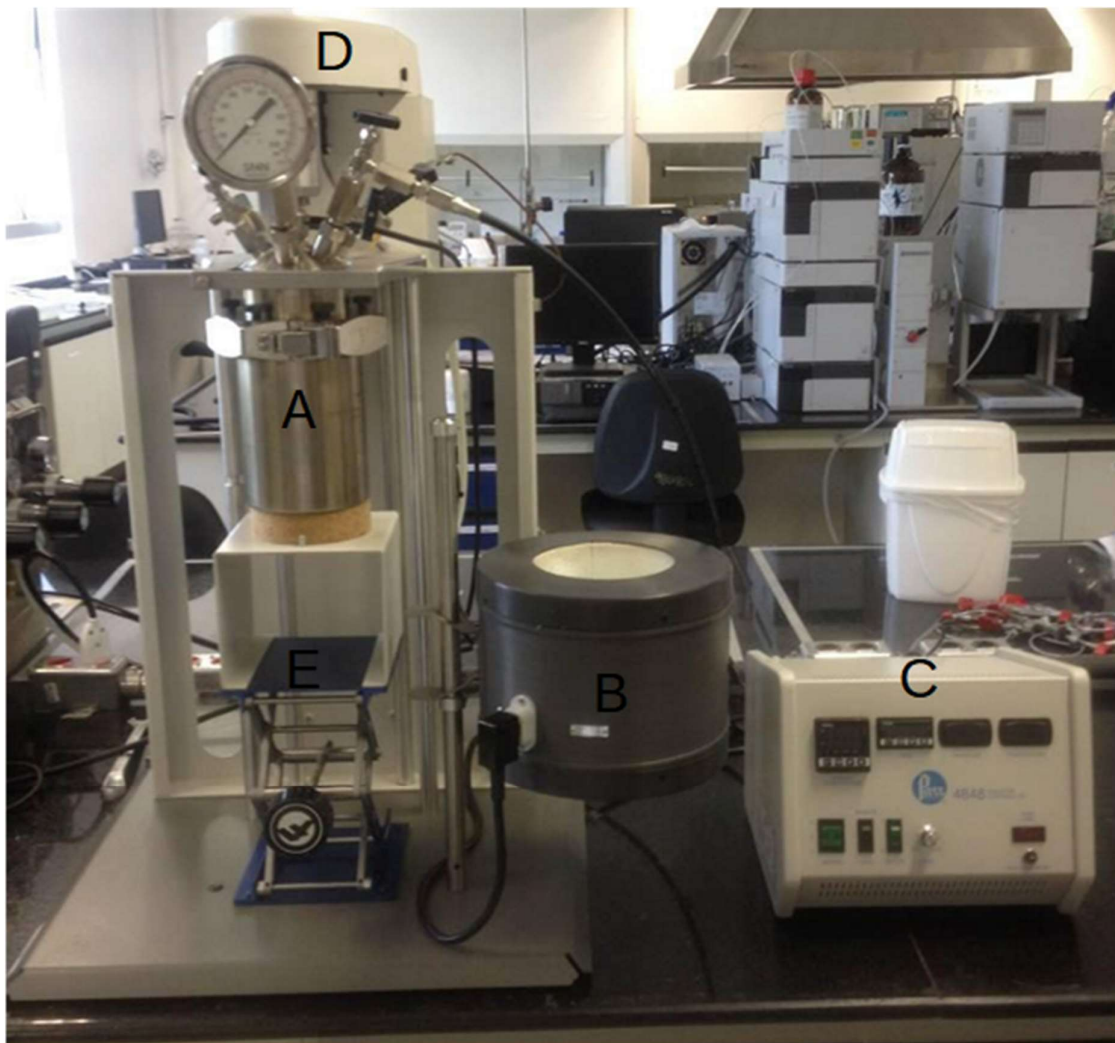


Figura 7: Imagem do reator Parr de 1L de capacidade utilizado para a realização dos pré-tratamentos hidrotérmicos.

O pré-tratamento foi realizado colocando 600 mL água destilada dentro do reator junto ao BSG. As quantidades de BSG eram preestabelecidas pelo planejamento experimental que estava sendo realizado, medidas em gramas. O tempo de reação foi contabilizado a partir do momento que o controlador do reator acusava que a temperatura de reação havia sido atingida. Após o tempo reacional, o aquecimento foi desligado, cessando o contato entre a cuba do reator e a manta de aquecimento. Quando atingido 40°C, o reator foi aberto e seu conteúdo retirado para a realização de análises e/ou hidrólise enzimática.

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi realizada no PExB em todos os experimentos. Para a realização da hidrólise enzimática, o conteúdo do reator de pré-tratamento foi

transferido para erlenmeyer de volume máximo de 1L, posteriormente foi adicionada a quantidade de tampão citrato 1M necessária para atingir pH 5,0 e coquetel enzimático da Novozymes CelicCtec3. O coquetel enzimático foi adicionado proporcionalmente à quantidade de BSG que foi processada durante o pré-tratamento, sendo 20 FPU/g de BSG seco e o coquetel enzimático contendo 220 FPU/mL. Após adicionados o tampão e o coquetel enzimático, todos os erlenmeyer devidamente identificados de acordo com a condição que foi realizado o pré-tratamento, foram igualados quanto a sua massa utilizando uma balança de precisão de duas casas decimais. As condições utilizadas para a realização da hidrólise enzimática foram escolhidas com o intuito de que toda a celulose presente fosse hidrolisada em açúcares, obtendo assim a máxima conversão e permitindo que fosse analisado o efeito dos produtos gerados (principalmente os inibidores) durante o pré-tratamento na hidrólise enzimática.

Em incubadora do tipo shaker, cada erlenmeyer foi tampado com plástico filme e afixado com garras e molas ao equipamento. O equipamento foi ligado e colocado a 50°C, com agitação de 200 rpm e operando durante 48 h. Amostras de 1,5 mL foram coletadas e centrifugadas em tubos do tipo eppendorf para análises seguintes.

3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O BSG por ser um material proveniente de um processo produtivo, pode variar muito quanto sua composição, já que a composição da cerveja e os grãos que participam dela tem uma grande variação. Sendo assim necessária a realização de um estudo experimental que esclareça as melhores condições para pré-tratamento para poder ser usada de forma satisfatória como matéria prima nas denominadas biorefinarias. Um fluxograma geral sobre as etapas experimentais é apresentado na Figura 8.

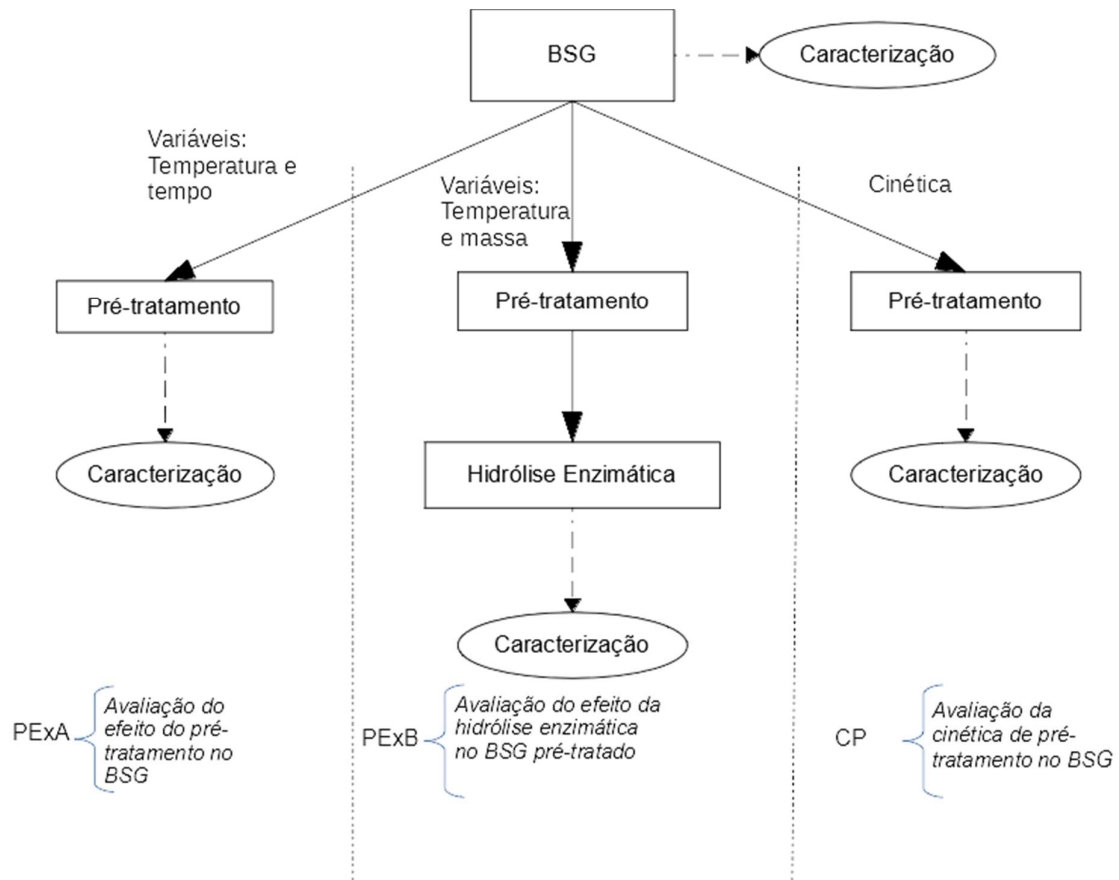


Figura 8: Fluxograma de análises feitas durante o estudo apresentado neste trabalho.

3.4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL A

O Planejamento Experimental A foi realizado para avaliar quais temperaturas e tempos eram eficazes na remoção da hemicelulose do BSG utilizando o pré-tratamento hidrotérmico descrito anteriormente. Trabalhos de pré-tratamento hidrotérmico de outras matérias lignocelulósicas, como bagaço de cana-de-açúcar, madeiras e resíduos de mandioca, utilizaram temperaturas entre 160°C e 210°C (ROCHA, *et al.*, 2017; JUNG *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2017). Com base nestes trabalhos, para um primeiro estudo, as temperaturas de 160°C e 200°C foram escolhidas. O tempo de reação escolhido foi também baseado na mesma literatura anterior, onde os tempos ótimos se encontravam entre 30 e 40 minutos. Como o PEXA foi um estudo realizado para entender melhor o efeito do pré-tratamento hidrotérmico no BSG, os tempos reacionais escolhidos tiveram um range maior (20 e 60 minutos), para garantir que o melhor tempo fosse abrangido.

Após terem sido feitos os estudos dessas duas temperaturas, uma terceira temperatura (120°C) foi estudada nos mesmos intervalos de tempo de reação para certificar que em temperaturas mais brandas não haveria modificação sobre a biomassa. A Tabela 2 expõe os valores reais e codificados do PExA. Para todos os experimentos realizados no PExA, foram utilizados 600 mL de água destilada e 60 g de BSG (base seca).

Tabela 2: Fatores e níveis realizados durante o planejamento experimental A.

Experimento	Temperatura		Tempo	
	Codificada	Real (°C)	Codificada	Real (min)
1A	-1	120	-1	20
2A	-1	120	+1	60
3A	+1	200	-1	20
4A	+1	200	+1	60
5A	0	160	-1	20
6A	0	160	+1	60

3.4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL B

O Planejamento Experimental B foi realizado com a intenção de se avaliar o efeito dos produtos liberados durante o pré-tratamento na hidrólise enzimática e o rendimento de açúcar obtido para cada um desses pré-tratamentos. Para tanto, foi realizado o pré-tratamento (como descrito no tópico 3.2) seguido pela hidrólise enzimática (como descrito no tópico 3.3).

Baseado no PExA, que obteve resultados não satisfatórios para a menor temperatura e variações pequenas de rendimento de celulose e remoção de hemicelulose com a variação do tempo de reação, as duas temperaturas superiores foram utilizadas, fixando-se o menor tempo de reação. Uma terceira temperatura foi adicionada, 180°C, para poder obter um fatorial completo de três níveis. A segunda variável escolhida foi a massa de entrada no reator, escolhendo também três níveis: 40g, 60g e 80g de BSG seco. A Tabela 3 apresenta os valores reais e codificados dos experimentos realizados no PExB. Para todos os ensaios realizados no PExB, foram utilizados 600 mL de água destilada.

Tabela 3: Fatores e níveis realizados no planejamento experimental B.

Experimento	Temperatura		Massa seca	
	Codificada	Real (°C)	Codificada	Real (g)
1B	-1	160	-1	40
2B	-1	160	+1	80
3B	-1	160	0	60
4B	+1	200	-1	40
5B	+1	200	+1	80
6B	+1	200	0	60
7B	0	180	-1	40
8B	0	180	+1	80
9B	0	180	0	60
10B	0	180	0	60
11B	0	180	0	60

3.4.3 CINÉTICA DE PRÉ-TRATAMENTO

A cinética de pré-tratamento (CP) foi realizada para avaliar a cinética das reações químicas que ocorrem durante o pré-tratamento hidrotérmico (realizado de acordo com o tópico 3.2). Duas condições do PExB foram escolhidas para serem estudadas (a melhor e a pior condição, respeitando a mesma massa de entrada no reator para possibilitar a comparação entre os dados finais), 160°C com 80 g de massa seca e 200°C com 80 g de massa seca, para todos 600 mL de água destilada. Para o levantamento dos dados experimentais da cinética do pré-tratamento, em cada condição estudada foi analisada amostras de licor nos tempos reacionais de 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos de acordo com o conteúdo de compostos orgânicos. Devido ao reator utilizado no pré-tratamento não ter condição para realizar amostragem, para cada tempo reacional foi realizado um experimento novo, dessa forma, 12 experimentos foram realizados no CP.

3.5 ANÁLISES

3.5.1 SÓLIDOS TOTAIS E CINZAS

A análise de sólidos totais foi realizada de acordo com o procedimento laboratorial NREL/TP-510-42621 do National Renewable Energy Laboratory

(SLUITER et al., 2008a). A quantificação de sólidos totais foi realizada na biomassa *in natura*, e após os pré-tratamentos. Essa análise foi feita com o auxílio de uma estufa a 105°C, onde as amostras de 0,5 g já pesadas em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados ficavam durante 6 horas ou *overnight*. Após retirados da estufa, eram colocados em dessecadores para o seu resfriamento até que atingissem a temperatura ambiente e em seguida pesados. A Equação 1 ilustra como foram realizados os cálculos de porcentagem de sólidos totais nas amostras analisadas.

$$\%ST = \frac{M_{total\ após\ estufa} - M_{cadin}}{M_{amostra}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A análise de cinzas foi realizada de acordo com o procedimento laboratorial NREL/TP-510-42622 do National Renewable Energy Laboratory (SLUITER et al., 2008b) nas amostras após a realização da massa seca. A amostra foi colocada em forno mufla a uma temperatura de 575°C durante 4 horas. Após, o forno resfriado até temperatura de 105°C e então as amostras eram retiradas e esfriadas até a temperatura ambiente em dessecadores. A porcentagem de cinzas é calculada de acordo com a Equação 2 a seguir.

$$\%Cinzas = \frac{M_{total\ após\ mufla} - M_{cadin}}{M_{total\ após\ estufa} - M_{cad}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.5.2 COMPOSTOS ORGÂNICOS E LIGNINA

As análises de compostos orgânicos e lignina foram realizadas com base no Procedimento de Análise Laboratorial do National Renewable Energy Laboratory (NREL/TP-510-42618) para a determinação de carboidratos estruturais e lignina em biomassas (SLUITER et al., 2012). Para isso foi realizada a hidrólise com ácido sulfúrico da biomassa para que açúcares complexos e lignina, ou seja, a estrutura lignocelular, fossem quebrados e permitisse a quantificação destes por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A coluna utilizada para as análises foi a Biorad Aminex HPX-87H, fase móvel de 5mM de ácido sulfúrico e tempo de corrida para cada uma das amostras de 60 minutos.

O procedimento laboratorial foi realizado em triplicatas, utilizando tubos de pressão (tubos de vidro que suportam pressões maiores que 1 atm) para realizar a hidrólise ácida. Nos tubos de pressão foram colocadas 0,3 g de biomassa com a porcentagem de sólidos totais maior que 90%. A análise de massa seca foi feita concomitante a essa análise para fim de resultados mais precisos sobre a composição da matéria. Após colocados nos tubos, foi adicionado 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m), e colocado em banho maria de 30°C durante uma hora. Para assegurar a

uniformidade do conteúdo do tubo, o volume foi agitado a cada 10 minutos com um bastão de vidro, sem tirar o tubo do banho. 84mL de água deionizada foi adicionada ao tubo, em seguida foi fechado e agitado para obter a homogeneização. Esse tubo seguia para autoclave, onde permanecia durante uma hora a 121°C. Após retiradas da autoclave e resfriadas, as amostras eram filtradas em cadinhos gooch (cadinhos de fundo poroso) previamente limpos, secos e pesados. Após filtrar todo o conteúdo, uma amostra de aproximadamente 50 mL do filtrado foi reservada para análises de lignina solúvel e compostos orgânicos. O retido no cadinho filtrante foi então lavado com no mínimo de 50 mL de água deionizada para evitar que o ácido ficasse retido junto da parte sólida e que o cadinho filtrante fosse danificado pelo ácido.

A amostra reservada do filtrado foi analisada em espectrofotômetro de UV visível com comprimento de onda de 240 nm, usando como branco uma solução de ácido sulfúrico 4% (m/m). A leitura ideal a ser obtida no espectrofotômetro (absorbância) foi entre 0,7 a 1,0. Para obter a leitura no range esperado, foram realizadas diluições com a mesma solução utilizada para a amostra em branco, fazendo a leitura a cada diluição até encontrar valor adequado de absorbância. A Equação 3 mostra o meio de calcular a quantidade de lignina solúvel presente na amostra (%LSA), em porcentagem:

$$\%LSA = \frac{UV_{abs} \times 86,73 \times Diluição}{\epsilon \times \%ST \times Massa\ amostra \times L} \times 100 \quad (Equação\ 3)$$

Sendo: UV_{abs} é a absorbância obtida nas leituras em espectrofotômetro, 86,73 o volume total filtrado em mL, $Diluição$ a diluição feita na amostra para alcançar a leitura ideal (volume da amostra diluída em relação ao volume inicial da amostra sem diluição), ϵ a absorvidade da biomassa (25 L/g cm) e L o lado interno da cubeta em cm. O valor de $Massa\ Seca$ utilizado nessa equação é em mg.

Para a quantificação de carboidratos, a amostra filtrada (sem nenhuma diluição) foi analisada em CLAE, onde quantificava concentrações de glicose, celobiose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Curvas elaboradas previamente com concentrações já conhecidas permitia que fossem quantificados esses compostos por meio do software LabSolutions. Essas quantidades eram utilizadas para o cálculo de concentração de celulose e hemicelulose. As Equações 4 e 5 a seguir são utilizadas para obter tais concentrações.

$$[Celulose] = (0,90 \times [Glicose]) + (0,95 \times [Celobiose]) + (1,2 \times [HMF]) \quad (Equação\ 4)$$

$$[Hemicelulose] = (0,88 \times [Xilose]) + (0,88 \times [Arabinose]) + (0,72 \times [Ácido\ Acético]) + (1,37 \times [Furfural]) \quad (Equação\ 5)$$

Onde, *[Carboidratos]* é a concentração de cada carboidrato em questão. Os fatores de conversão mostrados nas Equações são utilizados por Gouveia et al., 2009.

O cadinho junto à parte sólida foi então levado a estufa, onde ficava por 12 horas. Então resfriado em dessecadores, pesado e levado a mufla, onde permaneciam durante aproximadamente 10 horas em programação de rampa, até atingir a temperatura de 575°C e depois resfriado para 105°C até a sua retirada. Seguiu para o dessecador para esperar seu resfriamento e posteriormente foi pesado. Para o cálculo da lignina insolúvel em ácido (%LIA), a Equação 6 é utilizada:

$$\%LIA = \frac{(M_{\text{cadinho}+RI} - M_{\text{cadin}}) - (M_{\text{cadinho}+cin} - M_{\text{cadinho}})}{\%ST \times M_{\text{amostra}}} * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo, *M* a massa, em gramas e *RIA* o resíduo insolúvel em ácido. *M*_(cadinho+RIA) é a massa retida no cadinho gooch após seco em estufa.

3.5.3 PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de combustão em Analisador Elementar CHN Perkin Elmer 2400 Series ii. A técnica utilizada foi baseada no procedimento laboratorial NREL/TP-510-42625 de National Renewable Energy Laboratory (HAMES et al., 2008), que determina as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra. Seu funcionamento é baseado no método de Kjeldahl, em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica).

A quantificação é feita em amostra de 2 a 3 mg, pesadas em balança ultramicro, com a precisão de 0,001 mg. Para acomodar as amostras, cápsulas de estanho descartáveis são utilizadas para cada amostra individualmente. Como branco, foram utilizadas cápsulas vazias e padrão, amostras de acetanilida.

A leitura dada pelo equipamento, em porcentagem de nitrogênio, é multiplicada pelo fator de conversão 6,25 (fator de conversão usado tradicionalmente para alimentos e sementes segundo Angell et al., 2015) para assim obter o valor de porcentagem de proteína contida na amostra.

3.5.4 CÁLCULO DO FATOR DE SEVERIDADE

Com o objetivo de obter um fator que pudesse expressar as condições de pré-tratamento em um único valor, o cálculo de fator de severidade foi realizado. O fator

de severidade permite fazer uma generalização da reação, facilitando a previsão e entendimento do processo (RUIZ et al., 2017).

A equação desenvolvida por Overend e Chornet em 1987 para a solubilização da hemicelulose (principal reação do pré-tratamento hidrotérmico) em condições isotérmicas, chamada de Ordenação de Reação ou Fator de Severidade, $\log R_0$, onde R_0 pode ser calculado como mostrado na Equação 7:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) dt \quad (\text{Equação 7})$$

Onde, T é a temperatura em °C, t o tempo em min e 14,75 um valor empírico correlacionado com a energia de ativação. Considerando um aquecimento isotérmico, onde não há rampas de aquecimento e resfriamento, a Equação 8 pode ser simplificada para a Equação 9 (RUIZ, et al., 2013):

$$R_0 = \exp\left(\frac{T-100}{14,75}\right) * t \quad (\text{Equação 8})$$

Essas equações permitem que sejam comparados de forma mais simples a severidade entre os ensaios com a variação de temperatura em função do tempo.

3.5.5 CÁLCULO DO RENDIMENTO DE CELULOSE (RCEL)

O rendimento de celulose, ou Rcel, é calculado a partir das quantidades iniciais de celulose no sólido pré-tratado. Os fatores envolvidos no cálculo de Rcel são mostrados na Equação 9 a seguir.

$$R_{cel} = \frac{[Celulose]}{[máx Celulose]} * 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Onde, o $[máx Celulose]$ é a concentração máxima de celulose possível de ser encontrada em função da quantidade de BSG que entra no reator. A concentração máxima de celulose é calculada multiplicando a porcentagem de celulose no BSG *in natura* com a quantidade de matéria seca que se entra no reator.

3.5.6 CÁLCULO DA REMOÇÃO DE HEMICELULOSE

Baseado na concentração de hemicelulose no sólido pré-tratado, a remoção de hemicelulose é calculada de acordo com a Equação 10.

$$\text{Remoção de hemicelulose} = 100 - \frac{[Hemicelulose]}{[máx Hemicelulose]} * 100 \quad (\text{Equação 10})$$

Sendo, o $[máx Hemicelulose]$ a concentração máxima de hemicelulose possível de ser encontrada em função da quantidade de BSG que entra no reator. A concentração máxima de hemicelulose é calculada multiplicando a porcentagem de

hemicelulose presente no BSG *in natura* com a quantidade de matéria seca que entra no reator.

3.5.7 RENDIMENTO MÁSSICO

O rendimento mássico é a relação entre a quantidade de massa seca que entrou no reator e a massa seca que saiu do reator após o pré-tratamento. Para o cálculo da massa seca de saída do reator, foi necessário a separação de fases da mistura pré-tratada, feita pela filtração em cadinhos com filtro de papel com o auxílio de uma bomba a vácuo e um kitassato. O sólido foi então seco em vidros relógio a 40°C em estufa com o fluxo de ar forçado durante *overnight*. Esse produto seco foi pesado e feito a análise de sólidos totais. A Equação 11 ilustra como foram feitos os cálculos de rendimento mássico.

$$\text{Rendimento Mássico} = \frac{(\%ST \times M)_{final}}{(\%ST \times M)_{inicial}} \quad (\text{Equação 11})$$

Onde, o *Rendimento Mássico* é dado em g/100g; $(\%ST \times M)_{inicial}$ é equivalente a quantidade de massa seca que entra no reator e $(\%ST \times M)_{final}$ é a massa seca que sai do reator.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL DE ESTUDO

O BSG utilizado durante todas as análises e experimentos realizados neste trabalho foram executados com o produto de um mesmo lote, homogeneizado antes de qualquer análise ou experimento. As porcentagens de massa seca, devido à umidade do ar e a temperatura ambiente, tiveram flutuações durante o tempo, variando de 94 a 97%. Todos cálculos foram feitos em base de massa seca.

A quantificação de lignina e carboidratos, feita em triplicata, teve o resultado mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Composição da matéria sem processamento.

	Composição (g/100g de BSG)
Lignina Insolúvel em Ácido (LIA)	15,436 ± 0,303
Lignina Solúvel em Ácido (LSA)	4,896 ± 0,089
Celulose	25,100 ± 0,841
Hemicelulose	20,926 ± 0,936
Proteínas	27,975 ± 0,230
Cinzas	3,381 ± 0,142

Em análise feita em seis bagaços de cervejarias diferentes, feito por Bougrier et al., 2018, Klímek et al., 2017 e Qin et al., 2018 obtiveram os resultados mostrados na Tabela 1 exposta na introdução.

Os valores dos seis BSGs analisados com metodologias semelhantes a utilizada nesse estudo obtiveram resultados com coeficientes de variação para a lignina de 52,5%, para a celulose de 12,2%, hemicelulose de 18,65% e proteína de 9,6%. Essa variação é explicada pela origem do BSG, por ser um coproduto de um processo produtivo que varia a composição dos grãos de acordo com a qualidade de produto desejada, podendo conter outros grãos junto ao malte de cevada, como arroz e milho.

Os valores mostrados na Tabela 4 estão dentro da faixa de resultados obtidos por outros estudos, validando assim os resultados obtidos. Como os valores obtidos de celulose foram superiores a maioria dos resultados encontrados em literatura, o BSG trabalhado nesse estudo tem um potencial maior para a produção de glicose de segunda geração que outros bagaços analisados.

4.1.1 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO

A metodologia de caracterização utilizada (NREL/TP-510-42618) foi projetada para vários tipos de biomassas (SLUITER et al., 2012). Como o BSG é uma biomassa relativamente nova em campos de estudo, a metodologia utilizada, apesar de se apresentar como abrangente para todos os tipos de biomassas lignocelulósicas, não foi realmente testada sua acuracidade.

Para a confirmação da acuracidade da metodologia para amostras de BSG, foi realizada uma cinética de hidrólise ácida na biomassa *in natura*, onde três experimentos foram realizados com tempos de reação diferentes para assegurar que a quebra dos polissacarídeos estava ocorrendo completamente e que a lignina não estava sendo extensivamente degradada por esse processo. Os tempos foram alterados durante a hidrólise ácida com ácido sulfúrico 72%. O restante da metodologia foi executado da mesma maneira exposta no tópico 3.5.2 desse trabalho. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Composição da biomassa, em g/100g de BSG pré-tratado, obtida a partir da hidrólise ácida realizada em tempos diferentes.

t (min)	LSA	LIA	Lignina	Celulose	Hemicelulose
60	4,535±0,109	14,642±0,287	19,176±0,396	20,880±0,348	15,754±0,402
40	4,663±0,089	15,282±0,196	19,944±0,285	20,619±0,696	15,421±0,685
20	4,551±0,026	15,603±0,525	20,153±0,551	21,663±0,457	16,343±0,567

Após ser realizado o teste de Tukey nos dados obtidos, pode-se ter a conclusão de não houveram mudanças significativas na composição da biomassa com a variação do tempo de pré-tratamento, e por essa razão, foi compreendido que a metodologia foi adequada para a caracterização da biomassa em estudo. Os experimentos seguintes foram realizados seguindo a metodologia proposta inicialmente (com o tempo de hidrólise ácida de 60 minutos) para obter resultados comparáveis com a literatura.

4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL A

A realização do PExA, que teve como intuito compreender as transformações físicas e químicas sofridas pela biomassa em determinadas condições de pré-

tratamento, as respostas foram quantitativas e qualitativas. Quando feito o pré-tratamento a 200°C, o sólido resultante tinha um aspecto de carbonizado, sugerindo que as condições de pré-tratamento teriam degradado grande parte da matéria. O registro da apresentação visual do sólido pré-tratado é mostrado na Figura 9, em comparação com a biomassa sem pré-tratamento.



Figura 9: Bagaço de malte (a) sem pré-tratamento e (b) pré-tratado a 200°C durante 60 minutos.

Para evitar a degradação excessiva da biomassa durante o pré-tratamento, as reações realizadas se limitaram superiormente pela temperatura de 200°C. As temperaturas de 120°C e 160°C também foram investigadas. As fases líquida e sólida obtidas após o pré-tratamento foram separadas e caracterizadas.

4.2.1 FASE SÓLIDA

A caracterização da fase sólida do BSG pré-tratado segundo o PEXA determinou os teores de carboidratos, lignina e cinzas. O teor desses componentes em cada amostra foi calculado em relação à massa seca da amostra (g/100g de biomassa pré-tratada). Tais valores são mostrados na Tabela 6. A massa de cada amostra gerada após o pré-tratamento também foi mensurada para obter valores de rendimento mássico e esses dados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6: Composição do BSG pré-tratado em cada condição do PEXA, em g/100g de BSG pré-tratado.

Ensaio	Condição de pré-tratamento		LSA (%)	LIA (%)*	Celulose (%)	Hemicelulose (%)
	Temperatura (°C)	Tempo (min)				
1 ^a	120 (-1)	20 (-1)	3,871±0,292	18,038±0,476	19,443±1,270	13,371±0,910
2 ^a	120 (-1)	60 (+1)	3,362±0,180	15,408±0,162	15,783±0,241	13,632±0,082
3 ^a	160 (0)	20 (-1)	2,627±0,384	22,619±1,437	16,277±0,079	7,939±0,056
4 ^a	160 (0)	60 (+1)	2,006±0,041	28,403±1,189	15,359±0,682	6,552±0,191
5 ^a	200 (+1)	20 (-1)	2,368±0,154	35,332±0,718	6,367±0,128	1,798±0,143
6 ^a	200 (+1)	60 (+1)	2,464±0,179	34,034±0,696	5,369±0,057	1,884±0,154

* Valores considerados de lignina de insolúvel contendo proteínas

Tabela 7: Rendimento mássico, em g / 100 g de BSG pré-tratado, de cada ensaio realizado no PEXA19.

Ensaio	Condição		Rendimento Mássico
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
1A	120(-1)	20 (-1)	77,883
2A	120 (-1)	60 (+1)	71,210
3A	160 (0)	20 (-1)	56,423
4A	160 (0)	60 (+1)	51,525
5A	200 (+1)	20 (-1)	46,807
6A	200 (+1)	60 (+1)	45,430

Nota-se que em temperaturas muito brandas (120°C), independente do tempo, o BSG tende a manter sua composição similar à da Biomassa *in natura* (conforme mostrado na Tabela 4) . Por outro lado, em temperaturas muito elevadas (200°C) não há enriquecimento de celulose e lignina, como é esperado para processos de autohidrólise de biomassa lignocelulósica, havendo apenas um expressivo enriquecimento de lignina. Duas hipóteses podem ser criadas a partir desses dados, a primeira é de que na caracterização de BSG *in natura*, amido foi quantificado como celulose, superestimando o percentual desse componente. A segunda hipótese é a de que as alterações químicas nas estruturas de lignina e proteínas podem ter levado a uma complexação entre esses componentes fazendo com que essas moléculas fossem quantificadas como apenas uma (lignina) segundo a metodologia de caracterização utilizada nesse trabalho. Também é possível que as duas hipóteses ocorram simultaneamente, levando a valores superestimados de lignina.

As cinzas são o material inorgânico presente no BSG, e por tanto, variações significativas não são esperadas. Quando calculadas em base de 100 g de BSG processado, os valores obtidos são de aproximadamente 1,2 g, com um desvio da casa de 10^{-3} . Portanto, o pré-tratamento e a variação de severidade não afetaram a quantidade de material inorgânico presente na matéria.

Os percentuais da fração insolúvel obtida após o pré-tratamento, em diferentes condições, variaram de 45 a 78% (Tabela 7), aproximadamente. Houve, portanto, uma solubilização de mais de 50% da biomassa que entrou no reator, quando esta foi pré-tratada a 200°C por 60 minutos, sugerindo uma forte degradação de BSG. Wikberg et al., 2017, fizeram um estudo utilizando pré-tratamento hidrotérmico em reator de fluxo de leito fixo em meio básico com a temperatura de reação de 190°C durante 15 minutos e obtiveram uma recuperação de 34,5% da fração insolúvel de BSG. Portanto, em comparação com os dados encontrados na literatura, as condições de pré-tratamento hidrotérmico utilizadas neste trabalho obtiveram um rendimento mássico mais satisfatório para todos os tempos e temperaturas estudados (comparação feita com o ensaio 6A – 200°C, 60 minutos).

Para obter melhores comparações com estudos já existentes, o grau de severidade foi utilizado. Considerando que o comportamento da temperatura durante o pré-tratamento foi isotérmico, os valores de grau de severidade, calculados a partir da Equação 8 anterior, são mostrados na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8: Grau de severidade ($\log R_0$) para cada condição estudada no PExA.

Ensaio	Condição		$\log R_0$
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
1A	120 (-1)	20 (-1)	1,890
2A	120 (-1)	60 (+1)	2,367
3A	160 (0)	20 (-1)	3,068
4A	160 (0)	60 (+1)	3,545
5A	200 (+1)	20 (-1)	4,245
6A	200 (+1)	60 (+1)	4,723

O grau de severidade ($\log R_0$) foi utilizado para comparar o efeito da temperatura e do tempo de pré-tratamento simultaneamente. O gráfico representando o efeito do grau de severidade em relação aos valores de celulose e hemicelulose são apresentados na Figura 10.

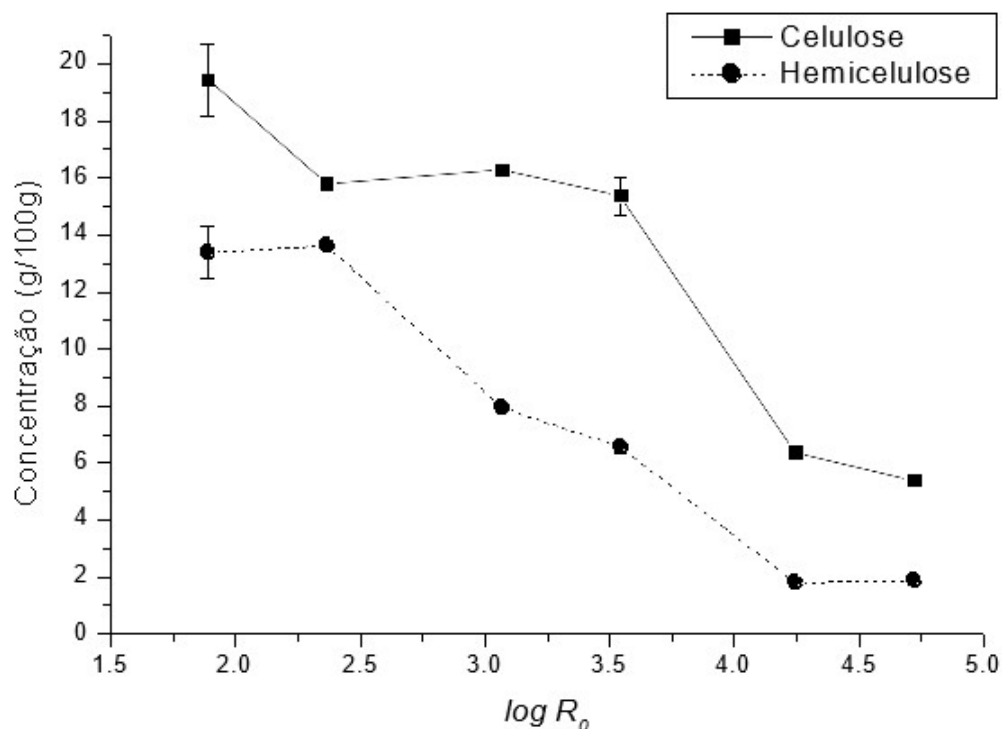


Figura 10: Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na composição da fração sólida recuperada em base de BSG processado.

O pré-tratamento hidrotérmico tem como principal impacto a degradação da hemicelulose e, portanto, a diminuição dessa em função do aumento da severidade do pré-tratamento, como observado pelo gráfico da Figura 9, implica na validação desse como um bom pré-tratamento em termos de remoção de hemicelulose.

Para etapas seguintes de hidrólise enzimática, fermentação ou qualquer outro processo que envolva a celulose ou seus produtos (como a glicose e a celobiose), o maior teor de celulose é outro parâmetro em potencial para avaliar a qualidade de um pré-tratamento. O maior teor de celulose foi obtido na condição de pré-tratamento do ensaio (1A), porém, no mesmo ensaio, o teor de hemicelulose também se apresenta alto. Os três pontos seguintes no gráfico de celulose na Figura 9, apresentaram um comportamento quase linear, mantendo o teor de celulose mesmo com a variação do grau de severidade. Já os dois últimos pontos (5A e 6A), cujo as amostras apresentam menor teor de celulose são considerados como os piores pré-tratamentos em função do aproveitamento da celulose.

Em algumas condições de pré-tratamento, a celulose e a hemicelulose apresentam comportamentos similares. Condições de pré-tratamento em que os teores de celulose e hemicelulose se mantêm elevados são indesejáveis pois isso significa que o pré-tratamento hidrotérmico não foi capaz de remover hemicelulose, o que dificulta a etapa posterior de hidrólise enzimática. Por outro lado, condições de pré-tratamento que geram amostras com baixos teores de hemicelulose e celulose também são indesejáveis por indicar que houve degradação de ambos polímeros, levando a um baixo aproveitamento da biomassa. Portanto, as condições de pré-tratamento com grau de severidade médio, onde o teor de celulose permanece alto enquanto o de hemicelulose é reduzido, são os mais desejados. Com esses critérios, o ponto 4A, onde a celulose tem um valor próximo dos dois pontos anteriores e a hemicelulose a menor entre os pontos 2A, 3A e 4A, será o considerado como o melhor pré-tratamento considerando a liberação da celulose e degradação da hemicelulose.

Outro fator importante para a avaliação de um bom pré-tratamento, considerando a etapa seguinte de hidrólise enzimática, é o teor de lignina. A lignina é um inibidor significativo durante a hidrólise enzimática por limitar a acessibilidade das celulasas e hemicelulasas a celulose e hemicelulose, respectivamente (JUNG, 2018). Por essa razão, a diminuição do teor de lignina é desejável, sendo considerado o terceiro parâmetro de avaliação do pré-tratamento. É apresentado na Figura 11 o gráfico da relação entre a severidade e o teor de lignina.

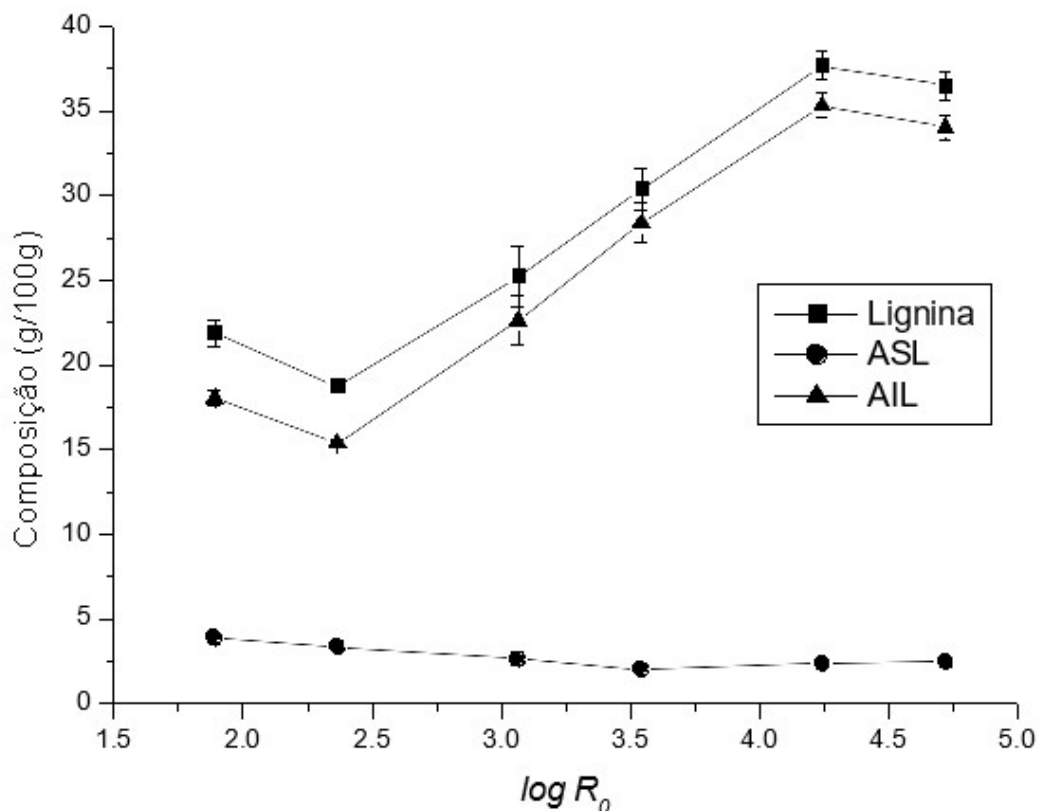


Figura 11: Efeito da severidade do pré-tratamento hidrotérmico na composição da lignina total, LIA e LSA.

O aumento do teor de lignina em função do aumento do grau de severidade de pré-tratamento está relacionado com a liquefação de xilanas, que causam um aumento no teor de todos os componentes que permanecem insolúveis. Porém, alguns valores de lignina extrapolam a quantidade absoluta existente na amostra de BSG *in natura*. Uma das hipóteses discutidas anteriormente para o valor superestimado de lignina é a interferência de proteínas. A biomassa *in natura* possui cerca de 28% de proteína, e desses 28 g/100g de BSG. Após o pré-tratamento na condição mais severa (200°C a 60 minutos), a fração insolúvel contém 12,7 g/100g de BSG de proteína. Portanto, grande parcela da proteína persiste após o pré-tratamento.

Além da interferência de proteínas na quantificação de lignina, com o aumento da severidade do pré-tratamento, reações de condensação com outros produtos de degradação da biomassa ocorrem, contribuindo mais ainda para o valor superestimado de lignina. Estudo feito por Ko et al., 2014 em madeira utilizando o pré-tratamento hidrotérmico também reportou aumentos de recuperação de lignina com o aumento da severidade do processo.

Os valores obtidos de recuperação de celulose e hemicelulose após o pré-tratamento podem ser comparados a outros estudos que utilizaram o pré-tratamento hidrotérmico utilizando os valores de grau de severidade, uma vez que as condições utilizadas muitas vezes não são as mesmas.

4.2.2 FASE LÍQUIDA

A fase líquida foi analisada diretamente, injetando amostras filtradas em CLAE. Os valores obtidos são mostrados na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9: Composição da fase líquida de pré-tratamento, em g/100g de BSG pré-tratado.

Ensaio	Condição		Celulose	Hemicelulose
	Temperatura (°C)	Tempo (min)		
1A	120 (-1)	20 (-1)	3,481±0,053	0,178±0,002
2A	120 (-1)	60 (+1)	3,373±0,007	0,251±0,003
3A	160 (0)	20 (-1)	3,739±0,015	1,630±0,007
4A	160 (0)	60 (+1)	4,619±0,018	3,805±0,041
5A	200 (+1)	20 (-1)	7,617±0,003	7,945±0,035
6A	200 (+1)	60 (+1)	2,397±0,083	2,974±0,002

O gráfico apresentado na Figura 12 apresenta os valores de concentração de celulose e hemicelulose em função do grau de severidade.

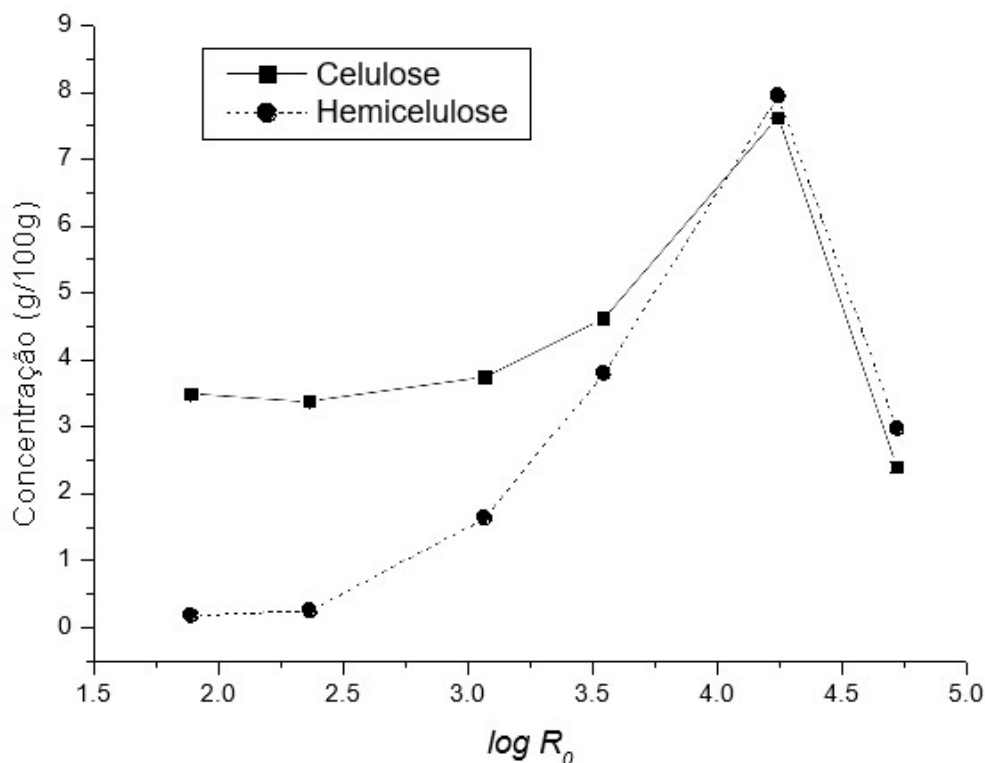


Figura 12: Efeito do grau de severidade do pré-tratamento hidrotérmico na concentração de celulose e hemicelulose na fase líquida.

A avaliação da concentração de celulose e hemicelulose é baseada no cálculo obtido a partir da concentração de seus carboidratos percussores e alguns de seus produtos de degradação: celobiose, glicose, ácido acético, xilose, arabinose, furfural e HMF. Quando há a degradação sequencial dessas moléculas, por exemplo de furfural e HMF em outras moléculas, a metodologia utilizada não os contabiliza. Na condição mais severa de pré-tratamento utilizada nesse estudo (200°C por 60 minutos) é possível que tenha havido a degradação excessiva dos monômeros e alguns derivados desses monômeros. Talvez, por essa razão, no ensaio 6A, os valores de celulose e hemicelulose no líquido tenham sido tão inferiores aos demais ensaios.

O último ponto da curva não segue a mesma tendência dos demais. Se excluído o ponto 6A e ajustando uma curva de segundo grau aos pontos de celulose e outra aos pontos de hemicelulose, obtêm-se de R^2 iguais ou superiores a 0,98 para ambas, o valor de celulose no último ponto (6A), seria de 10,122 g/100g; e o valor de hemicelulose 11,537 g/100g. Isso sugere que 7,725 g/100g de celulose e 8,563 g/100g

de hemicelulose se decomponem em produtos não contabilizados pela metodologia utilizada.

Estudo feito por Carvalheiro et al., 2009 que avaliou a produção de xilooligômeros pelo pré-tratamento hidrotérmico em quatro biomassas diferentes (lascas de eucalipto, espigas de milho, palha de trigo e o BSG). A liberação de xilooligômeros no grau de severidade de 3,53 encontrada por Carvalheiro et al., 2009 no BSG foi maior que a encontrada nesse estudo para o BSG 16,3 g/100g de BSG pré-tratado. Os dados apresentados na Tabela 10 apontam o ensaio 5A como o pré-tratamento que obteve a melhor recuperação de hemicelulose e, portanto, de xilooligômeros, uma vez que a hemicelulose é calculada a partir da concentração desses (arabinose e xilose). Portanto, a melhor recuperação de xilooligômeros foi encontrado com o grau de severidade de 4,2.

4.2.3 BALANÇO DE MASSA

O ensaio 4A obteve a melhor coeficiente entre o rendimento de celulose e a remoção de hemicelulose entre todos as condições estudadas no PExA. Um diagrama mostrando os valores de um balanço de massa simples (dado em gramas) do ensaio 4A é apresentado na Figura 13.

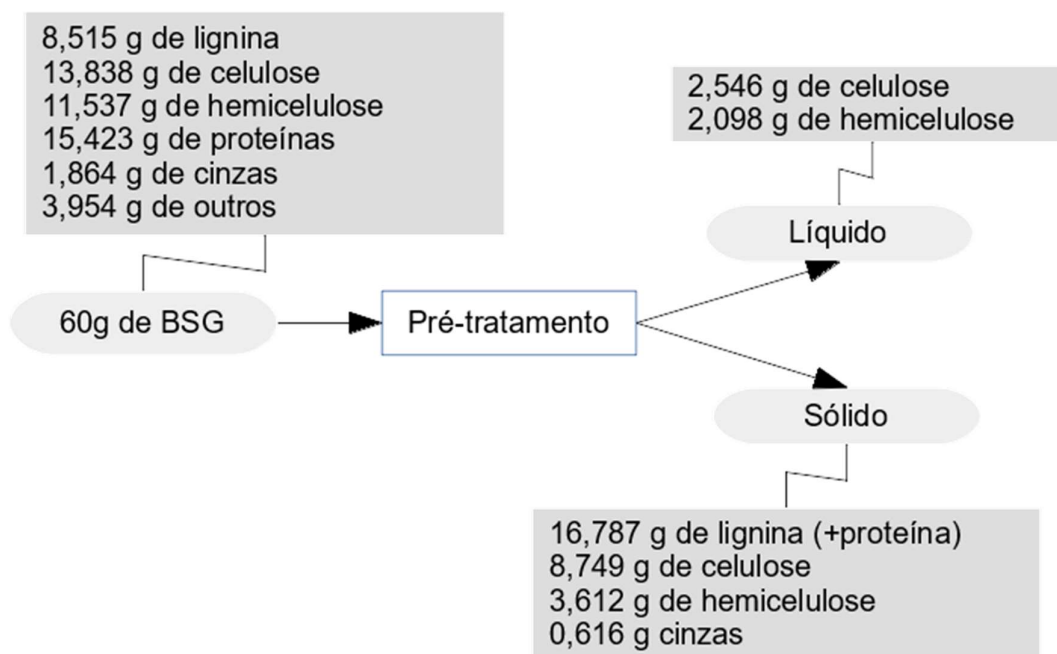


Figura 13: Diagrama simples do processo realizado no PExA.

Há uma recuperação total de 81,6% de celulose e 49,5% de hemicelulose. O percentual de celulose e hemicelulose que não foi recuperado após o pré-tratamento

está relacionado à formação de derivados desses polímeros que não são detectados pela metodologia utilizada, como por exemplo oligossacarídeos e derivados de HMF e furfural.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL B

O BSG pré-tratado pode ser utilizado para a produção de etanol, porém para que os polissacarídeos presentes na biomassa pré-tratada se tornem acessíveis e fermentáveis, é necessário que seja feita a hidrólise enzimática. Durante a hidrólise enzimática, a hemicelulose presente pode oferecer grande empecilho ao processo, uma vez que torna a celulose inacessível (QUING & WYNMAN, 2011).

A quantificação de carboidratos presentes na fase líquida após a hidrólise enzimática foi realizada, obtendo as concentrações de celobiose, glicose e xilose, o que permitiu os cálculos de concentração de celulose e hemicelulose. Os valores de porcentagem de glicose, celulose e hemicelulose são mostrados na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10: Concentrações de glicose, celulose e hemicelulose obtidas após hidrólise enzimática de BSG pré-tratado segundo as condições descritas em PExB, em g por 100 g de BSG pré-tratado.

Ensaio	Condição		Glicose	Celulose	Hemicelulose
	Temperatura (°C)	Massa de sólidos (g)			
1B	160 (-1)	40 (-1)	18,401	17,918	8,040
5B	160 (-1)	60 (0)	19,263	18,711	8,200
2B	160 (-1)	80 (+1)	18,514	19,918	8,416
7B	180 (0)	40 (-1)	20,678	21,128	8,403
9B	180 (0)	60 (0)	17,324	18,263	5,246
10B	180 (0)	60 (0)	17,596	19,119	5,432
11B	180 (0)	60 (0)	17,843	18,723	5,421
8B	180 (0)	80 (+1)	10,877	11,288	3,455
3B	200 (+1)	40 (-1)	8,273	9,908	3,652
6B	200 (+1)	60 (0)	7,728	8,586	3,294
4B	200 (+1)	80 (+1)	7,726	8,887	3,209

O grau de severidade, utilizado para comparar os resultados em diferentes condições de pré-tratamento, foi calculado para cada um dos ensaios apresentados no PExB a partir da integral dos valores obtidos por meio da medição de temperatura por segundo com ajuda do controlador do reator Parr e software Temperature Controller Communication Program. Os valores são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Graus de severidade ($\log R_0$) do PExB.

Ensaio	Condição		Log R_0
	Temperatura (°C)	Massa de sólidos (g)	
1B	160 (-1)	40 (-1)	5,073
2B	160 (-1)	80 (+1)	5,180
3B	200 (+1)	40 (-1)	6,346
4B	200 (+1)	80 (+1)	6,480
5B	160 (-1)	60 (0)	5,153
6B	200 (+1)	60 (0)	6,441
7B	180 (0)	40 (-1)	5,767
8B	180 (0)	80 (+1)	5,905
9B, 10B, 11B	180 (0)	60 (0)	5,876

A necessidade de se calcular o grau de severidade a partir de valores reais é devida equação do grau de severidade (Equações 8 e 9) não envolver em seu cálculo a carga do reator ou qualquer outra variável diretamente relacionada. Porém, com a variação da massa de sólidos que é colocado no reator, a distribuição da temperatura varia, e a medição da temperatura permite que o resultado da Equação 8 seja mais próximo do real.

O processo de obtenção de etanol por meio de fermentação consome açúcares simples e por essa razão, a liberação de glicose após a hidrólise enzimática, processo antecessor a fermentação, é desejada. Para poder ser analisado o efeito da severidade na liberação da glicose, assim como os efeitos dessa na celulose e hemicelulose, é mostrado o gráfico presente na Figura 14 a seguir.

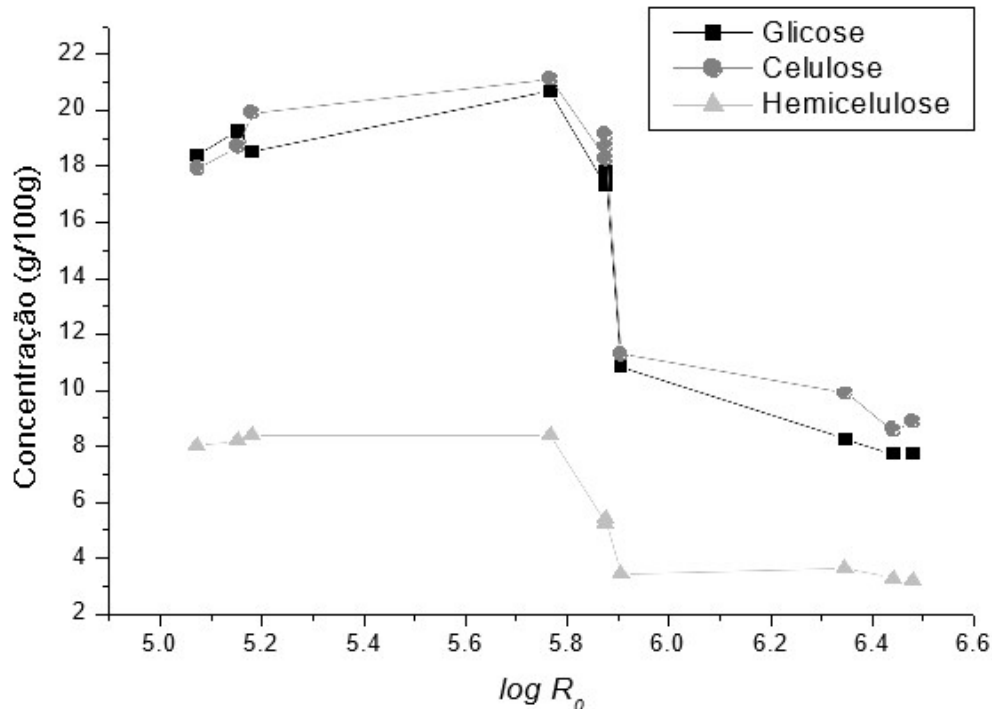


Figura 14: Concentrações de glicose, celulose e hemicelulose em função do grau de severidade ($\log R_0$)

O aumento da massa de sólidos no reator aumenta o grau de severidade para uma mesma temperatura. O gráfico da Figura 14 mostra que, para a temperatura mais branda, de 160°C, assim como a mais severa, 200°C, não houve grandes variações nas concentrações de celulose, hemicelulose e glicose. Na temperatura central por sua vez (180°C, graus de severidade 5,767, 5,905 e 5,876) foi a temperatura onde se apresentaram maiores variações de concentração de celulose, hemicelulose e glicose com o aumento da massa sólida de entrada do reator e conseqüentemente com o aumento do grau de severidade.

O aumento da severidade de um pré-tratamento gera um aumento no tempo de pré-tratamento e na quantidade de energia gasta para realizar tal. Sendo que a massa de sólidos processada no ensaio 2B (160°C e 80g, grau de severidade 5,180) é maior que em todas as condições de mesma temperatura, obteve a maior conversão em glicose e recuperação de celulose e obteve uma remoção de hemicelulose muito próxima as outras condições de 160°C.

As concentrações de celulose, hemicelulose e glicose na temperatura mais severa estudada no PExB (200°C) também resultou em valores próximos e foram as

condições com menor liberação de glicose: 8,273, 7,728 e 7,726 para as cargas (massa de sólidos processada) de 40, 60 e 80 g respectivamente.

A melhor condição, ou ponto mais alto mostrado no gráfico da Figura 13, foi a de 7B (180°C e 40 g, grau de severidade 5,767). As condições estudadas nessa mesma temperatura mostraram sofrer a maior influência com a variação do grau de severidade.

A maior concentração de glicose foi encontrada na condição 7B (180°C e 40 g, grau de severidade 5,767), que liberou mais de 20 g/100g de BSG processados. O BSG sem processamento tem em sua composição 25,1 g de celulose em 100 g de BSG. Se, a celulose tem um fator de conversão de 0,9, então o máximo de glicose que poderia ser liberado a cada 100 g de BSG processado seria de 27,9 g. Portanto, o rendimento que o ensaio 7B obteve foi de 71,7%. A Tabela 12 a seguir mostra os valores de rendimento de glicose para todos os ensaios realizados durante o PEXB.

Tabela 12: Rendimento mássico da glicose em função da máxima conversão de celulose em glicose.

Ensaio	Condição		Rcel
	Temperatura (°C)	Massa de sólidos (g)	
1B	160 (-1)	40 (-1)	65,980
5B	160 (-1)	60 (0)	69,071
2B	160 (-1)	80 (+1)	66,385
7B	180 (0)	40 (-1)	74,144
9B	180 (0)	60 (0)	62,118
10B	180 (0)	60 (0)	63,093
11B	180 (0)	60 (0)	63,979
8B	180 (0)	80 (+1)	39,001
3B	200 (+1)	40 (-1)	29,664
6B	200 (+1)	60 (0)	27,710
4B	200 (+1)	80 (+1)	27,703

Estudos realizados por Michelin & Teixeira, 2016 investigaram o efeito do pré-tratamento hidrotérmico em diferentes biomassas seguidos da hidrólise enzimática da fase sólida desses e obtiveram resultados positivos, onde foi atingido uma conversão de 76,08% de celulose em glicose para o BSG. O pré-tratamento foi realizado com um grau de severidade de 4,13 (calculado do grau de severidade realizado pelo autor

considerando o pré-tratamento sem as rampas de aquecimento e resfriamento – 190°C durante 30 minutos com uma fração de sólidos de 10% do volume total).

O ensaio realizado durante o PExB que utiliza a mesma de fração de sólidos é o 6B (200°C e 60g) do estudo do autor citado acima. Realizando o calculo do grau da severidade sem contabilizar as rampas de aquecimento e resfriamento, o resultado é de 4,25. Portanto, em comparação, o estudo feito por Michelin & Teixeira, 2016 obteve um maior sucesso (quase três vezes a conversão de celulose) para graus de severidade próximos, utilizando somente a fração sólida do pré-tratado.

Portanto, a utilização de todo o volume do pré-tratamento, para graus de severidade menores, geraram valores menores de rendimento que a utilização da fase sólida unicamente.

Os resultados do PExA sugerem que à temperatura muito alta e portanto, grau de severidade maior, há uma solubilização grande dos produtos de degradação da hemicelulose. Tais compostos agem como inibidores durante a hidrólise enzimática. A participação da fase líquida durante a hidrólise enzimática permitiu que não somente os polissacarídeos solubilizados participassem do processo, como também as xilanas, inibidoras da hidrólise enzimática (QUING & WYMAN, 2011).

4.4 CINÉTICA DE PRÉ-TRATAMENTO

A avaliação das cinéticas reacionais a partir das concentrações de compostos orgânicos em função do tempo foi realizada no CP. As condições estudadas foram escolhidas baseadas nos resultados obtidos no PExB. Considerando os ensaios em que foram utilizadas 80g de biomassa (em base seca), o ensaio 2B levou à maior quantidade (em g liberadas) glicose, enquanto o ensaio 4B, levou ao menor rendimento. As condições desses ensaios foram escolhidas para realizar a avaliação da cinética de reação de pré-tratamento. A escolha dessas condições foi baseada no fato de que quanto maior a quantidade de biomassa pré-tratada por reação, maior é o potencial de aplicação desse processo. Além de permitir a avaliação entre o maior e menor grau de severidade investigado.

Por limitações físicas, não foi possível fazer a amostragem durante o tempo de reação e, portanto, para cada tempo de reação a ser estudado, uma reação nova foi elaborada. Após o pré-tratamento, as fases líquidas da fase sólida foram separadas para obter a melhor caracterização do material. O CP obteve como principais resultados as concentrações dos carboidratos no líquido de pré-tratamento e no sólido

pré-tratado. Foi também analisada a quantidade de lignina presente na fase sólida. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Composição de lignina e carboidratos, em g/100g de BSG pré-tratado, obtida pela caracterização do sólido durante os ensaios a 160°C.

Ens. t (min)	Lignina Total	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Acético	HMF	Furfural
1C 0	33,676±0,518	0,848±0,026	17,290±0,112	8,504±0,018	2,296±0,002	1,245±0,012	0,424±0,000	0,680±0,013
2C 5	34,843±0,124	0,986±0,030	17,124±0,595	8,732±0,130	2,184±0,006	1,265±0,013	0,418±0,001	0,690±0,030
3C 10	36,485±0,132	1,165±0,020	18,168±0,244	8,995±0,083	2,079±0,024	1,362±0,023	0,454±0,001	0,730±0,020
4C 20	39,969±0,425	1,152±0,047	15,741±0,165	7,817±0,122	1,696±0,041	1,217±0,010	0,408±0,000	0,632±0,020
5C 40	46,036±1,031	0,800±0,018	15,706±0,027	6,506±0,054	1,136±0,053	1,112±0,030	0,406±0,010	0,649±0,010
6C 60	48,095±0,215	0,761±0,051	14,847±0,336	6,029±0,140	0,930±0,030	1,059±0,026	0,400±0,010	0,614±0,019

Tabela 14: Composição de lignina e carboidratos, em g/100g de BSG pré-tratado, obtida pela caracterização do sólido durante os ensaios a 200°C.

Ens. t(min)	Lignina Total	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
7C 0	73,432±0,701	0,786±0,142	1,339±0,039	1,792±0,039	34,931±1,795	10,378±0,115	10,167±0,556	1,273±0,044
8C 5	69,261±1,011	2,806±0,073	1,245±0,037	1,709±0,063	27,918±0,406	9,776±0,130	11,950±0,123	1,624±0,036
9C 10	69,372±0,142	2,511±0,070	1,145±0,035	1,587±0,125	27,411±1,556	6,136±0,252	7,903±0,524	0±0
10C 20	71,696±0,649	2,368±0,087	1,080±0,000	1,497±0,033	25,855±0,358	5,787±0,026	7,455±0,143	0±0
11C 40	72,317±0,379	2,853±0,194	1,049±0,000	1,638±0,115	26,527±0,102	5,979±0,188	7,838±0,049	0±0
12C 60	74,712±0,366	2,414±0,111	1,012±0,000	1,651±0,107	25,293±0,219	5,500±0,146	7,257±0,085	0±0

Os valores expostos na Tabela 13 foram utilizados para o cálculo de celulose e hemicelulose, e estes comparados em função do tempo para a melhor análise do seu comportamento. As curvas são expostas na Figura 15.

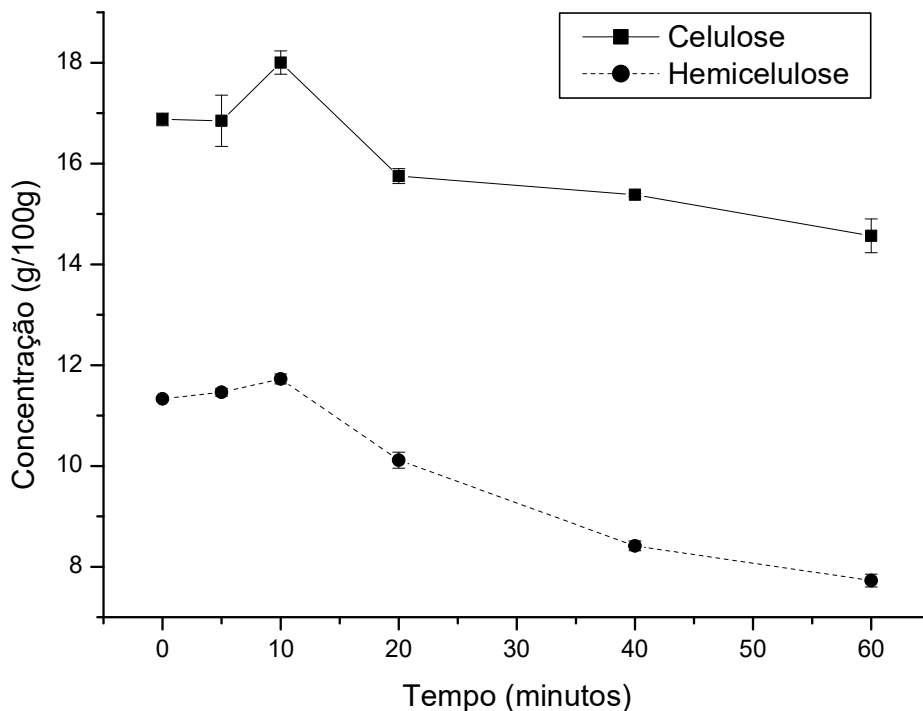


Figura 15: Composição do sólido pré-tratado em função do tempo de pré-tratamento a 160°C.

O tempo de pré-tratamento influencia negativamente nas concentrações de celulose e hemicelulose quando o tempo reacional é superior a 10 minutos. Anterior a esse tempo, há um aumento em ambas concentrações. Enquanto os maiores valores de celulose são desejados, valores de hemicelulose altos são indesejados, e como ambos apresentam mesma tendência, a indicação de melhor tempo de pré-tratamento dentro dessas mesmas condições se torna complexa.

A avaliação da concentração de celulose e hemicelulose no pré-tratamento a 200°C em função do tempo de pré-tratamento é exposta na Figura 16.

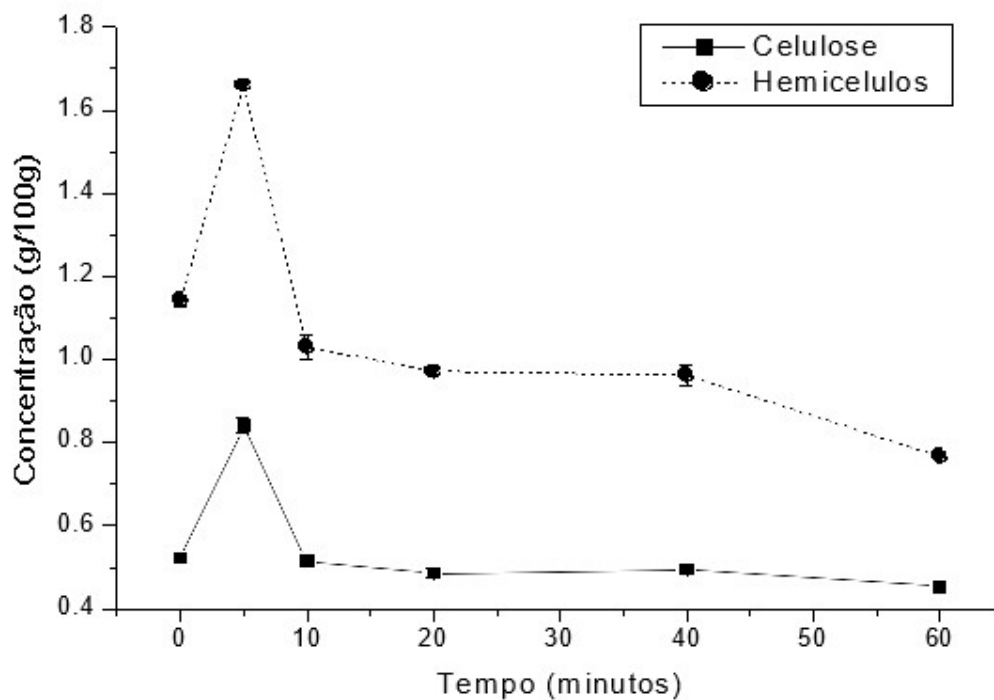


Figura 16: Concentrações de celulose e hemicelulose na fração sólida do pré-tratado em função do tempo de pré-tratamento a temperatura de 200°C.

Novamente, as duas curvas (de celulose e hemicelulose) apresentaram mesma tendência. Porém, aos 5 minutos de pré-tratamento que houve a maior concentração de celulose e hemicelulose. A curva de hemicelulose se sobrepõe a de celulose e, portanto, a celulose sofreu uma degradação muito maior que a hemicelulose, o que é altamente prejudicial ao processo, esperando uma liberação grande de celulose e degradação de hemicelulose.

O líquido foi analisado anteriormente e posteriormente a hidrólise ácida. Os valores obtidos são exibidos na Tabela 15, 16, 17 e 18.

Tabela 15: Concentrações de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido do pré-tratamento de 160°C

Ens.	t (min)	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
1C	0	3,816	1,523	1,504	2,743	0,519	0,200	0,179
2C	5	3,405	1,044	0,822	1,994	0,288	0,165	0,152
3C	10	3,294	1,035	0,751	1,873	0,311	0,054	0,071
4C	20	3,176	1,088	0,865	1,991	0,354	0,057	0,074
5C	40	2,078	1,079	1,124	1,250	0,433	0,142	0,102
6C	60	1,463	0,913	1,000	0,752	0,397	0,168	0,152

Tabela 16: Concentração de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido do pré-tratamento de 160°C após a hidrólise ácida.

Ens.	t(min)	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
1C	0	0,725±0,020	12,523±0,060	5,877±0,328	2,351±0,000	0,393±0,004	0,186±0,018	0,076±0,000
2C	5	0,796±0,019	13,634±0,259	6,293±0,367	2,546±0,035	0,376±0,029	0,031±0,003	0,013±0,001
3C	10	0,723±0,059	13,029±0,568	6,011±0,353	2,369±0,171	0,412±0,044	0,215±0,016	0,160±0,017
4C	20	0,765±0,081	14,125±0,593	6,994±0,357	2,505±0,232	0,455±0,030	0,040±0,004	0,016±0,001
5C	40	0,635±0,033	13,105±0,702	6,196±0,280	1,521±0,071	0,510±0,004	0,299±0,035	0,568±0,056
6C	60	0,557±0,044	13,025±0,514	5,812±0,205	1,145±0,040	0,579±0,014	0,334±0,034	0,638±0,017

Tabela 17: Concentrações de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido do pré-tratamento de 200°C.

Ens.	t (min)	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
1C	0	0,192	0,606	0,965	0,798	1,331	1,380	0,369
2C	5	0,196	0,589	0,487	0,151	0,506	0,409	0,091
3C	10	0,098	0,313	0,699	0,492	1,200	1,003	0,221
4C	20	0,058	0,000	0,574	0,366	0,922	0,611	0,109
5C	40	0,050	0,115	0,464	0,536	1,303	0,437	0,081
6C	60	0,031	0,051	0,184	0,190	0,613	0,049	0,025

Tabela 18: Concentração de carboidratos e produtos de degradação, em g/100g de BSG pré-tratado, no líquido de pré-tratamento de 200°C após a hidrólise ácida.

Ens.	t(min)	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético	HMF	Furfural
1C	0	0,016±0,001	1,026±0,102	0,902±0,007	0,542±0,015	1,253±0,009	0,476±0,006	0,410±0,052
2C	5	0,026±0,002	2,464±0,081	1,064±0,022	0,466±0,022	1,079±0,042	0,545±0,016	0,479±0,037
3C	10	0,011±0,000	0,460±0,028	0,573±0,007	0,409±0,003	0,967±0,004	0,267±0,027	0,259±0,031
4C	20	0,000±0,000	0,267±0,003	0,061±0,005	0,338±0,003	0,823±0,004	0,222±0,006	0,182±0,011
5C	40	0,000±0,000	0,000±0,000	0,385±0,040	0,329±0,025	0,763±0,073	0,075±0,010	0,058±0,005
6C	60	0,000±0,000	0,000±0,000	0,432±0,002	0,451±0,002	1,102±0,013	0,064±0,001	0,041±0,002

A concentração dos oligômeros foi calculada pela diferença encontrada entre a composição do líquido hidrolisado e o não hidrolisado. Os valores obtidos e comparados em função do tempo de pré-tratamento são mostrados nas Figuras 17 e 18.

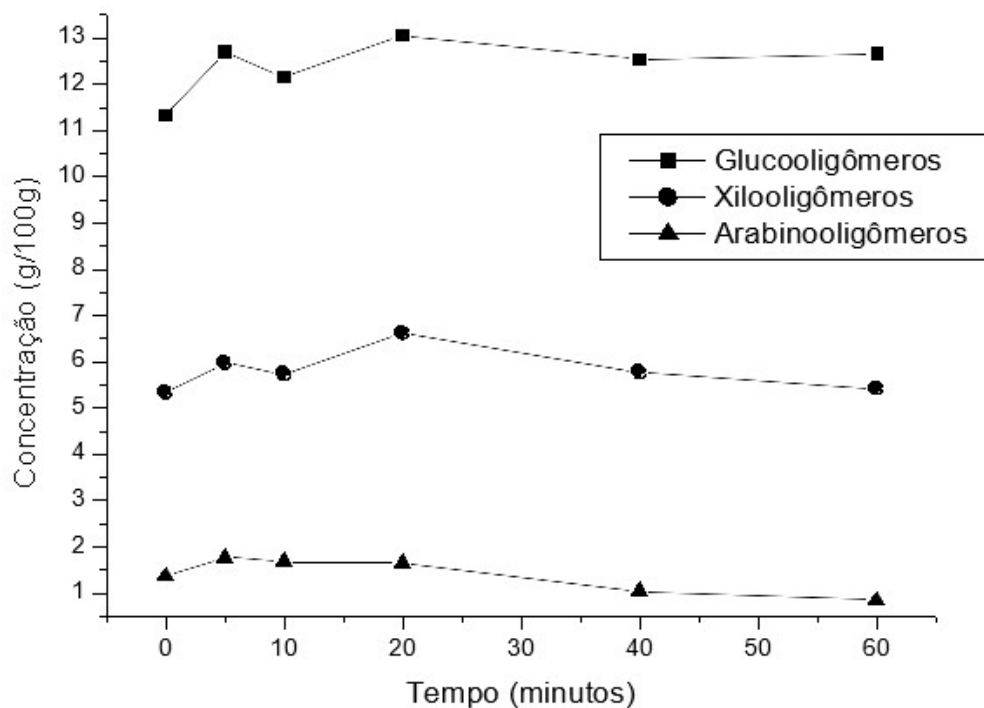


Figura 17: Concentrações de oligômeros em função do tempo de pré-tratamento, na condição de 160°C.

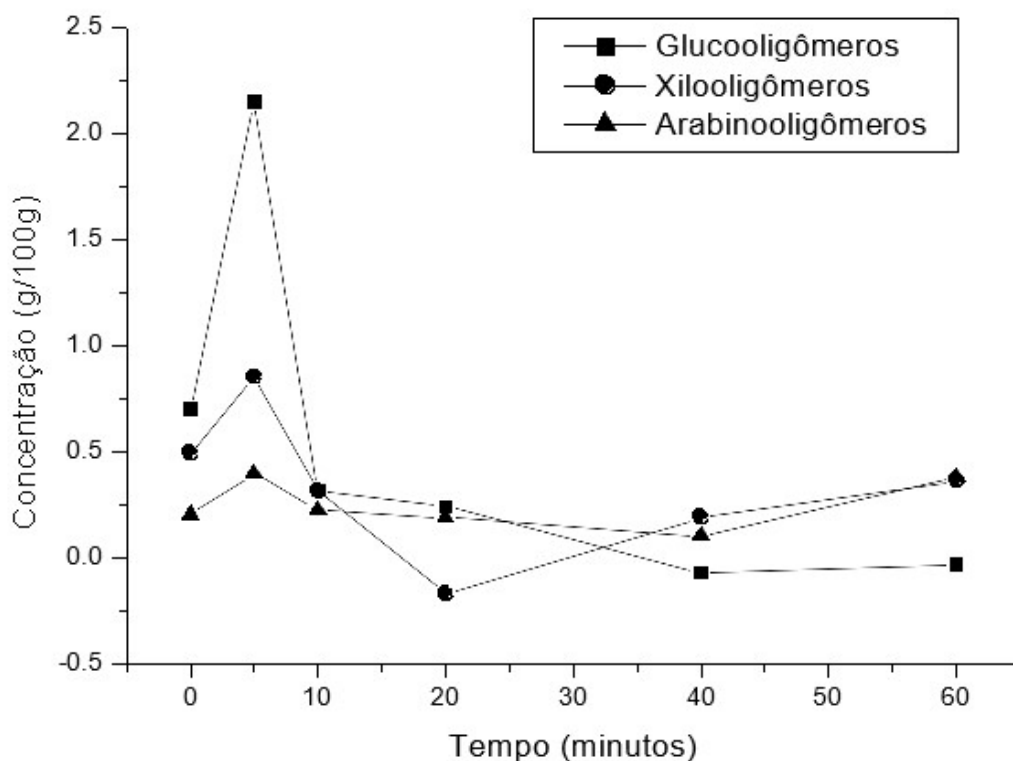


Figura 18: Concentrações de oligômeros em função do tempo de pré-tratamento, na condição de 200°C.

As concentrações dos oligômeros em reações a 160°C (Figura 16) não sofreram grandes influências do tempo de pré-tratamento nessa temperatura. Já a 200°C, há uma grande influência do tempo de pré-tratamento (Figura 17), principalmente entre os três primeiros tempos. Isso indica que as reações estão ocorrendo ao longo do tempo de reação e possivelmente na rampa de aquecimento.

A avaliação da concentração de oligômeros, carboidratos e produtos de degradação é estritamente relacionada com as reações propostas de degradação da hemicelulose e da celulose. Pronyk & Mazza (2010) propuseram duas reações de degradação da hemicelulose para o pré-tratamento hidrotérmico de palha de triticale (cereal híbrido entre o trigo e o centeio), que são mostradas na Figura 19.

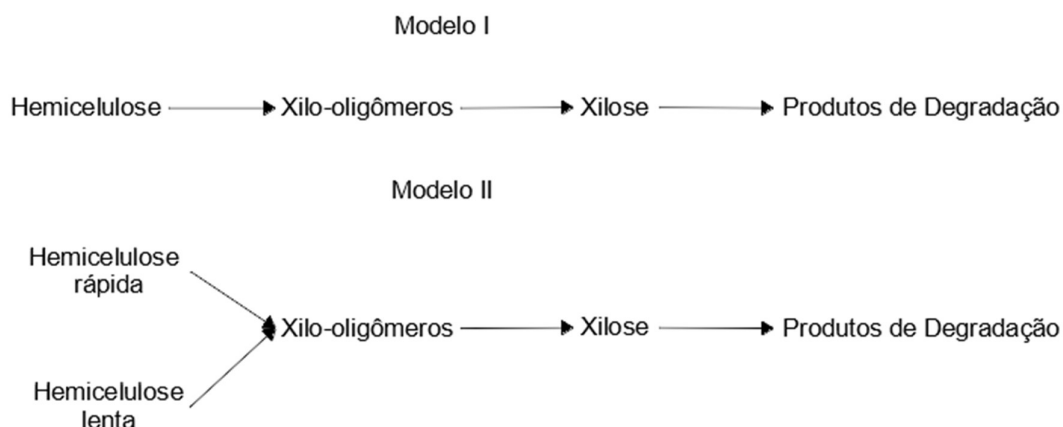


Figura 19: Caminhos de reação da hemicelulose durante a hidrólise. Modelo I: hidrólise monofásica da hemicelulose; Modelo II, hidrólise bifásica da hemicelulose (PRONYK & MAZZA, 2010).

Em ambos os modelos, há uma degradação da hemicelulose em xilose e em seguida em produtos de degradação (ácido acético e furfural). A arabinose por sua vez, produto da hidrólise da hemicelulose assim como a xilose, sofre uma degradação mais rápida em furfural (CARVALHEIRO et al., 2008). Essa degradação mais acelerada pode ser observada em ambas Figuras 16 e 17, com as concentrações de arabinooligômeros baixas quando comparadas com xilooligomeros.

A hidrólise da celulose por sua vez é analisada pelas composições de celobiose, glicose, glucooligômeros e HMF. Borrega et al., 2011, propôs a reação de hidrólise da celulose para a madeira de bétula, mostrada na Figura 20.

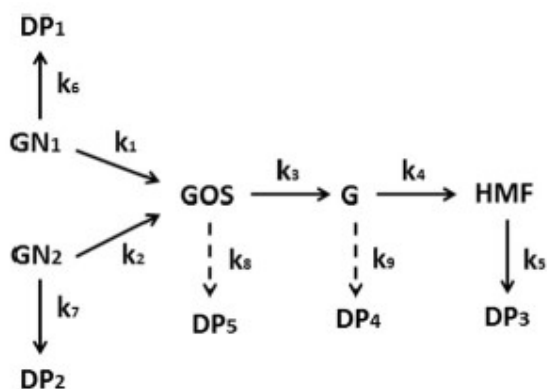


Figura 20: Vias de reação da hidrólise da celulose. GN são as frações de glucanas de rápida e lenta degradação, GOS os glucooligosacarídeos, G glicose e DP os produtos de degradação (BORREGA et al., 2011).

Os glucooligômeros têm a sua concentração relativamente constante em todos os tempos de pré-tratamento a 160°C (Figura 17), o que infere que a reação de degradação proposta não está sendo favorecida com o aumento do tempo de pré-

tratamento. Pela Tabela 15 é possível perceber que as concentrações de glicose e HMF também não sofrem alterações muito bruscas.

As reações que ocorrem a 200°C obtém um pico de liberação de oligômeros em 5 minutos de reação. Quando comparado com a Figura 16, que mostra os valores calculados de celulose e hemicelulose, ambos também obtiveram picos em 5 minutos. Isso sugere que há uma liberação grande de celulose para a fase líquida, aumentando assim as concentrações de glucooligômeros, e de hemicelulose, aumentando também as concentrações de xilooligômeros e arabinooligômeros, mas não da mesma proporção que o anterior.

O CP realizado à temperatura de 160°C obteve como melhor resultado o tempo de 10 minutos, onde foi liberada a maior quantidade de celulose na fração sólida e quantidades altas de glucooligômeros na fração líquida. Já o CP realizado à temperatura de 200°C obteve o maior rendimento de celulose em 5 minutos, porém com a concentração de hemicelulose maior que a concentração de celulose, descreditando como um todo a utilização da temperatura para realização do pré-tratamento hidrotérmico do BSG com o intuito de utilização da fração sólida para a produção de glicose. Na fração líquida, houve uma grande liberação de glucooligômeros em 5 minutos, porém, mesmo sendo a máxima liberação dentro dessa mesma temperatura (200°C), não obteve concentrações consideráveis para o aproveitamento de glicose.

5 CONCLUSÕES

Os estudos apresentados nesse trabalho obtiveram as seguintes conclusões:

- O bagaço de malte ou BSG foi caracterizado de forma eficaz pelo método NREL/TP-510-42623, obtendo valores com pequenos desvios quando variada o tempo utilizado na caracterização;
- A composição do bagaço de malte, 20,3% de lignina, 25,1% de celulose, 20,9% de hemicelulose, 28,0% de proteínas e 3,4% de cinzas são compatíveis com os dados de caracterização encontrados na literatura;
- Os resultados de rendimento de pré-tratamento do BSG apresentaram uma solubilização entre 32,2% e 54,6% da biomassa;
- Na fração sólida da biomassa pré-tratada, o melhor rendimento de celulose foi obtido para o grau de severidade de 1,8 (77,5%) porém com a menor remoção de hemicelulose (36,0%). A maior remoção de hemicelulose combinada com o maior rendimento de hemicelulose foram obtidos no grau de severidade de 3,6, com a remoção de 62,0% de hemicelulose e o rendimento de 61,5% de celulose;
- O balanço final de massa do ensaio de grau de severidade de 3,5 do PExA conseguiu ter uma recuperação total de 81,6% de celulose e uma degradação de 50,5% de hemicelulose;
- O PExB realizou os ensaios de hidrólise enzimática nos bagaços pré-tratados e obteve como maior rendimento de glicose 74,14% durante o ensaio com grau de severidade de 5,8;
- Os ensaios de hidrólise enzimática comparados a outros ensaios mostrados na literatura mostraram que a realização do procedimento envolvendo a fração líquida e sólida do pré-tratamento resultarão em maiores rendimentos finais que a utilização da fração líquida separada;
- A cinética de pré-tratamento hidrotérmico realizado a 160°C obteve o ponto máximo de liberação de celulose aos 10 minutos de reação e, quando realizado a 200°C, a máxima liberação de glicose é encontrada em 5 minutos;
- Durante a cinética foi possível perceber que a degradação da biomassa severa a 200°C, uma vez que mesmo com o tempo de reação zero havia uma degradação maior da celulose que da própria hemicelulose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second-generation bioethanol production: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631-653, 2016.

ADLER, E. Lignin chemistry – Past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, p. 169–218, 1977.

ANGELL, A. R.; MATA, L.; de Nys, R.; PAUL, N. A. The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 511–524, 2015.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BARTH-HASS GROUP. **Hops 2017/2018**. Disponível em: <<http://www.barthhaasgroup.com/images/mediacenter/downloads/pdfs/412/barthbericht20162017en.pdf>> Acesso em: 05/04/2018.

BHAUMIK, P.; DHEPE, P. L. **Chapter 1. Conversion of Biomass into Sugars**. Royal Society of Chemistry, p. 1–53, 2015.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v. 19, n. 5, p. 797–841, 1994.

BORREGA, M.; NIEMINEN, K.; SIXTA, H. Degradation kinetics of the main carbohydrates in birch wood during hot water extraction in a batch reactor at elevated temperatures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10724-10732, 2011.

BOUGRIER, C.; DOGNIN, D., LAROCHE, C.; CACHO RIVERO, J. A. Use of trace elements addition for anaerobic digestion of brewer's spent grains. **Journal of Environmental Management**, v. 223, p. 101–107, 2018.

BUDZIANOWSKI, W. M. High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 70, p. 793–804, 2016.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., SILVA-FERNANDES, T., LOPES, S., MOURA, P., PEREIRA, H., GÍRIO, F. M. **Hydrothermal processing of hardwoods and agro-industrial residues: evaluation of xylo-oligosaccharides production**. NWBC 2009, Helsinki, Finland, September 2-4.

CARVALHEIRO, F.; ESTEVES, M.P.; PARAJO, J.C.; PEREIRA, H.; GIRIO, F.M. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresour Technol** v. 91, p. 93–100, 2004.

CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; PARAJO, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F. M. Kinetic Modeling of Brewery's Spent Grain Autohydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 1, p. 233–243, 2008.

CHEN, H-G; ZHANG, Y.-H. P. New biorefineries and sustainable agriculture: Increase food, biofuels, and ecosystem security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 117-132, 2015.

CORDEIRO, L., G.; EL-AOUAR, A. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do Bagaço de Malte Oriundo de Cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.

EYLEY, S.; THIELEMANS, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. **Nanoscale**, v. 6, p. 7764-7779, 2014.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T. do, SOUTO-MAIOR, A. M. **Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar**. Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HAMES, B.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. Determination of Protein Content in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.

HASUNUMA, T.; YAMADA, R.; KONDO, A. Ethanol Production from Yeasts. In: BISARIA, V. S.; KONDO, A. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**. 1ª Ed. John Wiley & Sons, 2014. Cap. 8, p. 201-226

JUNG, S.; TRAJANO, H. L.; YOO, C. G.; FOSTON, M. B.; HU, F.; TOLBERT, A. K.; WYMAN, C. E.; RAGAUSKAS, A. J. Topochemical Understanding of Lignin Distribution During Hydrothermal Flowthrough Pretreatment. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 32, p. 9348–9352, 2018.

KAMIDE, Kenji. **Cellulose and Cellulose Derivatives: Molecular Characterization and its Applications**. 1ª Ed., Elsevier Science, 2005.

KLÍMEK, P.; WIMMER, R.; KUMAR MISHRA, P.; KÚDELA, J. Utilizing brewer's-spent-grain in wood-based particleboard manufacturing. **Journal of Cleaner Production**, v. 141, p. 812–817, 2017.

KO, J. K.; KIM, Y.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 252–262, 2014.

KOKOSSIS, A. C.; TSAKALOVA, M.; PYRGAKIS, K. Design of integrated biorefineries. **Computers and Chemical Engineering**, v. 81, p. 40-56, 2015.

KUDAKASSERIL KURIAN, J.; RAVEENDRAN NAIR, G.; HUSSAIN, A.; VIJAYA RAGHAVAN, G. S. Feedstocks, logistics and pre-treatment processes for sustainable lignocellulosic biorefineries: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 205–219, 2013.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 475, p. 64-76, 2016.

LU, H.; LV, C.; ZHANG, M.; LIU, S.; LIU, J.; LIAN, F. Optimization of hydrothermal pretreatment for co-utilization C-5 and C-6 sugars of cassava alcohol residue. **Energy Conversion and Management**, v. 132, p. 251–260, 2017.

LYND, L. R. Bioenergy: in search of clarity. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 9, p. 1150-1152, 2010.

MENESES, N. G. T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separ Purif Technol**, v. 108, p. 152–158, 2013.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MICHELIN, M.; TEIXEIRA, J. A. Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 862–869, 2016. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.018

MUSSATTO, S. I. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 7, p. 1264–1275, 2014. doi:10.1002/jsfa.6486

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 124-129, 2008.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 81, p. 268–274, 2006.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose** 4(3), p.173–207, 1997. doi:10.1023/a:1018431705579

ODIAN, George. **Principals of Polymerization**. 4^a Ed., Wiley Interscience, 2004, p.32.

OHRA-AHO, T.; NIEMI, P., AURA, A.-M.; ORLANDI, M.; POUTANEN, K.; BUCHERT, J.; TAMMINEN, T. Structure of Brewer's Spent Grain Lignin and Its Interactions with Gut Microbiota in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 812–820, 2016. doi:10.1021/acs.jafc.5b05535

PIERRE, G., et al. Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from Brewers' spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 54, p. 305-310, 2011.

PRONYK, C., & MAZZA, G. Kinetic Modeling of Hemicellulose Hydrolysis from Triticale Straw in a Pressurized Low Polarity Water Flow-Through Reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 14, p. 6367–6375, 2010. doi:10.1021/ie1003625

QIN, F.; JOHANSEN, A. Z.; MUSSATTO, S. I. Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 443–453, 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2018.09.017

QING, Q., & WYMAN, C. E. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1 p. 1-18, 2011. doi:10.1186/1754-6834-4-18

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 89-91, 2016.

ROCHA, M. S. R. S. et al. A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 176-185, 2017.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35–51, 2013.

RUIZ, Héctor A.; THOMSEN, Mette Hedegaard; TRAJANO, Heather L. **Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of Bioethanol and High Value Compounds of Second and Third Generation Biomass**. 1. ed. [S.l.]: Springer International Publishing, 2017. 511 p.

SANTOS, F. A., et al. Potencial Da Palha De Cana-De-Açúcar Para Produção De Etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SLUITER, A. et al. Determination of Ash in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory**, 2012.

SLUITER, A. et al. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.

SUHAS; GUPTA, V. K.; CARROTT, P. J. M.; SINGH, R.; CHAUDHARY, M.; KUSHWAHA, S. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1066-1076, 2016.

SUN, S., SUN, S., CAO, X., & SUN, R. (2016). **The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials**. *Bioresource Technology*, 199, 49–58. doi:10.1016/j.biortech.2015.08.061

WIKBERG, H., GRÖNQVIST, S., NIEMI, P., MIKKELSON, A., SIIKA-AHO, M., KANERVA, H., ... TAMMINEN, T. (2017). **Hydrothermal treatment followed by enzymatic hydrolysis and hydrothermal carbonization as means to valorize agro- and forest-based biomass residues**. *Bioresource Technology*, 235, 70–78. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.095

YANG, Shang-Tian et al. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. 1^a Ed., Elsevier Science, 2006.

YAO, S. et al. Extraction of hemicellulose by hot water to reduce absorbable organic halogen formation in chlorine dioxide bleaching of bagasse pulp. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 178-185, 2017.

ZENG, Y.; ZHAO, S.; YANG, S.; DING, S. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 38-45, 2014.