



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal de Ouro Preto

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PROAMB



Adonai Bruneli de Camargos

**VALORIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE ATRAVÉS DO
PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO EM UMA OU DUAS ETAPAS:
perspectivas para a obtenção de biometano e açúcares fermentescíveis**

Ouro Preto, MG

2019



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto



Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - PROAMB

ADONAI BRUNELI DE CAMARGOS

**VALORIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE ATRAVÉS DO
PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO EM UMA OU DUAS ETAPAS:
perspectivas para a obtenção de biometano e açúcares fermentescíveis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel

Ouro Preto, MG

2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C172v Camargos, Adonai Bruneli de .
Valorização do bagaço de malte através do pré-tratamento hidrotérmico em uma ou duas etapas [manuscrito]: perspectivas para a obtenção de biometano e açúcares fermentescíveis. / Adonai Bruneli de Camargos. - 2019.
173 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta.
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Vinícius Alves Gurgel.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Programa de Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Bactérias anaeróbicas. 2. Biocombustíveis - Etanol celulósico. 3. Biomassa - Lignocelulósica. 4. Engenharia ambiental. 5. Engenharia sustentável. I. Baêta, Bruno Eduardo Lobo. II. Gurgel, Leandro Vinícius Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 502:004

Bibliotecário(a) Responsável: Maristela Sanches Lima Mesquita - CRB:1716



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



VALORIZAÇÃO DO BAGAÇO DE MALTE ATRAVÉS DO
PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO EM UMA OU DUAS ETAPAS: perspectivas para a
obtenção de biometano e açúcares fermentescíveis

Autor: Adonai Bruneli de Camargos

Dissertação defendida e aprovada, em 20 de dezembro de 2019, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo Baêta - Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leandro Vinicius Alves Gurgel - Coorientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. Fabiana Lopes Del Rei Passos
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão
Universidade Federal de Ouro Preto

Agradecimentos

Eu devo toda a minha gratidão ao meu orientador Bruno Baêta, por ter me conduzido pelos caminhos da ciência com muita sabedoria.

Sou imensamente grato às minhas irmãzinhas Nayara e Yasmim, por estarem sempre dispostas a ajudar nos experimentos.

Muito mais que gratidão eu tenho por Alinêra, pelo seu espírito maternal sempre conduzindo as coisas em boa ordem.

Agradeço profundamente à Elisa, por sua luz guiando-me na escuridão.

Ao meu amigo e irmão Oscar, eu trago comigo o espelho da vida.

Ao meu Coorientador Leandro, pela paz de espírito e pela sobriedade.

À minha amada Tigrinha, pelo seu carinho e alento sempre ao meu lado.

Aos amigos das República Gaiola de Ouro, Tabu e Alcatéia, por terem me inserido no seio da comunidade ouropretana.

À minha querida mãezinha, por sua dedicação e consolo.

Ao meu querido pai, pelas idas e vindas de meu destino.

Ao meu amigo Toninho, pelas conversas descontraídas.

À minha avó, pela seu carinho incondicional.

À todos do LQTA, pela amizade e companheirismo.

À Cervejaria Acadêmica, por ter cedido o bagaço de malte para essa pesquisa.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro necessário à realização desta pesquisa.

À todos que de uma forma ou outra puderam contribuir com meu crescimento, eu deixo nesse pedacinho de papel a minha imensa gratidão, que sejam eternizadas todas as coisas que caminham para o bem, mesmo quando pareciam ser o contrário.

Lista de abreviaturas

[] – concentração, relacionada ao componente entre colchetes

A.A. – ácido acético

A.B. – ácido butírico

A.F. – ácido fórmico

AH – auto-hidrólise

A.I.B. – ácido isobutírico

A.I.V. – ácido isovalérico

A.P. – ácido propiônico

A.V. – ácido valérico

A/G – relação entre as concentrações de arabinoxilanas e glicanas no hidrolisado.

ΔE – saldo de energia térmica recuperada

Ac – teor de grupos acetil na fração sólida

Abs – absorvância do espectro eletromagnético, relacionado ao comprimento de onda (215 ou 280 nm)

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

AGV – ácidos graxos voláteis (ou ácidos orgânicos)

AIC – Critério de informação de Akaike

ara. – arabinose

ARX – teor de arabinoxilanas na fração sólida ou concentração de arabinoxilanas no hidrolisado

BB – bagaço de malte bruto (sem tratamento)

Biom – biomassa

BL – bagaço lavado (tratado em baixa severidade)

BMP – teste realizado para avaliar o potencial metanogênico da biomassa (do inglês *biochemical methane potential*)

bs – base seca (massa)

BS – palha de cevada (do inglês *barley straw*)

BSG – bagaço de malte (do inglês *barley spent grains*)

bu – base úmida (massa)

C – concentração

C.A. – carvão ativado em pó

C/N – relação entre carbono e nitrogênio

CAH – concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (celobiose, glicose, xilose, arabinose)

CC – “sabugos” de milho (do inglês *corn cob*)

cel. – celobiose

CG – cromatógrafo gasoso

CH₄ – gás metano

CHP – sistema de co-geração de energias térmica e elétrica (do inglês *combined heat and power*)

DA – digestão anaeróbia

db – dry base (do inglês *dry base*)

DB1 – auto-hidrólise do bagaço de malte a 180°C, 31 min e 5 mL.g⁻¹

DB1L - auto-hidrólise a 180°C, 31 min e 5 mL.g⁻¹, dos sólidos pré-tratados previamente a 80°C, 30 minutos, 10 mL.g⁻¹

DB2 – auto-hidrólise do bagaço de malte a 180°C, 60 min e 5,5 mL.g⁻¹

DB1L - auto-hidrólise a 180°C, 60 min e 5,5 mL.g⁻¹, dos sólidos pré-tratados previamente a 80°C, 30 minutos, 10 mL.g⁻¹

DE – auto-hidrólise do bagaço de malte a 150°C, 60 min e 4 mL.g⁻¹

DEL - auto-hidrólise a 150°C, 60 min e 4 mL.g⁻¹, dos sólidos pré-tratados previamente a 80°C, 30 minutos, 10 mL.g⁻¹

desej – desejabilidade

COD – demanda química de oxigênio (do inglês, *chemical oxygen demand*)

CODadd – demanda química de oxigênio adicionada ao teste de BMP na forma de substrato (do inglês, *added chemical oxygen demand*)

CODrem - demanda química de oxigênio adicionada ao teste de BMP na forma de substrato (do inglês, *removed chemical oxygen demand*)

E – teor de extrativos orgânicos

E_{biogás} – energia térmica recuperada pela queima do biogás em um sistema de CHP

E_{elétrica} – energia elétrica recuperada pela queima do biogás em um sistema de CHP

E_{PT} – energia térmica necessária para promover o pré-tratamento da biomassa

FAS – sulfato ferroso amoniacal (do inglês *ferrous ammonium sulfate*)

fd – fator de diluição, relacionado à razão entre o volume da amostra e o volume total da diluição

FF – 2-furfuraldeído

FL – fração líquida resultante do tratamento hidrotérmico

FL-DB1 – fração líquida resultante da condição DB1

FL-DB1L – fração líquida resultante da condição DB1L

FL-DB2 – fração líquida resultante da condição DB2

FL-DB2L – fração líquida resultante da condição DB2L

FL-DE – fração líquida resultante da condição DE

FL-DEL – fração líquida resultante da condição DEL

FL-TBS1 – hidrolisado resultante do tratamento de baixa severidade utilizada no primeiro teste de BMP com essa fração

FL-TBS2 – hidrolisado resultante do tratamento de baixa severidade utilizada no segundo teste de BMP com essa fração

FS – fração sólida resultante do tratamento hidrotérmico

FS-DB1 – fração sólida resultante da condição DB1

FS-DB1L – fração sólida resultante da condição DB1L

FS-DB2 – fração sólida resultante da condição DB2

FS-DB2L – fração sólida resultante da condição DB2L

FS-DE – fração sólida resultante da condição DE

FS-DEL – fração sólida resultante da condição DEL

gli. - glicose

GLU – teor de glicanas na fração sólida ou concentração de glicanas no hidrolisado

H⁺ - íon hidrônio

H₂ – gás hidrogênio

HE – hidrólise enzimática

HMF – 5-hidroximetil-2-furfuraldeído

HMF/FF – relação entre as concentrações de HMF e FF no hidrolisado.

HPLC – cromatógrafo líquido de alta precisão (do inglês *high performance liquid chromatography*)

inóc – inóculo

kWh – quilowatt-hora

LI – teor de lignina insolúvel

LS – teor de lignina solúvel

m – massa

MWh – megawatt-hora

NRMSE - erro quadrático médio normalizado (do inglês, *normalized mean square error*)

P_i – fósforo inorgânico

pH – potencial hidrogeniônico

PM – perda de massa

PBM – potencial bioquímico de produção de metano das frações líquidas do tratamento do bagaço de malte

Prot – teor de proteínas

PT - pré-tratamento

REC – recuperado (relacionado ao volume recuperado de hidrolisado, no caso denotado como V_{REC})

RG – remoção de glicanas da biomassa

RHE – rendimento da hidrólise enzimática em termos de glicose recuperada

RSIA – remoção de sólidos insolúveis em ácido da biomassa

RLS – razão líquido-sólido

RMSE - erro quadrático médio (do inglês, *mean square error*)

rpm – rotações por minuto

RX – remoção de arabinoxilanas da biomassa

SI – teor de sólidos inorgânicos (cinzas)

SIA – teor de sólidos insolúveis em ácido

SPT – sólidos pré-tratados

ST – teor de sólidos totais

SV – teor de sólidos voláteis

SV_{adic.} – sólidos voláteis adicionado ao teste de BMP como substrato

t - tempo

T - temperatura

TBS – tratamento hidrotérmico preliminar de baixa severidade (80°C, 30 minutos, 10 mL.g⁻¹)

U – teor de umidade

UASB – reator anaeróbio de fluxo ascendente (do inglês *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

V – volume

W - watt

xil. – xilose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um grão de cevada (LYNCH et al., 2016).....	7
Figura 2 - Esquema representativo da biomassa lignocelulósica (HEINZE, 2016).....	15
Figura 3 - Representação esquemática de um dímero de celobiose (HEINZE, 2016).....	16
Figura 4 - Representação esquemática das ligações de hidrogênio na molécula de celulose (HEINZE, 2016) (adaptado).....	17
Figura 5 - Representação esquemática de uma molécula de arabinoxilana (RUIZ, 2017) (adaptado).....	18
Figura 6 - Álcoois precursores da lignina e seus respectivos monolignóis resultantes (RUIZ et al., 2017) (adaptado).....	19
Figura 7 - Esquema representativo para a obtenção de produtos de valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica (WANG e YIN, 2017).....	23
Figura 8 - Esquema representativo do pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica (RUIZ et al., 2017).....	39
Figura 9 - Etapas envolvidas na digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos pré-tratados (BAËTA, 2016) (adaptado).....	46
Figura 10 - Rotas biotecnológicas utilizadas neste estudo para o tratamento hidrotérmico em uma etapa (a); e em duas etapas (b).....	78
Figura 11 - Teores dos componentes das biomassas bruta e lavada.....	80
Figura 12 - Concentrações de glicanas (a) e arabinoxilanas (b) obtidas com a hidrólise ácida da fração líquida do tratamento de baixa severidade (FL-TBS).....	81
Figura 13 - Diagramas de Pareto dos efeitos estimados padronizados das variáveis independentes sobre as variáveis PM (a), RG (b), RX (c), RSIA (d), RHE (e) e CAH (f).....	88
Figura 14 - Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável perda de massa (PM).....	90
Figura 15 - Superfícies de resposta geradas pela modelagem computacional da variável remoção de glicanas (RG).....	92
Figura 16 - Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável remoção de arabinoxilanas (RX).....	94
Figura 17 - Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável remoção de sólidos insolúveis em ácido (RSIA).....	96
Figura 18 - Superfícies de resposta geradas pela modelagem computacional da variável rendimento da hidrólise enzimática (RHE).....	99
Figura 19 - Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (CAH).....	102
Figura 20 - Comparação entre os valores observados durante a auto-hidrólise do bagaço de malte e os valores previstos pela modelagem computacional das variáveis PM (a), RG (b), RX (c), RSIA (d), RHE (e) e CAH (f).....	103
Figura 21 - Gráfico de desejabilidade para o cenário DB1.....	104
Figura 22 - Superfícies de resposta obtidas para o cenário DB1.....	105
Figura 23 - Gráfico de desejabilidade para o cenário DB2.....	106
Figura 24 - Superfícies de resposta obtidas para o cenário DB2.....	107
Figura 25 - Gráfico de desejabilidade para o cenário DE.....	108

Figura 26 – Superfícies de resposta obtidas para o cenário DE.....	109
Figura 27 – Concentrações de glicanas (GLU) e arabinoxilanas (ARX) nos hidrolisados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de deseabilidade, identificados antes (0 min) e após hidrólise ácida (15 min).....	112
Figura 28 – Rendimentos da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados nas condições de deseabilidade para a produção de etanol (a) e biogás (b).....	116
Figura 29 – Concentrações de AGV's ao final dos testes de BMP com as frações líquidas resultantes do pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de deseabilidade.....	123
Figura 30 – Produções específicas de CH ₄ observadas nos testes de BMP e previstas pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-TBS1 (a) e a FL-TBS2 (b).....	124
Figura 31 – Produção específica de CH ₄ observada nos testes de BMP e prevista pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-DEL.....	128
Figura 32 – Produção específica de CH ₄ observada nos testes de BMP e prevista pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-DB1 (a) e FL-DB1L (b).....	131
Figura 33 – Produção específica de CH ₄ observada nos testes de BMP e prevista pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-DB2 (a) e FL-DB2L (b).....	135
Figura 34 – Balanços de massa e energia para o cenário DB1.....	145
Figura 35 – Balanços de massa e energia para o cenário DB1L.....	146
Figura 36 – Balanços de massa e energia para o cenário DB2.....	147
Figura 37 – Balanços de massa e energia para o cenário DB2L.....	148
Figura 38 – Balanços de massa e energia para o cenário DEL.....	149
Figura 39 – Gráfico de Tukey para as produções específicas de CH ₄	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do bagaço de malte segundo a revisão de literatura.	12
Tabela 2 - Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos químicos do BSG e da BS de segundo os autores consultados na revisão de literatura.....	27
Tabela 3 - Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos hidrotérmicos do BSG e BS, de acordo com os autores consultados na revisão de literatura.....	43
Tabela 4 - Matriz de planejamento experimental dos ensaios de auto-hidrólise do bagaço de malte.....	63
Tabela 5 - Condições dos cenários estabelecidos para a produção de biogás e etanol.....	68
Tabela 6 - Perdas de massa e concentrações de açúcares monoméricos obtidos com o pré-tratamento de baixa severidade do bagaço de malte.....	81
Tabela 7 - Balanços mássicos dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise.....	84
Tabela 8 - Concentrações médias (g.L^{-1}) dos açúcares monoméricos, ácidos orgânicos e furfuraldeídos nos hidrolisados resultantes da auto-hidrólise do bagaço de malte.....	86
Tabela 9 - Variáveis-resposta obtidas com a auto-hidrólise do bagaço de malte.....	87
Tabela 10 - Caracterização dos sólidos pré-tratados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade (%).....	110
Tabela 11 - Composição média dos hidrolisados nas condições de desejabilidade (g.L^{-1}).....	111
Tabela 12 - Valores das variáveis-resposta obtidas com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade.....	114
Tabela 13 - Parâmetros da análise cinética da produção específica de metano.....	122
Tabela 14 - Parâmetros utilizados no cálculo das eficiências energéticas dos pré-tratamentos do bagaço de malte nas condições de desejabilidade.....	139
Tabela 15 - Análise de variância do modelo representativo da variável PM.....	168
Tabela 16 - Análise de variância do modelo representativo da variável RG....	168
Tabela 17 - Análise de variância do modelo representativo da variável RX.....	169
Tabela 18 - Análise de variância do modelo representativo da variável RSIA...	169
Tabela 19 - Análise de variância do modelo representativo da variável RHE...	170
Tabela 20 - Análise de variância do modelo representativo da variável CAH...	170
Tabela 21 - Resultados do teste Shapiro-Wilk para as produções específicas de CH_4	171
Tabela 22 - Resultados do teste t de Student para comparação das produções específicas de CH_4	171
Tabela 23 - Resultados do teste de Fligner-Killeen para as produções específicas de CH_4	171
Tabela 24 - Resultados do teste de Kruskal-Wallis para as produções específicas de CH_4	171
Tabela 25 - Resultados do teste de Bartlett para as produções específicas de CH_4	171
Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) dos valores de produções específicas de CH_4 (exceto o cenário TBS1).....	171
Tabela 27 - Resultados do teste Shapiro-Wilk para os saldos energéticos dos cenários estabelecidos.....	173

Tabela 28 – Resultados do teste de Fligner-Killeen para os saldos energéticos dos cenários estabelecidos.....	173
Tabela 29 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis para os saldos energéticos dos cenários estabelecidos.....	173.

ANEXOS

ANEXO 1 – Análises de variância (ANOVA).....	168
ANEXO 2 - Análises estatísticas das produções específicas de CH ₄	171
ANEXO 3 - Análises estatísticas dos saldos energéticos obtidos.....	173

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar as produções de metano, advindas da digestão anaeróbia dos hidrolisados obtidos a partir da auto-hidrólise do bagaço de malte bruto e do bagaço de malte submetido a um pré-tratamento preliminar de baixa severidade como etapa prévia. Considerando que a biomassa pode conter açúcares provenientes do processo de produção de cerveja, o tratamento preliminar objetivou a remoção desses açúcares para uma solução aquosa, que foi conduzida a avaliação de seu potencial de geração de metano. As frações sólidas resultantes do pré-tratamento da biomassa foram submetidas à hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares fermentescíveis. Ferramentas estatísticas foram utilizadas para a definição de cenários favoráveis à obtenção de biometano e etanol celulósico. Um planejamento experimental Doehlert foi realizado, utilizando como variáveis independentes, os parâmetros operacionais da auto-hidrólise do bagaço de malte. Dessa forma, avaliou-se as remoções dos componentes da biomassa e os rendimentos da hidrólise enzimática a fim de otimizar o pré-tratamento do bagaço de malte. Foram estabelecidos dois cenários para a produção de biogás e um cenário para a obtenção de etanol. Em cada cenário definido foram realizados os pré-tratamentos do bagaço de malte bruto e do bagaço de malte tratado previamente em uma baixa severidade. Os resultados foram comparados para avaliar a viabilidade ou não do uso do pré-tratamento em duas etapas. Verificou-se que no cenário para a produção de etanol, a biomassa tratada em duas etapas apresentou uma maior acessibilidade enzimática. O maior rendimento da hidrólise enzimática (86%) e a maior produção de metano ($302,4 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{bs}}$) foram obtidos com a biomassa tratada em dois estágios no segundo cenário para a produção de biogás, na condição mais severa (180°C , 60 min, $5,5 \text{ mL.g}^{-1}$). Porém, os maiores valores de recuperação energética foram obtidos com a biomassa tratada em uma única etapa nos dois cenários para a produção de biogás. A máxima recuperação de energia térmica ($1,88 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$) e energia elétrica ($0,403 \text{ kWh.kg}^{-1}$) foi obtida no primeiro cenário para a produção de biogás (180°C , 31 min, 5 mL.g^{-1}).

Palavras-chave: auto-hidrólise, hidrólise enzimática; digestão anaeróbia; testes de BMP; etanol celulósico; biomassa lignocelulósica.

ABSTRACT

The main objective of the present study was to compare the methane productions resulting from the anaerobic digestion of hydrolysates obtained from the autohydrolysis of raw barley spent grains and barley spent grains submitted to preliminary low severity pretreatment. Considering that biomass may contain sugars from the beer production process, the preliminary treatment aimed to remove these sugars into an aqueous solution, which was conducted to evaluate their methane generation potential. The solid fractions resulting from the biomass pretreatment were submitted to enzymatic hydrolysis to obtain fermentable sugars. Statistical tools were used to define favorable scenarios for obtaining biomethane and cellulosic ethanol. A Doehlert experimental design was performed, using as independent variables, the operating parameters of barley spent grains autohydrolysis reaction. Thus, the removal of biomass components and the enzymatic hydrolysis yields were evaluated in order to optimize barley spent grains pretreatment. Two scenarios have been established for biogas production and one scenario for obtaining ethanol. In each defined scenario, pretreatments of raw barley spent grains and it previously treated at a low severity pretreatment were performed. Results were compared to assess the feasibility of using two-stage pretreatment. It was found that in the scenario for ethanol production, the biomass treated in two stages presented a higher enzymatic accessibility. The highest yield of enzymatic hydrolysis (86%) and the highest methane production ($302.4 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{db}}$) were obtained with two-stage biomass treated in the second scenario for biogas production under the most severe condition (180° C , 60 min, 5.5 mL.g^{-1}). However, the highest energy recovery values were obtained with biomass treated in one step in both scenarios for biogas production. The maximum recovery of thermal energy (1.88 MJ.kg^{-1}) and electrical energy ($0.403 \text{ kWh.kg}^{-1}$) was obtained in the first scenario for biogas production (180° C , 31 min, 5 mL.g^{-1}).

Keywords: autohydrolysis; enzymatic hydrolysis; anaerobic digestion; BMP tests; cellulosic ethanol; lignocellulosic biomass.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	4
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo geral.....	6
3.2 Objetivos específicos.....	6
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1 O processo de produção de cerveja e a geração de resíduos.....	7
4.2 Características do bagaço de malte	9
4.3 A biomassa lignocelulósica.....	15
4.4 Potencial de uso do bagaço de malte.....	19
4.5 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica.....	21
4.5.1 Pré-tratamentos químicos.....	24
4.5.2 Pré-tratamentos físicos.....	32
4.5.3 Pré-tratamentos biológicos.....	34
4.5.4 Pré-tratamentos hidrotérmicos.....	38
4.6 A produção de etanol a partir do bagaço de malte	44
4.7 A produção de biogás a partir do bagaço de malte	46
4.8 Conclusão sobre a revisão de literatura.....	51
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
5.1 Aquisição, preparo e acondicionamento da biomassa.....	53
5.2 Produtos químicos e padrões analíticos.....	53
5.3 Pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade e análise do hidrolisado.....	54
5.4 Caracterização do bagaço de malte.....	55
5.4.1 Teor de umidade.....	55
5.4.2 Teor de extrativos.....	55
5.4.3 Teor de sólidos inorgânicos.....	57
5.4.4 Teores de lignina	57
5.4.4.1 Teor de sólidos insolúveis em ácido (SIA).....	57
5.4.4.2 Teor de lignina solúvel (LS).....	58
5.4.5 Teores de carboidratos e ácidos graxos voláteis.....	59
5.4.6 Teores de compostos fenólicos.....	61
5.4.7 Balanços de massa	62

5.5 Ensaio de auto-hidrólise do bagaço de malte	62
5.6 Hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados.....	64
5.7 Definição das variáveis-resposta e condições de desejabilidade.....	65
5.8 Hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados nas condições de desejabilidade.....	69
5.9 Determinação da demanda química de oxigênio dos hidrolisados obtidos nas condições de desejabilidade.....	70
5.10 Determinação dos teores de sólidos totais, voláteis e inorgânicos dos sólidos pré-tratados e hidrolisados obtidos nas condições de desejabilidade.....	70
5.11 Testes para avaliação do potencial bioquímico de metano (BMP).....	71
5.12 Análise da biodegradabilidade anaeróbia dos substratos	73
5.13 Análise da cinética da produção de metano	73
5.14 Avaliação das eficiências energéticas dos pré-tratamentos.....	75
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
6.1 Caracterização do bagaço de malte e avaliação da remoção de açúcares não-ligados através do tratamento hidrotérmico de baixa severidade.....	79
6.2 Auto-hidrólise do bagaço de malte.....	84
6.3 Otimização da auto-hidrólise do bagaço de malte e definição de cenários para a produção de biogás e etanol.....	86
6.4 Caracterização dos sólidos pré-tratados e hidrolisados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade.....	109
6.5 Hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados obtidos nas condições de desejabilidade.....	116
6.6 Análises das cinéticas de produção de CH ₄ e biodegradabilidades anaeróbias dos hidrolisados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade.....	121
6.6.1 Cinéticas de produção de CH ₄ e biodegradabilidades anaeróbias das FL-TBS1 e FL-TBS2.....	124
6.6.2 Cinética de produção de CH ₄ e biodegradabilidade anaeróbia da FL-DEL.....	127
6.6.3 Cinéticas de produção de CH ₄ e biodegradabilidades anaeróbias das FL-DB1 e FL-DB1L.....	130
6.6.4 Cinéticas de produção de CH ₄ e biodegradabilidades anaeróbias das FL-DB2 e FL-DB2L.....	135

6.6.5 Análise estatística das produções específicas de CH ₄	137
6.7 Análise da eficiência energética das condições de desejabilidade.....	138
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	150
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	152
9 REFERÊNCIAS.....	154

1 INTRODUÇÃO

Em geral, a produção de cerveja inicia-se com o processo de mosturação dos grãos maltados de cevada (*Hordeum vulgare*), que envolve a hidrólise enzimática de alguns constituintes do malte de cevada, principalmente o amido dos grãos, e em menores proporções são hidrolisadas proteínas, glicanas (β -1,3 e β -1,4) e arabinosilanas (MUSSATTO et al., 2006). Durante a produção do mosto, o amido dos grãos é convertido a açúcares fermentescíveis (glicose, maltose e maltotriose) e não-fermentescíveis (dextranas), enquanto proteínas são parcialmente degradadas a aminoácidos e polipeptídios (MUSSATTO, 2014).

Após a mosturação, a mistura contém de 25% a 30% de sólidos (FILLAUDEAU et al., 2006), sendo esses sólidos separados por filtração, enquanto o mosto é utilizado como matéria-prima para a produção de cerveja (MUSSATTO et al., 2006). Esses resíduos são constituídos de grãos de cevada gastos após o processo de produção, sendo denominados de bagaço de malte (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012). Esses resíduos possuem um teor de água em torno de 80% (WEGER et al., 2017), e são constituídos de celulose, polissacarídeos não-celulósicos, lignina, além de uma certa quantidade de proteínas e lipídios (MUSSATTO et al., 2006). Estima-se que cerca de 200 gramas de bagaço de malte sejam gerados para cada litro de cerveja produzido (NIGAM, 2017).

O bagaço de malte é normalmente utilizado na pecuária como alimento para o gado (STURM et al., 2012), ou na agricultura como insumo para o solo (THOMAS e RAHMAN, 2006). Em relação a esse aspecto, informações da Cervejaria Ambev (<https://www.ambev.com.br/sustentabilidade/residuo-zero-e-clima/>), confirmam que o bagaço de malte produzido no Brasil é praticamente todo transformado em ração animal.

Nesse tocante, ressalta-se que a destinação de grande parte dos resíduos agroindustriais a usos não-nobres, representa uma perda do potencial energético desses materiais, sobretudo no caso do Brasil, que assume uma posição de destaque em termos mundiais no que concerne à produção de gêneros agrícolas (BAÊTA, 2016). O Brasil possui a terceira maior produção de cerveja em termos mundiais, tendo no ano de 2016 uma produção estimada em

14,1 bilhões de litros (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2017). A elevada produção de cerveja no Brasil está também associada a geração de uma grande quantidade de bagaço. Tal subproduto se destinado de forma inadequada ou não tiver um plano de gestão consciente por parte da empresa, pode se tornar um grande passivo ambiental.

Apesar disso, atualmente as indústrias de cerveja têm se empenhado na redução do consumo energético, baseadas no conceito de “cervejaria verde” (CAETANO et al., 2013), que visa modificar a conduta das indústrias para adaptarem seus processos, no sentido de reduzirem os seus resíduos gerados (MUSSATTO et al., 2006). No caso do bagaço de malte, o seu baixo valor de comercialização, aliado aos problemas inerentes à sua disposição, têm conduzido a indústria e a comunidade científica a buscar alternativas mais nobres para a utilização desse subproduto (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012).

Por exemplo, a geração de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos configura-se como uma alternativa para a redução no consumo de combustíveis de origem fóssil (WON et al., 2012). Em relação a esse aspecto, o bagaço de malte representa um subproduto tão barato quanto promissor (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012), pois dentre as vantagens do uso de biocombustíveis provenientes de biomassa lignocelulósica estão a ampla disponibilidade de materiais e a possibilidade de manejo próximo à fonte geradora (YANG et al., 2014).

O bagaço de malte também pode ser utilizado como substrato para a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia (MUSSATTO et al., 2006). O uso de biomassas lignocelulósicas para essa finalidade contribui para uma gestão energética sustentável, uma vez que a energia liberada pela queima do biogás pode ser convertida em energias elétrica e térmica (POULSEN et al., 2017; WEGER et al., 2017). Desse modo, a biomassa representa um recurso potencialmente utilizável para reduzir a dependência energética das indústrias com relação à demanda por fontes de origem fóssil (OLSZEWSKI et al., 2019).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo comparar a utilização do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte em uma e duas etapas, a fim de verificar a melhor alternativa para viabilizar a produção de biometano a partir

da digestão anaeróbia das frações líquidas obtidas e a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Há uma tendência crescente das cervejarias utilizarem energias renováveis devido a uma série de razões econômicas e ecológicas (WEGER, 2017). Além da possibilidade de redução nas emissões de dióxido de carbono, o bagaço de malte pode contribuir com a autossuficiência energética da indústria de cerveja (WEBER e STADLBAUER, 2017). Considerando a importância das cervejarias criarem novas estratégias de gestão energética para a redução de seus custos de processo (STURM et al., 2012), é necessário apontar rotas tecnológicas para a utilização do bagaço de malte, a fim de implementar uma economia energética e uma maior sustentabilidade ambiental (CAETANO et al., 2013).

Apesar do potencial energético da biomassa lignocelulósica, os teores de lignina na matriz polimérica contribuem para o aspecto recalcitrante desses materiais (WU et al., 2013), impedindo a acessibilidade química ou enzimática aos seus açúcares constituintes (BAËTA, 2016). Por esses motivos, muitas abordagens de pré-tratamento da biomassa têm sido propostas para o fracionamento dos componentes do bagaço de malte (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012).

Define-se fracionamento como uma terminologia que designa as técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, através das quais promove-se a destruição da parede celular e o aumento da área superficial, facilitando assim a degradação microbológica desses substratos (SCHUMACHER et al., 2014). Muitas abordagens foram pesquisadas a fim de promover o pré-tratamento do bagaço de malte, desde tratamento químicos, físicos, biológicos e hidrotérmicos, bem como a combinação de mais de uma tecnologia.

Considerando que o processo de produção de cerveja envolve a conversão do amido dos grãos maltados de cevada em açúcares fermentescíveis, admite-se que ao final do processo de filtração do mosto, parte desses açúcares permaneça adsorvida na superfície do bagaço de malte. Considera-se que esses açúcares requerem uma menor energia de ativação para serem solubilizados durante o processo hidrotérmico de pré-tratamento. Assim, levantou-se a possibilidade da utilização de um pré-tratamento preliminar

de baixa severidade para remover parte desses açúcares não-ligados da biomassa.

Acredita-se que uma vez removidos os açúcares não-ligados, uma maior quantidade de energia térmica seria necessária para degradar os açúcares remanescentes da biomassa. Dessa forma, uma menor quantidade de produtos de degradação desses açúcares (furfuraldeídos tóxicos à microbiota), seriam gerados durante a auto-hidrólise do bagaço de malte, comparativamente ao pré-tratamento em uma única etapa. Isso aponta a perspectiva de uma maior produção de metano advinda da degradação anaeróbia da fração líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico.

Além disso, segundo conclusão do grupo de pesquisa em que este trabalho foi desenvolvido, acredita-se que uma menor formação de furanos durante o pré-tratamento da biomassa pode representar um maior rendimento da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados. Ou seja, as características mais hidrofóbicas desses compostos podem impactar negativamente na acessibilidade das enzimas aos açúcares da biomassa pré-tratada.

O presente estudo destaca-se por avaliar o potencial de geração de biometano da fração líquida obtida com um pré-tratamento de baixa severidade, considerando que o bagaço de malte contém açúcares de fácil remoção adsorvidos à superfície da biomassa. O presente trabalho diferencia-se de outras pesquisas por avaliar o potencial de geração de metano das frações líquidas obtidas por auto-hidrólise do bagaço de malte, comparando a existência ou não de um pré-tratamento preliminar de baixa severidade como etapa pré-eliminar.

Acredita-se que a recuperação energética por meio da queima do biogás produzido com as frações líquidas oriundas do pré-tratamento em duas etapas, possa ser superior à energia térmica demandada no pré-tratamento da biomassa, gerando assim um excedente de energia térmica a ser usado no próprio complexo industrial de produção de cerveja. Além dessa questão primordial, a fração sólida resultante do pré-tratamento pode ainda ser utilizada para a produção de etanol celulósico, o que contribui ainda mais para a inserção da indústria de cerveja no conceito de biorrefinaria, reciclando e agregando valor ao bagaço de malte, um subproduto gerado em abundância nos complexos cervejeiros de todo mundo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as condições do pré-tratamento hidrotérmico em uma ou duas etapas, capazes de melhorarem os rendimentos de produção de biogás e hidrólise enzimática a partir do bagaço de malte.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a remoção de açúcares não-ligados do bagaço de malte com um pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade.
- Definir melhores cenários para a produção de biogás e para a produção de etanol celulósico a partir do bagaço de malte.
- Compreender a cinética de produção de metano advinda da digestão anaeróbia dos hidrolisados obtidos com o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte nos cenários estabelecidos.
- Comparar a eficiência energética dos pré-tratamentos do bagaço de malte nos cenários estabelecidos.

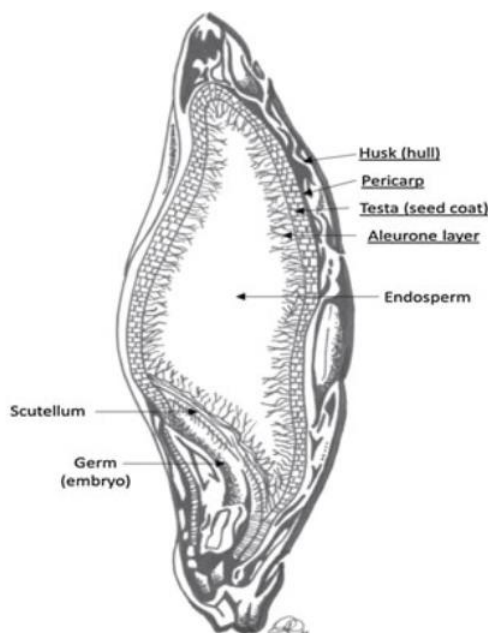
4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O processo de produção de cerveja e a geração de resíduos

A produção de cerveja se divide basicamente em três etapas, que vão desde a produção do mosto, a fermentação e o pós-tratamento da cerveja (AQUARONE et al., 2001). Contudo, nesse trabalho será dado maior enfoque à primeira etapa pois é a partir dela que a maior parte dos resíduos, representada pelo bagaço de malte é gerada.

O malte constitui um dos ingredientes básicos para a produção de cerveja sendo geralmente produzido a partir da cevada (*Hordeum vulgare L.*), que é uma gramínea cujos grãos possuem altos teores de amido e teores de proteínas adequados à nutrição de leveduras durante a fermentação (AQUARONE et al., 2001). Segundo os autores, os grãos de cevada (Figura 1) são compostos basicamente de uma casca externa, constituída de material celulósico, o endosperma amiláceo que é um tecido de reserva energética, e o embrião (ou germe).

Figura 1: Representação esquemática de um grão de cevada (LYNCH et al., 2016).



Uma das primeiras operações do processo de produção do malte é a malteação, que envolve a germinação dos grãos em condições controladas, o que aumenta a solubilidade dos componentes da biomassa em água

(FILLADEAU et al., 2006). Essa etapa tem como objetivo a exposição do endosperma amiláceo, o que facilita o ataque enzimático durante a produção do mosto (AQUARONE et al., 2001).

A malteação inicia-se com a mistura dos grãos de cevada em tanques contendo água a temperaturas entre 5° e 18°C durante dois dias, para que a umidade dos grãos atinja valores de no máximo 48% (MUSSATTO et al., 2006). Durante esse período, a água dos tanques é trocada em intervalos entre 6 e 8 horas e o oxigênio necessário à respiração do embrião da cevada é fornecido através da injeção de ar nos tanques, o que mantém a temperatura dos grãos entre 15° e 21°C (AQUARONE et al., 2001).

Tal procedimento de hidratação ativa o metabolismo da camada de aleurona, que envolve o endosperma amiláceo (MUSSATTO et al., 2006), e cuja função é de secreção de enzimas amilolíticas (AQUARONE et al., 2001). Após o período de hidratação, os grãos começam a germinar em condições controladas de temperatura e umidade durante cerca de uma semana (MUSSATTO et al., 2006). Tanto a água como o ar chegam ao embrião por meio de uma estrutura denominada micrópila, e entre o embrião e o endosperma, outra estrutura chamada escutelo, exerce a função de secreção enzimática e troca de nutrientes (AQUARONE et al., 2001). Durante esse processo de germinação ocorre a síntese e a secreção enzimática de amilases, proteases e β -glucanases, quando finalmente ao final desse processo, o endosperma do grão encontra-se total e uniformemente modificado (MUSSATTO et al., 2006).

Após esse período, o processo de germinação é interrompido a partir da secagem em três etapas dos grãos, utilizando ar aquecido a temperaturas de até 88°C (podendo em alguns casos chegar a 100°C), o que é feito para retirar umidade dos grãos a valores entre 4 e 5% para as cervejas do tipo *lager* e entre 2 e 3% para cervejas do tipo *ale* (AQUARONE et al., 2001). De acordo com os autores, o malte pode ser compreendido como o produto final desse processo de germinação controlada e secagem, através dos quais os grãos de cevada são conduzidos para a produção de cervejas, uísques, farináceos e outros produtos alimentícios.

A produção do mosto (mosturação) ocorre quando o malte é misturado com água potável em tanques, onde a temperatura é lentamente incrementada de 37°C a 78°C, em distintas rampas de aquecimento, para que o amido dos

grãos seja convertido a glicose, maltose, maltotriose e dextrinas (MUSSATTO, 2014). Durante este período ocorre a hidrólise enzimática principalmente do amido, mas também de outros componentes como proteínas, β -1 \rightarrow 3-glicanas e β -1 \rightarrow 4-glicanas (MUSSATTO et al., 2006). Apenas de 10% a 15% do conteúdo do mosto é representado por substâncias prontamente solúveis do malte, sendo o restante oriundo da degradação enzimática de macromoléculas da biomassa (AQUARONE et al., 2001).

Após o processo de liquefação e sacarificação do amido dos grãos de cevada (BELDMAN et al., 1986) e da extração dos componentes do malte para o mosto, o teor de sólidos na mistura encontra-se entre 25% e 30%, sendo essa parcela removida da mistura por filtração (FILLADEAU et al., 2006). O denominado bagaço de malte constitui essa parcela não degradada e insolúvel do malte, sendo utilizada como próprio leito filtrante do mosto, o qual é conduzido como matéria-prima para a produção de cerveja (MUSSATTO, 2014). Esse resíduo é constituído de cascas de grãos de cevada gastos, fragmentos da camada de aleurona, plúmulas (estruturas interiores ao escutelo), restos de paredes celulares e proteínas coaguladas (AQUARONE et al., 2001).

4.2 Características do bagaço de malte

Estima-se que anualmente sejam gerados em torno de 34 a 38,6 milhões de toneladas de bagaço de malte em termos globais (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012; MUSSATTO, 2014), sendo que 3,4 milhões de toneladas são geradas apenas nos países da União Européia (STEINER et al., 2015). Considerando a produção de cerveja no Brasil (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2017) e a geração de bagaço de malte por volume de cerveja produzido (NIGAM et al., 2017) é possível estimar que aproximadamente 2,82 milhões de toneladas de bagaço de malte tenham sido gerados no ano de 2016. O bagaço de malte é uma biomassa rica em celulose, hemicelulose e lignina (MUSSATTO et al., 2006), além de proteínas e lipídeos (KEMPPAINEN et al., 2016), representando cerca de 85% dos resíduos sólidos gerados nas cervejarias (MONTUSIEWICZ et al., 2017).

Segundo alguns autores consultados nessa revisão de literatura, percebeu-se que os teores de glicanas (hexoses) presentes no bagaço de malte

variam em uma larga faixa de valores, desde 14,07% (MONTUSIEWICZ et al., 2017) a 38,88% (PATEL et al., 2018). Interessante observar que Kempainen et al. (2016), verificaram que dentre as glicanas da biomassa, cerca de 73% era composta por celulose, 17% por amido e 10% por outros polissacarídeos não-celulósicos.

Vale salientar que Zhang et al. (2014), encontraram o mesmo teor de amido residual nas cascas dos grãos de cevada *in natura*. Por outro lado, Yang et al. (2013) quantificaram o teor de amido nos grãos de cevada *in natura* e obtiveram teores em torno de 55,2%. Essas observações levantam a perspectiva de que, durante o processo de mosturação, nem todo o amido é extraído, restando uma pequena parcela remanescente no resíduo gerado. Outros autores obtiveram menores teores de amido no bagaço de malte variando entre 1,2% (WILKINSON et al., 2016) e 5,25% (ROJAS-CHAMORRO et al., 2018). Tal fato indica que o teor de amido remanescente no bagaço de malte pode depender da eficiência do processo, do porte da indústria e das tecnologias adotadas.

Com relação às hemiceluloses contidas no bagaço de malte, os teores de xilanas (pentoses) apontados na revisão de literatura variaram entre 16,35% (QIN et al., 2018) e 25,85% (PAZ et al., 2019), e os teores de arabinanas (pentoses) entre 7,19% (QIN et al., 2018) e 9% (CARVALHEIRO et al., 2004). Teores de outros polissacarídeos não-celulósicos podem ser encontrados em concentrações-traço, tais como galactanas e mananas (QIN et al., 2018; ROJAS-CHAMORRO et al., 2018).

Com relação à presença de grupos acetil, os teores variaram entre 0,22% (ROJAS-CHAMORRO et al., 2018) e 1,4% (MUSSATTO et al., 2007). Em termos comparativos, Nabarlitz et al. (2007) verificaram teores de grupos acetil de 2,5% na caracterização da palha de cevada sem tratamento, com uma relação molar entre acetila e xilose de 0,28. Analogamente, Vargas et al. (2015) também verificaram teores de grupos acetil na palha de cevada (1,98%) superiores aos valores indicados na literatura para o bagaço de malte.

De acordo com os autores consultados, os teores de lignina insolúvel variaram em uma ampla faixa de valores desde 5,13% (MONTUSIEWICZ et al., 2017) até valores de 30,84% (RAVINDRAN et al., 2018). Da mesma forma, os teores de lignina solúvel apresentaram valores entre 1,5% (PROCENTESE et al., 2018) e 7,32% (OUTEIRIÑO et al., 2019). De acordo com Waters et al.

(2012), o bagaço de malte contém 131 mg.dm^{-3} de polifenóis. MONTUSIEWICZ et al.(2017) determinaram a soma dos teores de compostos fenólicos, polissacarídeos pécnicos, proteínas e monossacarídeos como sendo igual a 39,73% da biomassa.

Com relação ao teor de lipídios no bagaço de malte, poucos autores reportaram os teores desses componentes, havendo grande disparidade entre os valores apontados, que encontram-se entre 1,89% (ZHANG e ZANG, 2016) e 11% (ROMMI et al., 2018). Os principais ácidos graxos encontrados no bagaço de malte foram o ácido linoleico e o ácido palmítico (WATERS et al., 2012).

Além disso, o bagaço de malte possui um teor protéico entre 15% e 30% em termos mássicos, em sua maioria constituído de proteínas insolúveis que não são removidas após a filtragem do mosto (KEMPPAINEN et al., 2016). Os valores encontrados na literatura corroboram com essa assertiva e estiveram entre 15,1% (PLAZA et al., 2017) e 27,9% (WILKINSON et al., 2017). Segundo Waters et al. (2012), os principais aminoácidos encontrados no bagaço de malte são a histidina, o ácido glutâmico e a lisina. Qin et al. (2018) verificaram que os aminoácidos presentes em maior quantidade no bagaço de malte foram o ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, prolina, alanina, glicina, arginina e lisina.

Os teores de sólidos inorgânicos (cinzas) do bagaço de malte estiveram entre 1,2% (CARVALHEIRO et al., 2004) e 4,41% (OUTEIRIÑO et al., 2019), sendo o silício o elemento mineral mais abundante no bagaço de malte, podendo haver também a presença de fósforo e cálcio (MUSSATTO, 2014). De acordo com a pesquisa desenvolvida por Kempainen et al.(2016), apesar do bagaço de malte ter apresentado teores de 4,1% de cinzas, ao analisar esse mesmo teor nos sólidos insolúveis em ácido, os autores verificaram que o material continha 12% de cinzas.

De acordo com Paz et al.(2019), o bagaço de malte contém oligossacarídeos aderidos à superfície da biomassa, oriundos do próprio processo de fabricação de cerveja. Segundo os autores a presença desses açúcares (principalmente maltose) é um fator limitante para a comparação de metodologias de pré-tratamento. Semelhantemente, Beldman et al. (1986) verificaram que 3,5% da biomassa era composta por açúcares solúveis. Comparativamente, a palha de cevada possui entre 15 e 20% de componentes solúveis em água quente (LOPEZ et al., 1995; VANDENBOSSCHE et al., 2014),

de modo que Duque et al.(2013) obtiveram teores de 10 g.kg^{-1} de açúcares nos extrativos da palha de cevada em água.

Os teores dos componentes do bagaço de malte (BSG), bem como da palha de cevada (BS) encontram-se sumarizados a partir da Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização do bagaço de malte segundo a revisão de literatura (início).

Autores	Biom	gli. (%)	xil. (%)	ara. (%)	LI (%)	LS (%)	SI (%)	Prot (%)	Ac. (%)	E (solvente) (%)
Beldman et al. (1986)	BSG	15,1	24,8 ^(a)		25,0 ^(c)		3,5	23,8	n.d.	n.d.
Lopez et al. (1995)	BS	36,5	25,5 ^(a)		16,7 ^(c)		5,1	n.d.	n.d.	20,3 (água) 2,2 (etanol)
Carvalho et al. (2004)	BSG	21,9	20,6	9,0	21,7 ^(c)		1,2	24,6	1,1	n.d.
Nabarlatz et al. (2007)	BS	30,8	19,8	3,0	16,7 ^(c)		6,1	n.d.	2,5	5,9 (n.d.)
Mussatto et al. (2007)	BSG	16,8	28,4 ^(a)		27,8 ^(c)		4,6	15,2	1,4	5,8 (n.d.)
Xiros et al.(2008)	BSG	11,5	40,0 ^(a)		11,9 ^(c)		3,2	14,0	n.d.	n.d.
Panagiotopoulos et al. (2009)	BS	37,2	24,4 ^(a)		17,4 ^(c)		7,5	n.d.	n.d.	n.d.
Treimo et al. (2009)	BSG		45,9 ^(b)		12,6	9,0	n.d.	23,4	n.d.	n.d.
Kim et al. (2011)	BS	38,1	18,7	3,9	20,5	1,8	4,2	n.d.	n.d.	n.d.
Panagiotopoulos et al. (2011)	BS	34,2	13,2 ^(a)		15,9	0,4	n.d.	5,2	n.d.	13,7 (água) 5,1 (solvente)
Sáez et al. (2012)	BS	34,9	20,8	2,5	18,1 ^(c)		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Won et al. (2012)	BS	37,8	21,5	2,5	16,2	2,7	2,6	2,8	n.d.	9,2 (etanol) 1,8 (hexano)
Duque et al. (2013)	BS	39,1	25,7 ^(a)		15,2 ^(c)		6,8	n.d.	n.d.	10,0 (etanol) 1,0 (água)
Han et al. (2013)	BS	35,7	16,9	2,1	23,1	2,4	2,5	n.d.	n.d.	n.d.

Tabela 1: Caracterização do bagaço de malte segundo a revisão de literatura (continuação).

Autores	Biom	gli. (%)	xil. (%)	ara. (%)	LI (%)	LS (%)	SI (%)	Prot (%)	Ac. (%)	E (solvente) (%)
Yang et al. (2013)	BS	53,3	19,1	2,6	n.d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Marcolongo et al. (2014)	BSG	26,3	35,0 ^(a)		9,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Duque et al. (2014)	BS	39,1	23,8	1,9	15,2 ^(c)		6,8	n.d.	n.d.	n.d.
Wilkinson et al.(2014)	BSG	19,2	11,3	7,1	9,9		2,7	26,6	n.d.	n.d.
Sheikh et al. (2014)	BS	39,2	24,4 ^(a)		11,3	.1,4	9,0	n.d.	n.d.	n.d.
Vandenbossche et al. (2014)	BS	37,6	36,1 ^(a)		8,3 ^(c)		7,0	3,6	n.d.	15,3 (água) 21,6 (NDF)
Bochmann et al.(2015)	BSG	23,3	18,8 ^(a)		24,6 ^(c)		n.d.	24,4	n.d.	n.d.
Liguori et al. (2015)	BSG	27,5	28,8 ^(a)		12,8 ^(c)		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vargas et al. (2015)	BS	35,1	20,0	4,6	19,8	n.d.	7,6	n.d.	2,0	n.d.
Yang et al. (2015)	BS	36,6	18,8	2,3	21,3	1,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fabičovicová (2016)	BS	40,7	20,8 ^(a)		19,6 ^(c)		2,1	n.d.	n.d.	1,8 (acetona)
García-Torreiro et al. (2016)	BS	34,4	25,7 ^(a)		21,1 ^(c)		5,9	n.d.	n.d.	n.d.
Kemppainen et al. (2016)	BSG		43,5 ^(b)		10,0 ^(c)		4,1	23	n.d.	11,4 (heptano)
Michelin e Teixeira (2016)	BSG	16,5	16,75	8,8	20,4 ^(c)		2,1	n.d.	0,75	n.d.
Wilkinson et al. (2016)	BSG	22,1	11,3 ^(a)		8,0	10,7	2,7	28	n.d.	n.d.
Montusiewicz et al.(2017)	BSG	14,1	41,1 ^(a)		5,13 ^(c)		n.d.	20	n.d.	n.d.
Liu et al. (2017)	BS	35,4	28,7 ^(a)		13,1 ^(c)		4,5	n.d.	n.d.	8,1 (água) 2,7 (etanol)
Rojas-Chamorro et al.(2017)	BSG	22,5	16,9	6,8	14,4 ^(c)		2,3	21	n.d.	n.d.
Plaza et al. (2017)	BSG	23,1	15,5	7,4	14,1	4,9	3,5	15	n.d.	n.d.

Tabela 1: Caracterização do bagaço de malte segundo a revisão de literatura (final).

Autores	Biom	gli. (%)	xil. (%)	ara. (%)	LI (%)	LS (%)	SI (%)	Prot (%)	Ac. (%)	E (solvente) (%)
Patel et al.(2018)	BSG	38,9	16,23 ^(a)		13,7 ^(c)		n.d.	12,6	n.d.	n.d.
Procentese et al. (2018)	BSG	16,8	16,5	2,0	20,0 ^(c)	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Qin et al. (2018)	BSG	20,6	16,4	7,2	15,3	4,3	3,6	22,5	n.d.	n.d.
Tisma et al. (2018)	BSG	16,0	20,0 ^(a)		8,5 ^(c)	5,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fernández- Delgado et al. (2019)	BSG	19,2	17,5 ^(a)		16,6 ^(c)		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Giacobbe et al. (2019)	BSG	16,0	19,0 ^(a)		21,0 ^(c)	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
López-Linares et al. (2019)	BSG	17,9	28,7 ^(a)		19,4	6,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Outeiriño et al. (2019)	BSG	21,8	21,1	9,3	17,9	7,3	4,4	n.d.	n.d.	n.d.
Paz et al. (2019)	BSG	32,8	25,9		17,6	n.d.	3,3	n.d.	n.d.	14,4 (etanol)
Ravindran et al. (2019)	BSG	19,2	26,9	n.d.	30,5 ^(c)		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

(a) Soma de xilose e arabinose; (b) Soma de glicose, xilose e arabinose; (c) Soma de lignina solúvel e lignina insolúvel

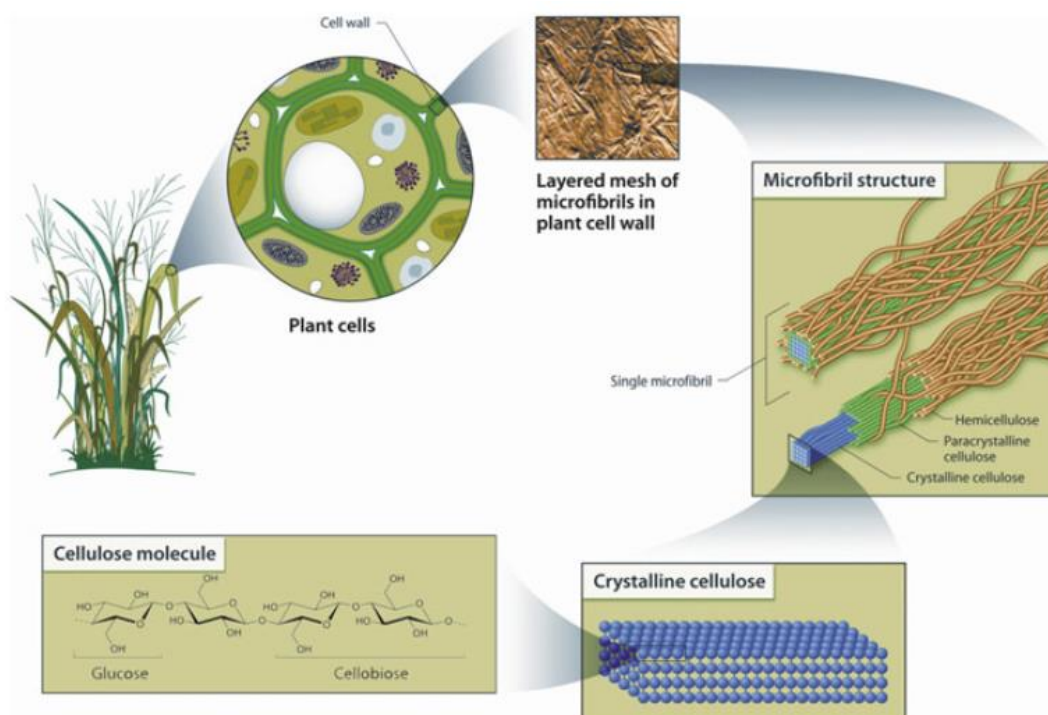
Diante dos dados da Tabela 1, percebeu-se que os teores de glicanas no bagaço de malte variam amplamente desde 11,5% (XIROS et al.,2008) até 38,9% (PATEL et al.,2018), o que pode estar relacionado às diferentes metodologias para a produção e filtragem do mosto, bem como ao porte e nível tecnológico da indústria. Com relação aos teores de arabinoxilanas, os dados da Tabela 1 também variam amplamente entre 11,3% (WILKINSON et al.,2016) a 41,1% (MONTUSIEWICZ et al.,2017), o que pode estar atribuído aos mesmos motivos. Com relação aos teores de lignina insolúvel os valores variaram entre 8% (WILKINSON et al.,2016) e 19,4% (LÓPEZ-LINARES et al.,2019), enquanto os teores de lignina solúvel variaram entre 4,3% (QIN et al.,2018) e 10,7% (WILKINSON et al.,2016). Os teores de cinzas variaram entre 1,2% (CARVALHEIRO et al.,2004) e 5,4% (TISMA et al.,2018), e com relação às proteínas os teores variaram entre 12,6% (PATEL et al.,2018) e 28% (WILKINSON et al.,2016). Assim, constata-se que diferenças entre as biomassas também podem estar a muitos outros motivos relacionados a fatores

meteorológicos, edáficos, em termos das práticas agrícolas e também diferenças entre as metodologias utilizadas pelos diversos autores. Assim, considerando que a indústria de cerveja é amplamente difundida mundialmente, uma série de fatores devem ser considerados para a comparação entre os teores dos componentes do bagaço de malte.

4.3 A biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (WU et al., 2013), além de uma menor proporção de minerais, metabólitos secundários e extrativos (BAËTA, 2016). A biomassa pode ser utilizada como fonte sustentável para a obtenção de produtos químicos e biocombustíveis (SILVA, 2017). Porém, apesar de seu potencial biotecnológico, a conversão desses materiais à produtos de valor agregado demanda a separação de seus principais constituintes (MUSSATTO et al., 2008), a partir do uso de técnicas de fracionamento da biomassa que garantem a recuperação de componentes potencialmente valiosos (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012). A Figura 2 apresenta um esquema representativo da biomassa lignocelulósica.

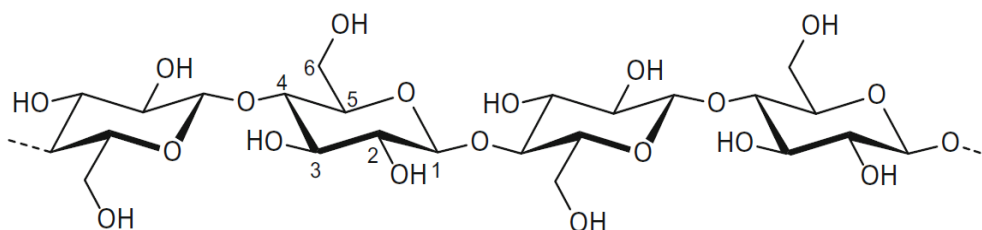
Figura 2: Esquema representativo da biomassa lignocelulósica (HEINZE, 2016).



A celulose constitui cerca de 40% do material carbonáceo em vegetais (HEINZE, 2016), e encontra-se associada à hemicelulose e outros componentes estruturais, sendo envolvida pela macromolécula de lignina (MUSSATTO et al., 2008). A associação entre a celulose e a hemicelulose é de natureza física, enquanto a associação entre a celulose e a lignina é de natureza físico-química (PIERRE et al., 2011). A celulose é um homopolímero linear e não ramificado presente na parede celular dos vegetais, sendo composta por 10 a 15 mil unidades de D-glicopiranosose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo ($\beta 1 \rightarrow 4$) (NELSON e COX, 2002).

As ligações glicosídicas entre os monômeros do polímero de celulose proporcionam um arranjo tridimensional da macromolécula, de tal forma que as unidades monoméricas de β -D-glicopiranosose são dispostas alternadas entre si em um ângulo de 180° (HEINZE, 2016), formando unidades diméricas denominadas de celobiose (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática de um dímero de celobiose (HEINZE, 2016).

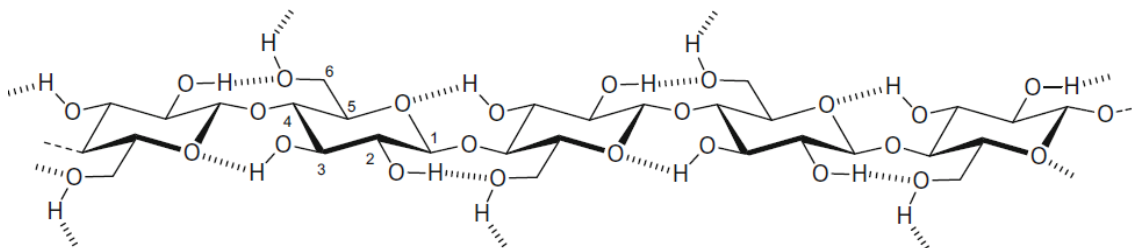


As cadeias de celulose possuem forte tendência de se agregarem em entidades estruturais altamente organizadas devido à sua conformação espacial e constituição química (GURGEL, 2010). A porcentagem relativa do polímero contendo regiões altamente organizadas é chamada de grau de cristalinidade da celulose e pode ser calculada através do perfil de difração de raios-X, podendo variar segundo a amostra e o pré-tratamento da biomassa (DRIEMEIER e CALLIGARIS, 2011; GURGEL, 2010).

As macromoléculas de celulose apresentam uma série de ligações de hidrogênio intermoleculares, conferindo uma forte interação química entre as cadeias adjacentes (HEINZE, 2016). Desse modo, a coesão intercadeias de celulose é favorecida pela alta regularidade espacial dos sítios formadores das ligações de hidrogênio e pelo envolvimento de três grupos hidroxila da molécula

de β -D-glicopiranosose na rede de ligações de hidrogênio (Figura 4) (GURGEL, 2010).

Figura 4: Representação esquemática das ligações de hidrogênio na molécula de celulose (HEINZE, 2016) (modificado).



O processo de hidrólise da celulose pode ser representado por uma série de reações de hidratação e desidratação, cuja formação de produtos ocorre segundo a seguinte reação:



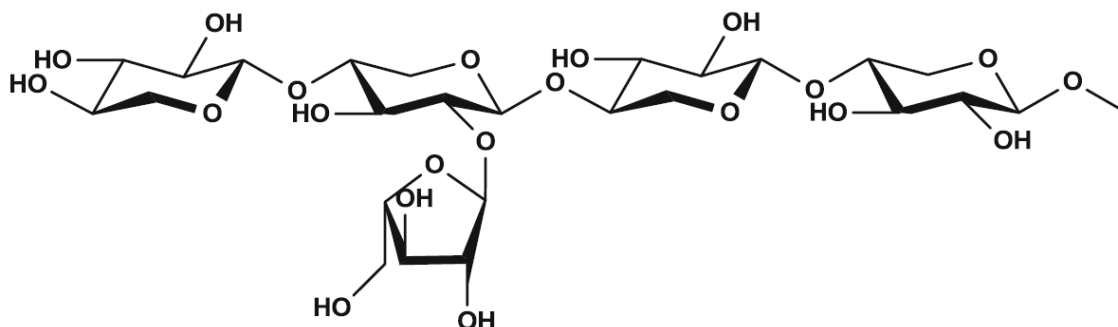
Por sua vez, as hemiceluloses possuem uma cadeia molecular menor do que a celulose, porém elas apresentam muitas ramificações que são responsáveis por unir as microfibrilas adjacentes de celulose (BAËTA, 2016). Essas ramificações reduzem a energia de ligação entre os seus monômeros constituintes, tornando a molécula mais facilmente hidrolisável do que a celulose (CANETTIERI, 2004), sendo esses polissacarídeos prontamente solubilizados durante o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa (RUIZ et al., 2017).

As hemiceluloses constituem entre 25% e 35% dos materiais lignocelulósicos (EBRINGEROVA e HEINZE, 2000), e ocorrem em associação íntima com a celulose e lignina, contribuindo para a rigidez da parede celular vegetal (GURGEL, 2010). Esses polissacarídeos possuem uma composição heterogênea de várias unidades de açúcares (SPIRIDON e POPA, 2008), sendo compostos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose) (SAHA, 2003), podendo apresentar uma quantidade significativa de grupos acetil (GURGEL, 2007).

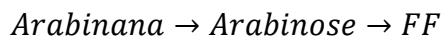
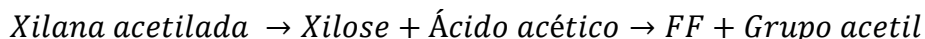
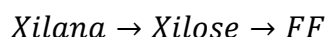
As hemiceluloses de resíduos agrícolas cereais, tais como o bagaço de malte e a palha de cevada, são formadas principalmente por arabinoxilanas, cuja característica é a presença de uma cadeia longitudinal de xilanas com

ramificações contendo arabinose (Figura 5), muito embora, possam estar presentes pequenas quantidades de galactanas e mananas, dependendo do vegetal que originou o resíduo (RUIZ et al., 2017).

Figura 5: Representação esquemática de uma molécula de arabinoxilana (RUIZ, 2017) (modificado).



A hidrólise das arabinoxilanas pode ser representada por uma série de reações cuja formação de produtos ocorre segundo as seguintes reações:

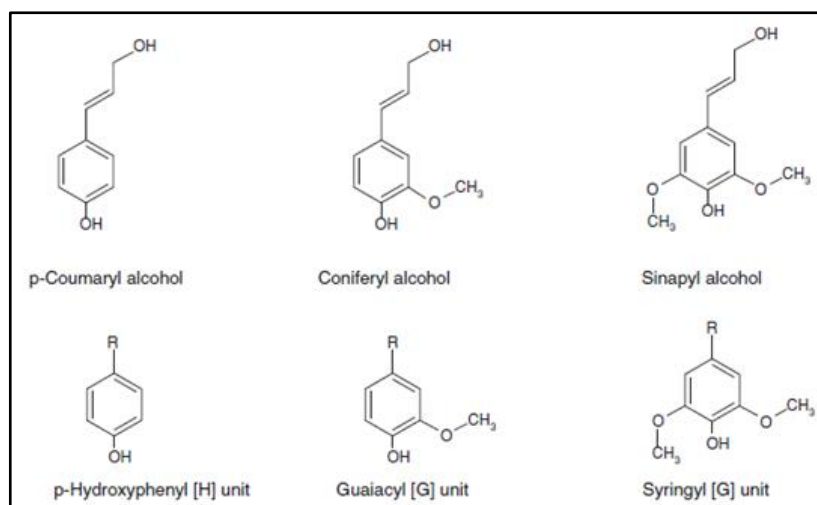


Por fim, a lignina é um polímero tridimensional cuja função primordial é agregar as fibras de celulose e hemiceluloses, atuando como uma barreira física à degradação enzimática (SOUSA, 1984). A lignina é um polímero aromático que constitui entre 15% a 40% dos tecidos vegetais, sendo usualmente incinerada em plantas industriais para a geração de calor (REGAUSKAS et al., 2014).

As unidades monoméricas da lignina são fenilpropanos originados a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (GURGEL, 2010). Ou seja, os núcleos aromáticos encontrados na lignina (denominados lignóis) derivam destes álcoois, sendo respectivamente chamados de hidroxifenila, guaiacila e siringila (GURGEL, 2007).

A formação da lignina envolve um mecanismo randômico de acoplamento de lignóis levando à formação de uma molécula não-linear (GURGEL, 2010), de modo que as características da macromolécula de lignina são definidas pelas proporções entre as unidades desses fenilpropanos (Figura 6) (RUIZ et al., 2017).

Figura 6: Álcoois precursores da lignina e seus respectivos monolignóis resultantes (RUIZ et al., 2017) (modificado).



A despolimerização da lignina é um processo pouco conhecido, dada a ampla distribuição das forças de ligação entre os átomos de carbono e entre os átomos de carbono e oxigênio, existindo uma tendência de espécies de baixo peso molecular sofrerem recondensação, muitas vezes para espécies químicas mais recalcitrantes (REGAUSKAS et al., 2014).

4.4 Potencial de uso do bagaço de malte

Atualmente existem muitas tendências no ramo da biotecnologia no sentido de desenvolver métodos para a transformação dos resíduos de origem orgânica em biocombustíveis, além da criação de meios efetivos para a exploração e a reciclagem desses recursos naturais (MALAKHOVA et al., 2015). O uso da biomassa para fins energéticos pode contribuir para a redução dos efeitos do aquecimento global, uma vez que o dióxido de carbono emitido na combustão de bio-combustíveis pode ser reutilizado no crescimento de nova biomassa, promovendo assim um ciclo fechado de carbono (SILVA, 2017).

Ressalta-se que a indústria de produção de cerveja gera grandes quantidades de resíduos sólidos em sua maioria passíveis de reciclagem e reuso (MUSSATTO et al., 2006). Dessa forma, é necessário avaliar as opções para a reciclagem destes resíduos visando converter este material em outros produtos de valor agregado (PANAGIOTOPOULOS et al., 2015). Kempainen et al. (2016) mencionam que o bagaço de malte é um resíduo facilmente obtido, além

de conter uma grande variedade de nutrientes e componentes renováveis valiosos. São subprodutos altamente úteis, cujo potencial biotecnológico indica que podem ser utilizados como matéria-prima em biorrefinarias (OUTEIRIÑO et al., 2019). Nesse sentido, uma vantagem competitiva do bagaço de malte é o fato de ele ser disponibilizado durante todo o ano a um baixo ou nenhum custo (WEGER et al., 2017) e em grandes quantidades (STURM et al., 2012).

Vale salientar que o bagaço de malte pode ser utilizado *in loco* nas próprias cervejarias, uma vez que grande quantidade de calor é requerida nos processos industriais, o que demanda grandes caldeiras alimentadas muitas vezes com combustíveis de origem fóssil (STURM et al., 2012). Em relação a esse aspecto, o bagaço de malte configura-se como uma fonte potencial para a combustão, desde que reduzido o seu teor de umidade a valores inferiores a 40% (CAETANO et al., 2013).

De fato, Weger et al. (2017), verificaram que a combustão da torta de grãos obtida após a prensagem e secagem convectiva do bagaço de malte, em um sistema de co-incineração com cavacos de madeira, seria capaz de gerar em torno de 44,5% da energia térmica demandada por uma cervejaria. Além da combustão direta, o bagaço de malte representa uma matéria-prima para a produção de outros produtos de maior interesse, tais como os bio-combustíveis.

Devido aos altos teores de açúcares contidos nesse material, ele pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia (MUSSATTO et al., 2006), bem como insumo em processos fermentativos para a produção de etanol (PANAGIOTOPOULOS et al., 2015). A conversão da biomassa lignocelulósica a produtos de valor agregado, utilizando uma abordagem de não desperdício, é um dos principais objetivos a serem considerados em uma biorrefinaria (CARVALHEIRO et al., 2005). Assim, uma eventual produção combinada ou simultânea de diferentes produtos poderia tornar o bioprocessamento economicamente eficiente (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012).

Interessante observar que além da energia térmica demandada em uma cervejaria, uma menor proporção de energia elétrica é necessária nos processos de fermentação e refrigeração do produto final (STURM et al., 2012). Em relação a esse aspecto, a queima do biogás produzido a partir da digestão anaeróbia do bagaço de malte em um sistema de co-geração de energias térmica e elétrica

(CHP), pode ser utilizada para suprir parcial ou integralmente a demanda energética da indústria.

Dentro desse contexto, Weger et al.(2017) realizaram uma simulação para uma cervejaria com capacidade produtiva para 20000 m³ de cerveja ao ano, e verificaram que a queima do biogás produzido a partir da digestão anaeróbia da fração líquida extraída após prensagem do bagaço de malte, em um sistema CHP, seria capaz de gerar 175 MWh de energia elétrica e 336 MWh de energia térmica anualmente. Considerando a energia térmica específica demandada por cervejarias (BLÜML, 2008 *apud* WEGER et al.,2016), esse montante de energia térmica gerada seria capaz de suprir cerca de 5,1% da produção anual analisada. Admitindo o consumo médio mensal de energia elétrica por residência no Brasil é de aproximadamente 150 kWh, o montante de energia elétrica recuperada seria capaz de suprir a demanda de aproximadamente 1167 residências.

Apesar das vantagens da biomassa como matéria-prima para a obtenção de produtos de valor agregado, em função de sua elevada complexidade estrutural, faz-se necessário muitas vezes, o uso de uma etapa de pré-tratamento desses materiais, para promover a separação de seus constituintes a fim de se obter bons rendimentos na conversão de produtos (SILVA, 2017).

4.5 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

A estrutura química do complexo de macro moléculas da biomassa lignocelulósica impede que esses materiais sejam convertidos diretamente a combustíveis e produtos de valor agregado (BAÊTA, 2016). Desintegração (ou fracionamento) é uma terminologia utilizada para designar as metodologias de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, no sentido de destruir a parede celular vegetal, aumentar a área superficial e liberar o conteúdo celular, a fim de melhorar a degradação do substrato e facilitar os processos microbiológicos de bioconversão (SCHUMACHER et al., 2014).

As metodologias para o fracionamento da biomassa lignocelulósica se dividem em físicas, químicas ou biológicas, podendo haver a combinação de mais de uma tecnologia (SCHUMACHER et al., 2014), de modo que cada tipo de pré-tratamento exerce um efeito específico sobre os constituintes da

biomassa (ZHANG e ZANG, 2016). O aspecto recalcitrante da matriz polimérica da biomassa lignocelulósica determina o quanto o material necessita de um pré-tratamento para aumentar a acessibilidade aos seus componentes (WON et al., 2012). Assim, o rendimento da conversão dos materiais lignocelulósicos a outros produtos depende da acessibilidade aos seus açúcares constituintes, seja ela por via enzimática, no caso de bioprocessos ou química, no caso de processos químicos (BAËTA, 2016).

Os pré-tratamentos exercem uma importante função na redução do índice de cristalinidade da celulose e no grau de polimerização dessa macromolécula (ZHANG e ZANG, 2016). Além disso, ao alterar a estrutura da matriz polimérica da biomassa, os pré-tratamentos solubilizam ou removem parte da hemicelulose e lignina (RUIZ et al., 2017). Desse modo a eficiência dos processos de pré-tratamento está vinculada a uma série de fatores, dentre os quais estão a temperatura, o tempo, a razão sólido-líquido (RLS), a dimensão das partículas, bem como o tipo e a concentração do catalizador utilizado (SANTIAGO, 2013).

Os fatores que devem ser considerados para a escolha do pré-tratamento ideal da biomassa são o custo, a simplicidade operacional, a facilidade de redução de partículas, o baixo consumo de energia, água e produtos químicos, a baixa corrosão de equipamentos, a capacidade de alterar a biomassa com mínimas perdas de açúcares, a possibilidade de geração de grandes quantidades de hemicelulose, a baixa geração de furanos (furfuraldeídos) e ácidos fenólicos, a obtenção de uma fração sólida com alto teor de celulose e alta susceptibilidade enzimática, a produção de lignina ou seus derivados com alta qualidade e a baixa geração de resíduos (VARGAS et al., 2016).

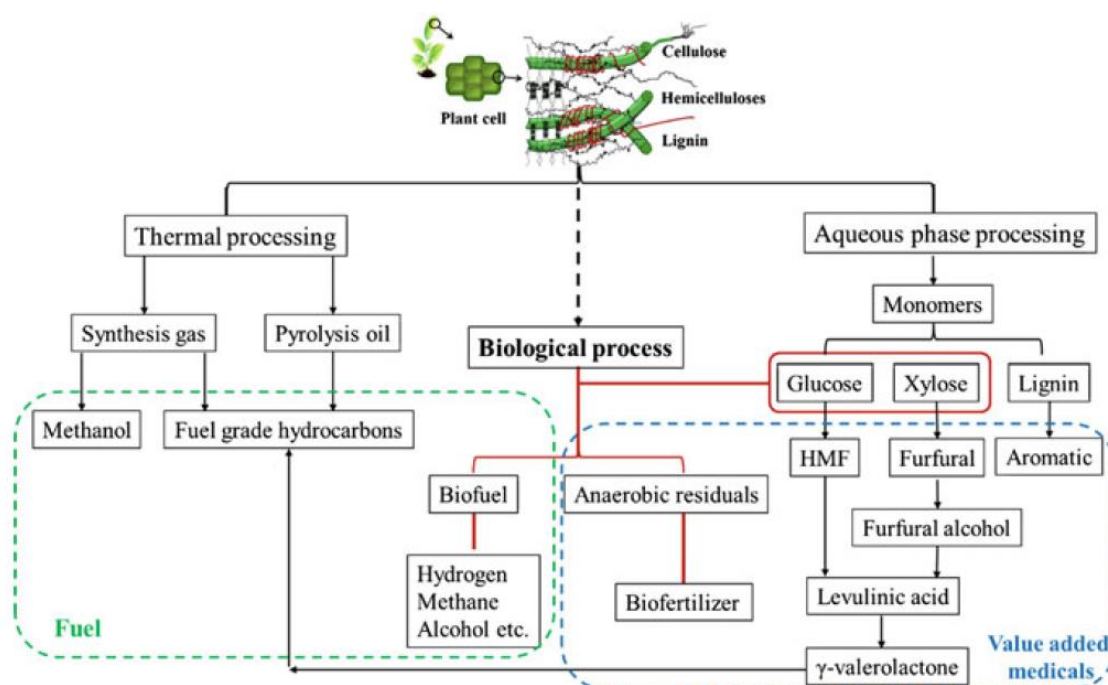
Abordagens biotecnológicas têm sido propostas para o fracionamento dos componentes do bagaço de malte com o objetivo de gerar oligossacarídeos, monossacarídeos, peptídeos, antioxidantes e lipídeos funcionais (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2012). Uma alternativa amplamente utilizada têm sido as metodologias de pré-tratamento termoquímico da biomassa lignocelulósica (WON et al., 2012).

Segundo Schumacher et al. (2014), dentre as vantagens do uso de técnicas de desintegração da biomassa estão o aumento do rendimento na produção de biogás devido a um aumento na área superficial da biomassa, a aceleração do processo de degradação do substrato, o que possibilita uma maior

capacidade de utilização do reator, além de serem evitadas camadas sedimentares ou flutuantes no reator, o que facilita o manejo e a automação de processos de alimentação, agitação e bombeamento.

O desenvolvimento de metodologias de pré-tratamento mais sustentáveis, eficientes, menos onerosas e que utilizem menores quantidades de produtos químicos é uma alternativa para tornar a conversão da biomassa em bioprodutos mais atrativa (LÓPEZ-LINARES et al., 2019). No entanto, o processo decisório através do qual se institui o pré-tratamento da biomassa depende de qual a aplicação está sendo direcionada para as frações sólida e líquida obtidas após tratamento. Os próximos tópicos descrevem aspectos da revisão da literatura em termos dos pré-tratamentos do bagaço de malte (BSG) e da palha de cevada (BS), bem como de suas utilidades, sobretudo com relação à produção de etanol e biogás. A Figura 7 demonstra uma representação esquemática através da qual a biomassa lignocelulósica pode, mediante o fracionamento de seus constituintes, ser inserida em uma cadeia produtiva de produtos de valor agregado dentro de um conceito de biorrefinaria.

Figura 7: Esquema representativo para a obtenção de produtos de valor agregado a partir da biomassa lignocelulósica (WANG e YIN, 2017).



4.5.1 Pré-tratamentos químicos

Os tratamentos termoquímicos são metodologias amplamente estudadas devido às suas potencialidades em aumentar a acessibilidade enzimática aos açúcares da biomassa (WON et al., 2012). As ligações glicosídicas entre os monômeros da celulose são susceptíveis à hidrólise na presença de um ácido como catalisador da reação (GURGEL, 2010). Desse modo, através dos pré-tratamentos com ácidos diluídos é possível converter a celulose em glicose e a hemicelulose em xilose e arabinose (WHITE et al., 2008).

No caso dos pré-tratamentos alcalinos, os principais mecanismos envolvidos nas reações são a quebra das ligações glicosídicas e a dissolução das ligações éster da parede celular, com consequentes mudanças na estrutura da biomassa e redução na cristalinidade da celulose (ZHANG e ZANG, 2016). Regauskas et al. (2014) mencionam que os tratamentos utilizando valores de pH elevados promovem a remoção de uma grande parte da lignina e uma menor quantidade de hemicelulose. Considerando as potencialidades dos pré-tratamentos químicos, muitos pesquisadores avaliaram a eficiência do uso de ácidos e bases, em relação ao fracionamento dos constituintes do bagaço de malte.

Conforme mencionado anteriormente, abordagens combinando mais de uma tecnologia podem ser feitas a fim de se obter melhores rendimentos. Esse foi o caso da pesquisa de Mussatto et al.(2007) e Mussatto et al.(2008), que realizaram dois pré-tratamentos termoquímicos do bagaço de malte, a fim de avaliarem respectivamente, a remoção de lignina e o rendimento da hidrólise enzimática. No primeiro pré-tratamento, os autores inseriram o bagaço em uma solução ácida de H_2SO_4 ($100 \text{ mg.g}^{-1}_{\text{BSG}}$), a 120°C durante 17 minutos, utilizando uma RLS de 8 g.g^{-1} . Posteriormente, os autores submeteram os sólidos pré-tratados a uma solução de NaOH ($2\% \text{ m.v}^{-1}$), a 120°C durante 90 minutos, utilizando uma RLS igual a 20 g.g^{-1} .

Mussatto et al.(2008), obtiveram 99,4% de rendimento da hidrólise enzimática, considerando a conversão de celulose a celobiose e glicose, e um rendimento de 93,1% em termos de glicose. Apesar dos bons resultados da hidrólise enzimática, a concentração de glicose no hidrolisado foi de apenas $20,1 \text{ g.L}^{-1}$, o que segundo os autores, é insuficiente para a produção de etanol ou

ácido láctico, onde as concentrações de glicose deveriam ser ao menos três vezes maiores.

Ainda se tratando de tecnologias combinadas, Caetano et al. (2013) avaliaram o tratamento termoquímico simultaneamente à hidrólise enzimática do bagaço de malte. Os autores utilizaram soluções de HCl (1% v.v⁻¹) e HNO₃ (1% v.v⁻¹) e também de HCl (1% v.v⁻¹) e H₂SO₄ (1% v.v⁻¹), temperaturas de 50°C e 75°C durante 30 minutos, RLS de 4 e 8 mL.g⁻¹, a uma velocidade de agitação de 75 rpm, submetendo a mistura a alguns coquetéis enzimáticos a fim de comparar seus rendimentos em termos da hidrólise de açúcares. O melhor resultado da hidrólise enzimática (72,1%) em termos da hidrólise de polissacarídeos, foram obtidos com o uso dos ácidos HCl e HNO₃.

Vale salientar que semelhantemente, White et al. (2008) verificaram que, em termos da recuperação de açúcares reduzidos, os pré-tratamentos ácidos do bagaço de malte com HCl ou HNO₃ foram mais efetivos do que aquele com H₂SO₄. Segundo os autores, tais pré-tratamentos também melhoraram a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, gerando rendimentos em torno de 39%, em termos de açúcares reduzidos, o que representou uma recuperação de açúcares em torno de 33% maior do que a obtida com o pré-tratamento com H₂SO₄. Na opinião dos autores, possivelmente a atividade nucleofílica dos íons cloreto e a ação oxidativa do ácido nítrico promoveram uma maior desestruturação da biomassa.

Marcolongo et al.(2014) também promoveram o pré-tratamento combinado do bagaço de malte, submetendo a biomassa a uma solução de amônia (NH₃) (10% v.v⁻¹), a 70°C durante 22 horas, utilizando uma RLS de 20 mL.g⁻¹, simultaneamente à ação de diferentes coquetéis enzimáticos a uma carga de 27,2 U.g⁻¹. A amônia possui a propriedade de clivar as ligações da lignina mas não necessariamente removê-la, aumentando a acessibilidade enzimática (REGAUSKAS et al., 2014). Marcolongo et al.(2014) obtiveram o maior rendimento da hidrólise enzimática (85,8%) em termos de xilose, utilizando o coquetel preparado com as enzimas celulase, celobiase, xilanase e arabinofuranosidase, isoladas a partir de diversos fungos.

Pierre et al.(2011) realizaram o fracionamento do bagaço de malte em três estágios, e avaliaram posteriormente a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados. Em um primeiro estágio, a biomassa foi inserida em uma solução de

H_2SO_4 (3% v.v⁻¹), a 120°C durante 60 minutos, para remover a hemicelulose e o amido da biomassa. Posteriormente, os autores submeteram os sólidos pré-tratados a uma solução de NaOH (2% m.v⁻¹), a 120°C durante 90 minutos, utilizando uma RLS de 20 g.g⁻¹. Em um terceiro estágio, os autores submeteram os sólidos ao pré-tratamento por explosão a vapor. Utilizando essa metodologia, os autores conseguiram obter um rendimento da hidrólise enzimática aproximadamente igual ao máximo teórico. No entanto, é válido ressaltar que este tipo de combinação de pré-tratamento pode implicar em elevados custos de operação.

A fim de avaliar a produção de biogás a partir dos sólidos pré-tratados, Sežun et al.(2011) compararam os efeitos dos pré-tratamentos ácido ou alcalino do bagaço de malte. Para isso, os autores submeteram a biomassa às soluções de NaOH (20% m.v⁻¹) ou HCl (37% v.v⁻¹), a temperatura ambiente durante 5 dias. Nesse caso, a maior taxa de produção média de biogás foi de 1,21 m³.m⁻³.dia⁻¹ (tratamento ácido), porém esse valor foi apenas 10% maior do que a taxa de produção de biogás obtida com o bagaço sem tratamento.

Outra abordagem visando a digestão anaeróbia dos sólidos pré-tratados foi realizada por Kan et al.(2018), que avaliaram a produção de metano após o pré-tratamento combinado do bagaço de malte, utilizando a ação de micro-ondas simultaneamente ao tratamento alcalino. Os autores observaram que a maior produção de metano (0,73 Nm³.kg⁻¹_{sv}) foi obtida utilizando a potência de 40 W, o tempo de reação de 4 minutos e relação mássica entre NaOH e biomassa (A/B) de 0,25 g.g⁻¹.

Semelhantemente, Poladyam et al.(2018) compararam a produção de hidrogênio (H₂) a partir de pré-tratamentos ácidos ou alcalinos. Nesses casos, os autores utilizaram a temperatura de 121°C, RLS entre 10 e 100 mL.g⁻¹, concentrações entre 0,5 a 3%, em que foram avaliados os ácidos clorídrico e sulfúrico, e os hidróxidos de sódio e potássio. Os autores verificaram que a maior produção de H₂ (175 mL em 12 horas) foi obtida utilizando H₂SO₄ (0,7% v.v⁻¹) e uma RLS de 25 mL.g⁻¹.

Na tabela 2 são sumarizados os melhores resultados obtidos com os pré-tratamentos químicos do bagaço de malte (BSG) e da palha de cevada (BS), de acordo com os autores consultados na revisão de literatura.

Tabela 2: Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos químicos do BSG e da BS de segundo os autores consultados na revisão de literatura (início).

Referência	BM	Pré-Tratamento	Condições do processo	Resultados obtidos
Beldman et al. (1986)	BSG	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ ou NaOH (0,5N), RLS 8 mL.g ⁻¹ , 90°C, 4 horas/ Biocellulase A.C. (1% (m.m ⁻¹) e Cellulase “2230A” (1% m.m ⁻¹), 40°C, 70 horas, RLS 10 mL.g ⁻¹	Hidrólise de 85% dos carboidratos da biomassa
Lopez et al. (1995)	BS	Alcalina	NaOH (13%), 60°C, 2 horas	Remoção de 57% de hemicelulose
Mussatto et al. (2007)	BSG	Ácido / Alcalino	H ₂ SO ₄ , 120°C, 17 minutos, RLS 8 g.g ⁻¹ , 100 mg.g ⁻¹ _{BSG} / NaOH (2% m.v ⁻¹), 120°C, 90 minutos, RLS 20 g.g ⁻¹	Remoção de 81,43% da lignina da biomassa
White et al. (2008)	BSG	Ácido / Enzimático	HNO ₃ (0,16 N), 121°C (autoclave), 15 minutos / Cellulase (6% m.m ⁻¹), β-Glucosidade (0,6% m.m ⁻¹), Xylanase (0,5% m.m ⁻¹), Hemicellulase (0,4% m.m ⁻¹), 50°C, 18 horas, 130 rpm	Rendimento de etanol de 320 g _{ETANOL} .kg ⁻¹ _{BSG}
Kan et al. (2018)	BSG	Micro-ondas e Alcalino	40 W, 4 minutos, relação A/B de 0,25 g.g ⁻¹	Rendimento 0,73 Nm ³ .kg ⁻¹ _{sv} de metano
Xiros et al. (2008)	BSG	Alcalino / Enzimático	NaOH (10% m.v ⁻¹), 121°C (autoclave), RLS 8 mL.g ⁻¹ , 30 minutos/ Celluclast 1.5 L e Ultraflo L	Rendimento de etanol de 65 g.kg ⁻¹ _{BSG}
Mussatto et al. (2008)	BSG	Ácido / Alcalino / Enzimático	H ₂ SO ₄ , 120°C, 17 minutos, RLS 8 g.g ⁻¹ , 100 mg.g ⁻¹ _{BSG} / NaOH (2% m.v ⁻¹), 120°C, 90 minutos, RLS 20 g.g ⁻¹ / 45 FPU.g ⁻¹ de Celluclast 1,5L, 45°C, 96 horas, RLS 50 mL.g ⁻¹ , 100 rpm	Rendimento da hidrólise de 93,1% em termos de glicose

Tabela 2: Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos químicos do BSG e da BS de segundo os autores consultados na revisão de literatura (continuação).

Referência	BM	Pré-Tratamento	Condições do processo	Resultados obtidos
Panagiotopoulos et al. (2009)	BS / BSG	Ácido (BS) / Enzimático (BSG)	H ₂ SO ₄ (1,8%), RLS 10 mL.g ⁻¹ , 170°C por 30 minutos (BS) / α -amilase Termamyl 120 (1,2% m.m ⁻¹) e da glicoamilase AMG300 (2,4% m.m ⁻¹) (BSG)	Produções de hidrogênio 123% (BS) e 85% (BSG) maiores do que nas amostras controle
Xiros e Christakopoulos (2009)	BSG	Alcalino	NaOH (10% m.v ⁻¹), 121°C (autoclave), 30 minutos, RLS 8 mL.g ⁻¹	Rendimento de etanol de 109 g.kg ⁻¹ BSG
Kim et al. (2011)	BS	Organossolve (catalisado) / Enzimático	Etanol (50%), H ₂ SO ₄ (0,1%), 0,1 mol FeCl ₃ .L ⁻¹ , 170°C, 60 minutos / Celluclast 1.5L (20 FPU.g ⁻¹ cel.) e β -glucosidase (40 CBU. g ⁻¹ cel.), 50°C, 150 rpm	Rendimento da hidrólise de 85,38% em termos de glicose
Kim et al. (2011a)	BS	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ (1,16%), 150°C, 17 minutos / Celluclast 1.5L e Novozyme 188, 60 FPU.g ⁻¹ cel., (proporção 4:1), 45°C, 72 horas, 150 rpm	Rendimento de etanol de 90%
Sežun et al.(2011)	BSG	Ácido	HCl (37% v.v ⁻¹), 5 dias a temperatura ambiente e aquecimento (140°C), 2 horas	Taxa de produção média de biogás de 1,21 m ³ .m ⁻³ .dia ⁻¹
Sáez et al. (2012)	BS	Líquido iônico	1-acetato de etil-3-metilimidazólio, 110°C, 30 minutos	Rendimento de etanol de 86%
Panagiotopoulos et al. (2012)	BS	Ácido / Enzimático	H ₃ PO ₄ (1% v.v ⁻¹), 160°C, 30 minutos, RLS 10 mL.g ⁻¹ / Celulase (CG 220), 30 FPU.g ⁻¹ , 50°C, 24 horas	Rendimento de 40 mmol.L ⁻¹ de hidrogênio

Tabela 2: Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos químicos do BSG e da BS de segundo os autores consultados na revisão de literatura (continuação).

Referência	BM	Pré-Tratamento	Condições do processo	Resultados obtidos
Panagiotopoulos et al. (2012a)	BS	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ (2% v.v ⁻¹), 180°C, 30 minutos, RLS 10 mL.g ⁻¹ / Celulase CG 220, 45 FPU.g ⁻¹ , 50°C, 24 horas, RLS 10 mL.g ⁻¹ , 170 rpm	Rendimento de 70,6% em termos de açúcares reduzidos
Won et al. (2012)	BS	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ (1% v.v ⁻¹), 158°C, 15 minutos / Celluclast 1.5L e Novozyme 188, 60 FPU.g ⁻¹ , 50°C, 120 rpm	Rendimento de 70,8% em termos de glicose
Duque et al. (2013)	BS	Alcalino /Enzimático	NaOH (10%), 68°C, RLS 17 mL.g ⁻¹ / Celulase e xilanase (9:1), 15 FPU.g ⁻¹ , 50°C, 72 horas, RLS 20 mL.g ⁻¹ , 150 rpm	Rendimento de 90% em termos de glicose
Han et al. (2013)	BS	Alcalino / Enzimático	NaOH (0,58 mol.L ⁻¹), 86,6°C, 84,8 mL _{NaOH} .min ⁻¹ / Cellic CTec 2 (30 FPU.g ⁻¹ _{cel}), Cellic HTec 2 (15% g.g ⁻¹ _{CTec}), 50°C, 48 horas, 150 rpm	Rendimento de etanol de 89,75%
Santiago (2013)	BSG	Alcalino / Enzimático	NaOH(0,5%), 60°C, 100 minutos / Cellubrix (25 FPU.g ⁻¹), Novozyme 188 (25 Ui.g ⁻¹), 45°C, 12 horas, 100 rpm	Concentração de glicose de 22 g.L ⁻¹ após a sacarificação enzimática
Wu et al. (2013)	BS	Ozonização / Enzimático	11 psi, 0,63 L _{PADRÃO} .minuto ⁻¹ , 40% de umidade, 45 minutos / NS22086 (5% m.m ⁻¹), NS22083 (0,2% m.m ⁻¹), NS22118 (0,6% m.m ⁻¹), 50°C, 120 rpm	Produção de hidrogênio 166% maior do que na amostra controle
Yang et al. (2013)	BS	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ (1,5%), 121°C (autoclave), 60 minutos, RLS 10 mL.g ⁻¹ / Celluclast 1.5L (10 FPU.g ⁻¹), Novozyme 188 (200 nkat.g ⁻¹), 50°C, 48 horas, 200 rpm	Rendimento de 96% em termos de glicose

Tabela 2: Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos químicos do BSG e da BS de segundo os autores consultados na revisão de literatura (continuação).

Referência	BM	Pré-tratamento	Condições do processo	Resultados obtidos
Caetano et al. (2013)	BSG	Ácido e enzimático	HCl (1% v.v ⁻¹), 75°C, 30 minutos, RLS 4mL.g ⁻¹ , 75 rpm, 2,5 g de Glucanex 100g, pH 4,5 / HNO ₃ (1% v.v ⁻¹), 50°C, 30 minutos, RLS 8mL.g ⁻¹ , 75 rpm, 2,3 mL de Ultraflo L, pH 6	Rendimento da hidrólise de açúcares de 72,1%
Duque et al. (2014)	BS	Alcalino / Enzimático	NaOH (8%), 68°C, 20% de sólidos, 150 rpm / Celulase (8 FPU.g ⁻¹) e xilanase (9:1), 50°C, 48 horas, 150 rpm	Rendimento de etanol de 110 g.kg ⁻¹
Sheikh et al. (2014)	BS	Oxidativo / Enzimático	Solução de NaClO e H ₂ O ₂ (10:1) a 2%, 121°C, 30 minutos / Celluclast 1.5L e Novozyme 188	Rendimento de etanol de 186 g.kg ⁻¹
Vandenbossche et al. (2014)	BS	Alcalino / Enzimático	NaOH (7,5%), RLS 12 g.g ⁻¹ , 68°C, 150 rpm / coquetel enzimático (não especificado)	Rendimento de 38% em termos de glicose
Wilkinson et al. (2014)	BSG	Alcalino / Enzimático	NaOH (5% m.v ⁻¹), 50°C, 12 horas, RLS 4 mL.g ⁻¹ / Celluclast 1.5L (0,2 mL.g ⁻¹), Cellic CTec 2 (0,5 mL.g ⁻¹), 50°C, 24 horas, 150 rpm	Rendimento de mais de 90% em termos de glicose
Marcolongo et al. (2014)	BSG	Alcalino e enzimático (simultâneos)	NH ₃ (10% v.v ⁻¹), 70°C, 22 horas, RLS 20 mL.g ⁻¹ , 27,2 U.g ⁻¹ , ATCC26921 (5,4 U.g ⁻¹), celobiase (<i>A. niger</i>) (145 U.g ⁻¹), xilanase (<i>T. viride</i>) (80 U.g ⁻¹), β-xilosidade termoestável (8 U.g ⁻¹), α-L-arabinofuranosidae (<i>P. pastoris</i>), 50°C, 72 horas, 140 rpm	Rendimento de 85,5% em termos de xilose
Yang et al. (2015)	BS	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ (2%), 121°C (autoclave), 60 minutos / Celluclast 1.5L e Novozyme 188, endo-1,4-b-xilanase (<i>T. longibrachiatum</i>), PEG 4000 (surfactante), 50°C, 48 horas, 200 rpm	Rendimento 86,9% em termos de glicose

Tabela 2: Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos químicos do BSG e da BS de segundo os autores consultados na revisão de literatura (final).

Referência	BM	Pré-tratamento	Condições do processo	Resultados obtidos
Wolters et al. (2016)	BSG	Ácido / Biológico	H ₂ SO ₄ (0,1 mol.L ⁻¹), 121°C (autoclave), 20 minutos, RLS 10 mL.g ⁻¹ / <i>H. erinaceus</i>	Rendimento de erinacina C de 569,1 mg.L ⁻¹
Fabicovicová et al. (2016)	BS	Organossolve com catalizador (Ru-W/AC)	Etanol (50%), 170°C, 150 minutos	Rendimentos de polióis de 70%
Wilkinson et al. (2016)	BSG	Ácido	HCL (1%), 121°C, 30 minutos	Rendimento de etanol de 36,8%
Plaza et al. (2017)	BSG	Ácido / Enzimático	H ₂ SO ₄ (1 mol.L ⁻¹), 121°C (autoclave), 30 minutos, RLS 7 mL.g ⁻¹ / Celluclast 1.5L (15 FPU.g ⁻¹), Novozyme 188 (15 IU.g ⁻¹), 50°C, 48 horas, RLS 10 mL.g ⁻¹ , 150 rpm	Rendimento de butanol de 75 g.kg ⁻¹
Schneider et al. (2017)	BS	Ácido / Mecânico	Ácido oxálico di-hidratado (1 mol.kg ⁻¹) sob agitação / Moagem em minho de bolas, 20 minutos / H ₂ SO ₄ (1 mol.kg ⁻¹), 130°C, 60 minutos	Rendimento de açúcares reduzidos de 53,4%
Procentese et al.(2018)	BSG	Líquido iônico / Enzimático	Glicinato de colina, 150°C, 3 horas, RLS 32 mL.g ⁻¹ / Cellic CTec 2 (15 mg.g ⁻¹ _{cel}) e Amylase (10 U.g ⁻¹ _{BSG})	Rendimento de 94,1% em termos açúcares reduzidos
Qin et al. (2018)	BSG	Alcalino / Ácido	NaOH (110 mmol.L ⁻¹), 50°C, 60 minutos, RLS 20 mL.g ⁻¹ , 200 rpm / H ₂ SO ₄ (1 mol.L ⁻¹), 25°C, 1 hora, 250 rpm	Rendimento de 95% na solubilização de proteínas
Poladyan et al. (2018)	BSG	Ácido	H ₂ SO ₄ (0,7% v.v ⁻¹), 121°C (autoclave), 25 mL.g ⁻¹	172 mL de H ₂ (12 horas)
Paz et al. (2019)	BSG	Alcalino / Enzimático	NaOH (0,5 mol.L ⁻¹), 50°C, 4 horas, 160 rpm/ Ultraflo L. (25 U.mL ⁻¹), 40°C, 120 horas, 270 rpm	Rendimento de 31,73% em termos de glicose

A maior parte dos autores consultados na revisão de literatura utilizaram os pré-tratamentos químicos do bagaço de malte (BSG) ou da palha de cevada (BS), seguidos da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados para a obtenção de açúcares fermentescíveis e posterior produção de etanol. Conforme mencionado anteriormente, os tratamentos químicos são mais usuais devido à alta susceptibilidade de quebra das ligações glicosídicas aos tratamentos ácidos, bem como devido à alta remoção de lignina mediante condições alcalinas. Ou seja, os tratamentos químicos são bastante favoráveis à obtenção de açúcares fermentescíveis e à redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Contudo, a viabilidade econômica destes pré-tratamentos deve considerar aspectos como os custos de aquisição e recuperação de produtos químicos, bem como os custos envolvidos na construção de reatores, por ser necessária a utilização de materiais anti-corrosivos. Embora a produção de etanol a partir do BSG e BS tenha sido pesquisada apenas desde a metade da década de 80, muitos proveitos foram conseguidos ao longo de pouco mais de três décadas de estudos, tais como metodologias combinadas de pré-tratamento e ação conjunta de enzimas, a fim de se obter melhores rendimentos de etanol.

4.5.2 Pré-tratamentos físicos

Indiretamente, muitos pesquisadores utilizam algum tipo de pré-tratamento físico da biomassa, selecionando partículas de certas dimensões para submetê-las a algum tipo de tratamento posterior. Por exemplo, Peces et al.(2015) realizaram a separação granulométrica das frações do bagaço de malte, e verificaram que 61% eram partículas com dimensões entre 2 e 5 milímetros (mm) e 34% eram partículas com dimensões entre 1 e 2 mm. Interessante observar que os testes de potencial bioquímico de metano (BMP) após a separação granulométrica das partículas de palha de cevada, demonstraram produções de metano de 330 L.kg⁻¹_{sv} para as partículas com 4 mm e de 270 L.kg⁻¹_{sv} para aquelas com 1 mm nos testes de BMP (LIU et al., 2017). Semelhantemente, Sežun et al.(2011) realizaram a seleção de partículas de bagaço de malte com dimensões inferiores a 0,5 milímetros, a fim de averiguar a eficácia dos pré-tratamentos com relação à produção de biogás.

Porém, os autores verificaram que as taxas de produção média de biogás, tanto no bagaço bruto quanto no bagaço tratado fisicamente foram as mesmas.

Além da trituração, moagem ou separação granulométrica tem-se outras possibilidades como a extrusão, a ação de micro-ondas, a sonificação e a prensagem. Por exemplo, Beldman et al.(1986) compararam a moagem e a extrusão do bagaço de malte, a fim de avaliar a eficiência dos pré-tratamentos químicos e enzimáticos posteriores. No primeiro caso, os autores submeteram material a um moinho de martelo e posterior separação das partículas com dimensões inferiores a 0,5 milímetros. A segunda metodologia foi submeter o material a um extrusor de parafuso simples, com uma razão de compressão de 33%, utilizando velocidades entre 45 e 105 rpm e temperaturas de 170°C. Segundo Beldman et al.(1986), os pré-tratamentos físicos do bagaço de malte transformaram a macroestrutura desse subproduto em pequenos fragmentos, de modo que, no caso da moagem e trituração, a hidrólise de carboidratos foi 10% e 18% maiores respectivamente, do que no caso do bagaço sem tratamento.

No caso dos pré-tratamentos utilizando micro-ondas, os dois principais mecanismos do pré-tratamento são a rotação do dipolo e a condução iônica (LÓPEZ-LINARES et al., 2019). De acordo com os autores, o pré-tratamento por micro-ondas possui algumas vantagens comparativamente ao aquecimento convencional, tais como menores tempos, aquecimento uniforme, simplicidade de processo, alta remoção de grupos acetila da hemicelulose além de menor geração de compostos inibitórios (ácido acético, ácido fórmico, HMF e FF). Alguns autores utilizaram o tratamento do bagaço de malte utilizando a ação de micro-ondas, combinado com outros tratamentos (RACHBAUE et al., 2015; PATEL et al., 2018; LÓPEZ-LINARES et al., 2019).

Peces et al.(2015) avaliaram a produção de biogás a partir do pré-tratamento por sonificação do bagaço de malte. Nesse caso, os autores utilizaram partículas com dimensões distintas, RLS variando entre 4,5 e 16,5 mL.g⁻¹, temperaturas de 60° e 80°C, tempos de reação entre 12 e 72 horas e energias específicas do sistema de ultrassom entre 1000 e 50000 kJ.kg⁻¹_{ST}. A avaliação energética do pré-tratamento indicou que na condição mais favorável (60°C, 12 horas, 12 mL.g⁻¹, 1000 kJ.kg⁻¹_{ST}) houve um maior consumo energético do que a energia recuperada a partir da queima do biogás. Nessa condição,

houve um pequeno incremento na produção específica de metano mas nenhum impacto sobre a cinética química do processo.

Estudo interessante foi realizado por Weger et al.(2017), que promoveram a prensagem do bagaço de malte obtido após a filtração do mosto, e procederam a sua secagem convectiva, de modo que simplesmente com esse processo os autores conseguiram reduzir o teor de umidade dos grãos de 80% para 12%. Após esse processo, os autores obtiveram uma torta de grãos com um poder calorífero inferior de 20 MJ.kg⁻¹, que em um sistema de co-incineração com cavacos de madeira seria capaz de gerar 44,5% da energia térmica demandada pela própria indústria que forneceu o bagaço de malte (WEGER et al., 2017).

Além disso, Weger et al.(2017) verificaram uma produção máxima de metano de 717 L.kg⁻¹_{SV} a partir da digestão anaeróbia da fase líquida removida após a prensagem do bagaço de malte. Os parâmetros operacionais utilizados nessa condição foram um tempo de retenção de sólidos de 33 dias e uma taxa de alimentação orgânica de 2,1 kg_{SV}.m⁻³.dia⁻¹. Segundo os autores, considerando uma concentração de metano de 65%, a queima do volume de biogás produzido, em um sistema de CHP (*combined heat and power*) seria capaz de gerar um saldo de 17 MWh de energia elétrica e 113 MWh de energia térmica, admitindo apenas o consumo energético da planta de digestão anaeróbia.

Interessante observar que no estudo realizado por Weger et al.(2017), o simples tratamento mecânico foi suficiente para remover grande parte dos açúcares não-ligados do bagaço de malte. Isso aponta a perspectiva de que o processo de produção de cerveja culmina por promover a adsorção de oligômeros e açúcares monoméricos na superfície da biomassa, cujo potencial biotecnológico pode ser utilizado para a produção de biocombustíveis utilizando processos de pré-tratamento térmico de baixa severidade.

4.5.3 Pré-tratamentos biológicos

As tecnologias atuais de conversão da biomassa lignocelulósica a etanol requerem a ação de enzimas para a conversão do substrato a açúcares fermentescíveis (XIROS e CHRISTAKOPOULOS, 2009; PIERRE et al., 2011). Em materiais como o bagaço de malte, a ação enzimática se limita à barreira

imposta pela matriz lignocelulósica e pela cristalinidade da celulose (BELDMAN et al., 1986). Por esse motivo, na maioria dos estudos direcionados à produção de álcoois alifáticos, a hidrólise enzimática ocorre após uma etapa de pré-tratamento.

Para se atingir altos rendimentos na hidrólise enzimática é necessário ajustar cuidadosamente uma mistura de enzimas que atuam na matriz polimérica da biomassa (MARCOLONGO et al., 2014). Nesse sentido, os autores mencionam que celulases, xilanases e outras enzimas complementares, tais como arabinofuranosidades, pectinases e manases são necessárias para a conversão da biomassa à açúcares fermentescíveis.

A bioconversão do bagaço de malte a açúcares fermentescíveis (hexoses) para a produção de etanol demanda a utilização de celulases (SANTIAGO, 2013), que possuem três grupos de enzimas que atuam sinergicamente sobre a hidrólise da celulose (β -1,4-endoglucanases, β -1,4-exoglucanases e as β -glicosidades) (PIERRE et al., 2011). Isso é necessário, pois, as leveduras tradicionalmente utilizadas na indústria alcooleira (*Saccharomyces cerevisiae*) não utilizam pentoses (xilose e arabinose) como fontes de açúcar (WHITE et al., 2008).

De acordo com Pierre et al.(2011), as endoglucanases atacam regiões de baixa cristalinidade da celulose, criando extremidades de cadeia livre ao longo da macromolécula, enquanto as exoglucanases (celobioidrolases) removem moléculas de celobiose a partir das extremidades livres das cadeias de celulose. Por fim, os autores mencionam que as β -glicosidades hidrolisam as moléculas de celobiose, produzindo monômeros de glicose.

Muitos pesquisadores investigaram o tratamento enzimático do bagaço de malte, a fim de fracionar seus constituintes para diversas finalidades. Por exemplo, Qin et al.(2018) investigaram, dentre várias metodologias de pré-tratamento do bagaço de malte, a hidrólise enzimática, a fim de avaliar a solubilização de proteínas. Nesse caso, os autores avaliaram a ação da enzima comercial Alcalase® 2.41 (P4860), produzida a partir das bactérias do gênero *Bacillus licheniformis*, utilizando uma carga enzimática de 7,415 U.g⁻¹_{BSG}, a 60°C durante 24 horas, a uma velocidade de agitação de 250 rpm. O valor de rendimento da hidrólise enzimática obtido nesse caso, foi de apenas 50%.

Em muitos casos, as pesquisas são direcionadas para comparar os rendimentos da hidrólise enzimática com o uso de enzimas ou pré-tratamentos distintos. Por exemplo, Paz et al.(2019) compararam a hidrólise enzimática do bagaço de malte sem tratamento, do bagaço lavado a 50°C por 4 horas e do bagaço após tratamento alcalino, comparando os rendimentos obtidos a partir de três preparados enzimáticos. Porém, em todas as situações avaliadas, não observou-se uma boa conversão de celulose a glicose, o que Paz et al.(2019) atribuem à interferência causada pela maltose da biomassa. O maior rendimento da hidrólise enzimática foi 31,73% de conversão de glicanas à glicose e 37,05% de conversão de xilanas à xilose, a partir da enzima comercial Ultraflo® L (Novozymes) utilizando uma carga enzimática de 25 U.mL⁻¹.

Muitas pesquisas são direcionadas para averiguar o rendimento da hidrólise de açúcares a partir do uso de coquetéis enzimáticos, preparados com enzimas distintas em certas proporções. Como é o caso da pesquisa realizada por Xiros et al.(2008), que submeteram o bagaço de malte pré-tratado à ação de um coquetel enzimático preparado com as enzimas Celluclast 1.5 L e Ultraflo L (Novozyme), utilizando a mesma proporção entre as enzimas.

Caetano et al.(2013) avaliaram a hidrólise enzimática simultaneamente ao pré-tratamento ácido do bagaço de malte. Os autores compararam os rendimentos da enzima Viscozyme L (Sigma Aldrich) com os rendimentos de dois coquetéis enzimáticos, sendo o primeiro deles preparado a partir das enzimas Cellulase e Hemicellulase (Sigma Aldrich) isoladas dos fungos do gênero *Aspergillus niger*, e o segundo preparado com as enzimas Glucanex 100g e Ultraflo L (Novozyme). O maior rendimento da hidrólise de polissacarídeos foi de 72,1%, utilizando primeiramente o pré-tratamento com HCl (1% v.v⁻¹) e a enzima Glucanez 100g, ajustando o pH a 4,5, e em um segundo estágio utilizando o ácido HNO₃ (1% v.v⁻¹) e a enzima Ultraflo L, ajustando o pH para 6.

López-Linares et al.(2019) avaliaram a ação da enzima Cellic CTec 2 (Novozyme) sobre o bagaço de malte pré-tratado por micro-ondas e tratamento hidrotérmico simultaneamente, utilizando uma carga enzimática de 15 FPU.g⁻¹. Na condição mais favorável do planejamento experimental (192,7°C e 5,4 minutos), houve um rendimento da hidrólise enzimática de 82% em relação à solubilização dos polissacarídeos da biomassa pré-tratada.

Pierre et al.(2011) avaliaram a hidrólise enzimática do bagaço de malte pré-tratado termoquimicamente e posteriormente por explosão a vapor. Nesse caso, os autores procederam a adição de enzimas em três etapas distintas. Na primeira delas, os sólidos foram submetidos a um coquetel enzimático contendo 32 U.L⁻¹ da enzima Fungamyl® 800L, que é uma α -amilase isolada dos fungos do gênero *Aspergillus orizae*, a 50°C durante 120 minutos. Na segunda etapa, os sólidos foram submetidos a uma carga de 1,5 U.L⁻¹ da enzima AMG 300L, que é uma glicoamilase obtida a partir dos fungos do gênero *Aspergillus niger*, a 65°C durante 60 minutos. Na etapa final, os sólidos foram submetidos a ação da enzima Celluclast® 1,5L, utilizando uma carga de 480 FPU.L⁻¹, suplementada com a enzima Novozyme® 188 a uma carga de 125 FPU.L⁻¹, a 50°C por 20 horas, sob uma velocidade de agitação de 600 rpm. Os autores verificaram que na condição otimizada do pré-tratamento por explosão a vapor, o rendimento da hidrólise enzimática foi próximo ao valor máximo teórico.

Interessante salientar o estudo de Mussatto et al.(2008), que através de um planejamento experimental, investigaram os parâmetros operacionais mais favoráveis à hidrólise enzimática do bagaço de malte pré-tratado. Nesse caso, os autores utilizaram cargas enzimáticas de 5, 25 e 45 FPU.g⁻¹, velocidades de agitação de 100, 150 e 200 rpm e RLS de 12, 20 e 50 mL.g⁻¹, com a enzima comercial Celluclast® 1.5L (Novozymes), extraída a partir dos fungos do gênero *Trichoderma reesei*. Os autores verificaram uma conversão de 93,1% de conversão de celulose a glicose, e 99,4% de conversão de celulose a celobiose e glicose, utilizando uma carga enzimática de 45 FPU.g⁻¹, velocidade de agitação de 100 rpm e RLS de 50 mL.g⁻¹, com uma concentração de glicose no hidrolisado de 20,1 g.L⁻¹.

A Tabela 2 (descrita no item 4.5.1) e a Tabela 3 (descrita no item 4.5.4) apontam que na maioria dos casos, os tratamentos enzimáticos que proporcionaram os maiores rendimentos, em termos da recuperação de glicose para a produção de etanol, foram aqueles que utilizaram coquetéis contendo as enzimas Celluclast 1.5L e Novozym 188. Além disso, os melhores rendimentos em termos da produção de etanol foram obtidos em pesquisas que abordaram a combinação de mais de uma metodologia de pré-tratamento da biomassa. Isso aponta a possibilidade da existência de componentes que impedem a

acessibilidade enzimática aos açúcares da biomassa, tais como a hemicelulose, a lignina e as proteínas.

4.5.4 Pré-tratamentos hidrotérmicos

Processos hidrotérmicos (auto-hidrólise e explosão à vapor) são tecnologias que utilizam água a altas temperaturas (150 a 220°C) e pressões (5 a 20 bar) com RLS entre 5 e 15 mL.g⁻¹ para promover o pré-tratamento da biomassa, a partir da extração, hidrólise ou modificação estrutural de seus componentes (RUIZ et al., 2017). Uma vantagem dos pré-tratamentos hidrotérmicos é o fato de serem menos onerosos do que outras metodologias, por não demandarem a aquisição de produtos químicos nem tampouco requererem materiais anti-corrosivos para a construção de reatores (LÓPEZ-LINARES et al., 2019).

O principal efeito dos tratamentos hidrotérmicos sobre a biomassa lignocelulósica é a solubilização da fração hemicelulósica, produzindo intermediários a um baixo custo operacional (RUIZ et al., 2017). De acordo com os autores, o uso do fator de severidade em processos hidrotérmicos tem se tornado comum para compreender interações entre temperatura e tempo de reação sobre as mudanças na ultraestrutura da biomassa.

Durante a auto-hidrólise, a biomassa encontra-se em condições em que o íon hidrônio (H⁺) é gerado a partir da auto-dissociação da água, levando à formação de ácido acético a partir das xilanas acetiladas (MICHELIN e TEIXEIRA, 2014). Nesse processo, a hemicelulose é hidrolisada através de reações catalisadas pelo H⁺ presente no meio aquoso (CARVALHEIRO et al., 2005).

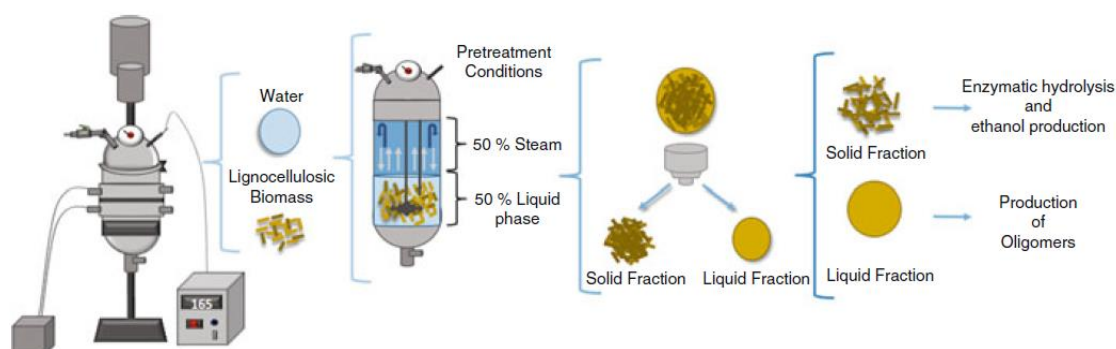
A temperatura e o tempo de reação são proporcionais à solubilização da biomassa, de tal forma que os produtos solúveis da hidrólise ácida são complexos e mudam conforme a severidade do pré-tratamento (RUIZ et al., 2017). Segundo os autores, oligossacarídeos podem ser hidrolisados em seus monômeros constituintes e as hemiceluloses sofrem reações de desacetilação. Concomitantemente à solubilização das hemiceluloses ocorre a hidratação das moléculas de celulose e a remoção parcial da lignina, aumentando a biodegradabilidade do material e a ação enzimática (BAÊTA, 2016).

No caso da explosão a vapor, ocorre a hidrólise parcial da hemicelulose, a despolimerização da lignina e a desestruturação da celulose (PIERRE et al., 2011). Nessas condições, os componentes da biomassa sofrem muitas reações paralelas, como desacetilação e hidrólise das hemiceluloses, clivagem da cadeia de celulose, degradação e solubilização da lignina, neutralização ácida por cinzas e remoção de extrativos (RUIZ et al., 2017).

No início do pré-tratamento hidrotérmico as concentrações de monômeros e oligômeros aumentam com o incremento da temperatura e o tempo de reação até o momento em que as reações de desidratação desses açúcares, formando HMF e FF (furfuraldeídos) tornam-se significantes (RUIZ et al., 2017). Carvalheiro et al. (2004) mencionam que a auto-hidrólise pode representar uma tecnologia promissora através da qual o bagaço de malte pode ser inserido na cadeia produtiva de ingredientes úteis à indústria alimentícia, por exemplo com a produção de oligossacarídeos funcionais.

Uma melhoria em termos dos rendimentos do processo de auto-hidrólise fundamenta-se na compreensão da cinética do processo e os possíveis mecanismos envolvidos no fracionamento dos constituintes da biomassa lignocelulósica (CARVALHEIRO et al., 2005). A Figura 8 representa um esquema representativo do pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica.

Figura 8: Esquema representativo do pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica (RUIZ et al., 2017).



Muitos pesquisadores investigaram os processos de tratamento hidrotérmico da biomassa para diversos fins. Interessante observar que Paz et al.(2019) realizaram o simples aquecimento do bagaço de malte com água a 50°C durante 4 horas, a uma velocidade de agitação de 160 rpm, a fim de avaliar

o teor de açúcares extraídos nesse processo bem como para evitar erros de medição. De acordo com os autores, as análises da água de lavagem do bagaço de malte indicaram uma concentração de $3,71 \text{ g.L}^{-1}$ de maltose.

Paz et al.(2019) verificaram que, em termos da caracterização da biomassa, houve uma diferença significativa entre a biomassa bruta e a biomassa lavada, em termos dos teores de extrativos, cinzas, celulose e hemicelulose. Nesse caso, os autores verificaram que os teores de glicose foram de 22,45% e 32,84%, e os teores de hemicelulose foram de 33,78% e 25,85%, respectivamente na biomassa lavada e bruta. Isso aponta a perspectiva de que tratamentos hidrotérmicos de baixa severidade são capazes de remover ou solubilizar grande parte dos açúcares não-ligados da biomassa, podendo esses açúcares serem utilizados na produção de biogás.

Os principais produtos obtidos com o pré-tratamento por auto-hidrólise da biomassa são uma mistura de oligossacarídeos, açúcares monoméricos, ácido acético e produtos da degradação de açúcares, tais como 2-furfuraldeído (FF) e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) (CARVALHEIRO et al., 2005). Considerando esse aspecto, Carvalho et al. (2004) realizaram o pré-tratamento do bagaço de malte por auto-hidrólise utilizando três temperaturas distintas e uma RLS de 8 mL.g^{-1} , com o objetivo de avaliar a produção de oligossacarídeos.

Os autores observaram que as condições que proporcionaram a maior recuperação de oligossacarídeos foram 150°C durante 120 minutos, 170°C durante 20 minutos e 190°C durante 5 minutos. Em tais condições, os autores observaram concentrações bem baixas de ácido acético e de produtos da degradação de açúcares (HMF e FF), o que eles associam uma vantagem competitiva do pré-tratamento por auto-hidrólise para a produção de oligossacarídeos, comparativamente a outras tecnologias.

Bochmann et al.(2015) avaliaram a produção de metano a partir do bagaço de malte após pré-tratamento combinado de micro-ondas e explosão a vapor, sob temperaturas entre 100°C e 200°C , durante 15 minutos a pressões de 40 bar e utilizando uma RLS de 9 mL.g^{-1} . Os autores verificaram que o tratamento que proporcionou o maior rendimento de metano ($493,7 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{SV}}$) foi aquele que utilizou a temperatura de 140°C . Embora esse rendimento tenha sido apenas 27,8% maior do que no caso do bagaço sem tratamento. Os autores

afirmam que a partir de 140°C os rendimentos de metano foram decrescentes devido a uma maior produção de produtos inibitórios ou não-degradáveis. Além disso, os autores verificaram que o pré-tratamento a 160°C proporcionou um teor de proteínas 87,2% maior e uma quantidade de produtos térmicos intermediários em torno de dez vezes maior, comparativamente ao pré-tratamento a 140°C.

Semelhantemente, Schumacher et al. (2014) se proporem a avaliar a produção potencial de metano a partir palha da cevada pré-tratada por explosão a vapor. Nesse caso, os autores realizaram uma análise exploratória através da qual variou-se a temperaturas entre 130 e 190°C e os tempos de reação entre 5 e 30 minutos, utilizando uma RLS de 3 mL.g⁻¹. Neste caso, os autores obtiveram uma produção de metano avaliada em torno de 228 mL.g⁻¹_{SV} no caso das amostras não-tratadas e apenas 251 mL.g⁻¹_{SV} para as amostras na condição otimizada do pré-tratamento (190°C e 30 minutos).

Interessante observar a pesquisa desenvolvida por Pierre et al.(2011), que realizaram o pré-tratamento combinado do bagaço de malte, em que nas duas primeiras etapas foram utilizados pré-tratamentos termoquímicos e, em um terceiro estágio a metodologia de explosão a vapor. Nesse último caso, os autores submeteram os sólidos pré-tratados a temperaturas entre 122°C e 165°C, pressões entre 2 e 7 bar, utilizando um tempo de reação igual a 15 minutos. Nesse caso, os autores verificaram que o pré-tratamento a 165°C e 7 bar proporcionou um rendimento da hidrólise enzimática próximo ao valor máximo teórico.

A fim de avaliar a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, Michelin e Teixeira (2014) submeteram o bagaço de malte a autohidrólise a 190°C durante 30 minutos, utilizando uma RLS de 10 mL.g⁻¹. Nessa condição houve uma remoção de cerca de 64% das hemiceluloses e um rendimento de 76% de conversão de celulose a glicose, utilizando uma carga enzimática 15 FPU.g⁻¹ de Cellic Ctec 2 suplementada com 15 UI.g⁻¹ da enzima NS22083. Segundo os autores, o pré-tratamento proporcionou baixos níveis de produtos da degradação de açúcares, tais como furfuraldeído (FF) e hidroximetilfurfuraldeído (HMF).

López-Linares et al.(2019) avaliaram a produção de butanol através de uma cepa modificada das bactérias do gênero *Clostridium beijerinckii*, utilizando como substrato o bagaço de malte, após pré-tratamento simultâneo por micro-ondas e auto-hidrólise. Nesse caso, os autores fixaram a potência do sistema de

micro-ondas em 1000 W e a RLS em 10 mL.g⁻¹, variando a temperatura entre 150° e 220° C e o tempo entre 0 e 10 minutos. A condição mais favorável à produção de butanol foi uma temperatura de 192,7°C e um tempo de reação igual a 5,4 minutos, com uma produção potencial de 46 kg.ton⁻¹_{BSG}.

A fim de avaliar as condições que otimizam a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, Kemppainen et al. (2016) promoveram o pré-tratamento do bagaço de malte por explosão a vapor. Nesse caso, variando as temperaturas entre 160 e 200°C, pressões entre 6,18 e 15,55 bar e o tempo entre 5 e 10 minutos. Na condição otimizada (200°C, 15,55 bar e 10 minutos), os autores obtiveram um rendimento da hidrólise enzimática em torno de 75%.

Na tabela 3 encontram-se sumarizados os melhores resultados obtidos com os pré-tratamentos hidrotérmicos do bagaço de malte (BSG) e da palha de cevada (BS), de acordo com os autores consultados na revisão de literatura.

Tabela 3: Dados sumarizados sobre os pré-tratamentos hidrotérmicos do BSG e BS, de acordo com os autores consultados na revisão de literatura.

Referência	BM	Pré-tratamento	Condições do processo	Resultados obtidos
Carvalho et al. (2004)	BSG	Auto-hidrólise	190°C, 5 minutos, 150 rpm, RLS 8 g.g ⁻¹	Rendimento de 61% de xilo-oligômeros
Nabarlatz et al. (2007)	BS	Auto-hidrólise	179°C, 23 minutos, RLS	Rendimento de 47,1% de xilo-oligômeros
Schumacher et al. (2014)	BS	Explosão a vapor	190°C, 30 minutos, RLS 3 mL.g ⁻¹	Potencial teórico de 378 mL.g ⁻¹ _{SV} de CH ₄
Vargas et al. (2015)	BS	Auto-hidrólise / Enzimático	230°C, RLS 8 g.g ⁻¹ / Celluclast 1.5L (10 FPU.g ⁻¹), β-glicosidade (<i>A. niger</i>) (5 IU.FPU ⁻¹), 48,5°C, 120 horas, 150 rpm	Rendimento de 95% em termos de glicose
Bochmann et al. (2015)	BSG	Explosão a vapor e micro-ondas	140°C, 40 bar, 15 minutos, RLS 9 mL.g ⁻¹ ,	Rendimento de CH ₄ de 493,7 NL.kg ⁻¹ _{SV}
Kemppainen et al. (2016)	BSG	Explosão a vapor / Enzimático	200°C, 10 minutos, RLS 8 mL.g ⁻¹ / Cel7A (60%), Cel6A (10%), Cel5A (15%), Xyl10 (12%), Cel3A (3%), 55°C, 48 horas	Rendimento da hidrólise de 75% em termos de açúcares reduzidos
Michelin e Teixeira (2016)	BSG	Auto-hidrólise / Enzimático	190°C, 30 minutos, RLS 10 mL.g ⁻¹ / Cellic CTec 2 (15 FPU.g ⁻¹) e NS22083 (15 IU.g ⁻¹), 50°C, 72 horas, RLS 20 mL.g ⁻¹ , 350 rpm	Rendimento de 76% em termos de glicose
Vargas et al. (2016)	BS	Auto-hidrólise / Organossolve / Enzimático	205°C, 150 rpm, RLS 8 mL.g ⁻¹ / Etanol (40% v.v ⁻¹), 170°C, 60 minutos, RLS 8 mL.g / Celluclast 1.5L (14 FPU.g ⁻¹), Novozyme 188 (5 IU.FPU ⁻¹), 35°C, 90 horas, 120 rpm	Rendimento de etanol de 100%
López-Linares et al. (2019)	BSG	Micro-ondas e hidrotérmico / Enzimático	192,7°C, 5,4 minutos, 1000 W, RLS de 10mL.g ⁻¹ / Cellic CTec 2 (15 FPU.g ⁻¹), 50°C, 48 horas, 150 rpm	Produção potencial de butanol de 46 kg.ton ⁻¹ _{BSG}

A Tabela 3 revela que, o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte ou da palha de cevada combinado com outras metodologias de pré-tratamento foram mais eficazes na obtenção de melhores rendimentos em termos de etanol e biogás. Isso corrobora a perspectiva apontada anteriormente de que podem existir componentes recalcitrantes da biomassa, tais como a lignina e as proteínas, que impedem o ataque enzimático e a degradação microbiológica. Além disso, não foram encontrados trabalhos que avaliassem o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte em duas etapas, utilizando baixas e altas severidades, para produção de biogás a partir das frações líquidas e açúcares fermentescíveis a partir das frações sólidas obtidas após o pré-tratamento.

4.6 A produção de etanol a partir do bagaço de malte

Muitas pesquisas foram realizadas a fim de avaliar o potencial de geração de etanol a partir do bagaço de malte e da palha de cevada, de modo que essas abordagens na maioria das vezes, ocorrem após a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados. Devido ao fato das leveduras da indústria alcooleira (*Saccharomyces cerevisiae*) não metabolizarem pentoses (xilose e arabinose) como fontes de açúcar (WHITE et al., 2008), muitos autores abordam a hidrólise de polissacarídeos da biomassa em termos da solubilização da glicose.

Porém, uma controvérsia foi levantada por Caetano et al. (2013), que perceberam que nos ensaios de fermentação utilizando essas leveduras, os teores de pentoses reduziram até certo ponto, indicando que esses açúcares foram metabolizados pelas leveduras. Nesse caso, Caetano et al.(2013) submeteram o hidrolisado enzimático à fermentação a 30°C durante dois dias, a uma velocidade de agitação de 75 rpm, ajustando o pH para 5,5.

Caetano et al.(2013) observaram que toda a maltose, mas nem toda a glicose foram convertidas a etanol, o que foi atribuído à necessidade de um tempo de fermentação superior a 48 horas. Os autores verificaram que para o melhor resultado da hidrólise enzimática (72,1%), em termos da hidrólise de polissacarídeos, houve uma eficiência de fermentação de 78,5%. No entanto, os autores observaram que a maior eficiência da fermentação (89,6%) foi obtida com o pré-tratamento que utilizou HCl e H₂SO₄ que, que forneceu um rendimento

de apenas 40,5% na hidrólise enzimática de polissacarídeos, dos quais 15,9% eram glicose, 16,9% xilose, 42,8% arabinose e 24,4% maltose.

Embora a fermentação alcoólica seja um processo utilizado pelo homem a pelo menos 4000 anos, somente a pouco menos de dois séculos, as leveduras têm sido usadas para essa finalidade, e devido à sua importância biotecnológica o seu metabolismo é bem conhecido pela comunidade científica (LIMA et al., 2001). Contudo, os autores mencionam que outros organismos também podem ser utilizados na produção de etanol, tais como leveduras que metabolizam pentoses e fungos amilolíticos.

Como é o caso, por exemplo, da pesquisa realizada por Xiros et al.(2008) e Xiros e Christakopoulos (2009), que utilizaram um bio-processo consolidado de fermentação em estado sólido. Xiros et al.(2008) e Xiros e Christakopoulos (2009), obtiveram respectivamente 65 e 109 g.kg⁻¹ de rendimento de etanol (correspondentes a 30 e 60% do rendimento teórico), utilizando proporções entre bagaço de malte e “sabugos” de milho de 7:1 e 1:1. Além disso, Xiros e Christakopoulos (2009) avaliaram que a máxima concentração de bagaço de malte (6% m.v⁻¹) proporcionou a melhor produção de etanol, e que em condições microaeróbias a produção de etanol foi cerca de duas vezes maior do que em condições anaeróbias.

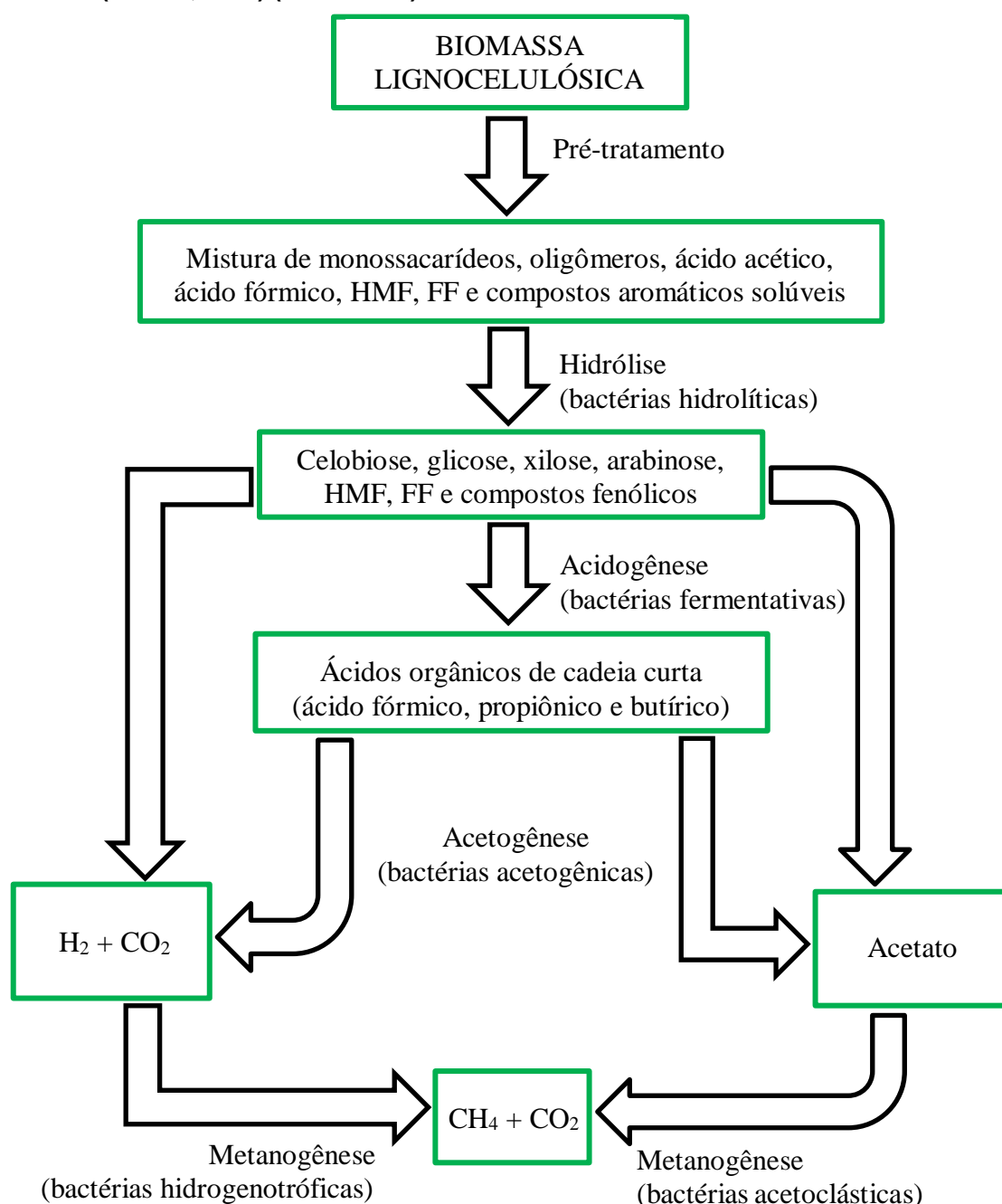
Um estudo comparativo foi realizado por White et al.(2008), que avaliaram a produção de etanol utilizando leveduras que metabolizam pentoses. Nessa ocasião, os autores promoveram o pré-tratamento ácido do bagaço de malte com HNO₃ (0,16 N), a 121°C durante 15 minutos, utilizando uma RLS de 5 mL.g⁻¹. Posteriormente os sólidos pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática a 50°C durante 18 horas sob uma velocidade de rotação de 150 rpm, utilizando uma RLS de 5 mL.g⁻¹ e o kit de amostras de biomassa disponibilizado pela Novozymes, contendo 6% de celulase (m.m⁻¹), 0,6% de β-glicosidade (m.m⁻¹), 0,5% de xilosidade (m.m⁻¹) e 0,4% de hemicelulase (m.m⁻¹).

Nesse caso, o hidrolisado enzimático foi submetido à fermentação com as leveduras *Pichia Stipitis* NCYC 1540 e *Kluyveromyces marxianus* NCYC 1425, e os resultados comparados. Dessa forma, os processos fermentativos a 30°C durante 48 horas, a uma velocidade de 100 rpm, apresentaram rendimentos de produção de etanol, respectivamente iguais a 0,32 e 0,23 g.g⁻¹_{BSG} (WHITE et al., 2008).

4.7 A produção de biogás a partir do bagaço de malte

Biorremediação é um conceito que representa a utilização de microrganismos para detoxicar ou degradar poluentes (TORTORA et al., 2012). Em relação a esse conceito, uma das técnicas de biorremediação de resíduos orgânicos complexos é a digestão anaeróbia, que é um processo que ocorre em quatro estágios, denominados de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Figura 9).

Figura 9: Etapas envolvidas na digestão anaeróbia de resíduos lignocelulósicos pré-tratados (BAÊTA, 2016) (modificado).



Na primeira fase da digestão anaeróbia, a secreção de exoenzimas por bactérias fermentativas hidrolíticas é responsável pela hidrólise de materiais poliméricos em produtos solúveis mais simples, que são metabolizados por bactérias acidogênicas e convertidos a dióxido de carbono, ácido graxos voláteis e hidrogênio (CHERNICHARO, 1997). As reações da fase acidogênica da digestão anaeróbia ocorrem mais rapidamente do que as da fase metanogênica, e por esse motivo, para que o processo de metanização da biomassa seja bem-sucedido, é necessário que uma população viável de bactérias metanogênicas já esteja presente no meio (CASSINI, 2003). Durante a fase acidogênica ocorre a detoxicação do meio, devido ao rápido crescimento das bactérias acidogênicas e sua capacidade de assimilar compostos tóxicos e recalcitrantes (BAËTA et al., 2016a)

Durante a terceira fase da digestão anaeróbia, os ácidos graxos voláteis são oxidados por bactérias acetogênicas, gerando como produtos dióxido de carbono (CO_2), hidrogênio (H_2) e acetato, sendo esse último produto utilizado como substrato por bactérias metanogênicas acetoclásticas, responsáveis por 60% a 70% da produção de gás metano (CH_4) (CHERNICHARO, 1997). De acordo com os autores, o restante da produção de metano provém do metabolismo de bactérias metanogênicas hidrogenotróficas, capazes de converter CO_2 e H_2 em CH_4 .

Em termos de sua composição, o biogás possui geralmente entre 70 a 80% de CH_4 e entre 20 e 30% de CO_2 (CHERNICHARO, 1997), embora possam haver pequenas quantidades de gás sulfídrico (H_2S), nitrogênio gasoso (N_2), hidrogênio (H_2) e monóxido de carbono (CO) (EZEONU e OKADA, 1994). Portanto o biogás representa uma fonte renovável de energia bem econômica, uma vez que é produzido a partir da degradação de resíduos orgânicos (CASSINI, 2003). O biogás é um gás inodoro e incolor que possui uma importância ambiental estratégica, pois além de poder ser utilizado como fonte energética através da queima, a digestão anaeróbia de resíduos orgânicos contribui para a redução na emissão de gases causadores do efeito estufa (CASSINI, 2003).

Em relação a esse contexto, as cervejarias representam um setor da economia que consome significativas quantidades de combustíveis de origem fóssil, e por esse motivo estão sob constantes pressões acerca da sua gestão

energética (PANJIČKO et al., 2017). Nesse sentido, o uso de fontes renováveis de energia tem se tornado interessante à medida que as energias fósseis se escasseiam e os custos de extração dessas fontes se tornam mais onerosos (TORTORA et al., 2012).

Dessa forma, a digestão anaeróbia do bagaço de malte representa uma alternativa interessante para solucionar questões ambientais e energéticas da indústria de cerveja, pois ao mesmo tempo que esses resíduos são degradados, o metano produzido na digestão anaeróbia pode ser utilizado como suprimento energético (BOCHMANN et al., 2015), suplementando a demanda por gás natural (PANJIČKO et al., 2017). Dessa forma, esse manejo representa uma alternativa interessante para agregar valor a esses subprodutos através da produção de biogás e a recuperação da energia térmica gasta no pré-tratamento da biomassa (OLIVEIRA et al., 2018; MONTUSIEWICZ et al., 2017).

Além dessas questões, a digestão anaeróbia possui a vantagem de preservar parte do nitrogênio e fósforo contidos na biomassa, o que garante que os digestatos sólidos oriundos desse processo, possam ser utilizados na produção agrícola na forma de insumos para o solo, agregando ainda mais valor ao bagaço de malte (POULSEN et al., 2017). Contudo, é necessário ajustar parâmetros operacionais da digestão anaeróbia e a relação alimento-microrganismos (ou relação substrato-inóculo) adequada para otimizar a eficiência energética desse processo (MONTUSIEWICZ et al., 2017).

Deve-se considerar que o longo período de retenção de materiais lignocelulósicos em reatores torna a digestão anaeróbia pouco atrativa em termos econômicos, uma vez que para processar grandes quantidades são necessários reatores de grandes volumes (BOCHMANN et al., 2015). De acordo com os autores, esse fato conduziu a comunidade científica a pesquisar metodologias de pré-tratamento da biomassa a fim de se obter maiores rendimentos na produção de biogás. No entanto, somente nos últimos anos despertou-se a atenção para a utilização do bagaço de malte para a produção de biogás (PANJIČKO et al., 2017).

Algumas pesquisas foram realizadas a fim de avaliar a produção de biogás a partir do bagaço de malte. Um exemplo muito interessante é a pesquisa desenvolvida por Oliveira et al.(2018), que diante da proporção entre bagaço de malte e *trub* (sedimentos de lúpulo, proteínas e resíduos de malte) gerados nas

cervejarias, se proporam a investigar a produção de metano em um sistema de co-digestão anaeróbia, utilizando uma relação mássica entre bagaço de malte e *trub* de 9:1 (que é um valor comum na indústria). Nesse caso, Oliveira et al.(2018) verificaram que o maior valor obtido para a produção de biogás (573 L.kg⁻¹_{sv}) ocorreu a partir da suplementação do substrato com 10% de glicerol. Nessa condição, os autores afirmam que o potencial de recuperação energética foi de 206 kWh para cada metro cúbico de cerveja produzido, o que representa 80% da demanda energética de uma cervejaria típica.

Outro exemplo é o estudo de Poladyam et al.(2018), que avaliaram a produção de hidrogênio (H₂) a partir de uma cepa modificada das bactérias do gênero *Escherichia coli*, utilizando como meio de cultura o hidrolisado dos pré-tratamentos termoquímicos ácidos ou alcalinos do bagaço de malte. Os autores verificaram que a maior produção cumulativa de H₂ (120 mL em 12 horas) foi obtida a partir do pré-tratamento do bagaço de malte com H₂SO₄ (0,7% v.v⁻¹) e RLS de 25 mL.g⁻¹. No entanto, a maior produção de H₂ (290 mL) dentre os ensaios comparativos, foi obtida com uma cepa não modificada da *E. coli*, utilizando um meio de cultura à base de peptona e glicose.

Interessante ressaltar a pesquisa realizada por Poulsen et al.(2017), que investigaram a co-digestão do bagaço de malte, esterco bovino e dejetos suínos, a fim de avaliar qual a melhor proporção desses resíduos a fim de melhorar a relação entre CH₄ e CO₂ no biogás gerado. Nesse caso, os autores utilizaram uma relação alimento-microrganismo de 0,5 g.g⁻¹, temperaturas de 55°C durante 65 dias. O maior valor de rendimento de biogás (311 L.kg⁻¹_{sv}) foi obtido com uma proporção mássica de 83% de bagaço de malte, 9% de esterco bovino e 8% de dejetos suínos, em termos de sólidos voláteis. Nessa condição, os autores obtiveram uma relação CH₄/CO₂ de 1,40 no biogás gerado.

Peces et al.(2015) avaliaram a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia do bagaço de malte tratado por ultrassom. Nesse caso, os autores utilizaram partículas de dimensões distintas, variando a concentração de sólidos, a temperatura, o tempo de reação e a energia específica do sistema de ultrassom. Porém a avaliação energética do pré-tratamento indicou que na condição mais favorável (60°C, 12 horas, RLS de 10 mL.g⁻¹ e 1000 kJ.kg⁻¹), houve um maior consumo energético do que a energia recuperada a partir da queima do biogás. Além disso, os autores verificaram que nessa condição houve

um pequeno incremento na produção específica de metano, comparativamente ao bagaço sem tratamento, porém nenhum efeito foi observado sobre a cinética química do processo.

A fim de avaliar a produção de metano a partir da digestão anaeróbia do bagaço de malte, Kan et al.(2018) realizaram um planejamento experimental para avaliar os parâmetros do pré-tratamento alcalino simultaneamente com a ação de micro-ondas. Os autores realizaram testes de BMP (*biochemical methane potential*) utilizando como inóculo o lodo de um digestor anaeróbio mesofílico proveniente de uma estação de tratamento de esgotos, incubando os frascos a 35°C, com um *head space* de 40% do volume do frasco. Nesse caso, os autores verificaram que a maior produção de metano (0,73 Nm³.kg⁻¹_{sv}) foi obtida utilizando no pré-tratamento do bagaço de malte, uma potência do sistema de micro-ondas de 40W, durante 4 minutos, utilizando uma relação mássica entre NaOH e biomassa (A/B) de 0,25.

Zhang e Zang (2016) avaliaram a produção de hidrogênio a partir da co-digestão anaeróbia do bagaço de malte pré-tratado e do hidrolisado obtido, utilizando como agente químico do pré-tratamento um resíduo gerado em grandes quantidades na indústria de produção de alumina a partir da bauxita. Apesar do critério inovador da pesquisa, os autores verificaram a inibição da atividade metanogênica, além de uma constante cinética inferior à obtida com o bagaço sem tratamento. A máxima produção específica de hidrogênio foi de 198,62 mL.g⁻¹_{sv} no caso do bagaço tratado com uma solução de 10 g.L⁻¹ da “lama vermelha calcinada”, a 55°C durante 48 horas em atmosfera anóxica.

Um estudo interessante foi a pesquisa desenvolvida por Panjičko et al.(2017), que avaliaram a digestão anaeróbia em dois estágios do bagaço de malte pré-tratado termoquimicamente com HCl. Nesse caso, os autores realizaram a separação das fases sólida e líquida obtidas após o pré-tratamento, submetendo-as em reatores distintos. Os sólidos pré-tratados, após a sua neutralização foram submetidos em um reator para digestão em estado sólido, enquanto o hidrolisado foi inserido em um reator granular anaeróbio baseado na tecnologia dos reatores de lodo ascendente. Os reatores foram operados durante 200 dias realizando ciclos de 33 dias.

Panjičko et al.(2017) observaram efeitos inibitórios à atividade metanogênica, causados pela presença de amônia, o que os autores atribuíram

ao alto teor protéico do bagaço de malte. De fato, Bougrier et al. (2018) verificaram teores de nitrogênio de 1,09%, o que eles consideram uma concentração muito alta para a digestão anaeróbia.

Além disso, Panjičko et al.(2017) verificaram altas concentrações de ácidos orgânicos (acima de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$) nos 5 primeiros dias de processo no caso do reator em estado sólido, sendo os ácidos acético, butírico e propiônico mais preponderantes. No entanto, as concentrações de p-cresol estiveram entre 3 e 25 mg.L^{-1} durante os primeiros 10 dias de cada ciclo de operações, tornando-se decrescentes a partir disso. No caso do reator granular, Panjičko et al.(2017) observaram que a maior parte do metano gerado (77,4%) foram provenientes desse reator, que proporcionaram uma remoção de sólidos voláteis em torno de 80% e produções específicas de biogás e metano, respectivamente iguais a 431 e $234 \text{ L.kg}^{-1}\text{sv}$.

Por fim, Bougrier et al.(2018) avaliaram a suplementação nutricional em reatores semi-contínuos alimentados com o 11% de bagaço de malte. Nesse caso os autores utilizaram dois níveis de suplementação nutricional ($0,02$ e $0,01 \text{ mL.g}^{-1}$) de uma solução preparada com macro (NH_4Cl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaHCO_3 , $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$) e micronutrientes ($\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$). Bougrier et al.(2018) verificaram que os reatores suplementados com macro e micronutrientes apresentaram uma maior estabilidade do processo de digestão anaeróbia, evitando o colapso dos reatores. Contudo, tanto os reatores suplementados com uma baixa ou alta carga de nutrientes apresentaram resultados similares, o que indica que uma baixa carga de nutrientes é suficiente para a estabilização do processo. Nesses casos, os autores obtiveram produções de metano entre 320 e 333 L.kg^{-1} e biodegradabilidades em torno de 70%.

4.8 Conclusão sobre a revisão de literatura

A maior parte dos autores consultados abordaram o pré-tratamento químico da biomassa, de tal maneira que os pré-tratamentos hidrotérmicos do bagaço de malte e da palha de cevada somente começaram a ser estudados a partir do início desse século. Assim, ao contrário dos pré-tratamentos químicos, os processos hidrotérmicos ainda não estão bem consolidados diante da

comunidade científica. Isso aponta a perspectiva de que muitos proveitos possam ainda ser angariados diante da pesquisa acadêmica acerca dos pré-tratamentos hidrotérmicos.

Embora a maior parte das pesquisas tenham sido direcionadas à obtenção de etanol celulósico, a geração de biogás a partir do bagaço de malte tem sido gradativamente investigada. Considera-se que a grande disponibilidade desse resíduo, aliada ao seu baixo custo, têm despertado o interesse pela utilização dessa biomassa para a produção de biocombustíveis. Em relação a esse aspecto, o presente trabalho aborda de forma inovadora a extração dos açúcares ditos não-ligados da biomassa e a sua utilização como substrato à digestão anaeróbia para a produção de metano. Dentre os autores consultados, apenas o estudo de Paz et al.(2019) abordou a remoção desses açúcares, muito embora os autores não tenham conduzido essa fração da biomassa a uma utilização biotecnológica.

A produção de biogás a partir do hidrolisado resultante da auto-hidrólise em duas etapas do bagaço de malte e a subsequente hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados é uma temática ainda não abordada entre os pesquisadores consultados. A maior parte das pesquisas está focada na utilização de uma corrente do pré-tratamento, seja ela sólida ou líquida, em detrimento das demais.

Acredita-se que a remoção de açúcares não-ligados da biomassa represente um novo vetor energético passível de utilização nas próprias cervejarias, a fim de suprir suas demandas energéticas. Ao mesmo tempo, considera-se que, uma vez removidos esses açúcares, a geração de produtos da degradação de açúcares (furfuraldeídos) seja reduzida durante o pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de malte. Dessa forma, acredita-se que a produção de metano e os rendimentos da hidrólise enzimática sejam favorecidos com a utilização do pré-tratamento em duas etapas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aquisição, preparo e acondicionamento da biomassa

O bagaço de malte foi cedido pela Cervejaria Acadêmica, localizada no município de Ouro Preto (MG) (20°17'15" S, 43°30'29" W) durante o mês de fevereiro de 2018. O bagaço de malte foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar a 80°C durante cerca de uma semana para reduzir os seus teores de umidade a valores inferiores a 8%. Posteriormente a biomassa foi armazenada em um saco plástico hermeticamente fechado em um local ao abrigo da luz solar, umidade e ar atmosférico.

5.2 Produtos químicos e padrões analíticos

Os reagentes químicos utilizados durante a execução do trabalho foram ciclohexano, etanol (99,5% v.v⁻¹) e ácido sulfúrico (95-98% v.v⁻¹), adquiridos da empresa Synth (Brasil). Sulfato de prata (P.A.), sulfato de mercúrio II (P.A.) e sulfato ferroso amoniacal (P.A.), adquiridos da empresa ACS Científica. Sulfato de ferro II heptahidratado (P.A.) adquirido da empresa Neon Científica. Dicromato de potássio (P.A.) adquirido da empresa Êxodo Científica. Além de 1,10-fenantrolina monohidratada (P.A.) adquirida da empresa Vetec Química Fina.

Os padrões cromatográficos utilizados foram celobiose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido valérico, ácido isovalérico, 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) e 2-furfuraldeído (FF), fornecidos pela empresa Sigma-Aldrich (Brasil), além de ácido acético e ácido fórmico, fornecidos pela empresa Fluka Analytical. Uma solução padrão de biogás, fornecida pela empresa Oxiteno, contendo metano (CH₄) e hidrogênio (H₂) em concentrações respectivamente iguais a 0,249 e 0,254 mol.mol⁻¹.

5.3 Pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade e análise do hidrolisado

Três alíquotas de 40 gramas (em base seca) foram condicionadas em béqueres de vidro juntamente com 400 mL de água destilada. Os conjuntos foram submetidos a um pré-tratamento com água destilada em temperaturas de 80°C durante intervalos de tempo de 30, 45 e 60 minutos, sendo as misturas mantidas sob agitação permanente com o auxílio de um bastão de vidro. Após os períodos de reação as misturas foram submetidas a filtração, separando os sólidos da fase líquida.

Os sólidos (bagaço lavado) foram submetidos à secagem em estufa de circulação de ar a 80°C até que seus teores de umidade reduzissem a valores inferiores a 8% e armazenados para análises posteriores. As fases líquidas geradas a partir desses processos foram acondicionadas em vials de 1,5 mL e submetidas a análise de açúcares monoméricos (celbiose, glicose, xilose e arabinose) e ácidos graxos voláteis (fórmico e acético) em cromatógrafo líquido de alta precisão (HPLC) da marca Agilent Technologies (modelo 1260 Infinity II), conforme metodologia descrita posteriormente no item 5.4.5.

Com intuito de avaliar a quantidade de açúcares oligoméricos presentes, alíquotas de 50 mL dos hidrolisados foram acondicionadas em tubos autoclaváveis de 200 mL, sendo adicionado um volume de 1,1 mL de H₂SO₄ (densidade igual a 1,84 g.L⁻¹ e pureza média de 96,5%) para se obter uma concentração de 4% (m.v⁻¹). Essas amostras foram submetidas à hidrólise ácida em autoclave a temperaturas de 121°C e 1 atm, durante os intervalos de tempo de 5, 10 e 15 minutos. Metodologia análoga foi utilizada por Carvalheiro et al. (2004) e Vargas et al.(2016), muito embora os autores tenham utilizado respectivamente, tempos de reação de 60 e 40 minutos para quantificação de oligômeros presentes no hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de malte e da palha de cevada.

Ao final desse processo de hidrólise ácida, alíquotas dos hidrolisados foram acondicionadas em vials de 1,5 mL e submetidas à análise de açúcares monoméricos (celbiose, glicose, xilose e arabinose), ácidos orgânicos (fórmico e acético) e aldeídos (5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) e 2-furfuraldeído (FF)) em HPLC, sendo os balanços de massa calculados de acordo com as equações

(5) e (10). As condições cromatográficas utilizadas para a quantificação de açúcares, ácidos graxos voláteis e furfuraldeídos foram as mesmas que as descritas posteriormente no item 5.4.5.

5.4 Caracterização do bagaço de malte

5.4.1 Teor de umidade

Os teores de umidade do bagaço de malte *in natura* (bruto), do bagaço de malte submetido ao tratamento hidrotérmico de baixa severidade (lavado) e dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise (SPT), foram determinados a partir da balança termogravimétrica da marca OHAUS (modelo MB25). Nestes casos, massas entre 0,5 e 1 grama foram submetidas ao equipamento que promove o aquecimento da amostra a temperaturas de 110°C até que a variação na massa em relação ao tempo seja desprezível.

O teor de umidade de uma amostra (U) é calculado automaticamente pela relação percentual entre a massa perdida durante o aquecimento e a massa inicial utilizada. Para efeito da maioria dos cálculos, os valores das massas são referenciados com relação aos seus teores isento de umidade (base seca, BS) segundo as equações:

$$m_{bs} = \frac{m_{bu}}{(1 + U)}$$

(equação 1)

$$m_{bu} = \frac{m_{bs}}{(1 - U)}$$

(equação 2)

Em que: m_{bs} é a massa de sólidos em base seca (g); m_{bu} é a massa de sólidos em base úmida (g); e U é o teor de água da amostra de sólidos ($g \cdot g^{-1}$).

5.4.2 Teor de extrativos

Alíquotas do bagaço de malte bruto e do bagaço lavado foram trituradas com o auxílio de um moinho de facas de modo que as partículas do material foram reduzidas a valores menores do que 40 mesh. Amostras com massas (em

base seca) entre 15 e 20 gramas ($m_{inicial}$) foram adicionadas em cartuchos de extração e esses foram acondicionados em um extrator do tipo Soxhlet. Utilizou-se como solução extratora uma mistura de etanol (95% v.v⁻¹) e ciclohexano, na mesma proporção em volume, mantendo-se uma proporção de 250 mL da mistura para cada 10 gramas (base seca) durante o período de 48 horas, segundo metodologia utilizada por BAËTA (2016).

Posteriormente, os sólidos foram lavados com um excesso de água destilada, utilizando um sistema de filtração à vácuo e conduzidos à secagem em estufa de circulação de ar a 80°C durante 24 horas. Posteriormente, determinou-se as massas finais de sólidos ($m_{final(BU)}$) e o seus teores de umidade (U). O teor de extrativos (E) nas amostras do bagaço bruto e do bagaço lavado foram determinados como a relação percentual entre as massas perdidas durante o processo de extração e as massas de sólidos iniciais utilizadas, de tal forma que:

$$E = \frac{m_{inicial(bs)} - m_{final(bs)}}{m_{inicial(bs)}} \quad (\text{equação 3})$$

Em que: E é o teor de extrativos na biomassa (g.g⁻¹); $m_{inicial(bs)}$ é a massa inicial de sólidos em base seca (g); $m_{final(bs)}$ é a massa final de sólidos em base seca.

As caracterizações dos sólidos após a extração admitiram a perda de massa advinda da remoção dos extrativos. Assim, nesses casos, os teores dos componentes mencionados nas equações (5), (7), (8) e (9) representam a relação mássica entre os componentes da biomassa e o bagaço após a remoção dos extrativos orgânicos.

Assim, é necessário utilizar um fator de conversão (1 - E) através do qual é possível converter os teores em relação à biomassa extraída nos teores em relação à biomassa bruta (ou lavada), com o intuito de adequar os balanços de massa posteriores, o que foi feito através da seguinte equação:

$$\left(\frac{m_{componente}}{m_{BAGAÇO EXTRAÍDO}} \right) \cdot \left[\frac{(1 - E) m_{BAGAÇO EXTRAÍDO}}{m_{BAGAÇO BRUTO}} \right] = (1 - E) \cdot \left(\frac{m_{componente}}{m_{BAGAÇO BRUTO}} \right) \quad (\text{equação 4})$$

Em que: $m_{\text{componente}}$ é a massa do componente (sólidos insolúveis em ácido (SIA's), lignina solúvel, glicanas ou arabinosilanas) (g); $m_{\text{BAGAÇO EXTRAÍDO}}$ é a massa final (base seca) obtida após a remoção dos extrativos (g); E é o teor de extrativos na biomassa ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); e $m_{\text{BAGAÇO BRUTO}}$ é a massa de bagaço bruto (base seca) antes da remoção dos extrativos orgânicos (g).

Ressalta-se contudo, que esse procedimento não foi realizado para as amostras (sólidos) pré-tratadas por auto-hidrólise, pois considerou-se que durante o tratamento hidrotérmico ocorre parte considerável da remoção de extrativos (RUIZ et al., 2017), não sendo admitido nesse caso o uso de um fator de conversão.

5.4.3 Teor de sólidos inorgânicos

Uma alíquota dos sólidos extraídos (ou pré-tratados) foi reservada para a determinação do teor de sólidos inorgânicos (cinzas). O teor de cinzas foi determinado segundo a Norma TAPPI T211 om-02.

5.4.4 Teores de lignina

O procedimento para a obtenção dos teores de lignina no bagaço de malte *in natura* e no bagaço lavado baseou-se na Norma TAPPI T222 om-02 e no protocolo do NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), que utilizam a hidrólise ácida em duas etapas para fracionar a biomassa em componentes que possam ser facilmente mensurados (SLUITER et al., 2012).

5.4.4.1 Teor de sólidos insolúveis em ácido (SIA)

Para cada replicata, utilizou-se uma massa (m_{BS}) de 0,3 g (base seca) de bagaço de malte triturado (partículas passantes na peneira de 40 mesh), disposta em um tubo autoclavável de 200 mL. Um volume de 3 mL de uma solução de H_2SO_4 de 72% (densidade = $1,6338 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionado sobre os sólidos, sendo a mistura submetida à agitação com o auxílio de agitador e barra magnéticos durante 60 minutos.

Após esse período, conhecido como fase de condensação, um volume de 84 mL de água destilada foi adicionado a cada tubo, tornando a concentração de ácido igual a 3% (m/v). Após esse processo, ocorre a fase de hidrólise, em que os tubos devidamente fechados foram submetidos em autoclave pré-aquecida, a temperaturas de 121°C, durante 60 minutos e pressões manométricas de 1 atm.

Após a autoclavagem dos tubos, a mistura resultante de cada ensaio foi submetida à filtração a vácuo, utilizando um cadinho de vidro com placa porosa (n° 4), previamente calcinado e pesado. Após esse processo, o conjunto formado por sólidos insolúveis em ácido (SIA) e cadinho foi conduzido à secagem em estufa de circulação de ar a 80°C durante quatro horas, tendo a sua massa ($m_{inicial}$) medida após este período. Por fim, o conjunto formado por cadinho e SIA foi calcinado em mufla a 525°C, durante duas horas, utilizando uma rampa de aquecimento de 1,25°C.minuto⁻¹, tendo a sua massa (m_{final}) aferida ao final desse período.

Assim, o teor de sólidos insolúveis em ácido (SIA) do bagaço de malte é dado pela relação percentual entre a diferença entre $m_{inicial}$ e m_{final} e a massa inicial utilizada (m_{BS}). Porém, dentre os SIA's encontram a lignina insolúvel, as proteínas e as cinzas (SLUITER et al., 2012). Por este motivo, o teor de lignina no presente estudo, foi expresso indiretamente em termos do teor de sólidos insolúveis em ácido, expresso pela seguinte equação:

$$SIA = \left[\frac{(m_{inicial} - m_{final})}{m_{(bs)}} \right] \quad \text{(equação 5)}$$

Em que: SIA é o teor de sólidos insolúveis em ácido (g.g⁻¹); $m_{inicial}$ é a massa de sólidos insolúveis em ácido após secagem (g); m_{final} é a massa de sólidos após calcinação (g); e $m_{(bs)}$ é a massa de sólidos inicial em base seca (g).

5.4.4.2 Teor de lignina solúvel (LS)

O hidrolisado resultante da filtração dos SIA's (tópico anterior) foi adicionado em um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com

água destilada. Uma alíquota de 3 mL do hidrolisado foi retirada e diluída com água destilada em um balão volumétrico de 50 mL, sendo conduzida à análise de absorvância em espectrofotômetro utilizando os comprimentos de onda iguais a 215 nanômetros e 280 nanômetros (nm).

Marabezi (2009) propõe uma equação para estimar a concentração de lignina solúvel (em ácido) no hidrolisado, considerando a absorvância molar dos interferentes gerados a partir da degradação de carboidratos em 215 e 280 nm, assim como a absorvância molar da lignina nestes comprimentos de onda.

$$C_{LS} = \frac{4,53 \cdot Abs_{215 \text{ nm}} - Abs_{280 \text{ nm}}}{300} \quad (\text{equação 6})$$

Em que: C_{LS} é a concentração de lignina solúvel (g.L^{-1}); $Abs_{215 \text{ nm}}$ é a absorvância da amostra em 215 nm (adimensional); $Abs_{280 \text{ nm}}$ é a absorvância da amostra em 280 nm (adimensional).

Considerando que a massa de lignina solúvel contida no hidrolisado é dada pelo produto entre a concentração de lignina solúvel (C_{LS}) e o volume do balão volumétrico onde o hidrolisado foi diluído (no caso 100 mL), então o teor de lignina solúvel em ácido é dado pela seguinte equação:

$$LS = \frac{\left(\frac{4,53 \cdot Abs_{215 \text{ nm}} - Abs_{274 \text{ nm}}}{300} \right) \cdot V_f}{m_{bs}} \cdot \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \quad (\text{equação 7})$$

Em que: LS é o teor de lignina solúvel na biomassa (g.g^{-1}); V_f é o volume do balão volumétrico onde o hidrolisado foi diluído (0,1 L); V_i é o volume de hidrolisado obtido após o processo de hidrólise em duas etapas (0,08673 L, segundo Sluiter et al., 2012); e m_{bs} é a massa em base seca utilizada no ensaio (g).

5.4.5 Teores de carboidratos e ácidos graxos voláteis

A determinação dos teores de carboidratos no bagaço de malte baseou-se na Norma TAPPI T222 om-02 e no protocolo do NREL (*National Renewable Energy Laboratory*). Nesse caso, os hidrolisados resultantes do processo de

filtração dos SIA's foram reservados para a quantificação de glicanas, xilanas, arabinanas, ácidos orgânicos (acético e fórmico) e furfuraldeídos (FF e HMF).

Para isso, alíquotas do hidrolisado foram filtradas com membranas de nitrato de celulose com poros de tamanho igual a 0,45 μm e acondicionadas em vials de 1,5 mL para análises em HPLC (marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity II), equipado com detector de índice de refração (IR) e uma coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm BIO-RAD). Uma solução eluente de H_2SO_4 (pureza igual a 98%, da marca Merck) de concentração 0,005 mol.L⁻¹ foi utilizada a uma vazão de 0,6 mL.minuto⁻¹, sendo a coluna mantida a uma temperatura de 55°C.

A quantificação de ácidos graxos voláteis (AGV's) e furfuraldeídos (FF e HMF) foi realizada sob as mesmas condições cromatográficas, no entanto nesse caso utilizou-se um detector de UV-Vis (espectros ultravioleta e visível) operado em canal duplo, nos comprimentos de onda 210 nm (para ácidos orgânicos) e 274 nm (para aldeídos).

A partir das concentrações dos compostos hidrolisados, as massas de celobiose, glicose, ácido fórmico e HMF foram convertidas em glicanas (GLU), e as massas de xilose, arabinose, ácido acético e FF foram convertidas em arabinoxilanas (ARX), conforme descrito nas equações abaixo:

$$GLU = \frac{(0,947 \cdot C_{cel.} + 0,900 \cdot C_{gli.} + 3,52 \cdot C_{ác.fórmico} + 1,29 \cdot C_{HMF}) \cdot (V_f)}{m_i} \cdot \left(\frac{V_f}{V_i}\right) \quad (\text{equação 8})$$

$$ARX = \frac{(0,88 \cdot C_{xil.} + 0,88 \cdot C_{ara.} + 0,7 \cdot C_{ác.acético} + 1,38 \cdot C_{FF}) \cdot (V_f)}{m_i} \cdot \left(\frac{V_f}{V_i}\right) \quad (\text{equação 9})$$

Em que: GLU é o teor de glicanas na amostra (g.g⁻¹); C_{cel.} é a concentração de celobiose (g.L⁻¹); C_{gli.} é a concentração de glicose (g.L⁻¹); C_{ác.fórmico} é a concentração de ácido fórmico (g.L⁻¹); C_{HMF} é a concentração de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (g.L⁻¹); ARX é o teor de arabinoxilanas na amostra (g.g⁻¹); C_{xil.} é a concentração de xilose (g.L⁻¹); C_{ara.} é a concentração de arabinose (g.L⁻¹); C_{ác.acético} é a concentração de ácido acético (g.L⁻¹); C_{FF} é a concentração de 2-furfuraldeído (g.L⁻¹); V_f é o volume do balão volumétrico (0,1 L); V_i é o

volume do hidrolisado (0,08673 L, segundo Sluiter et al., 2012); e m_i é a massa da amostra (base seca) (cerca de 0,3 g).

No caso das concentrações de glicanas e arabinoxilanas nos hidrolisados, as equações (8) e (9) foram utilizadas, com a diferença que o termo V_f , nesse caso corresponde ao volume de hidrolisado recuperado (V_{REC}), m_i é a massa de bagaço de malte a ser tratada e a razão (V_f / V_i) foi substituída por (fd^{-1}), em que fd é o fator de diluição da amostra, dado pela relação entre o volume da solução e o volume da amostra.

5.4.6 Teores de compostos fenólicos

As determinações dos teores de compostos fenólicos nas frações sólidas e líquidas obtidas com pré-tratamento da biomassa nas condições de desejabilidade, em sua maioria produtos da degradação da lignina, foram realizadas segundo modificação da metodologia proposta por Rossetti (2007). Durante a fase de extração, aproximadamente 1 grama (em base seca) das frações sólidas e 1 mL das frações líquidas, foram adicionados em tubos Falcon de 15 mL em volume, juntamente com respectivamente 10 e 9 mL de acetona (70% v.v⁻¹), e posteriormente submetidos a ultrassonificação durante 20 minutos em um béquer contendo água líquida e cubos de gelo.

Após esse período, procedeu-se a etapa de análise, em que os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 3000 rpm durante 10 minutos, sendo coletado um volume de 50 μ L do líquido sobrenadante de cada tudo. Os líquidos sobrenadantes foram adicionados em tubos de ensaio com tampa, juntamente com 450 μ L de água deionizada, 1,25 mL de uma solução de carbonato de sódio (7% m.v⁻¹) e 520 μ L do reagente Folin Ciocalteau (solução de molibdato, tungstato e ácido fosfórico).

Os conteúdos dos tubos de ensaio foram conduzidos à agitação em um sistema de vórtex durante 5 minutos, sendo os tubos isolados da incidência de luz durante 35 minutos. Após esse período, o conteúdo dos tubos foi conduzida a análise em espectrofotômetro operando com o comprimento de onda de 725 nm. A elaboração da curva de calibração do espectrofotômetro foi realizada sob as mesmas condições, utilizando soluções com volumes crescentes (20, 60, 80,

100, 250 e 500 μL) de ácido tânico (concentração $0,1 \text{ g.L}^{-1}$), completando-se o volume das cubetas até 500 μL com água destilada.

5.4.7 Balanços de massa

Os balanços de massa utilizados nas caracterizações do bagaço extraído foram realizados de acordo com a seguinte equação:

$$BM = GLU + ARX + SIA + LS + SI + E \quad (\text{equação 10})$$

Em que: BM é a soma dos teores dos componentes da biomassa (g.g^{-1}); GLU é o teor de glicanas (g.g^{-1}); ARX é o teor de arabinoxilanas (g.g^{-1}); SIA é o teor de sólidos insolúveis em ácido (g.g^{-1}); LS é o teor de lignina solúvel (g.g^{-1}); SI é o teor de sólidos inorgânicos (cinzas) (g.g^{-1}); e E é o teor de extrativos orgânicos (g.g^{-1}).

No caso dos balanços mássicos dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise, na equação (10) desconsiderou-se a parcela de extrativos, pelo fato de durante a auto-hidrólise ocorrer a remoção dessa parcela da biomassa (RUIZ et al., 2017). Enquanto no caso dos balanços mássicos dos sólidos pré-tratados nas condições de desejabilidade, desconsiderou-se a parcela de extrativos e considerou-se a parcela de fenóis.

5.5 Ensaios de auto-hidrólise do bagaço de malte

Realizou-se um planejamento experimental Doehlert (modelo quadrático com três variáveis) para os ensaios de auto-hidrólise do bagaço de malte, variando-se o tempo de reação (t) em cinco níveis entre 15 e 60 minutos, a temperatura (T) em sete níveis desde 60°C a 180°C , e a razão líquido-sólido (RLS) em três níveis entre $4 \text{ mL.g}^{-1}_{\text{BS}}$ e $10 \text{ mL.g}^{-1}_{\text{BS}}$, com 4 replicatas no ponto central, o que resultou em 16 ensaios. A matriz de planejamento com os valores decodificados das variáveis pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 - Matriz de planejamento experimental dos ensaios de auto-hidrólise do bagaço de malte.

Ensaio	Tempo (nível)	Temperatura (nível)	RLS (nível)
1	60 (+1,000)	120 (0,000)	7 (0,000)
2	49 (+0,500)	180 (+0,866)	7 (0,000)
3	49 (+0,500)	140 (+0,289)	10 (+0,817)
4	15 (-1,000)	120 (0,000)	7 (0,000)
5	26 (-0,500)	60 (-0,866)	7 (0,000)
6	26 (-0,500)	100 (-0,289)	4 (-0,817)
7	49 (+0,500)	60 (-0,866)	7 (0,000)
8	49 (+0,500)	100 (-0,289)	4 (-0,817)
9	26 (-0,500)	180 (+0,866)	7 (0,000)
10	38 (0,000)	160 (+0,577)	4 (-0,817)
11	26 (-0,500)	140 (+0,289)	10 (+0,817)
12	38 (0,000)	80 (-0,577)	10 (+0,817)
13	38 (0,000)	120 (0,000)	7 (0,000)
14	38 (0,000)	120 (0,000)	7 (0,000)
15	38 (0,000)	120 (0,000)	7 (0,000)
16	38 (0,000)	120 (0,000)	7 (0,000)

Os ensaios de auto-hidrólise foram realizados em reatores cilíndricos de aço, com volume útil de aproximadamente 207 mL, contendo em torno de 15 gramas de bagaço *in natura* (bruto) e um volume de água destilada variando entre 60 e 150 mL. Os reatores foram aquecidos em banho termostático (marca Marconi) contendo glicerina aquecida nas temperaturas desejadas, e mantidos durante o tempo estabelecido no planejamento experimental. Posteriormente, os reatores foram resfriados abruptamente em um recipiente contendo gelo em excesso durante cerca de 30 minutos para parar a reação.

Após o processo de auto-hidrólise do bagaço de malte a mistura foi submetida à filtração para separar os sólidos pré-tratados do hidrolisado, sendo o volume recuperado, a massa de sólidos e os seus teores de umidade aferidos. Os sólidos pré-tratados foram conduzidos à análise dos teores de cinzas, sólidos insolúveis em ácido, lignina solúvel e teores de carboidratos, de acordo com as metodologias descritas anteriormente (item 5.4).

Alíquotas das frações líquidas resultantes da auto-hidrólise do bagaço de malte, foram submetidas à centrifugação a 12000 rpm durante 12 minutos. Após esse período, os líquidos sobrenadantes foram filtrados com o auxílio de uma membrana de nitrato de celulose com poros de tamanhos iguais a 0,45 μm ,

e diluídas com água mili-Q (fator de diluição 10 vezes). As soluções foram inseridas em vials de 1,5 mL para análises em HPLC, para a quantificação das concentrações de açúcares, ácidos orgânicos e aldeídos conforme metodologia descrita anteriormente (item 5.3). O restante dos hidrolisados e dos sólidos pré-tratados foram armazenados a 0°C para análises posteriores. Vale ressaltar que, após a auto-hidrólise do bagaço de malte foram avaliadas variáveis-resposta relacionadas ao pré-tratamento, de modo a determinar as melhores condições de auto-hidrólise a partir do planejamento experimental. Uma vez definidas estas condições, avaliou-se o efeito do pré-tratamento térmico em duas etapas sobre os rendimentos de biogás e hidrólise enzimática, comparativamente ao processo de tratamento em uma única etapa.

5.6 Hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados

Alíquotas dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise foram separadas para a realização de ensaios de hidrólise enzimática, utilizando uma carga enzimática de 10 FPU.g⁻¹_{BS} segundo metodologia proposta por Lima (2018). Nesse caso, um coquetel foi preparado a partir das enzimas Cellic® CTec 2 e Cellic® Htec 2 (Novozymes), misturadas na proporção volumétrica de 85% e 15% (coquetel 85:15). O coquetel de atividade enzimática originalmente igual a 264,3 FPU.mL⁻¹, foi diluído a fim de se obter uma solução de atividade enzimática igual a 2,5 FPU.mL⁻¹.

Massas de sólidos pré-tratados de cerca de um grama (base seca) foram inseridas em erlenmeyers de 25 mL, sendo adicionado aos frascos um volume de 4 mL do coquetel enzimático, volumes de uma solução tamponante de citrato de sódio (0,05 mol.L⁻¹) e de uma solução de azida sódica (0,02% m.v⁻¹) também foram adicionados aos frascos, sendo o restante do volume completado com água destilada para manter uma razão líquido-sólido de 10 mL.g⁻¹.

Posteriormente, os frascos foram vedados contra vazamento de material e incubados a 50°C durante 72 horas, sendo mantidos sob uma rotação de 150 rpm em uma incubadora com agitação orbital, da marca Marconi (modelo MA-830), durante o período de 72 horas. Após esse período os frascos foram subitamente resfriados em um recipiente contendo gelo em excesso, sendo

mantidos nessa condição durante cerca de 30 minutos a fim de encerrar as reações envolvidas na hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados.

Feito isso, as amostras foram submetidas à centrifugação durante 15 minutos sob uma velocidade de rotação de 12000 rpm, em tubos Eppendorf com volume de 3 mL. Após esse período, os líquidos sobrenadantes foram filtrados, a partir de uma membrana de nitrato de celulose com poros de tamanhos iguais a 0,45 μm . Esses volumes filtrados foram devidamente diluídos e acondicionados em vials de 1,5 mL para a análise de açúcares monoméricos em HPLC, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 5.4.5). Nesse caso, utilizou-se volumes de 100 μL de hidrolisado enzimático completando o volume do vial com 900 μL de água milli-Q (ultrapura), ou seja, utilizou-se uma diluição de 10 vezes.

Os rendimentos da hidrólise enzimática em termos da recuperação de glicose, foram calculados a partir da seguinte equação:

$$RHE = \left(\frac{m_{gli.}}{GLU_{SPT}} \right) \cdot 100$$

(equação 11)

Em que: RHE é o rendimento da hidrólise enzimática em termos de glicose hidrolisada (%); $m_{gli.}$ é a massa de glicose solubilizada no hidrolisado enzimático (g); e GLU_{SPT} é a massa de glicanas nos sólidos pré-tratados (g).

5.7 Definição das variáveis-resposta e condições de desejabilidade

A otimização do pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de malte foi realizada preconizando a produção de biogás a partir do hidrolisado gerado e a produção de etanol a partir da fração sólida pré-tratada. Para isso, realizou-se a avaliação de algumas variáveis-resposta (y) para ajustar uma função matemática que descreva o comportamento das mesmas, de acordo com os níveis das variáveis independentes do planejamento experimental (NOVAES et al., 2017).

As variáveis-resposta escolhidas na otimização da auto-hidrólise foram a perda de massa (PM), a remoção de glicanas (RG), a remoção de arabinoxilanas (RX), a remoção de sólidos insolúveis em ácido (RSIA), a concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (CAH) e o rendimento da hidrólise

enzimática dos sólidos pré-tratados (RHE), de modo que os modelos preditivos para as variáveis-resposta foram dados pela seguinte equação genérica:

$$Var = b_0 + b_1 \cdot t + b_2 \cdot t^2 + b_3 \cdot T + b_4 \cdot T^2 + b_5 \cdot RLS + b_6 \cdot RLS^2 + b_7 \cdot t \cdot T + b_8 \cdot t \cdot RLS + b_9 \cdot T \cdot RLS$$

(equação 12)

Em que: Var é o valor previsto da variável-resposta; b_i são os coeficientes de regressão para as variáveis dependentes; t é o tempo (minutos); T é a temperatura (°C); e RLS é a razão líquido-sólido ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$).

A partir dos modelos obtidos para as variáveis-resposta, utilizou-se a ferramenta de desejabilidade do *software* Statistica® (Statsoft Inc, versão 10.0) para estimar as condições do pré-tratamento mais adequadas à produção de biogás e à produção de etanol. É válido ressaltar que outros autores (BAËTA et al., 2016; SANTOS et al., 2018) já utilizaram a desejabilidade como ferramenta preditiva de condições de pré-tratamento ideais à obtenção de bio-produtos.

Essa ferramenta estatística objetiva prever os valores das variáveis independentes (tempo, temperatura e RLS) de acordo com os níveis atribuídos pelo observador a cada variável dependente. Em outras palavras são atribuídos níveis entre 0 (menos desejável) e +1 (mais desejável) as variáveis dependentes (PM, RG, RX, RSIA, RHE, CAH) e o *software* prediz as condições do pré-tratamento (cenários para a produção de biogás e etanol), atribuindo valores às variáveis independentes (T, t, RLS).

Conforme pode ser observado na Tabela 5, no cenário estabelecido para a produção de etanol, utilizou-se como variáveis respostas a perda de massa (PM), a remoção de glicanas (RG), a remoção de arabinoxilanas (RX), a remoção de sólidos insolúveis em ácido (representados por lignina e proteínas) (RSIA) e o rendimento da hidrólise enzimática (RHE).

Nesse cenário, considerou-se que as leveduras tradicionalmente utilizadas na indústria alcooleira (*Saccharomyces cerevisiae*) não utilizam pentoses (arabinoxilanas) como fontes de açúcar (WHITE et al., 2008). Considerou-se também, que a remoção de glicanas (hexoses) da biomassa não é interessante quando o objetivo do pré-tratamento converge para a produção de etanol celulósico (SANTOS et al., 2018), Portanto, o nível da variável RG nesse caso, foi estabelecido como mínimo (menos desejável). Além disso,

assumiu-se nesse cenário, a mínima solubilização da biomassa, a fim de preservar a fração sólida pré-tratada, ou seja, nesse cenário a variável PM também foi estabelecida em seu nível mínimo (menos desejável).

Considerando que ao alterar a estrutura da biomassa, os pré-tratamentos solubilizam ou removem parte da hemicelulose e lignina, aumentando a acessibilidade enzimática, os níveis das variáveis RX e RSIA foram definidos como máximos (mais desejáveis). Por fim e não menos importante, o nível da variável RHE foi definido como máximo (mais desejável), posto que altos rendimentos na produção de etanol celulósico dependem de uma alta solubilização das glicanas da biomassa na forma de glicose, o que foi avaliado como rendimento da hidrólise enzimática.

Deve-se ressaltar contudo, que nesse cenário priorizou-se a produção de etanol celulósico a partir da fração sólida pré-tratada. Nesse caso, os rendimentos da hidrólise enzimática foram avaliados no processo decisório acerca da utilização ou não de um pré-tratamento hidrotérmico preliminar de baixa severidade. Ou seja, os rendimentos da hidrólise enzimática em termos de glicose foram comparados entre os cenários da biomassa bruta e da biomassa lavada. Uma vez definida a melhor condição, o hidrolisado resultante do pré-tratamento foi utilizado para a produção de biogás, integrando nesse cenário a produção de etanol celulósico e biogás.

Por sua vez, nos cenários estabelecidos para a produção de biogás a partir da fração líquida resultante do pré-tratamento, as variáveis-resposta escolhidas foram a perda de massa (PM), a remoção de glicanas (RG), a remoção de arabinoxilanas (RX), a concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (CAH), sendo todas elas estabelecidas em seus níveis máximos.

Tal pressuposto é válido uma vez que se considera que condições mais favoráveis para a produção de biogás sejam aquelas em que se obtenha a maior solubilização da biomassa e a maior quantidade de açúcares no hidrolisado, posto que os mesmos serão utilizados como substrato pela microbiota durante a digestão anaeróbia. Além destas variáveis, a remoção de sólidos insolúveis em ácido (RSIA) também foi considerada para comparar duas condições para a produção de biogás.

Dessa forma, dois cenários foram estabelecidos para produção de biogás, diferindo entre si apenas no nível da variável remoção de sólidos

insolúveis em ácido (RSIA). No primeiro cenário para a produção de biogás (DB1) considerou-se como desejável um hidrolisado com baixo teor de lignina, ou seja, uma baixa remoção de sólidos insolúveis em ácido. No segundo cenário (DB2), considerou-se o nível da variável RSIA como máximo (mais desejável). A motivação para comparar cenários com baixos e altos teores de lignina deve-se ao fato de alguns autores afirmarem que os produtos de degradação da lignina, em sua maioria compostos aromáticos e fenólicos, apresentam alta toxicidade ao consórcio microbiano, afetando a divisão celular e a permeabilidade seletiva da membrana celular destes organismos, contribuindo negativamente para produção de biogás (BAËTA, 2016).

Para os dois cenários estabelecidos (DB1 e DB2), avaliou-se o impacto da adição do pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade como etapa prévia ao tratamento por auto-hidrólise, sobre a produção de biogás e etanol. Para tanto, avaliou-se a inserção ou não de uma etapa de lavagem do bagaço de malte antes das condições DB1 e DB2, originando as condições DB1L e DB2L, conforme pode ser visto na Tabela 5.

Ressalta-se que os sólidos pré-tratados nos cenários para a produção de biogás, foram submetidos à hidrólise enzimática a fim de avaliar a produção de açúcares fermentescíveis (hexoses) e fomentar a produção de etanol celulósico. Porém nesse caso, orientou-se pela escolha do coquetel enzimático e da fração bruta ou lavada, de acordo com os melhores resultados apontados no cenário para a produção de etanol (DE ou DEL).

Tabela 5 – Condições dos cenários estabelecidos para a produção de biogás e etanol.

Cenários	Níveis das variáveis-resposta						Tratamento de baixa severidade
	PM	RG	RX	RSIA	CAH	RHE	
DB1	+1	+1	+1	0	+1	---	Não
DB1L	+1	+1	+1	0	+1	---	Sim
DB2	+1	+1	+1	+1	+1	---	Não
DB2L	+1	+1	+1	+1	+1	---	Sim
DE	0	0	+1	+1	---	+1	Não
DEL	0	0	+1	+1	---	+1	Sim

Uma vez definidos os cenários de produção de biogás e de etanol, os sólidos pré-tratados e os hidrolisados obtidos nessas condições foram submetidos à caracterização, conforme descrito no item 5.4. Os hidrolisados

foram submetidos à hidrólise ácida para a quantificação de oligômeros, segundo metodologia análoga à descrita no item 5.3, com a diferença que nesse caso, o tempo de reação foi fixado em 15 minutos.

5.8 Hidrólise enzimática do sólidos pré-tratados nas condições de desejabilidade

Os sólidos pré-tratados por auto-hidrólise nas condições de desejabilidade para etanol (DE e DEL) foram submetidos à hidrólise enzimática, de acordo com a mesma metodologia descrita no item 5.6. Porém, nesse caso foram utilizadas as cargas enzimáticas de 10 FPU.g⁻¹, 25 FPU.g⁻¹ e 50 FPU.g⁻¹, a fim de se avaliar o efeito da carga enzimática sobre o rendimento em termos de glicose recuperada. Ressalta-se portanto que, o coquetel 85:15, cuja atividade enzimática originalmente de 264,3 FPU.mL⁻¹ foi diluído distintamente para as diversas cargas enzimáticas, fornecendo soluções de atividade enzimática iguais a 2,5 FPU.mL⁻¹, 6,25 FPU.mL⁻¹ e 12,5 FPU.mL⁻¹.

No cenário para a produção de etanol, comparou-se os resultados obtidos com o coquetel 85:15 com um segundo coquetel preparado a partir das mesmas enzimas Cellic® CTec 2 e Cellic® Htec 2 (Novozymes), porém, nesse caso, misturadas na proporção volumétrica de 1:1 (coquetel 50:50). Nesse caso, o coquetel, de atividade enzimática originalmente igual a 208,4 FPU.mL⁻¹, foi diluído distintamente para as cargas enzimáticas, fornecendo soluções de atividades iguais a do coquetel 85:15.

Portanto, no cenário para a produção de etanol, comparou-se os rendimentos da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados sob dois aspectos. O primeiro deles foi a influência do coquetel enzimático sobre os rendimentos de glicose recuperada. Ou seja, nesse cenário avaliou-se qual o coquetel enzimático que proporcionou os maiores rendimentos em termos de glicose. O segundo aspecto relaciona-se à adoção ou não de um pré-tratamento de baixa severidade. Em outras palavras avaliou-se a efetividade do pré-tratamento em uma ou duas etapas, sobre a acessibilidade enzimática, traduzida em termos dos rendimentos de glicose recuperada. Uma vez definidos o melhor coquetel enzimático e a adoção ou não do tratamento em duas etapas, os sólidos pré-tratados nos dois cenários para a produção de biogás, foram submetidos à

hidrólise enzimática conforme as condições descritas acima para os coquetéis 85:15 ou 50:50.

5.9 Determinação da demanda química de oxigênio dos hidrolisados obtidos nas condições de desejabilidade

A determinação da demanda química de oxigênio (COD) dos hidrolisados obtidos, foram realizadas segundo metodologia proposta por Ferreira (2013). Nesse caso utilizou-se 1 mL de amostra, 9 mL de água destilada, 20 mL da solução digestora e 30 mL da solução catalítica. Após a digestão da amostra, ela foi submetida a uma etapa de titulação utilizando solução padronizada de sulfato ferroso amoniacal (FAS). A demanda química de oxigênio (COD) das amostras líquidas é dada pela seguinte equação.

$$COD = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \cdot 8 \cdot N}{V_{hidrolisado}}$$

(equação 13)

Em que: COD é a demanda química de oxigênio da amostra ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); V_{branco} é o volume de FAS gasto na titulação do branco (mL); $V_{amostra}$ é o volume de FAS gasto na titulação da amostra (mL); N é a normalidade da solução de FAS (N); e $V_{hidrolisado}$ é o volume de hidrolisado utilizado (1 mL).

5.10 Determinação dos teores de sólidos totais, voláteis e inorgânicos dos sólidos pré-tratados e hidrolisados obtidos nas condições de desejabilidade

Os teores de sólidos voláteis (SV) nos sólidos pré-tratados e nos hidrolisados obtidos nas condições de desejabilidade (cenários), foram obtidos considerando a diferença entre os sólidos totais da amostra e os sólidos inorgânicos obtidos após calcinação, segundo metodologia padronizada (APHA, 2005).

5.11 Testes para avaliação do potencial bioquímico de metano (BMP)

Os teste de BMP (*biochemical methane potential*) foram realizados segundo protocolo proposto por Angelidaky et al.(2009). Foram utilizados frascos reatores de 120 mL, com 50% de volume de trabalho (60 mL de head space) e concentrações de sólidos totais entre 2% e 5%, dependendo da condição do pré-tratamento. Como inóculo utilizou-se uma mistura de esterco bovino recém coletado e lodo granular de reator UASB concentrado, de tal forma que a mistura de esterco e lodo continha 50% de sólidos voláteis advinda de cada uma das partes, conforme metodologia proposta por Lima et al.(2018).

Alíquotas de 6 mL dos hidrolisados obtidos foram utilizadas como substratos na digestão anaeróbia. Utilizou-se em todos os testes uma relação alimento-microrganismo (substrato-inóculo) igual a 0,4 g_{COD}.g⁻¹_{sv}. Uma solução nutriente contendo macro e micronutrientes foi preparada segundo protocolo proposto por Baêta et al.(2016a), para manter o pH entre 6 e 8 e a relação C:N:P próxima das condições ideais para a digestão anaeróbia (300:5:1). Uma amostra testemunha (branco) foi utilizada para avaliar a produção de biogás a partir da digestão anaeróbia da matéria orgânica do inóculo, de modo que a composição do frasco reator nesse caso, difere das demais replicatas por não possuírem substrato. Ou seja, o volume de 6mL de água destilada foi utilizado nesse caso, em substituição ao hidrolisado. Assim, a produção volumétrica de biogás em cada replicata do teste de BMP foi calculada subtraindo-se a produção volumétrica da amostra testemunha. Os frascos reatores foram incubados a 35°C, sob uma velocidade de agitação de 180 rpm em shaker orbital da marca Solab Científica (modelo SL 221) durante o período de 46 dias.

O monitoramento da produção de biogás foi realizado medindo-se as pressões acumuladas nos frascos reatores, com auxílio de um manômetro diferencial da marca CCE, capaz de medir pressões em uma faixa de pressão de 0 a 5 atm. Posteriormente, as concentrações de CH₄ e H₂ no biogás foram estimadas injetando 1 mL de biogás em um cromatógrafo de fase gasosa da marca Shimadzu (modelo CG-2014), equipado com um detector de condutividade térmica em uma temperatura de 120°C, equipado com uma coluna capilar de peneira molecular (5Å) da marca Restek, preenchida com fase estacionária Msieve 5Å, trabalhando a uma temperatura 120°C usando

nitrogênio 5.0 como gás de arraste, em velocidade linear de 23,8 mL min⁻¹. Os resultados das áreas das amostras foram comparados com a área obtida com uma mistura padrão de fração molar conhecida. O volume de gás foi calculado nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP), utilizando os dados de pressão e composição do biogás medidos.

Após a realização dos testes de BMP, utilizou-se o *software* R para realizar o teste de Shapiro-Wilk, a fim de avaliar se as produções específicas de CH₄ possuem uma distribuição normal. Em caso negativo, procedeu-se a transformação dos dados utilizando o inverso do valor, a raiz quadrada ou o logaritmo neperiano para posterior avaliação de normalidade dos dados transformados. Procedeu-se o teste t de Student (dados normais) ou o teste U de Mann-Whitney (dados não-normais), para avaliar se as diferenças entre as produções médias de CH₄ foram significativas. Ambos casos, comparou-se as produções dos testes de BMP com as FL-TBS1 e FL-TBS2, com as FL-DB1 e FL-DB1L, e com as FL-DB2 e FL-DB2L.

Em um segundo instante, um delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, de tal forma que as produções específicas de CH₄ foram avaliadas segundo o cenário estabelecido. Nesse caso, utilizou-se o *software* R para realizar o teste de Shapiro-Wilk a fim de avaliar a normalidade das produções de CH₄ de todas as condições mencionadas (TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L, DEL). Em caso negativo, procedeu-se a transformação dos dados conforme referenciado anteriormente e avaliou-se a normalidade dos dados transformados. Posteriormente, utilizou-se os testes de Bartlett (dados normais) ou Fligner-Killeen (dados não-normais) para avaliar a homocedasticidade dos dados, ou seja a homogeneidade das variâncias.

Confirmadas a normalidade e homocedasticidade dos dados, utilizou-se o teste F a partir da análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar se existem diferenças significativas entre os cenários, com relação às produções específicas de CH₄. Posteriormente, seguiu-se o teste de Tukey para confirmar os resultados da ANOVA. Caso os dados não possuam normalidade e/ou homocedasticidade, procedeu-se o teste de Kruskal-Wallis, para avaliar se os cenários diferem entre si significativamente.

5.12 Análise da biodegradabilidade anaeróbia dos substratos

Após a etapa de monitoramento dos testes de BMP, os fracos reatores foram abertos e tiveram amostras coletadas para análise de COD, as quais foram realizadas de acordo com descrito no item 5.9 deste documento. Posteriormente, alíquotas das amostras foram filtradas com o auxílio de filtros com tamanho de poros de 0.45 μm e adicionadas em *vials* de 1,5 mL, para serem analisados em HPLC, de acordo com a metodologia descrita no item 5.4.5 desse documento, a fim de avaliar a presença de ácidos graxos voláteis (AGV's).

Após a análise de AGV's, $\text{COD}_{\text{efluente}}$ e produção de biogás foi possível realizar um balanço de massa em termos de COD, e determinar qual a quantidade de COD alimentada foi convertida em COD_{CH_4} . Tal cálculo teve como objetivo determinar a biodegradabilidade do sistema em termos de rendimento de metano. Para tanto considerou-se que nas condições normais de temperatura (273,15K) e pressão (1 bar) o rendimento teórico de CH_4 é de 354,6 NmL por grama de COD do substrato adicionado ao teste.

5.13 Análise da cinética da produção de metano

Os estudos cinéticos das produções de metano são válidos para transpor os resultados experimentais para uma escala industrial, a fim de subsidiar o dimensionamento de uma instalação produtiva de biogás (SCHMIDELL et al., 2001). Os parâmetros cinéticos relacionados à produção de biogás foram determinados segundo os modelos cinéticos de primeira ordem (equação 14) e de Gompertz modificado (equação 15), de acordo com a proposição apontada por Zwietering et al.(1990).

$$P = P_0 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$$

(equação 14)

Em que: P é a produção acumulada de CH_4 ($\text{NmL} \cdot \text{g}^{-1} \text{COD}$) no tempo t; P_0 é a produção máxima de CH_4 ($\text{NmL} \cdot \text{g}^{-1} \text{COD}$); e é o número de Euler (2,71828); k_1 é a constante cinética de primeira ordem da produção de CH_4 (dia^{-1}); e t é o tempo (dias).

$$P = P_0 \cdot e^{-e^{\left\{\left[\frac{\mu_m \cdot e}{P_0} \cdot (\lambda - t)\right] + 1\right\}}}$$

(equação 15)

Em que: P é a produção acumulada de CH_4 ($\text{NmL} \cdot \text{g}^{-1} \text{COD}$) no tempo t ; P_0 é a produção máxima de CH_4 ($\text{NmL} \cdot \text{g}^{-1} \text{COD}$); e é o número de Euler (2,71828); μ_m é a taxa máxima de produção ($\text{NmL} \cdot \text{g}^{-1} \text{COD} \cdot \text{dia}^{-1}$); λ é a fase lag (dias); e t é o tempo (dias).

O ajuste dos modelos aos dados experimentais foram realizados avaliando algumas funções de erro, tais como, os coeficientes de determinação (R^2) entre os valores experimentais e os valores previstos pelos modelos, os erros quadráticos médios (RMSE), os erros quadráticos médios normalizados (NRMSE) e os critérios de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1992; MOTULSKY e CHRISTAPOULOS, 2003), de tal forma que:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i,\text{observado}} - Y_{i,\text{estimado}})^2}{\sum (Y_{i,\text{observado}} - Y_{\text{médio}})^2}$$

(equação 16)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i,\text{observado}} - Y_{i,\text{estimado}})^2}{n}}$$

(equação 17)

$$NRMSE = \left[\frac{RMSE}{(Y_{\text{máximo}} - Y_{\text{mínimo}})} \right] \cdot 100$$

(equação 18)

$$AIC = n \cdot \ln\left(\frac{SS}{n}\right) + 2 \cdot k$$

(equação 19)

Em que: $Y_{i,\text{observado}}$ é o valor da produção específica de CH_4 observado no tempo i ; $Y_{i,\text{estimado}}$ é o valor da produção específica de CH_4 estimado no tempo i ; $Y_{\text{médio}}$ é a média dos valores de produção específica de CH_4 observados; n é o número de medições realizadas durante o experimento; $Y_{\text{máximo}}$ é a máxima produção específica de CH_4 observada; $Y_{\text{mínimo}}$ é a mínima produção específica de CH_4 observada; SS é a soma dos quadrados dos resíduos; e k é o número de variáveis do modelo.

Assim, considerou-se que, o modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais foi aquele que apresentou os maiores valores de coeficiente de determinação (R^2) e os menores valores de RMSE, NRMSE e AIC, conforme proposição apontada por LIMA et al.(2018).

5.14 Avaliação das eficiências energéticas dos pré-tratamentos

As eficiências energéticas dos pré-tratamentos nas condições de desejabilidade (cenários para a produção de etanol e biogás) foram atestadas avaliando se a energia térmica recuperada a partir da queima do biogás em um sistema CHP seria capaz de suprir a energia térmica demandada nos os pré-tratamentos da biomassa, não sendo considerada a energia para o funcionamento de uma planta de digestão anaeróbia. Portanto, as eficiências energéticas foram definidas de acordo com a seguinte equação.

$$\Delta E = E_{biogás} - E_{PT}$$

(equação 20)

Em que: ΔE é o saldo de energia térmica do pré-tratamento ($MJ.kg^{-1}$); $E_{biogás}$ é a energia térmica recuperada pela queima do CH_4 e H_2 em um sistema CHP ($MJ.kg^{-1}$); e E_{PT} é a energia térmica gasta no pré-tratamento da biomassa ($MJ.kg^{-1}$).

Os termos da equação acima podem ser explicitados das seguintes formas, nos casos da biomassa tratada em um e em dois estágios, respectivamente, segundo as seguintes equações:

$$E_{biogás} = ((PBM \cdot \Delta H_{CH_4}^0) + (PBH \cdot \Delta H_{H_2}^0)) \cdot DQO_{FL} \cdot k \cdot \eta_{comb} \cdot \eta_{térmica}$$

(equação 21)

$$E_{biogás} = ((PBM \cdot \Delta H_{CH_4}^0) + (PBH \cdot \Delta H_{H_2}^0)) \cdot DQO_{FL} \cdot k \cdot k_{TBS} \cdot \eta_{comb} \cdot \eta_{térmica}$$

(equação 22)

Em que: BMP é o potencial bioquímico de metano ($Nm^3.kg^{-1}_{COD}$); $\Delta H_{CH_4}^0$ é a entalpia da combustão do CH_4 ($34,5 MJ.Nm^{-3}$); PBH é o potencial bioquímico de hidrogênio ($Nm^3.kg^{-1}_{COD}$); $\Delta H_{H_2}^0$ é a entalpia da combustão do H_2 ($10,8 MJ.Nm^{-3}$); COD_{FL} é a demanda química da fração líquida resultante do pré-

tratamento ($\text{kg}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$); k é a relação entre o volume de hidrolisado recuperado e a massa de entrada de biomassa no reator de hidrólise térmica (em base seca) ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$); k_{TBS} é a relação entre a massa de sólidos de entrada na autohidrólise e a massa de entrada no tratamento de baixa severidade (em base seca) (no caso, $0,748 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$), no caso das condições de pré-tratamento de duas etapas; $\eta_{\text{comb.}}$ é a eficiência de combustão do biogás em motores comerciais, $\eta_{\text{térmica}}$ é a eficiência de conversão da energia da combustão do biogás em energia térmica em um sistema CHP.

Segundo Cano et al.(2015), a eficiência de combustão em um sistema de co-geração de calor e energia (CHP) é de 0,85, enquanto a eficiência de conversão de energia térmica é de 0,65 e elétrica 0,35.

Assim, a energia elétrica recuperada a partir da queima do biogás, nos casos da biomassa tratada em um e em dois estágios, respectivamente são dadas por:

$$E_{\text{elétrica}} = ((PBM \cdot \Delta H_{\text{CH}_4}^0) + (PBH \cdot \Delta H_{\text{H}_2}^0)) \cdot DQO_{\text{FL}} \cdot k \cdot FC \cdot \eta_{\text{comb.}} \cdot \eta_{\text{elétrica}} \quad (\text{equação 23})$$

$$E_{\text{elétrica}} = ((PBM \cdot \Delta H_{\text{CH}_4}^0) + (PBH \cdot \Delta H_{\text{H}_2}^0)) \cdot DQO_{\text{FL}} \cdot k \cdot k_{\text{TBS}} \cdot FC \cdot \eta_{\text{comb.}} \cdot \eta_{\text{elétrica}} \quad (\text{equação 24})$$

Em que: PBM é o potencial bioquímico de metano ($\text{Nm}^3\cdot\text{kg}^{-1}_{\text{COD}}$); $\Delta H_{\text{CH}_4}^0$ é a entalpia da combustão do CH_4 ($34,5 \text{ MJ}\cdot\text{Nm}^{-3}$); PBH é o potencial bioquímico de hidrogênio ($\text{Nm}^3\cdot\text{kg}^{-1}_{\text{COD}}$); $\Delta H_{\text{H}_2}^0$ é a entalpia da combustão do H_2 ($10,8 \text{ MJ}\cdot\text{Nm}^{-3}$); COD_{FL} é a demanda química da fração líquida resultante do pré-tratamento ($\text{kg}_{\text{COD}}\cdot\text{L}^{-1}$); k é a relação entre o volume de hidrolisado recuperado e a massa de biomassa que entra no reator de hidrólise térmica (em base seca) ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$); k_{TBS} é a relação entre a massa de sólidos de entrada na autohidrólise e a massa de entrada no tratamento de baixa severidade (em base seca) (no caso, $0,748 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$), que deve ser considerado nos caso das condições em pré-tratamentos em duas etapas; FC é o fator de conversão de MJ para kWh (no caso, $0,28 \text{ kWh}\cdot\text{MJ}^{-1}$); $\eta_{\text{comb.}}$ é a eficiência de combustão do biogás em motores comerciais; $\eta_{\text{elétrica}}$ é a eficiência de conversão da energia da combustão do biogás em energia elétrica em um sistema CHP.

A energia térmica gasta no pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte pode ser obtida pela seguinte expressão:

$$E_{PT} = (c_{biom} \cdot (T_{PT} - T_{biom})) + (c_{\acute{a}gua} \cdot RLS \cdot (T_{PT} - T_{\acute{a}gua}))$$

(equação 25)

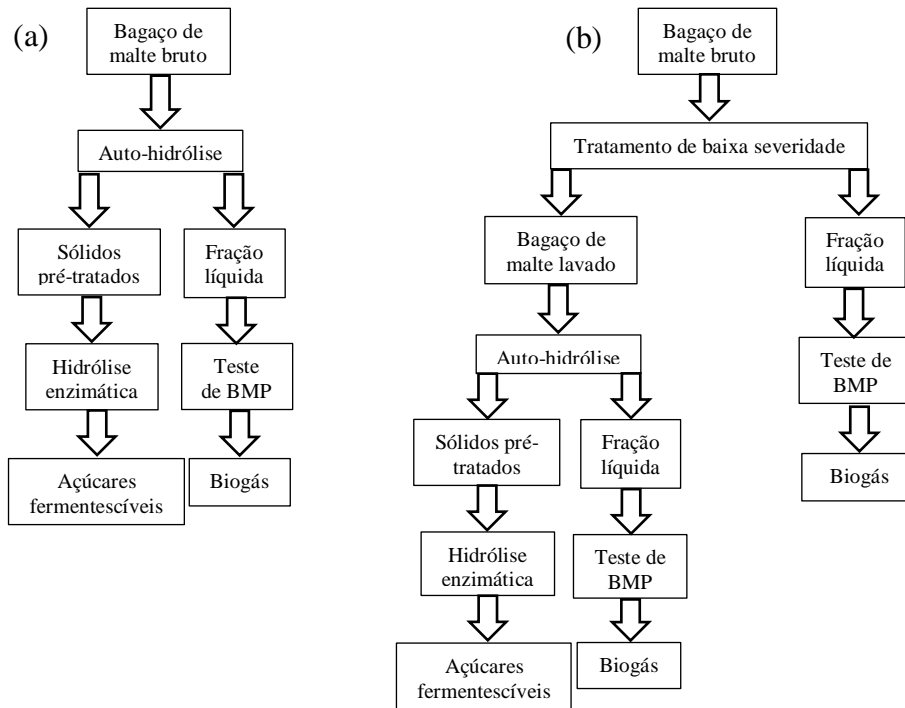
Em que: c_{biom} é a calor específico do bagaço de malte baseado em sua composição ($0,003941 \text{ MJ.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$), de acordo com Bochmann et al. (2015); T_{PT} é a temperatura do pré-tratamento (K); T_{biom} é a temperatura da biomassa de entrada ($333,15 \text{ K}$), segundo Bochmann et al. (2015); $c_{\acute{a}gua}$ é o calor específico da água ($0,0041868 \text{ MJ.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$); RLS é a razão líquido-sólido adotada no pré-tratamento (kg.kg^{-1}); e $T_{\acute{a}gua}$ é a temperatura da água de alimentação ($373,15 \text{ K}$).

Na equação acima, pode-se fazer a consideração de que a água de alimentação já chega no reator a uma temperatura de 100°C e no estado de vapor, uma vez que os gases de combustão final e a água de resfriamento obtida a partir do sistema CHP, podem ser utilizadas em um trocador de calor para obter a água de alimentação nas condições de entrada (BAËTA et al., 2016a). Uma análise estatística dos valores de eficiência energética foi realizada conforme mencionado no item 5.11 deste documento.

5.15 Rotas biotecnológicas utilizadas

As metodologias utilizadas nesse estudo baseiam-se na produção de biogás a partir das frações líquidas obtidas com o tratamento hidrotérmico do bagaço de malte, bem como a produção de açúcares fermentescíveis com a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, de acordo com a seguinte figura 10.

Figura 10 - Rotas biotecnológicas utilizadas neste estudo para o tratamento hidrotérmico em uma etapa (a); e em duas etapas (b).



6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do bagaço de malte e avaliação da remoção de açúcares não-ligados através do tratamento hidrotérmico de baixa severidade

O bagaço de malte bruto (sem tratamento) utilizado no presente estudo apresentou uma composição química média de $33,8 \pm 1,3$ % de glicanas, $20,5 \pm 1,0$ % de arabinoxilanas, $20,7 \pm 5,1$ % de sólidos insolúveis em ácido (lignina e proteínas), $22,2 \pm 2,4$ % de extrativos, $3,5 \pm 0,1$ % de lignina solúvel e $3,3 \pm 0,1$ % de sólidos inorgânicos (cinzas). Por sua vez, o bagaço de malte submetido ao tratamento hidrotérmico de baixa severidade (lavado) durante 30 minutos, apresentou uma composição média de $34,7 \pm 3,4$ % de glicanas, $28,1 \pm 2,0$ % de arabinoxilanas, $11,7 \pm 0,9$ % de sólidos insolúveis em ácido (SIA's), $13,7 \pm 1,2$ % de extrativos, $4,7 \pm 0,1$ % de lignina solúvel e $3,5 \pm 0,2$ % de cinzas.

Os resultados de uma forma geral mostram que o pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade proporcionou um enriquecimento da fração sólida em termos de glicanas, arabinoxilanas, lignina solúvel e cinzas, em detrimento da remoção de outros componentes, possivelmente proteínas hidrossolúveis da biomassa identificadas nas formas de SIA's e extrativos.

Vale ressaltar que o estudo de Paz et al. (2019), revelou que a lavagem do bagaço de malte a 50°C durante 4 horas proporcionou uma redução nos teores de glicanas, lignina Klason, extrativos e cinzas da fração sólida, tendo havido um enriquecimento apenas em termos de hemicelulose. Nesse caso, os autores realizaram essa lavagem da biomassa para evitar erros analíticos. De fato, após o tratamento de baixa severidade, os desvios padrão dos teores de SIA's e extrativos reduziram bastante.

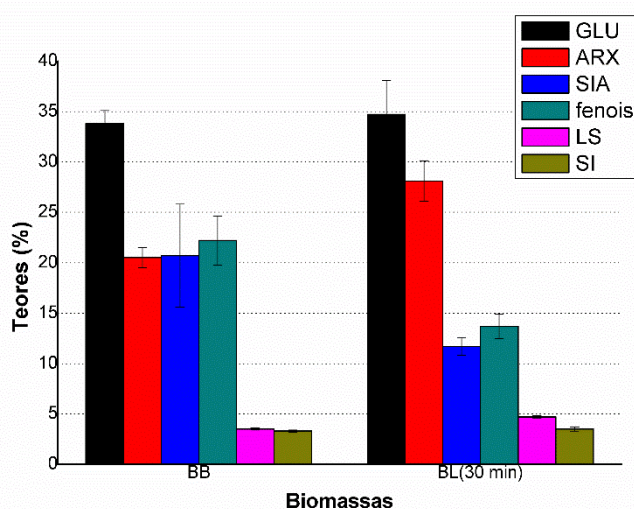
Os teores de glicanas obtidos nas biomassas foram superiores aos fornecidos por Carvalheiro et al. (2004) (21,9%) e Michelin e Teixeira (2016) (16,5%), Wilkinson et al. (2016) (23,3%) e Kemppainen et al. (2016) (18,1%), para o mesmo tipo de biomassa. No entanto, deve-se considerar que o bagaço de malte utilizado no presente estudo provém de uma microcervejaria local, enquanto os autores mencionados obtiveram biomassas oriundas de instalações industriais de maior porte. Em relação a esse aspecto, a diferença entre os maiores valores obtidos neste estudo e os observados por outros autores pode

estar associada a uma maior eficiência dos processos de malteação e mosturação em instalações industriais, comparativamente a uma cervejaria de pequeno porte, sobretudo com relação aos teores de glicanas. Além disso, outros fatores devem ser levados em consideração, tais como as características da cevada e a qualidade do malte.

Em termos de arabinoxilanas, os valores obtidos no presente estudo foram coerentes com aqueles apresentados por Panagiotopoulos et al. (2009), Kemppainen et al. (2016), Michelin e Teixeira (2016), Wilkinson et al. (2016) e Plaza et al. (2017), cujos teores mássicos percentuais estiveram entre 19,3% e 25,6% para o mesmo tipo de biomassa. Vale salientar que Rojas-Chamorro et al. (2017) e Qin et al. (2018) verificaram traços de galactanas e mananas, enquanto Kemppainen et al. (2016) detectaram além desses açúcares, traços de raminanas no bagaço de malte.

Os teores percentuais médios dos componentes do bagaço de malte bruto (BB) e do bagaço lavado por 30 minutos (BL), encontram-se indicados na Figura 11. Em geral os balanços mássicos apresentaram bons resultados, com valores entre 96,4% (biomassa lavada) e 104% (biomassa bruta).

Figura 11: Teores dos componentes das biomassas bruta e lavada.



O pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade proporcionou valores de perda de massa (PM) entre $25,2 \pm 2,7\%$ e $28,8 \pm 1,9\%$, dependendo do tempo de reação utilizado, tendo ocorrido uma relação direta de proporcionalidade entre a PM e o tempo de reação, conforme pode ser visto na Tabela 6. No entanto, é válido ressaltar que tais diferenças foram consideradas baixas, mostrando que

os compostos livres presentes na superfície do bagaço de malte são removidos na maior parte durante os primeiros trinta minutos de pré-tratamento de baixa severidade, portanto, o tempo de 30 minutos foi utilizado no restante do trabalho.

Tabela 6 – Perdas de massa e concentrações de açúcares monoméricos obtidos com o pré-tratamento de baixa severidade do bagaço de malte.

Tempo (min)	V _{REC} (mL)	PM (%)	GLU (g.L ⁻¹)	ARX (g.L ⁻¹)
30	275 (2)	25,2 (2,7)	3,322 (1,129)	0,279 (0,140)
45	270 (1)	26,4 (2,3)	3,343 (0,709)	0,349 (0,090)
60	245 (3)	28,8 (1,9)	3,434 (1,284)	0,342 (0,140)

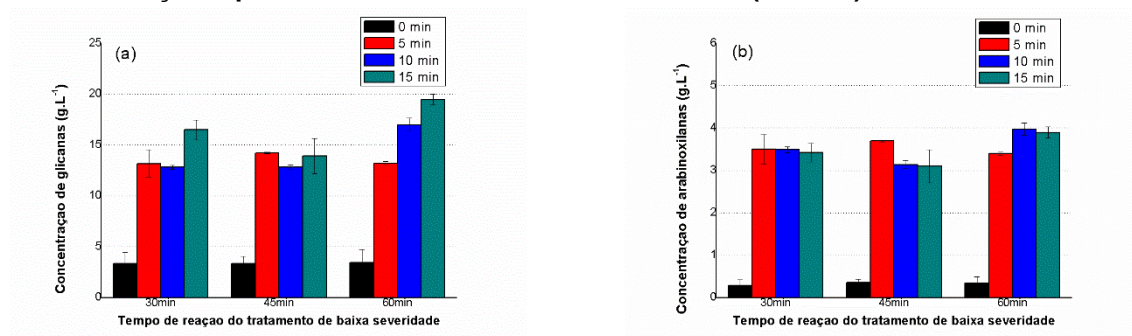
A Tabela 6 mostra que a maior parte dos açúcares monoméricos obtidos com o tratamento de baixa severidade são glicanas (celobiose e glicose). Inclusive, a maior parte dos açúcares identificados são dímeros de glicose, nesse caso identificados como celobiose. No entanto, deve-se considerar que a baixa severidade do pré-tratamento não é suficiente para degradar celulose, liberando dímeros de glicose na solução.

Assim, acredita-se que a celobiose e a glicose identificadas nos hidrolisados, são decorrentes dos oligômeros adsorvidos à superfície da biomassa, sendo remanescentes do processo de mosturação. Vale salientar que o tratamento de baixa severidade, independente do tempo de reação, não foi capaz de gerar produtos da degradação de açúcares, tais como FF e HMF. Isso aponta uma perspectiva promissora para a produção de biogás.

Para compreender o teor total de açúcares (monômeros e oligômeros) no hidrolisado do tratamento de baixa severidade, tais frações líquidas foram submetidas a uma hidrólise ácida conforme descrito no item 5.3. O aumento das concentrações de açúcares monoméricos (glicanas e arabinosilanas), ácidos fórmico, ácido acético, FF e HMF ao longo do tempo da hidrólise ácida é um indicativo de que grande parte dos açúcares presentes na fração líquida obtida com o pré-tratamento de baixa severidade (FL-TBS), se encontrava em sua forma oligomérica, sendo degradados a monômeros, ácidos e aldeídos após submetidos a uma hidrólise ácida.

A Figura 12 indica as concentrações totais de glicanas e arabinosilanas não-ligadas do bagaço de malte, removidas com o pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade a 30, 45 e 60 minutos.

Figura 12 – Concentrações de glicanas (a) e arabinoxilanas (b) obtidas com a hidrólise ácida da fração líquida do tratamento de baixa severidade (FL-TBS).



A partir da Figura 12 observa-se que a FL-TBS (0 min, sem hidrólise ácida) possui uma concentração de glicanas (hexoses) entre 3,0 e 3,6 g.L⁻¹ e arabinoxilanas (pentoses) de 0,4 e 0,6 g.L⁻¹. Tais resultados mostram que não houve uma diferença considerável entre os teores de açúcares monoméricos na FL-TBS considerando diferentes tempos de reação, o que indica que o tempo não foi um fator tão importante para solubilização dos açúcares monoméricos e que, dentre os tempos de reação avaliados, o valor de 30 minutos é suficiente para remover grande parte dos açúcares adsorvidos à superfície da biomassa.

Os baixos valores de severidade aplicados na etapa de lavagem sugerem que os açúcares removidos durante esse processo não pertencem à estrutura da biomassa, pois tais condições de pré-tratamento não são suficientes para promover a hidrólise da celulose e hemicelulose. Isso corrobora a perspectiva de que esses açúcares podem ser advindos do próprio processo de produção de cerveja, possivelmente devido à adsorção dos açúcares contidos no mosto e/ou pela solubilização de parte dos açúcares residuais que não foram utilizados no processo de mosturação.

A Figura 12 confirma também, que grande parte dos açúcares presentes na FL-TBS se encontram na sua forma oligomérica. Após a hidrólise ácida dos hidrolisados gerados, percebeu-se que as concentrações de glicanas aumentaram para uma faixa entre 16,5 a 19,5 g.L⁻¹, o que corresponde a aproximadamente 600% de aumento no conteúdo de glicanas em relação a FL-TBS não submetida à hidrólise ácida (0 min). Para as arabinoxilanas a faixa de concentração obtida após a hidrólise ácida encontrou-se entre 3,4 e 3,9 g.L⁻¹, o que representa um aumento de aproximadamente 850% em relação ao teor de arabinoxilanas identificados inicialmente.

O aumento considerável nas concentrações dos açúcares monoméricos após a hidrólise ácida, confirma que a maior parte desses açúcares solubilizados durante o pré-tratamento de baixa severidade a 80°C, estão presentes na forma oligomérica. Pois, durante a hidrólise ácida ocorrem a clivagem de cadeias oligoméricas e a desidratação de açúcares monoméricos, na forma de monômeros, ácidos orgânicos e furfuraldeídos. Os resultados mostram que o teor de açúcares na FL-TBS é elevado, o que indica o seu potencial para a geração de biogás a partir da digestão anaeróbia.

Metodologia análoga foi utilizada por Carvalheiro et al. (2004) para quantificar o teor de xilo-oligossacarídeos nos hidrolisados obtidos após a auto-hidrólise do bagaço de malte entre as temperaturas de 150° e 190°C, utilizando uma RLS de 8 mL.g⁻¹, porém os autores utilizaram um tempo de autoclavagem de até 60 minutos. Os mesmos obtiveram hidrolisados com concentrações de xilo-oligossacarídeos de 13,9 g.L⁻¹ (150°C, 180 min), 14,3 g.L⁻¹ (170°C, 30 min) e 16,6 g.L⁻¹ (190°C, 5 min), valores esses bem inferiores às concentrações de glico-oligômeros obtidas com a lavagem do bagaço de malte. Além disso, Paz et al. (2019) obtiveram um hidrolisado com um teor de 3,71 g.L⁻¹ de maltose ao submeterem o bagaço de malte em água a 50°C durante 4 horas, sob uma velocidade de agitação de 160 rpm. Tais resultados confirmam que o bagaço de malte possui uma grande quantidade de açúcares não-ligados adsorvidos à superfície da biomassa, que são remanescentes do processo de mosturação.

Com relação ao pré-tratamento por auto-hidrólise (AH) a presença destes açúcares superficiais não-ligados pode ser um fator negativo. Como tais açúcares se encontram em uma forma mais disponível, parte da energia fornecida ao sistema durante o pré-tratamento por AH pode ser destinada para as reações de desidratação dos açúcares mais disponíveis à HMF e FF, respectivamente, aumentando a concentração de tais compostos no meio.

A presença de HMF e FF em altas quantidades pode influenciar na produção de biogás a partir da fração líquida gerada após o pré-tratamento por AH, devido à toxicidade que esses compostos exercem sobre a microbiota. Ou ainda, dificultar a acessibilidade das enzimas durante a hidrólise enzimática (HE) da fração sólida pré-tratada, devido a efeitos de adsorção improdutiva e hidrofobicidade. Diante disso, avaliou-se o efeito da utilização de um pré-tratamento térmico em duas etapas (80°C durante 30 min seguido do pré-

tratamento por auto hidrólise), sobre a produção de biogás e sobre os rendimentos da hidrólise enzimática.

É válido ressaltar que, a maior parte dos trabalhos que utilizam o pré-tratamento por auto-hidrólise (AH) do bagaço de malte, considera o processo em uma única etapa. Assim, para avaliar o efeito da adição da etapa de lavagem à 80°C e 30 min, as melhores condições do pré-tratamento (condições de desejabilidade) foram repetidas, adicionando uma etapa de lavagem anteriormente à AH, sendo os resultados de rendimento comparados.

6.2 Auto-hidrólise do bagaço de malte

Em geral, as frações sólidas pré-tratadas apresentaram bons resultados de balanços de massa, com valores entre 91% e 106,8% conforme pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7 – Balanços mássicos dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise.

Ensaio	GLU (%)	ARX (%)	SIA (%)	LS (%)	SI (%)	Soma (%)
1	41,0(1,2)	14,6(0,5)	30,9(5,1)	5,2(0,1)	3,5(0,2)	95,2
2	36,3(1,7)	9,5(0,8)	53,0(0,8)	3,0(0,1)	2,0(0,3)	103,8
3	35,9(2,2)	18,6(1,6)	36,8(3,0)	4,3(0,2)	3,2(0,2)	98,8
4	34,8(1,2)	19,7(1,3)	29,5(2,7)	4,4(0,1)	3,1(0,1)	91,5
5	43,3(1,5)	19,0(1,1)	35,7(0,9)	4,4(0,1)	3,3(0,1)	105,7
6	41,5(1,2)	18,7(0,8)	27,6(5,7)	4,2(0,1)	3,0(0,2)	95,0
7	41,1(0,6)	16,4(0,5)	40,8(6,3)	4,0(0,1)	3,0(0,1)	105,3
8	38,9(0,8)	18,1(0,7)	35,4(5,4)	4,2(0,1)	3,3(0,1)	99,9
9	37,3(0,7)	16,9(0,2)	45,0(6,0)	3,8(0,3)	2,1(0,4)	105,1
10	37,5(1,0)	16,8(0,8)	33,3(4,2)	4,2(0,1)	2,7(0,3)	94,5
11	31,9(1,1)	22,3(1,0)	44,9(6,1)	4,9(0,1)	2,8(0,2)	106,8
12	38,2(1,0)	18,0(0,8)	33,9(0,8)	4,5(0,2)	3,5(0,3)	98,1
13	34,9(0,8)	19,6(1,1)	30,8(6,2)	4,2(0,1)	2,6(0,4)	92,1
14	36,0(1,0)	18,1(0,4)	30,4(4,7)	4,4(0,3)	3,4(0,3)	92,3
15	34,3(1,5)	18,1(1,2)	32,0(3,2)	4,3(0,1)	3,2(0,1)	91,9
16	35,8(0,5)	18,8(0,8)	29,3(5,4)	3,7(0,1)	3,4(0,2)	91,0

Carvalho et al.(2004) realizaram experimentos de auto-hidrólise do bagaço de malte, variando o tempo de reação entre 0 e 420 minutos em um reator do tipo Parr, utilizando uma rotação de 150 rpm, temperaturas de 150°C, 170°C e 190°C e razões líquido-sólido de 8 mL.g⁻¹. Os autores obtiveram sólidos

pré-tratados contendo entre 19,6% e 29,2% de glicanas, 4,41% a 32,04% de arabinoxilanas e 28,16% a 60,12% de lignina Klason, utilizando uma matéria-prima contendo inicialmente 21,9% de glicanas, 29,6% de arabinoxilanas e 21,7% de lignina Klason. Michelin e Teixeira (2016) também realizaram a auto-hidrólise do bagaço de malte em um reator do tipo Parr, utilizando a temperatura de 190°C e o tempo de reação de 30 minutos. Os autores obtiveram sólidos pré-tratados contendo 26,55% de glicanas, 10,25% de arabinoxilanas e 32,6% de lignina Klason, utilizando uma matéria-prima contendo inicialmente 16,5% de glicanas, 25,55% de arabinoxilanas e 20,4% de lignina Klason.

As frações sólidas pré-tratadas obtidas no presente estudo apresentaram valores de glicanas de 31,9% a 43,3%, e de arabinoxilanas entre 9,5% e 19,8%. Para algumas condições de pré-tratamento a fração sólida obtida foi enriquecida em até 10% no seu teor de glicanas inicial, valores próximos dos apresentados por Carvalheiro et al.(2004) e Michelin e Teixeira (2016).

Os resultados obtidos com relação à composição dos hidrolisados gerados após os pré-tratamentos hidrotérmicos por AH do bagaço de malte, encontram-se apresentados na Tabela 8. Embora tenham sido identificadas decrescentes concentrações de celobiose e crescentes concentrações de glicose com o aumento da severidade do pré-tratamento, acredita-se que as magnitudes das concentrações de celobiose, sobretudo nos ensaios de menor severidade, revelam que tais dímeros de glicose podem ser advindos da clivagem de oligômeros não-ligados da biomassa. Enquanto o aumento das concentrações de glicose podem ser advindos da clivagem desses dímeros de glicose e glico-oligômeros.

Carvalheiro et al. (2004) analisaram as composições dos hidrolisados gerados durante o tratamento do bagaço de malte por auto-hidrólise e diagnosticaram que a concentração de 2-furfuraldeído (FF) aumentou proporcionalmente ao tempo de reação. Os autores observaram que a formação de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF) foi detectada apenas em baixas concentrações, valor máximo de 0,39 g.L⁻¹. De fato, nos ensaios 2 (180°C, 49 minutos, 7 mL.g⁻¹), 9 (180°C, 26 minutos, 7 mL.g⁻¹) as concentrações de FF e HMF aumentaram proporcionalmente ao tempo de reação, tendo o ensaio 2 gerado um hidrolisado com concentração de HMF de 0,27 g.L⁻¹. Além destes ensaios, o HMF foi apenas detectado no ensaio 10 (160°C, 38 min, 4 mL.g⁻¹).

Vale salientar que o limite de detecção utilizado nas análise em HPLC para estes compostos foi de 5 mg.L⁻¹.

Tabela 8 – Concentrações médias (g.L⁻¹) dos açúcares monoméricos, ácidos orgânicos e furfuraldeídos nos hidrolisados resultantes da auto-hidrólise do bagaço de malte.

Ensaio	cel.	gli.	xil.	ara.	A.F.	A.A.	HMF	FF
1	2,59 (0,53)	0,34 (0,02)	0,03 (0,01)	0,09 (0,02)	0,14 (0,01)	0,53 (0,01)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
2	0,88 (0,02)	0,59 (0,01)	0,58 (0,03)	0,82 (0,04)	7,77 (0,02)	0,97 (0,03)	0,10 (0,00)	0,27 (0,00)
3	1,75 (0,29)	0,13 (0,01)	0,03 (0,00)	0,05 (0,00)	0,10 (0,01)	0,33 (0,05)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
4	2,22 (0,56)	0,08 (0,00)	0,02 (0,00)	0,07 (0,01)	0,22 (0,04)	0,46 (0,08)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
5	2,31 (1,38)	0,05 (0,00)	0,08 (0,06)	0,11 (0,09)	0,36 (0,15)	0,32 (0,03)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
6	2,18 (0,04)	0,07 (0,02)	0,03 (0,00)	0,07 (0,01)	0,28 (0,10)	0,27 (0,03)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
7	2,86 (0,22)	0,42 (0,50)	0,05 (0,03)	0,18 (0,14)	0,55 (0,03)	0,29 (0,05)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
8	3,17 (0,12)	0,15 (0,06)	0,06 (0,02)	0,10 (0,00)	0,28 (0,10)	0,52 (0,10)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
9	1,44 (0,04)	0,41 (0,00)	0,21 (0,00)	1,40 (0,02)	2,11 (0,06)	1,04 (0,04)	0,02 (0,00)	0,04 (0,00)
10	2,79 (0,03)	0,40 (0,08)	0,21 (0,01)	0,82 (0,02)	0,83 (0,04)	1,37 (0,11)	0,01 (0,00)	0,00 (0,00)
11	1,25 (0,40)	0,09 (0,01)	0,03 (0,00)	0,05 (0,00)	0,10 (0,00)	0,33 (0,03)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
12	2,26 (0,06)	0,11 (0,01)	0,05 (0,00)	0,06 (0,00)	0,11 (0,07)	0,44 (0,11)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
13	1,58 (0,32)	0,09 (0,00)	0,03 (0,01)	0,07 (0,03)	0,10 (0,02)	0,63 (0,06)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
14	1,76 (0,51)	0,09 (0,00)	0,02 (0,01)	0,05 (0,01)	0,20 (0,01)	0,35 (0,03)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
15	2,43 (0,64)	0,09 (0,00)	0,04 (0,00)	0,05 (0,00)	0,32 (0,08)	0,64 (0,23)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
16	2,05 (0,02)	0,10 (0,00)	0,03 (0,01)	0,05 (0,02)	0,20 (0,02)	0,57 (0,34)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

6.3 Otimização da auto-hidrólise do bagaço de malte e definição de cenários para a produção de biogás e etanol

Os valores das variáveis resposta utilizadas na otimização do pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de malte, e que foram utilizadas para a obtenção dos cenários visando a produção de biogás e produção de etanol, encontram-se apresentados na Tabela 9.

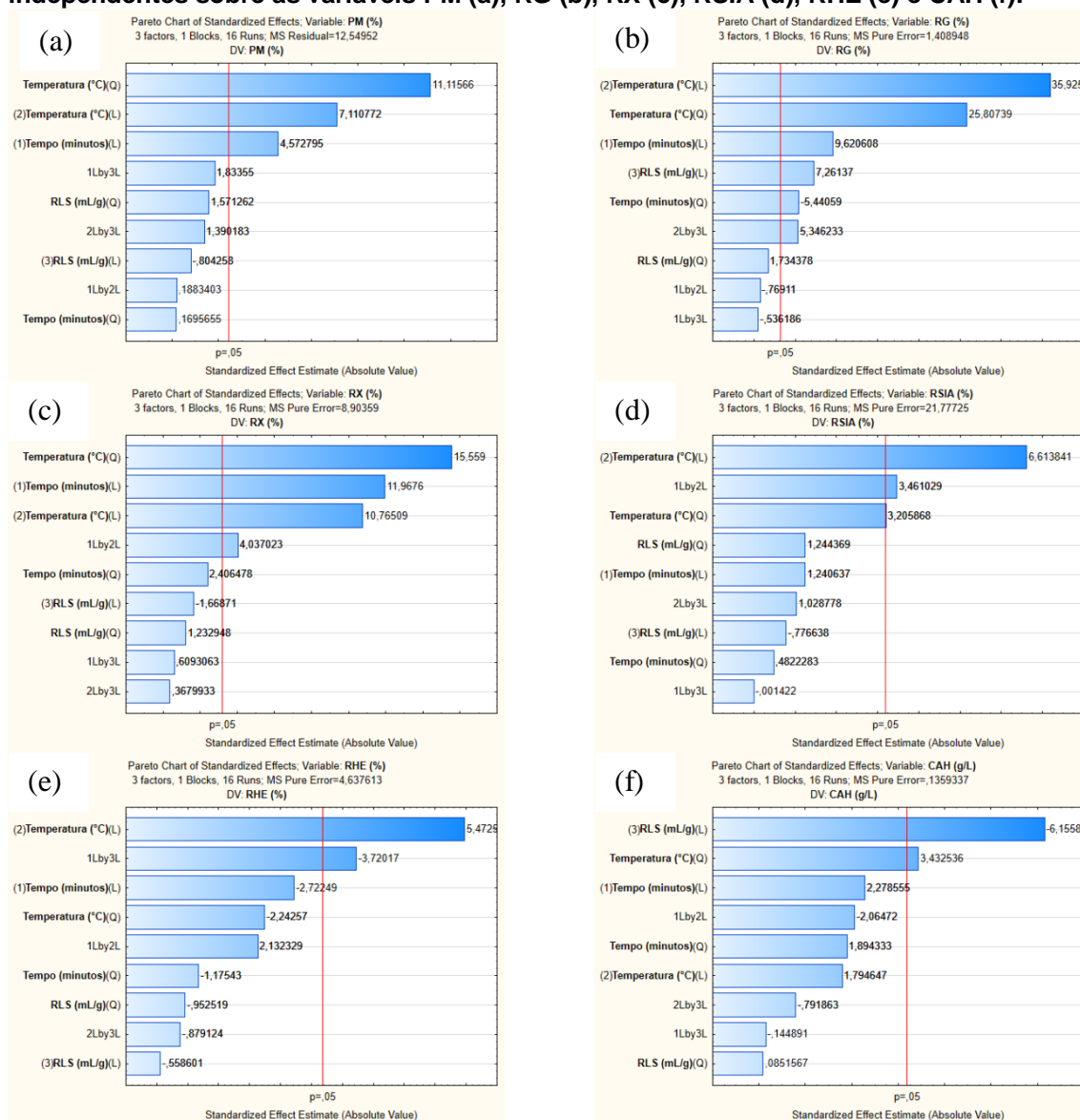
Tabela 9 – Variáveis-resposta obtidas com a auto-hidrólise do bagaço de malte.

Ensaio	PM (%)	RG (%)	RX (%)	RSIA (%)	RHE (%)	CAH (g.L ⁻¹)
1	21,9	5,3	44,5	13,63	17,0	3,1
2	58,2	56,3	90,8	47,64	18,7	2,9
3	32,4	28,3	38,6	10,89	6,3	2,0
4	9,4	6,7	12,9	4,17	12,7	2,4
5	24,3	3,0	29,9	3,02	12,7	2,5
6	19,8	1,4	26,7	20,62	15,5	2,4
7	31,9	17,2	45,4	0,29	0,5	3,5
8	24,3	13,0	33,0	4,03	14,2	3,5
9	49,0	43,6	50,8	17,70	21,4	3,5
10	31,3	23,7	43,7	17,90	16,5	4,2
11	14,1	19,0	20,9	17,10	21,7	1,4
12	22,1	11,9	31,5	5,21	14,7	1,2
13	15,0	12,2	18,5	6,10	18,8	1,8
14	15,4	10,0	25,3	7,94	17,9	1,9
15	14,0	12,7	24,1	1,37	13,8	2,6
16	16,9	12,0	23,6	12,65	17,3	2,2

Os efeitos normalizados das variáveis independentes (tempo (t), temperatura (T) e razão líquido-sólido (RLS)) sobre as variáveis dependentes (PM - perda de massa, RG - remoção de glicanas, RX - remoção de arabinoxilanas, RSIA - remoção de SIA's, RHE - rendimento hidrólise enzimática, CAH - concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado), estão apresentados nos Diagramas de Pareto da Figura 12.

O Diagrama de Pareto da Figura 13(a) indica que tanto o efeito da variável temperatura (T), quanto o efeito dessa variável elevado à segunda potência (T^2) representam a maior parte dos efeitos significativos e positivos sobre a variável perda de massa (PM). Ou seja, aproximadamente 80% da modelagem da variável PM pode ser representada por um polinômio de segunda ordem em termos de T. A variável tempo (t) também exerce um efeito significativo positivo sobre a perda de massa, porém com uma menor influência sobre o modelo. Isso coloca a perspectiva de que nos pré-tratamentos por auto-hidrólise do bagaço de malte, maiores temperaturas e tempos de reação são indicados quando se deseja obter uma maior solubilização dos constituintes do bagaço de malte.

Figura 13 – Diagramas de Pareto dos efeitos estimados padronizados das variáveis independentes sobre as variáveis PM (a), RG (b), RX (c), RSIA (d), RHE (e) e CAH (f).



Os ensaios de auto-hidrólise 9 e 2 (180°C e 7 mL.g⁻¹), cujos tempos de reação foram iguais a 26 e 49 minutos, foram aqueles que proporcionaram as maiores perdas de massa, respectivamente iguais a 49 e 58,2%. Interessante ressaltar, que o resultado obtido com o ensaio 2 é análogo à perda de massa obtida no estudo de Beldman et al.(1986) com o tratamento termoquímico do bagaço de malte, utilizando NaOH (0,5 N) a 90°C durante 4 horas, cujo valor foi de 61,6%. No entanto, é válido ressaltar que a solubilização durante o pré-tratamento por AH não necessita de nenhum tipo de reagente químico, o que implica em menores custos de operação e implementação do processo quando comparado aos processos termoquímicos ácidos e básicos.

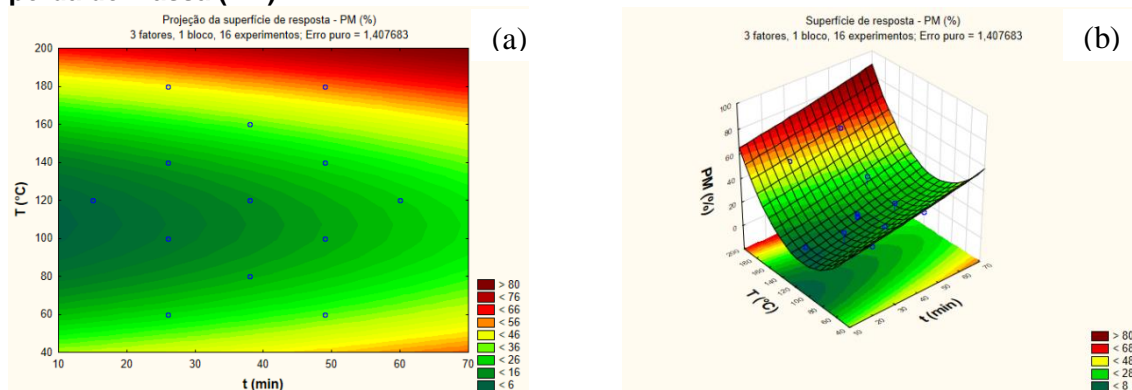
Comparando os ensaios 11 e 3 (140°C e 10 mL.g^{-1}), percebeu-se que um incremento no tempo de reação de 26 para 49 minutos proporcionou um aumento de 18,3% nos valores de perda de massa. Porém, comparando os ensaios 6 e 8 (100°C e 4 mL.g^{-1}), percebeu-se que um incremento no tempo de reação de 26 para 49 minutos proporcionou um aumento de apenas 4,5% nos valores de perda de massa. No caso do ensaio 4, dos experimentos no ponto central do planejamento experimental e do ensaio 1, cujas temperaturas foram de 120°C e RLS de 7 mL.g^{-1} , com tempos de reação iguais a 15, 38 e 60 minutos, respectivamente, os percentuais de perda de massa foram respectivamente iguais a 9,4%, 15,3% (em média) e 21,9%. Isto mostra que em temperaturas mais elevadas o efeito do aumento do tempo é mais efetivo na solubilização da biomassa e no aumento da perda de massa.

Portanto, evidencia-se em todos esses casos que existe uma relação proporcional direta entre o tempo de reação e os valores de perda de massa, considerando os mesmos valores de temperatura e razão líquido-sólido. Além disso, evidenciou-se que no caso de dois ensaios realizados com a mesma T e RLS, a diferença entre os valores de perda de massa obtidos aumenta com o incremento do t. Além disso, o efeito positivo da temperatura na perda de massa pode ser observado comparando os resultados para os ensaios 2 (180°C , 7 mL.g^{-1} e 49 min) e 7 (60°C , 7 mL.g^{-1} e 49 min), os quais diferem-se somente na temperatura. A condição de maior temperatura (ensaio 2) apresentou um valor de perda de massa 26% maior que o apresentado para condição 7. As superfícies de resposta geradas pela modelagem do comportamento da variável dependente PM, como uma função das variáveis independentes, podem ser vistas nas Figuras 14 (a) e 14 (b).

As Figuras 14(a) e 14(b) indicam que quanto maiores os tempos de reação da auto-hidrólise do bagaço de malte, tão menores necessitam ser as temperaturas para se obter resultados análogos de PM. De fato, os ensaios 3 (140°C , 49 minutos, 10 mL.g^{-1}) e 10 (160°C , 38 minutos, 4 mL.g^{-1}) apresentaram valores de perda de massa em torno de 32%, bem como os ensaios 6 (100°C , 26 minutos, 4 mL.g^{-1}) e 12 (80°C , 38 minutos, 10 mL.g^{-1}) apresentaram valores de perda de massa em torno de 21%. Interessante observar que o pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade, realizado a 80°C durante 30 minutos, utilizando uma RLS de 10 mL.g^{-1} proporcionou uma perda de massa

ligeiramente superior (algo em torno de 3%) à perda de massa obtida no ensaio 12, o que possivelmente está atribuído à agitação da mistura durante todo o tempo de reação durante o pré-tratamento de baixa severidade.

Figura 14 – Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável perda de massa (PM).



A análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da variável PM encontra-se no ANEXO 1. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,97109. A equação gerada pela modelagem computacional da variável PM é dada por:

$$PM = 152,0187 - 0,4734 \cdot t + 0,0010 \cdot t^2 - 1,7143 \cdot T + 0,0071 \cdot T^2 - 11,8186 \cdot RLS + 0,3361 \cdot RLS^2 + 0,0005 \cdot t \cdot T + 0,0992 \cdot t \cdot RLS + 0,0251 \cdot T \cdot RLS$$

(equação 25)

O Diagrama de Pareto da Figura 13(b) indica que os efeitos da temperatura (T) e desta variável à segunda potência (T^2) correspondem a 73,5% dos efeitos positivos significativos sobre a variável dependente remoção de glicanas (RG). A variável tempo (t) e razão líquido-sólido (RLS) também exercem efeitos positivos significativo sobre a RG, representando cerca de 20% dos efeitos significativos positivos do modelo. Isso indica que, diferentemente da perda de massa, a RLS é uma variável independente que deve ser considerada durante a remoção de glicanas da biomassa, de modo que um aumento da relação líquido-sólido provoca uma maior remoção de hexoses. Além disso, o efeito significativo negativo da variável t^2 indica que à medida que o tempo de reação é incrementado pode ocorrer uma redução nos valores de RG.

Analogamente ao caso anterior, os maiores valores de remoção de glicanas da biomassa foram aqueles obtidos nos ensaios 2 e 9, muito embora o

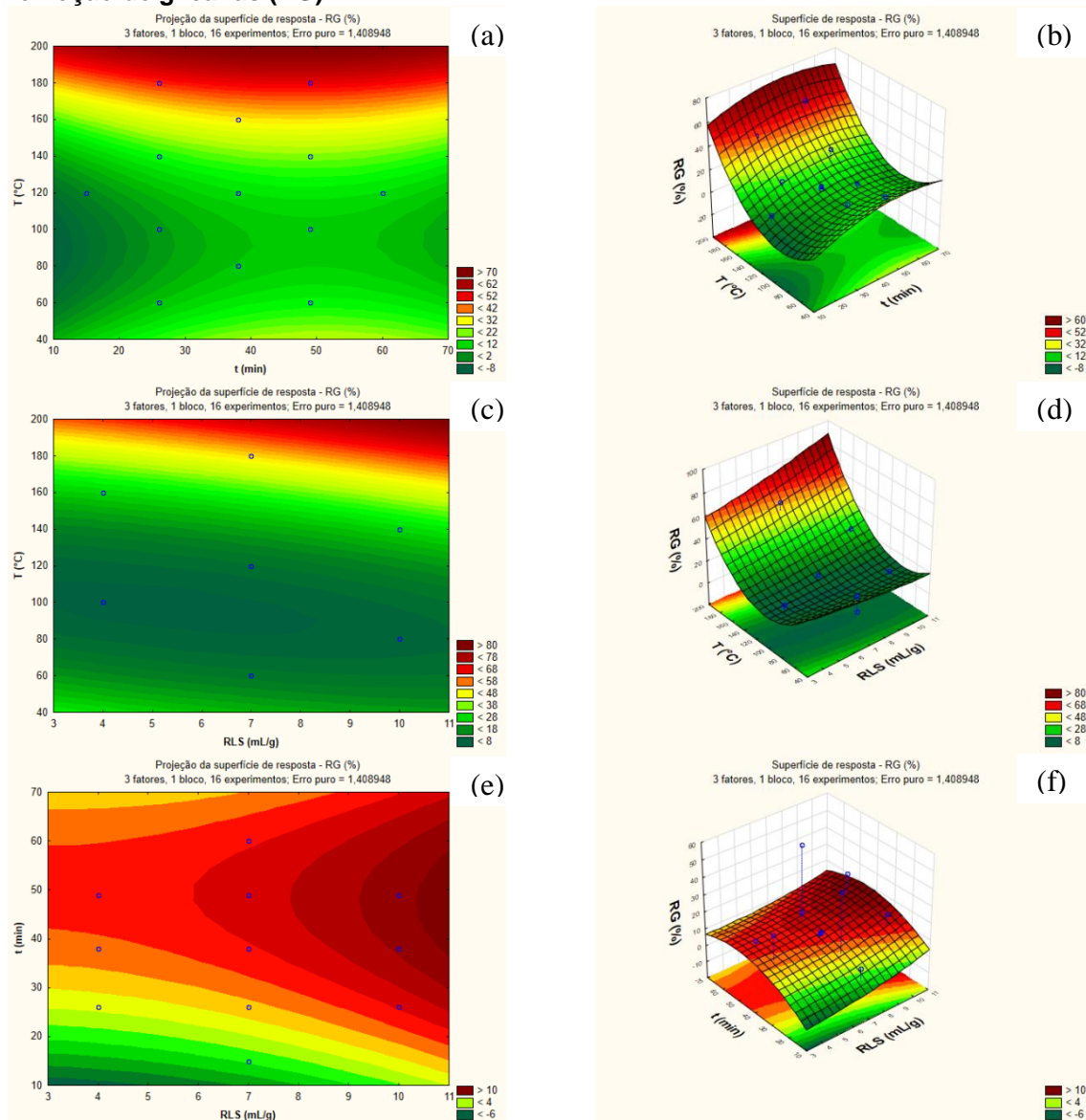
incremento na remoção de glicanas (12,7%) tenha sido ligeiramente maior do que o incremento na PM (9,2%) quando o tempo de reação aumentou de 26 para 49 minutos. Interessante ressaltar o resultado obtido com o ensaio 12 (80°C, 38 minutos e 10 mL.g⁻¹), cuja remoção de glicanas foi de 11,9%.

Tal ensaio assemelha-se em condições operacionais com o pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade, que difere apenas pelo tempo de 30 minutos e pela agitação da mistura durante todo o tempo de reação. Nesse último caso, a remoção de glicanas da biomassa foi de 23,2%, o que indica que mesmo utilizando um tempo inferior ao do ensaio de auto-hidrólise, a agitação da mistura durante o tempo de reação na etapa de pré-tratamento de baixa severidade foi capaz de provocar um incremento de 11,3% na remoção de glicanas.

As Figuras 15(a), 15(b) indicam que a modelagem da variável RG em função da temperatura e do tempo apresenta um ponto de máximo em torno de 50 minutos, expresso pelo ponto de sela do parabolóide hiperbólico da superfície de resposta gerada. Isso pode ser confirmado a partir da análise das figuras 15(e) e 15(f), que indicam que diferentemente da PM, existe uma magnitude de tempo em que os valores de RG tornam-se decrescentes, o que ocorre aparentemente após os 50 minutos de reação.

De fato, quando comparados os ensaios realizados no ponto central do planejamento experimental (120°C e 7 mL.g⁻¹, 38 min) e o ensaio 1 (120°C e 7 mL.g⁻¹, 60 min), percebe-se que um incremento no tempo de reação de 38 para 60 minutos, ocasionou um decréscimo de 6,4% nos valores de RG. Além disso, quando comparados os ensaios 6 e 8 (100°C, 4 mL.g⁻¹) e os ensaios 11 e 3 (140°C, 10 mL.g⁻¹), um incremento no tempo de reação de 26 para 49 minutos em ambos os casos, ocasionou incrementos respectivamente iguais a 11,6 e 9,4% nos valores de RG. Tais informações corroboram a perspectiva apontada pelas Figuras 15(e) e 15(f), com relação à existência de um ponto de máximo da função remoção de glicanas em um tempo de 50 minutos.

Figura 15 – Superfícies de resposta geradas pela modelagem computacional da variável remoção de glicanas (RG).



A análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da variável RG encontra-se denotada no ANEXO 1. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,93938. A equação gerada pelo modelo computacional para a variável RG é dada por:

$$\begin{aligned}
 RG = & 48,66227 + 1,22739 \cdot t - 0,01105 \cdot t^2 - 1,21793 \cdot T + 0,00552 \cdot T^2 \\
 & - 4,07616 \cdot RLS + 0,12429 \cdot RLS^2 - 0,00066 \cdot t \cdot T - 0,0972 \cdot t \cdot RLS \\
 & + 0,03228 \cdot T \cdot RLS
 \end{aligned}$$

(equação 26)

O Diagrama de Pareto da Figura 13(c) indica que os efeitos da temperatura (T), o efeito da temperatura elevado à segunda potência (T^2) e o

efeito tempo (t) correspondem à cerca de 90% dos efeitos positivos significativos sobre a variável remoção de arabinosilanas do bagaço de malte (RX). Ou seja, o modelo preditivo para a RX é explicado, quase totalmente por um polinômio de segundo grau contendo essas variáveis. O sinergismo existente entre T e t também exerce um efeito significativo positivo sobre a RX, o que levanta a perspectiva de que um aumento nas magnitudes da temperatura e tempo ocasionaria um incremento nos valores de RX.

Vale salientar que a variável t representa aproximadamente 28,3% dos efeitos significativos positivos sobre a RX, enquanto que no caso da RG esse valor é de apenas 11,5%. Isso indica que o tempo é mais influente sobre a RX do que sobre a RG para o bagaço de malte. De fato, quando comparados os ensaios 11 e 3 (140°C, 10 mL.g⁻¹) e 9 e 2 (180°C, 7 mL.g⁻¹), percebeu-se que um aumento no tempo de 26 para 49 minutos ocasionou incrementos de 9,4% e 21%, 12,7% e 40,1%, respectivamente sobre a RG e RX.

Cabe salientar que no estudo cinético da auto-hidrólise do bagaço de malte, realizado por Carvalheiro et al.(2005), os autores consideraram as xilanas e arabinanas como duas cadeias poliméricas distintas e que sofrem hidrólise independentemente, devido aos altos teores de arabinanas em relação às xilanas da biomassa. Segundo os autores, a porcentagem relativa adotada de xilanas em relação ao total de hemiceluloses foi de 67%.

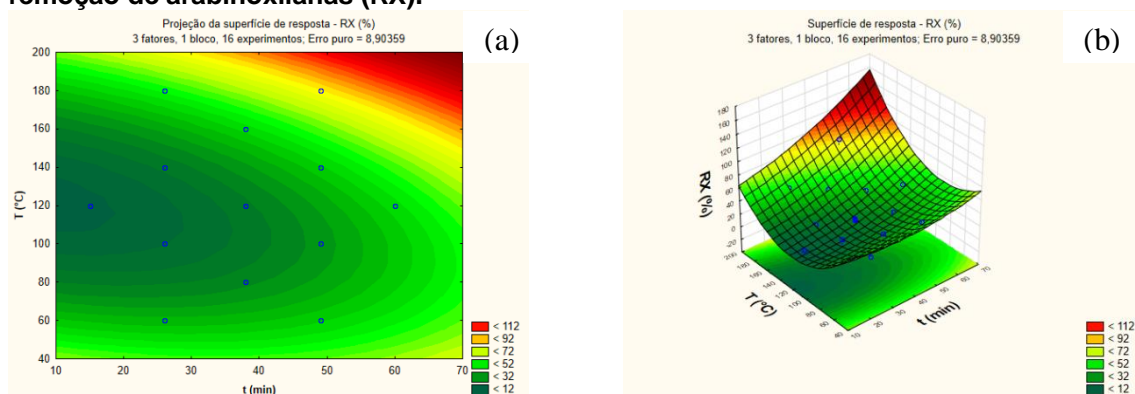
Interessante observar que na pesquisa realizada por Lopez et al.(1995), o pré-tratamento alcalino da palha de cevada com uma solução de NaOH (13% m.v⁻¹) a 60°C durante 120 minutos, ocasionou uma remoção de 57% das hemiceluloses da biomassa, valor esse ligeiramente superior ao obtido com o ensaio 9 (180°C, 26 minutos e 7 mL.g⁻¹), cuja remoção de arabinosilanas foi de 50,8%. Porém, os tratamentos termoquímicos apresentam como desvantagens serem menos amigáveis ao meio ambiente e mais onerosos do ponto de vista de implantação e operação.

Vale salientar que a remoção de hemiceluloses do bagaço de malte (25,5%), obtida no estudo de Montusiewicz et al.(2017) com o pré-tratamento oxidativo avançado por cavitação hidrodinâmica, foi similar aos resultados obtidos com os ensaios 6 (100°C, 26 minutos, 4 mL.g⁻¹) e os ensaios realizados no ponto central do planejamento experimental (120°C, 38 minutos, 7 mL.g⁻¹), cuja média dos valores esteve em torno de 24,8%. Os resultados mostram uma

vantagem do pré-tratamento hidrotérmico frente ao oxidativo avançado, uma vez que os custos para implementação e operação do pré-tratamento hidrotérmico é menor devido a sua maior simplicidade.

As superfícies de respostas geradas pela modelagem computacional do comportamento da variável dependente RX, encontram-se denotadas a partir da Figura 16.

Figura 16 – Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável remoção de arabinosilanas (RX).



As Figuras 16(a) e 16(b) indicam que, semelhantemente à variável PM, é possível adotar distintos pares de valores de T e t de modo a se obter valores análogos de RX. De fato, quando comparando os ensaios 1 (120°C, 60 minutos, 7 mL.g⁻¹) e 10 (160°C, 38 minutos, 4 mL.g⁻¹), percebeu-se que os valores de RX estiveram em torno de 44,1%, tal comparação é possível, pois ao avaliar-se o diagrama de Pareto para variável RX (Figura 13(c)), é possível perceber que o efeito da variável RLS não é significativo para RX. Assim, estima-se que resultados análogos ao do ensaio 2 (180°C, 49 minutos, 7 mL.g⁻¹), cuja remoção de arabinosilanas foi de 91%, possam ser obtidos adotando-se os pares de valores 170°C e 60 minutos ou 160°C e 70 minutos.

Interessante ressaltar que Carvalheiro et al.(2005) mencionam que os parâmetros cinéticos da auto-hidrólise do bagaço de malte tendem a aumentar com a temperatura, sendo que a fração hidrolisável das xilanas esteve entre 70,8 e 88,6%. De acordo com os autores, as arabinosilanas da biomassa, devido à sua natureza química como ramificações da cadeia de xilopiranosil, possuem uma maior susceptibilidade à hidrólise, devido ao menor tempo de reação necessário para se obter altas taxas de oligômeros, comparativamente às xilanas.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da variável RX encontra-se denotada no ANEXO 1. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,94496. A equação gerada pelo modelo computacional para a variável RX é dada por:

$$RX = 169,8449 - 1,3786.t + 0,0123.t^2 - 2,1420.T + 0,0084.T^2 - 5,4989.RLS + 0,2221.RLS^2 + 0,0087.t.T + 0,0278.t.RLS + 0,0056.T.RLS$$

(equação 27)

O Diagrama de Pareto da Figura 13(d) indica que os efeitos da temperatura (T), da temperatura à segunda potência (T^2) representam cerca de 73,9% dos efeitos significativos positivos sobre a variável RSIA. Vale salientar que no caso da variável RG, os mesmos efeitos representaram 73,5% dos efeitos significativos positivos, indicando que a temperatura exerce efeitos similares em tanto para as hexoses, quanto para os compostos insolúveis em ácido, dentro os quais se encontram proteínas e lignina insolúvel. Interessante observar que o sinergismo das variáveis t e T representam o restante dos efeitos significativos positivos sobre a variável remoção de sólidos insolúveis em ácido (RSIA). Isso aponta a perspectiva de que um aumento nas magnitudes do tempo e temperatura ocasionaria um incremento nos valores de RSIA.

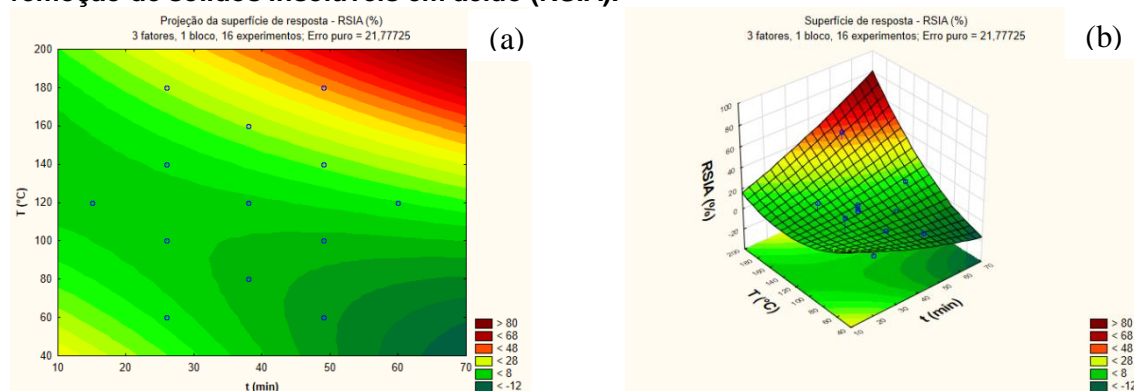
De fato, quando comparados os ensaios realizados no ponto central do planejamento experimental e o ensaio 1 (120°C, 7 mL.g⁻¹), percebe-se que um aumento no tempo de reação de 38 para 60 minutos ocasiona um incremento de 6,5% nos valores de RSIA. Analogamente, quando comparados os ensaios 9 e 2 (180°C, 7 mL.g⁻¹), percebe-se que um aumento no tempo de reação de 26 para 49 minutos ocasiona incrementos respectivamente iguais a 30% na RSIA. Tais resultados evidenciam que a remoção de sólidos insolúveis em ácido provocada pelo efeito do tempo é mais efetiva em maiores temperaturas.

O maior valor de RSIA (47,7%) foi obtido com o ensaio 2 (180°C, 49 minutos, 7 mL.g⁻¹), o que demonstra que dentre as frações majoritárias da biomassa, os SIA's são os menos susceptíveis à solubilização por auto-hidrólise. No estudo realizado por Outeiriño et al.(2019), a utilização do pré-tratamento utilizando líquidos iônicos a 90°C proporcionou uma remoção de lignina de 75,89%. Por outro lado, em trabalho realizado por Mussatto et al.(2007), os autores atingiram 81,43% de remoção de lignina após submeterem o bagaço de

malte ao pré-tratamento termoquímico combinado, utilizando uma solução de H_2SO_4 ($100 \text{ mg.g}^{-1}_{\text{BSG}}$), a 120°C durante 17 minutos a uma RLS de 8 g.g^{-1} , seguido do tratamento alcalino com NaOH ($2\% \text{ m.v}^{-1}$), a 120°C durante 90 minutos a uma RLS de 20 g.g^{-1} . No entanto, é válido ressaltar que tais pré-tratamentos apesar de se mostrarem eficientes, possuem como características serem menos amigáveis ao meio ambiente.

A superfície de resposta gerada pela modelagem computacional do comportamento da variável dependente RSIA, encontra-se indicada a partir da Figura 17.

Figura 17 – Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável remoção de sólidos insolúveis em ácido (RSIA).



Conforme mencionado anteriormente, a Figura 17 evidencia que os SIA's são a fração da biomassa mais resistente à hidrólise através do tratamento hidrotérmico, de modo que os valores previstos superiores a 50% encontravam-se em uma faixa de amplitude não contemplada no planejamento experimental dos ensaios de auto-hidrólise. Interessante observar que o ensaio 6 (100°C , 26 minutos, 4 mL.g^{-1}) apresentou uma RSIA de 20,6%, com uma severidade de apenas 1,41. Tais resultados, evidenciam que parte da fração de SAI's é proteína, uma vez que baixas severidades no pré-tratamento hidrotérmico sem adição de reagentes químicos, não possui energia suficiente e ambiente químico favoráveis para remoção de lignina.

Cabe salientar que os SIA's quantificados pela Metodologia Klason, representam duas porções da biomassa (SLUITER et al., 2012), e portanto, os processos de despolimerização e hidrólise da lignina e das proteínas podem ocorrer independentemente. Isso levanta a perspectiva de que, em estudos posteriores, sejam necessárias análises dos teores de nitrogênio das amostras

sólidas após o pré-tratamento, a fim de quantificar a remoção de ambos polímeros.

Vale ressaltar que na pesquisa realizada por Qin et al.(2018), os autores obtiveram 65% de solubilização de proteínas, após submeterem o bagaço de malte ao pré-tratamento por auto-hidrólise, utilizando 60°C durante 60 minutos e uma RLS de 40 mL.g⁻¹. De acordo com os autores, dentre os pré-tratamentos utilizados, a auto-hidrólise foi aquele que demonstrou ser mais seletivo com relação à extração de proteínas, isto pode ser um indicativo do porque do pré-tratamento por auto-hidrólise ter removido maiores valores de sólidos insolúveis em ácido quando comparado a outras biomassa como o bagaço de cana, no qual a remoção de lignina não passou de 30% (Baêta et al., 2016). Considera-se que parte da fração de sólidos insolúveis em ácidos removidos do bagaço de malte no presente estudo pode representar proteínas, devido aos reduzidos teores de SIA's obtidos no bagaço de malte lavado comparativamente ao bagaço bruto.

Cabe salientar que Kemppainen et al.(2016), observaram que após submeterem o bagaço de malte ao pré-tratamento por explosão a vapor entre 160 e 200°C, a solubilização de proteínas atingiu um máximo de 12%. Kemppainen et al.(2016) observaram que o teor de proteínas na fração de SIA's permaneceu relativamente estável entre 20,4 e 22,7%. Os autores perceberam que as proteínas parcialmente degradadas, sobretudo nos tratamentos mais severos, permaneceram insolúveis na fração sólida ou fortemente associadas a outros SIA's.

O comportamento irregular da variável RSIA pode estar associado aos fenômenos apontados por Qin et al.(2018), que perceberam uma menor remoção de proteínas a temperaturas superiores a 75°C, durante a auto-hidrólise do bagaço de malte. Além disso, deve-se considerar as observações apontadas por Kemppainen et al.(2016), sobre as modificações químicas ocorridas nas proteínas durante o tratamento do bagaço de malte por explosão a vapor, mesmo em condições menos severas. Segundo os autores, essas modificações ocasionaram um aumento nos SIA's da fração sólida resultante.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da variável RSIA encontra-se denotada no ANEXO 1. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,76698. A equação gerada pelo modelo computacional para a variável RSIA é dada por:

$$RSIA = 113,4515 - 1,5651.t + 0,0039.t^2 - 1,0339.T + 0,0027.T^2 - 8,3286.RLS \\ + 0,3506.RLS^2 + 0,0117.t.T - 0,0001.t.RLS + 0,0244.T.RLS$$

(equação 28)

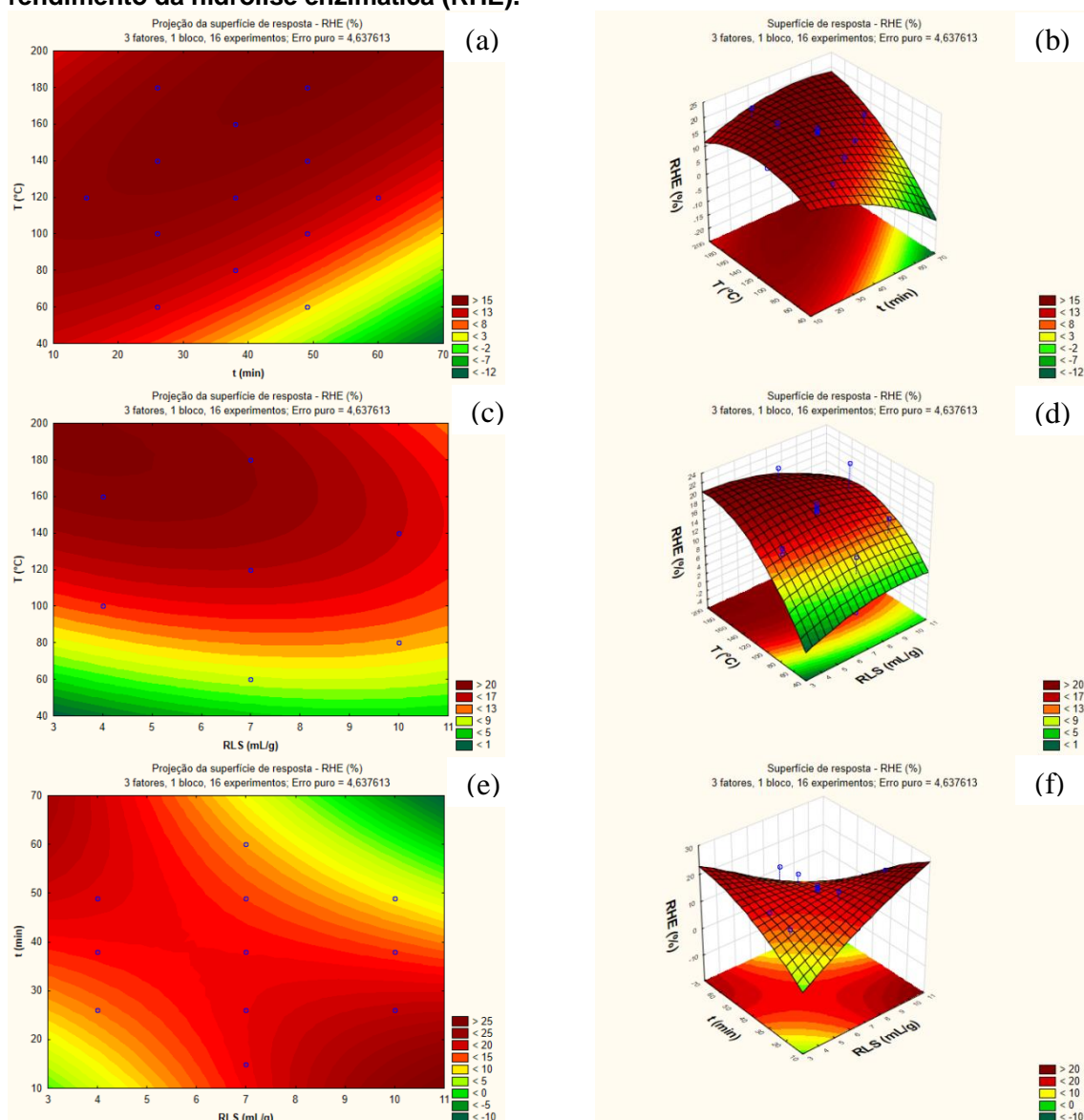
O Diagrama de Pareto da Figura 13(e) indica que apenas a temperatura (T) exerce efeito significativo positivo sobre a variável rendimento da hidrólise enzimática (RHE). O que era de se esperar, uma vez que conforme demonstrado anteriormente, maiores temperaturas são capazes de removerem maiores quantidades de hemicelulose e lignina, compostos conhecidos por dificultarem o processo de hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos.

Por sua vez, o sinergismo das variáveis t e RLS exerce um efeito significativo negativo sobre o RHE, o que aponta a possibilidade de que, um aumento do tempo de reação da auto-hidrólise do bagaço de malte, aliado a altos valores de RLS tendem a reduzir o rendimento da hidrólise enzimática. Uma possível explicação esteja relacionada as maiores produções de inibidores em longos tempos e a baixa solvência de fragmentos hidrofóbicos de lignina em meio aquoso, tal fato acarreta em permanência destes fragmentos de inibidores e lignina na biomassa, o que conforme mencionado anteriormente pode contribuir para o aumento de adsorções improdutivas das enzimas. De fato, os ensaios 7 (60°C, 38 minutos, 10 mL.g⁻¹) e 3 (140°C, 49 minutos, 10 mL.g⁻¹) apresentaram valores de apenas 0,5 e 6,3% de RHE.

Ainda sobre o sinergismo negativo das variáveis t e RLS, maiores rendimentos da hidrólise enzimática podem ser obtidos mediante a adoção de um longo tempo de reação da auto-hidrólise, aliado a pequenos valores de RLS. Além dessa questão, percebeu-se que embora não seja significativo o efeito negativo da variável t sobre a RHE, nos ensaios 6 e 8 (100°C, 4 mL.g⁻¹), 11 e 3 (140°C, 10 mL.g⁻¹) e 9 e 2 (180°C, 7 mL.g⁻¹), um aumento no tempo de reação de 26 e 49 minutos ocasionou reduções de 1,3%, 15,4% e 2,7%, respectivamente nos valores de RHE.

As superfícies de resposta geradas pela modelagem computacional do comportamento da variável dependente rendimento da hidrólise enzimática, encontram-se apresentadas a partir da Figura 18.

Figura 18 – Superfícies de resposta geradas pela modelagem computacional da variável rendimento da hidrólise enzimática (RHE).



As Figuras 18(e) e 18(f) demonstram o sinergismo negativo entre t e RLS, indicando que os maiores valores de RHE podem ser obtidos mediante a adoção de longos tempos de reação da auto-hidrólise aliados à adoção de pequenos valores de RLS. Vale ressaltar que a variável t , por si só não exerce nenhum efeito significativo sobre o RHE. De fato, comparando os ensaios realizados no ponto central do planejamento experimental e o ensaio 1 (120°C , $7 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), percebeu-se que aumento no tempo de reação de 38 para 60 minutos não ocasionou mudança significativa nos valores de RHE.

A Figura 18(a) e 18(b) indicam que os maiores valores de RHE podem ser obtidos utilizando uma faixa de valores entre 160 e 200°C , durante 40 a 60 minutos. No entanto, deve-se considerar que para obter esses valores é

necessário utilizar severidades crescentes do pré-tratamento, incrementando os valores de T e t simultaneamente, o que pode não ser interessante em termos de balanço energético do processo. Vale salientar que os ensaios 9 (180°C, 26 minutos, 7 mL.g⁻¹) e 11 (140°C, 26 minutos, 10 mL.g⁻¹) apresentaram os maiores valores de RHE (21,5% em média), sendo que nesses casos os valores de RSIA estiveram em torno de 17,4%.

A superfície quadrática de resposta gerada na modelagem do RHE em função de T e t , apresenta a concavidade voltada para baixo, o que indica que existem parâmetros operacionais que proporcionam os máximos rendimentos na hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados. Dessa forma, a interpretação da superfície gerada levanta a possibilidade de existir uma amplitude de valores a partir da qual os valores de RHE tornam-se decrescentes, o que de fato foi explanado anteriormente no caso dos ensaios 6 e 8 (100°C, 4 mL.g⁻¹), 11 e 3 (140°C, 10 mL.g⁻¹) e 9 e 2 (180°C, 7 mL.g⁻¹), em que um aumento no tempo de reação de 26 para 49 minutos ocasionou decréscimos nos valores de RHE.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da variável RHE encontra-se denotada no ANEXO 1. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,63766. A equação gerada pelo modelo computacional para a variável RHE é dada por:

$$RHE = -37,1439 + 0,6533.t - 0,0043.t^2 + 0,2365.T - 0,0009.T^2 + 7,3136.RLS - 0,1238.RLS^2 + 0,0033.t.T - 0,1223.t.RLS - 0,0096.T.RLS$$

(equação 29)

O Diagrama de Pareto da Figura 13(f) indica que apenas variável independente razão líquido-sólido (RLS) exerce efeito significativo negativo sobre a concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (CAH). Isso é bastante coerente, pois à medida que se utiliza um maior volume de água no tratamento hidrotérmico, menor será a concentração de açúcares monoméricos solubilizados no hidrolisado.

A temperatura, por sua vez exerce efeito significativo, porém positivo sobre a variável CAH, o que aponta a perspectiva de que pré-tratamentos por auto-hidrólise do bagaço de malte que utilizam maiores temperaturas tendem a proporcionar uma maior concentração de açúcares no hidrolisado gerado, o que é bastante interessante quando o objetivo é utilizar esta fração líquida

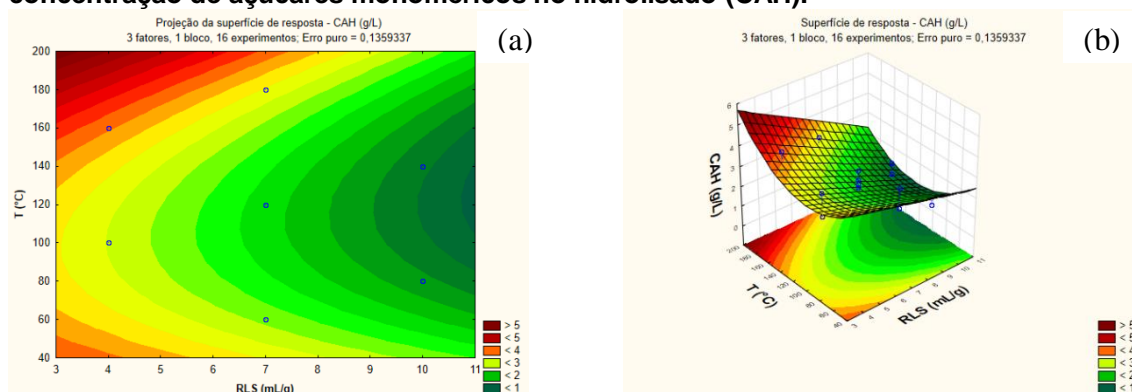
posteriormente para produção de biocombustíveis como o biogás. Isso é bastante coerente e corrobora as perspectivas apontadas nas avaliações das variáveis PM, RG e RX, que indicam que o aumento na temperatura de reação colaboram para uma maior solubilização da biomassa e uma maior remoção de açúcares.

Dentre os ensaios de auto hidrólise do bagaço de malte, aquele que apresentou a maior concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado ($4,2 \text{ g.L}^{-1}$) foi o ensaio 10 (160°C , 38 minutos, 4 mL.g^{-1}). Vale salientar que nos ensaios 9 e 2 (180°C , 7 mL.g^{-1}), um aumento no tempo de reação de 26 para 49 minutos, proporcionou uma redução de 17,14% na CAH, o que está atribuído a uma maior formação de produtos de degradação originados pela desidratação destes açúcares, formando como produto da reação ácido fórmico (A.F.), HMF e FF, conforme descrito no item 4.3 deste documento. De fato, quando comparados os ensaios 9 e 2 (180°C , 7 mL.g^{-1}), percebeu-se que um aumento no tempo de reação de 26 para 49 minutos, proporcionou incrementos de 368,2%, 500% e 675% nos valores de AF, HMF e FF.

Interessante comparar os resultados obtidos com o ensaio 12 (80°C , 38 minutos, 10 mL.g^{-1}) e com o pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade, cujas condições operacionais divergem apenas pelo tempo de reação e pela agitação da mistura. Nesse último caso, a CAH foi aproximadamente igual ao dobro da concentração no hidrolisado obtido com a auto-hidrólise do bagaço de malte, o que indica a importância da agitação da mistura para a solubilização dos açúcares da biomassa, principalmente aqueles presentes na superfície do bagaço de malte, ou seja, aqueles remanescentes do processo de mosturação.

A superfície de resposta gerada pela modelagem computacional do comportamento da variável dependente concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (CAH), encontra-se denotada a partir da Figura 19.

Figura 19 – Superfície de resposta gerada pela modelagem computacional da variável concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado (CAH).



As Figuras 19(a) e 19(b) indicam que as maiores CAH podem ser obtidas mediante a adoção de altas temperaturas aliadas a pequenos valores de RLS. Vale salientar que não foram detectadas concentrações de HMF e FF nos ensaios de auto-hidrólise utilizando temperaturas inferiores a 180°C, muito embora não tenham sido feitas análises em temperaturas intermediárias entre 160 e 180°C. Em relação a esse aspecto, a utilização de temperaturas superiores a 180°C na auto-hidrólise do bagaço de malte deve estar aliada a adoção de pequenos tempos de reação, a fim de se reduzir a formação de produtos da degradação de açúcares, muitas vezes considerados tóxicos para os microrganismos fermentativos e anaeróbios.

A análise de variância (ANOVA) para o modelo representativo da variável CAH encontra-se denotada no ANEXO 1. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,86907. A equação gerada pelo modelo computacional para a variável CAH é dada por:

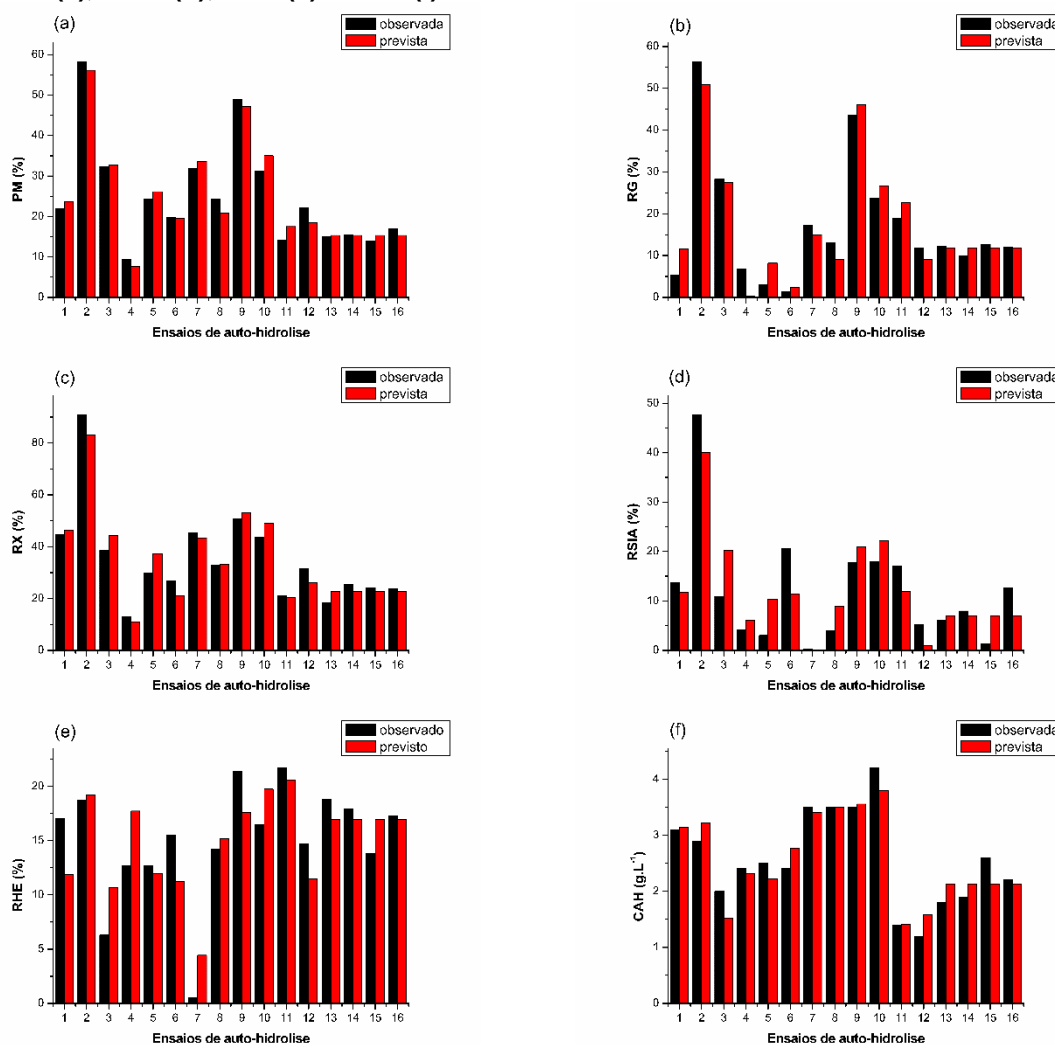
$$\begin{aligned} CAH = & 4,130249 + 0,000693.t + 0,001195.t^2 - 0,018868.T + 0,000228.T^2 \\ & - 0,126678.RLS + 0,001896.RLS^2 - 0,000551.t.T \\ & - 0,000816.t.RLS - 0,001485.T.RLS \end{aligned}$$

(equação 30)

As acurácias médias dos modelos foram de 100,12% (PM), 114,33% (RG), 100% (RX), e 101,16% (CAH). Porém no caso das variáveis RSIA e RHE, os modelos superestimaram os dados experimentais em 39% e 51%, o que pode ser atribuído aos baixos coeficientes de determinação ajustados dessas variáveis, de apenas 0,417 e 0,094, respectivamente. A partir da Figura 20 são comparados os valores observados durante os ensaios de auto-hidrólise do

bagaço de malte (dados experimentais) e os valores previstos pela modelagem computacional das variáveis dependentes.

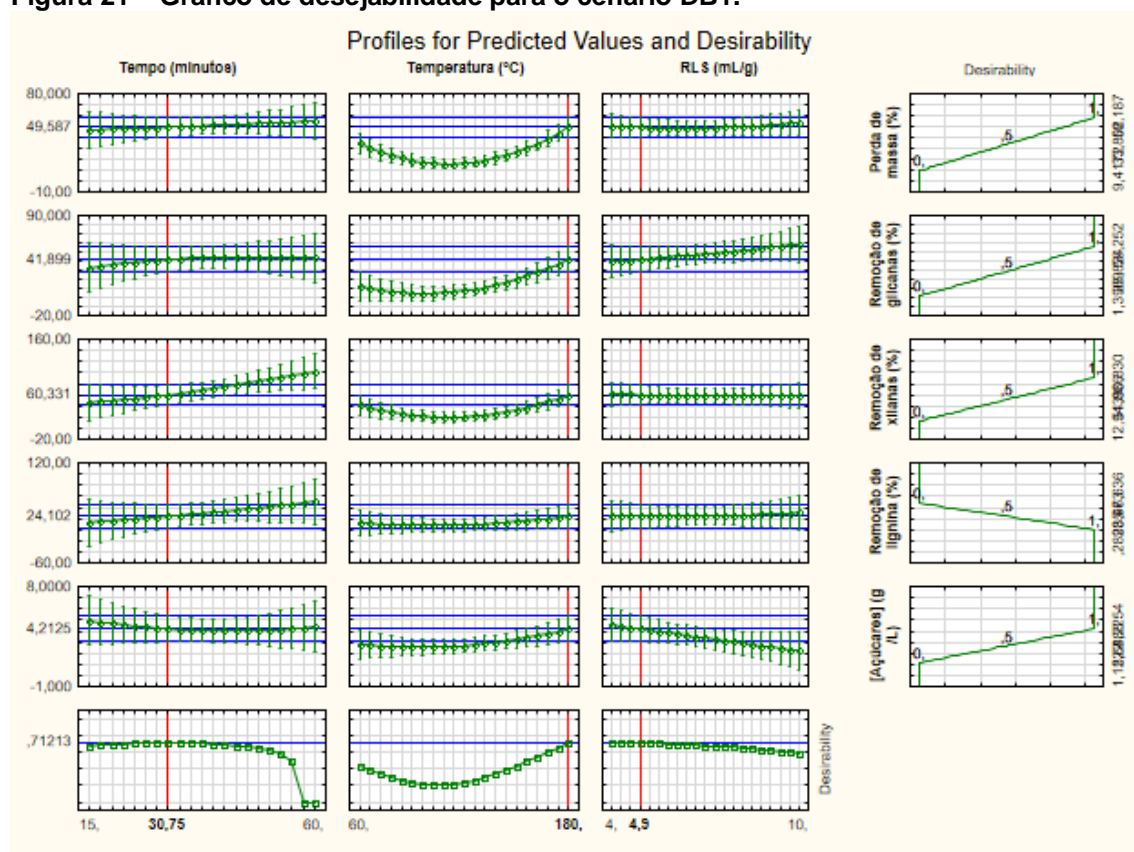
Figura 20 – Comparação entre os valores observados durante a auto-hidrólise do bagaço de malte e os valores previstos pela modelagem computacional das variáveis PM (a), RG (b), RX (c), RSIA (d), RHE (e) e CAH (f).



Embora o coeficiente de determinação da variável RSIA tenha sido de apenas 77%, considerou-se que o uso dessa variável na ferramenta de desejabilidade para o estabelecimento de cenários para a produção de biogás torna-se importante para avaliar a inibição que compostos fenólicos e proteínas exercem sobre a digestão anaeróbia. Além disso, embora o coeficiente de determinação da variável RHE tenha sido de apenas 63,8%, considerou-se que o uso dessa variável para definição do cenário para a produção de etanol é importante para definir condições que promovam uma maior acessibilidade enzimática dos sólidos pré-tratados.

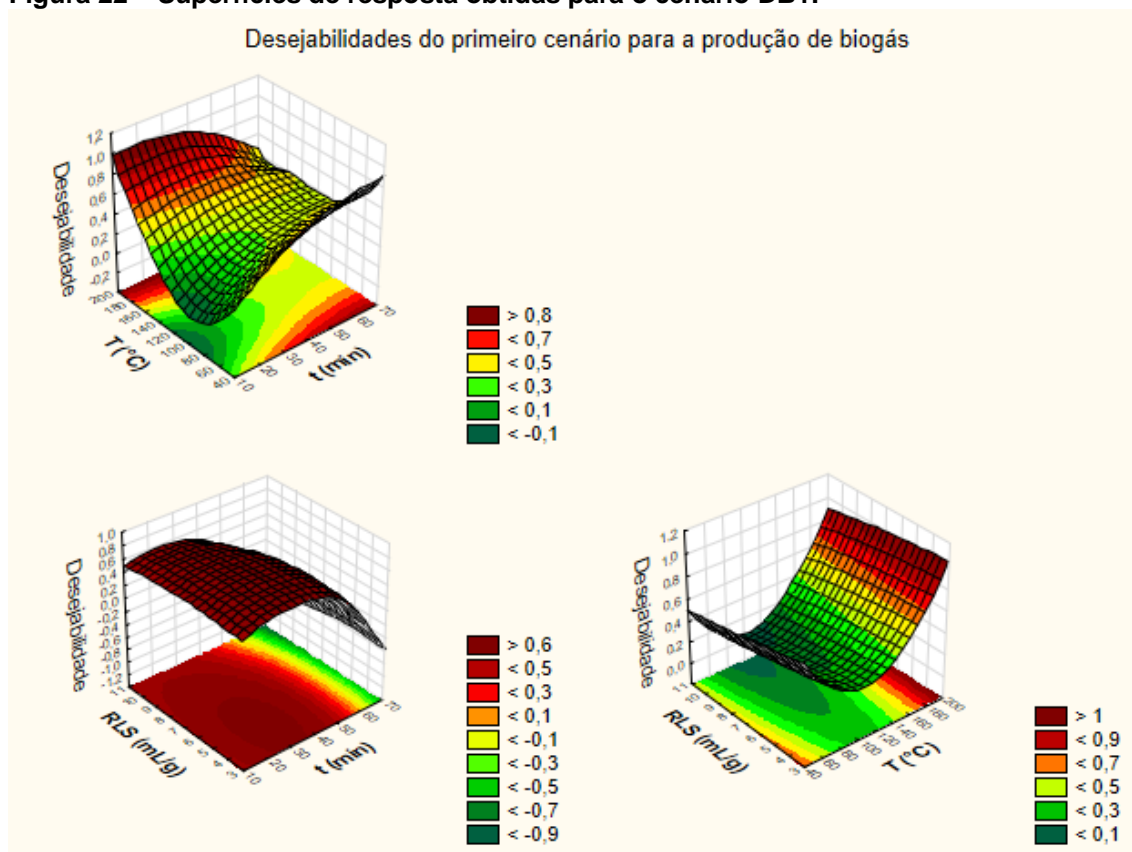
A utilização da ferramenta de desejabilidade forneceu os parâmetros operacionais da auto-hidrólise do bagaço de malte, tomando como base alguns cenários estabelecidos, conforme descritos no item 5.7 da seção de materiais e métodos, visando a produção de biogás (DB1 e DB2) e etanol (DE). Os gráficos de desejabilidade, bem como as superfícies de resposta dos modelos computacionais para os cenários estabelecidos nesse estudo, encontram-se indicados a partir dos Figuras 21, 23 e 25.

Figura 21 – Gráfico de desejabilidade para o cenário DB1.



Considerando que no cenário DB1 esperava-se obter um hidrolisado de mais fácil degradação, ou seja, maior teor de carboidratos e menores quantidades de compostos fenólicos, ao estabelecer o nível da variável RSIA's como nível mínimo (Tabela 5), o modelo apontou como condição desejável uma temperatura de 180°C e tempo de 31 minutos, uma vez que conforme discutido anteriormente a remoção de SIA's da fração sólida torna-se crescente com o tempo. As superfícies de resposta para o cenário DB1 encontram-se indicadas a partir da Figura 22.

Figura 22 – Superfícies de resposta obtidas para o cenário DB1.



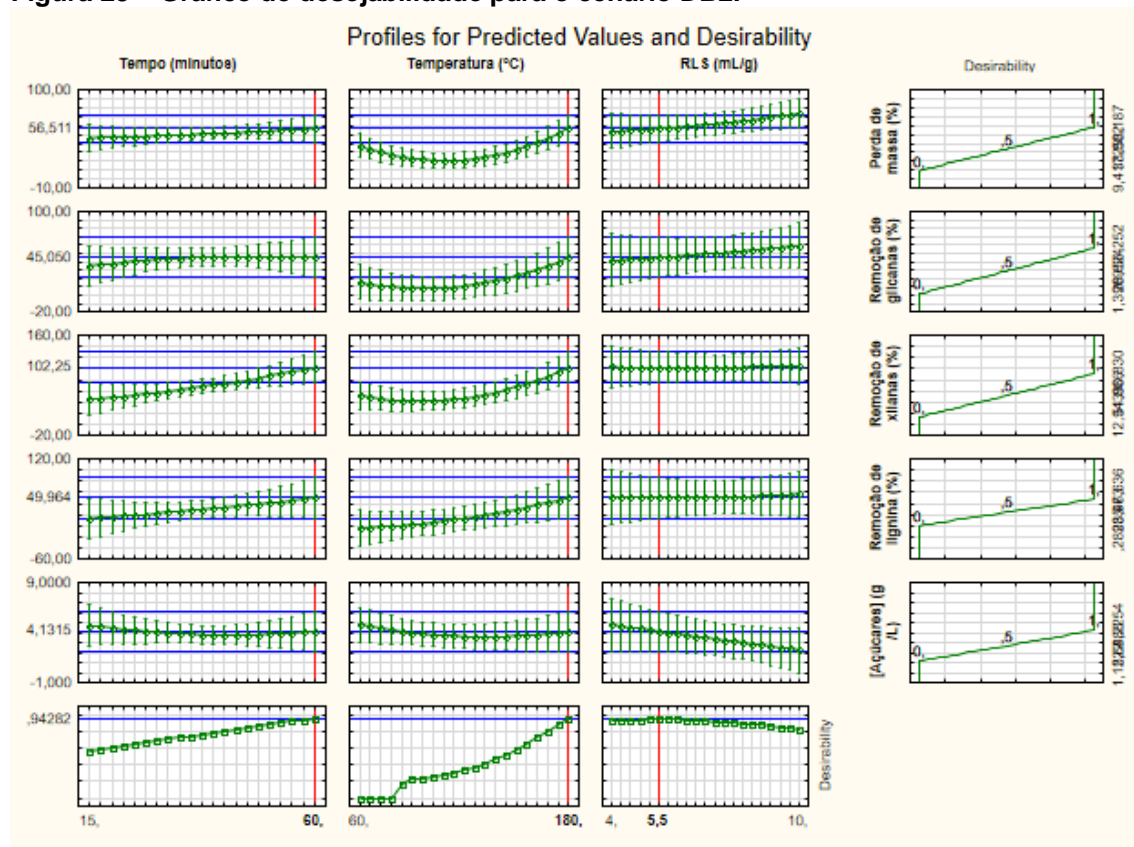
A interpretação dos gráficos de desejabilidade para esse cenário apresentados na Figura 22 permitem fazer a inferência de que as melhores condições para se obter um hidrolisado com características mais favoráveis para produção de biogás é utilizando altas temperaturas e baixos tempos. Isto é claro, partindo da premissa que hidrolisados com maiores teores de carboidratos e menores teores de SIA's são melhores biodegradáveis em condições anaeróbias.

A concavidade voltada para baixo do gráfico de t versus RLS (Figura 21(b)), indica que a utilização de RLS superiores a 7 mL.g^{-1} podem gerar um hidrolisado com menor susceptibilidade para biodegradação, uma vez que maiores RLS implicam em hidrolisados mais diluídos em termos de carboidratos e maiores tempos provocam maiores concentrações de inibidores gerados pela degradação dos açúcares.

No segundo cenário para a produção de biogás (DB2), aquele que teve como premissa obter uma condição de pré-tratamento que gerasse um hidrolisado com alto teor de carboidratos e alto teor de SIA's, afim de comparar o efeito com a condição DB1, na qual difere-se somente no quesito RSIA (Tabela

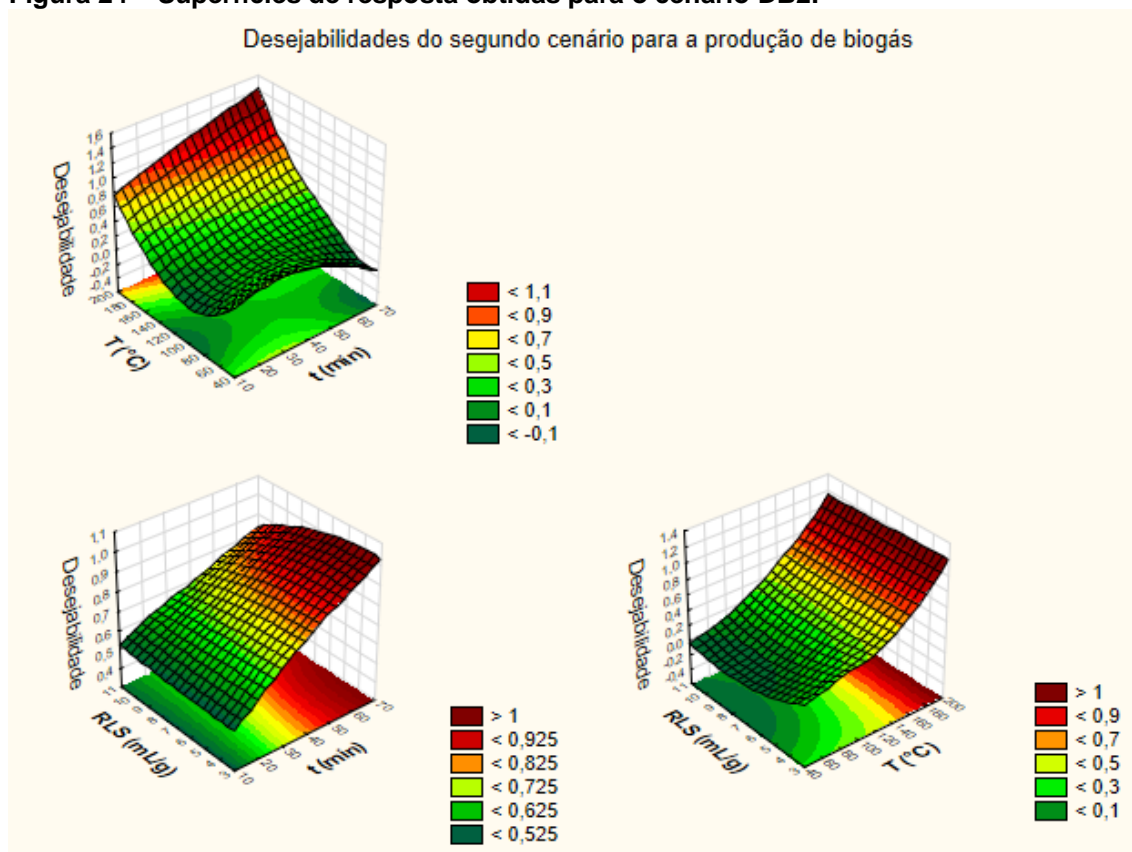
5), a ferramenta de desejabilidade indicou como condição desejável as maiores temperaturas e tempos de reação do planejamento experimental (180°C, 60 minutos) (Figura 23).

Figura 23 – Gráfico de desejabilidade para o cenário DB2.



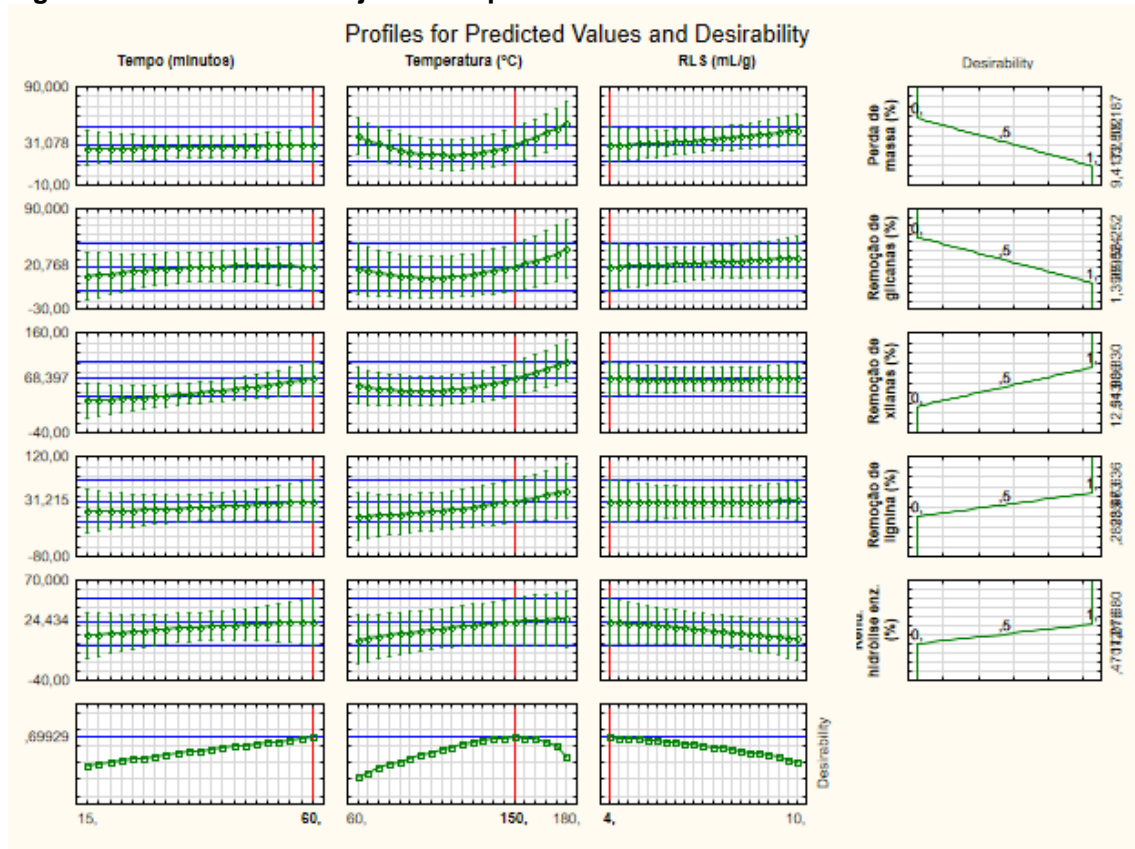
Tais resultados são coerentes, uma vez que conforme visto anteriormente, a severidade do processo (par temperatura e tempo) influenciam diretamente as variáveis dependentes estabelecidas para o cenário que visa a produção de biogás. As superfícies de resposta obtidas para o cenário DB2 encontram indicadas a partir da Figura 24. O gráfico de *T versus RLS* (Figura 23(b)), indica que a variável RLS não influencia os valores de desejabilidade nesse cenário, o que possibilita a adoção de menores quantidades de água no pré-tratamento da biomassa, o que contribui diretamente para uma maior sustentabilidade do processo.

Figura 24 – Superfícies de resposta obtidas para o cenário DB2.



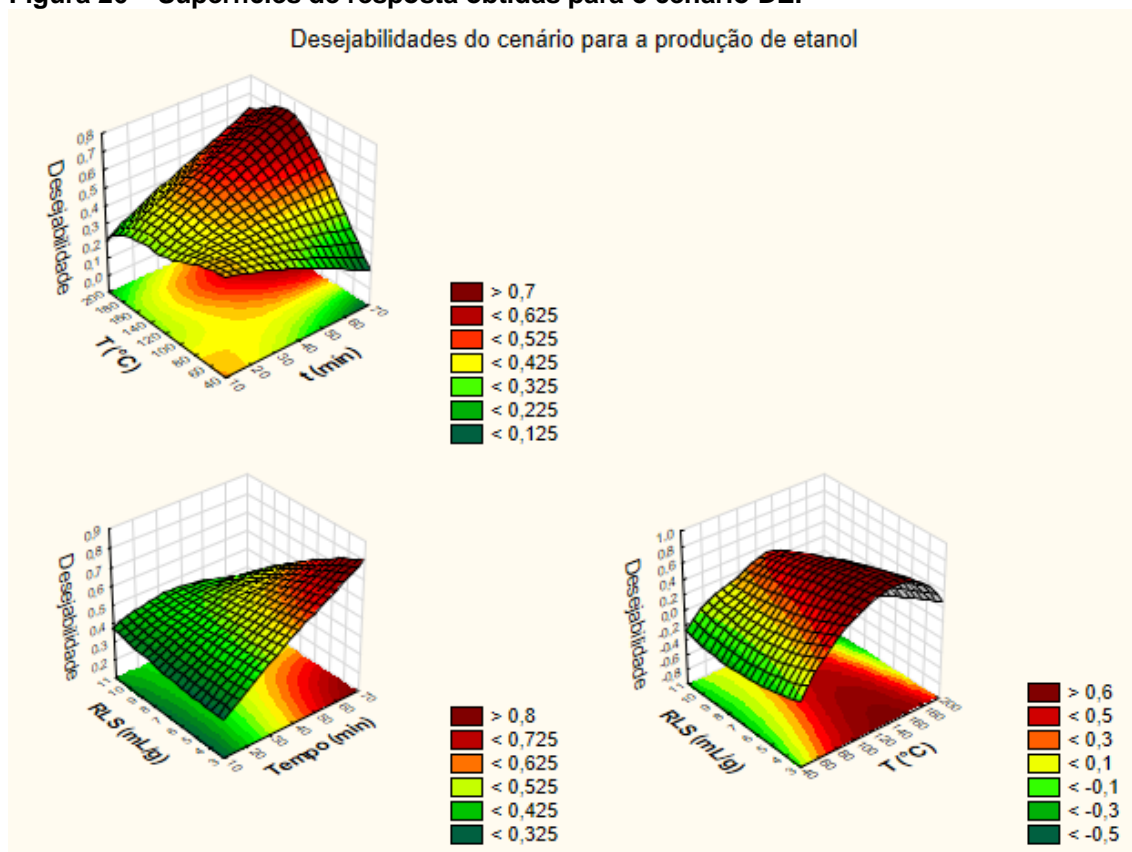
Por fim, no cenário que preconiza a produção de etanol a partir da fração sólida pré-tratada, conforme apresentando na Tabela 5, a intenção seria determinar uma condição capaz de gerar uma fração sólida com alto teor de celulose, ou seja, uma condição de pré-tratamento com baixa remoção de glicanas, elevadas remoções de arabinoxilanas e SIA's, aliado as condições que geraram substrato que apresentaram elevados RHE. Nesse caso, o modelo computacional apontou para a utilização de temperaturas da ordem de 150°C, 60 min e RLS de 4 mL.g⁻¹, conforme pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 – Gráfico de desejabilidade para o cenário DE.



Porém, nessa condição a remoção de arabinoxilanas da biomassa pode ser insuficiente para permitir a acessibilidade enzimática às hexoses da biomassa. As superfícies de resposta obtidas para o cenário DB2 encontram indicadas a partir da Figura 26.

Figura 26 – Superfícies de resposta obtidas para o cenário DE.



Analogamente ao caso do cenário DB1, a concavidade do gráfico de T *versus* RLS (Figura 25(b)), indica que a utilização de temperaturas superiores a 160°C pode ocasionar RG crescentes, o que não é interessante quando se objetiva obter etanol através da fração sólida gerada após o pré-tratamento (SANTOS et al.,2018). Assim como no cenário DB2, a utilização de tempos de reação superiores a 40 minutos demanda a redução dos valores de RLS, a fim de se obter uma fração sólida que apresente melhores resultados na produção de etanol.

6.4 Caracterização dos sólidos pré-tratados e hidrolisados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade

As caracterizações dos sólidos pré-tratados nas condições de desejabilidade, em termos do balanço mássico de seus componentes, são indicadas a partir da Tabela 10. Em geral os balanços mássicos apresentaram bons resultados, com valores entre 94,2% e 101,4%. Em termos gerais, houve um aumento dos teores de SIA's e uma redução dos teores de compostos

fenólicos, no caso das biomassas lavadas. Isso corrobora a perspectiva apontada anteriormente, de que tratamentos mais severos contribuem para a RSIA, ocasionando uma menor ocorrência de reações de recondensação da lignina.

Tabela 10 – Caracterização dos sólidos pré-tratados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade (%).

Condição	GLU	ARX	SIA	LS	SI	fenóis	Total
DB1	33,3(0,7)	12,2(0,3)	43,1(8,3)	2,6(0,3)	2,1(0,6)	0,9(0,1)	94,2
DB1L	30,5(2,6)	14,1(1,6)	45,0(3,1)	2,5(0,4)	2,3(0,2)	0,8(0,1)	95,2
DB2	34,4(2,0)	8,7(0,6)	51,9(5,3)	2,9(0,2)	1,9(0,4)	1,6(0,1)	101,4
DB2L	31,0(0,7)	10,2(0,3)	48,5(3,1)	3,0(0,5)	2,0(0,1)	1,2(0,1)	95,9
DE	33,2(1,2)	20,9(0,4)	40,1(9,5)	3,6(0,4)	3,1(0,5)	0,5(0,1)	101,4
DEL	27,6(0,6)	21,7(0,7)	43,2(0,9)	3,2(0,1)	3,2(0,2)	0,4(0,0)	99,3

Em relação a esse aspecto, Regauskas et al.(2014) afirmam que durante a despolimerização da lignina, existe uma tendência de espécies de baixo peso molecular sofrerem recondensação, originando compostos mais recalcitrantes. Além disso, Kemppainen et al.(2016) mencionam que as modificações químicas ocorridas nas proteínas do bagaço de malte durante o tratamento por explosão a vapor, ocasionaram um aumento nos teores de SIA's da fração sólida resultante, possivelmente devido a reações de condensação da lignina com outros componentes da biomassa. Além disso, deve-se considerar que, em detrimento da retirada da maior parte das arabinoxilanas, ocorre um aumento dos teores de SIA's na fração remanescente ao pré-tratamento.

Vale salientar que Qin et al.(2018), obtiveram 65% de remoção de proteínas do bagaço de malte com o pré-tratamento por auto-hidrólise, utilizando 60°C durante 60 minutos e uma RLS de 40 mL.g⁻¹, e que acima de 75°C os teores de remoção desses compostos tornava-se decrescente. Isso aponta a perspectiva de que o pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade promoveu a remoção de proteínas da biomassa, e que por esse motivo, os teores de SIA's da condição de DB2L foram bastante inferiores ao da condição DB2.

Com relação aos teores de açúcares dos sólidos pré-tratados, observou-se que o tratamento de baixa severidade proporcionou a obtenção de biomassas contendo maiores teores de arabinoxilanas, comparativamente ao bagaço de malte bruto, embora tenha havido uma redução nos teores de glicanas e

compostos fenólicos. Isso mostra que de fato, conforme já discutido anteriormente, o pré-tratamento de baixa severidade é capaz de remover as hexoses oriundas do processo de mosturação presentes na superfície da biomassa. A caracterização média dos hidrolisados obtidos com os pré-tratamentos nas condições de desejabilidade encontram-se indicada a partir da tabela 11.

Tabela 11 – Composição média dos hidrolisados nas condições de desejabilidade (g.L⁻¹).

Condição	cel.	gli.	xil.	ara.	A.F.	A.A.	HMF	FF	fenóis
DB1	1,71 (0,03)	0,60 (0,04)	0,57 (0,04)	2,27 (0,09)	5,03 (0,31)	1,56 (0,19)	0,081 (0,002)	0,156 (0,004)	4,08 (0,65)
DB1L	0,92 (0,02)	0,25 (0,01)	0,82 (0,06)	3,07 (0,11)	4,82 (0,10)	0,85 (0,11)	0,062 (0,002)	0,220 (0,003)	3,63 (0,39)
DB2	1,78 (0,08)	1,35 (0,08)	1,61 (0,01)	1,89 (0,16)	6,30 (0,37)	1,42 (0,09)	0,245 (0,007)	0,502 (0,105)	6,09 (0,47)
DB2L	0,75 (0,04)	0,74 (0,06)	1,57 (0,08)	2,31 (0,13)	3,49 (0,24)	1,05 (0,07)	0,186 (0,010)	0,571 (0,076)	4,89 (0,65)
DE	4,07 (0,06)	0,52 (0,04)	0,29 (0,01)	1,05 (0,08)	0,46 (0,03)	1,69 (0,06)	0,008 (0,000)	0,000 (0,000)	1,13 (0,02)
DEL	0,78 (0,02)	0,07 (0,04)	0,15 (0,01)	1,49 (0,01)	0,11 (0,00)	0,78 (0,02)	0,002 (0,000)	0,004 (0,000)	0,78 (0,14)

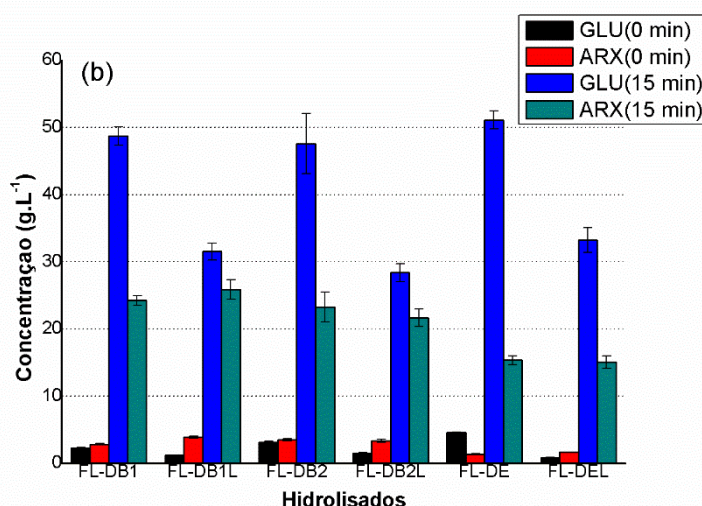
Interessante observar que as biomassas tratadas em duas etapas (cenários DB1L, DB2L e DEL) apresentaram menores concentrações de celobiose, glicose, ácido fórmico, ácido acético, HMF e fenóis na fração líquida da auto-hidrólise (AH), muito embora, nesses casos, as concentrações de xilose, arabinose e FF tenham sido superiores comparativamente às biomassas tratadas em uma única etapa. Em termos gerais, tal fato ocorre, pois, quando não se submete o bagaço ao pré-tratamento de baixa severidade (etapa de lavagem), a biomassa entra para o pré-tratamento por auto-hidrólise com uma elevada quantidade de carboidratos residuais ligados a superfície da biomassa, sobretudo hexoses. Como tais açúcares já estão livres, parte da energia aplicada ao pré-tratamento é destinada para estes açúcares disponíveis, acarretando uma hidrólise seguida de desidratação dos dímeros e trimeros de hexose em produtos de degradação, tais como ácido fórmico (A.F.) e HMF.

Por outro lado, quando o bagaço é submetido a uma etapa de lavagem prévia, as hexoses presentes são somente aquelas estruturais da biomassa, ou seja, para serem solubilizadas necessitam de maiores energia, o que não é atingido nas mesmas proporções do que a biomassa bruta. No entanto, como não existe mais competição de energia com as hexoses disponíveis na

superfície, uma vez que as mesmas já foram removidas em uma etapa prévia de lavagem, a acessibilidade a hemicelulose aumenta, o que pode ser observado a partir dos maiores valores de concentração de arabinose e xilose nos hidrolisados das condições DB1L, DB2L e DEL, quando comparado as condições DB1 DB2 e DE, conforme apresentado na Tabela 12.

As concentrações de glicanas e arabinoxilanas (monômeros) nos hidrolisados obtidos com os pré-tratamentos da biomassa nas condições de desejabilidade, bem como as concentrações totais desses açúcares identificadas após a hidrólise ácida desses hidrolisados, estão descritas a partir da Figura 27.

Figura 27 – Concentrações de glicanas (GLU) e arabinoxilanas (ARX) nos hidrolisados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade, identificados antes (0 min) e após hidrólise ácida (15 min).



Interessante observar que em todas as condições, a maior parte das glicanas da biomassa removidas para os hidrolisados, encontra-se na sua forma oligomérica, uma vez que após a hidrólise ácida das frações líquidas, esses oligossacarídeos foram detectados na forma de monômeros de celobiose e glicose, bem como produtos da degradação desses açúcares. Vale salientar que, embora no cenário para a produção de etanol, tenha-se estabelecido a mínima remoção de glicanas da biomassa, no cenário DE foi obtida a maior concentração de glicanas no hidrolisado. Isso provavelmente decorre do sinergismo entre as outras variáveis utilizadas para estabelecer esse cenário, sobretudo a remoção de arabinoxilanas.

Além dessas questões, cabe ressaltar que no cenário estabelecido para a produção de etanol (150°C, 60 minutos, 4 mL.g⁻¹), houveram as maiores diferenças entre as glicanas obtidas nas frações líquidas resultantes da auto-hidrólise e as glicanas totais, obtidas após a hidrólise ácida. Ou seja, nesse cenário ocorreu a maior remoção de açúcares na forma oligomérica. Isso aponta a perspectiva de que a obtenção de oligômeros a partir do bagaço de malte é favorecida por pré-tratamentos utilizando temperaturas medianas e longos tempos de reação, associados à uma baixa razão líquido-sólido. À medida que a severidade do pré-tratamento aumenta, observou-se que, a diferença entre açúcares monoméricos e oligoméricos reduziu, possivelmente devido às reações de clivagem e degradação desses oligômeros.

O gráfico da Figura 27 indica que, analogamente às glicanas, a maior parte dos arabinoxilanas solubilizadas nos hidrolisados encontra-se em sua forma oligomérica. De fato, Carvalheiro et al.(2005) mencionam que os principais produtos obtidos com o pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de malte são uma mistura de oligossacarídeos, açúcares monoméricos, ácido acético e produtos da degradação de açúcares tais como HMF e FF. Vale salientar que, o primeiro cenário para a produção de biogás foi aquele que proporcionou as maiores concentrações de arabinoxilanas na forma oligomérica.

Isso indica que há um valor de severidade a partir do qual a remoção de arabinoxilanas da biomassa torna-se decrescente. O tratamento de baixa severidade não afetou a remoção de arabinoxilanas no cenário estabelecido para a produção de etanol, muito embora nos demais cenários, esse tratamento preliminar tenha proporcionado efeitos distintos. Em relação a esse aspecto, Carvalheiro et al.(2005) mencionam que a hidrólise das hemiceluloses do bagaço de malte ocorre mais rapidamente com o aumento da temperatura, sendo as arabinanas da biomassa mais susceptíveis à hidrólise devido à sua natureza química, por serem ramificações da cadeia de xilopiranosil.

Interessante observar que Carvalheiro et al.(2004) submeteram o bagaço de malte ao pré-tratamento por auto-hidrólise a 150°C durante 60 minutos, utilizando uma razão líquido-sólido de 8 g.g⁻¹, e obtiveram uma concentração de xilo-oligossacarídeos (11,75 g.L⁻¹) ligeiramente inferior àquele obtido no cenário estabelecido para a produção de etanol (150°C, 60 minutos, 4 mL.g⁻¹), cujo valor foi de aproximadamente 13 g.L⁻¹. Em relação a esse aspecto, vale ressaltar que

Carvalho et al.(2005) mencionaram que a razão líquido-sólido parece não afetar a recuperação de xilanas na forma oligomérica, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Vale ressaltar que a maior parte dos açúcares contidos no hidrolisado é composta por glico-oligossacarídeos (hexoses), e que por esse motivo, a utilização do hidrolisado para a produção de etanol, representa uma alternativa ao uso dessa fração do pré-tratamento, uma vez que as leveduras usadas na indústria alcooleira não utilizam pentoses. Estudos posteriores podem contemplar a hidrólise enzimática da fração líquida resultante da auto-hidrólise do bagaço de malte.

Embora não seja abordado no escopo desse trabalho, acredita-se que a submissão da FL-DE à hidrólise enzimática possa demandar uma menor carga enzimática para hidrolisar os glico-oligossacarídeos na forma de glicose. Vale salientar que Mussatto et al.(2008) mencionam que uma concentração mínima de 59 g.L⁻¹ de glicose é adequada para os processos fermentativos, valor este que é ligeiramente superior à concentração de glicanas na FL-DE.

Os resultados obtidos após o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade, para as variáveis-resposta perda de massa, remoção de glicanas, remoção de arabinoxilanas, remoção de SIA's e concentração de açúcares monoméricos no hidrolisado, encontram-se denotados a partir da Tabela 12.

Tabela 12 – Valores das variáveis-resposta obtidas com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade.

Condições	PM (%)	RG (%)	RX (%)	RSIA (%)	CAH (g.L ⁻¹)	A/G (%)	HMF/FF (%)
DB1	54,8 (2,2)	55,4 (0,91)	73,1 (0,71)	44,3 (10,8)	5,15 (0,16)	53,73 (0,23)	51,77 (0,31)
DB1L	35,0 (3,7)	42,8 (4,88)	67,4 (3,63)	-----	5,07 (0,20)	87,78 (1,57)	28,00 (0,32)
DB2	58,8 (1,6)	57,9 (2,46)	82,5 (1,22)	38,9 (8,5)	6,63 (0,32)	52,54 (0,66)	50,42 (11,52)
DB2L	40,7 (1,1)	47,0 (1,15)	78,4 (0,54)	-----	4,84 (0,31)	81,25 (1,28)	33,05 (6,53)
DE	36,2 (3,1)	37,4 (2,21)	34,9 (1,94)	14,2 (7,3)	5,92 (0,14)	48,84 (0,53)	-----
DEL	20,4 (2,8)	36,7 (1,48)	38,5 (1,94)	-----	2,49 (0,05)	32,38 (5,46)	57,15 (6,33)

Na Tabela 12, encontram-se indicadas duas variáveis-resposta, que não foram utilizadas no estabelecimento de cenários, porém elas foram

posteriormente discutidas no item 6.6. São elas a relação entre as concentrações de arabinoxilanas e glicanas (A/G) e a relação entre as concentrações de HMF e FF nos hidrolisados (HMF/FF).

Vale salientar que no caso das condições DB1L, DB2L e DEL, a variável RSIA apresentou valores negativos e por sua vez, incongruentes. Isso pode se dar devido à possibilidade de recondensação da lignina e proteínas, conforme mencionado anteriormente no item 6.4. Isso aponta a perspectiva de que a remoção de SIA's não represente fidedignamente a modelagem da auto-hidrólise do bagaço de malte. Estudos posteriores podem abordar as remoções de lignina, proteínas separadamente, a fim de aumentar a compreensão sobre a despolimerização da biomassa por advento dos tratamentos hidrotérmicos.

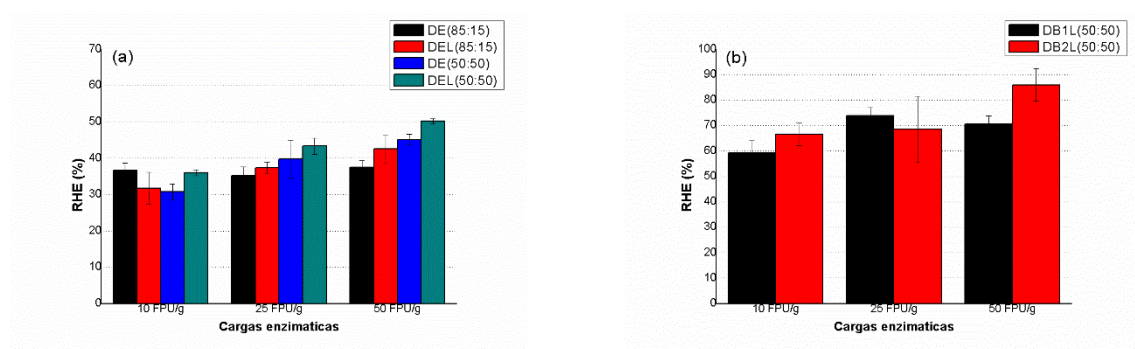
Considerando a possibilidade de que parte das proteínas da biomassa foram removidas durante o tratamento de baixa severidade, pode-se supor que a lignina remanescente, dentre os SIA's, tenha se tornado mais susceptível aos fenômenos, ainda pouco conhecidos, da recondensação da lignina. Nesse sentido, estudos posteriores podem utilizar as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ressonância magnética nuclear (RMN) a fim de auxiliar na compreensão desses fenômenos.

Não obstante essa questão, pode-se apontar o fato de que o tratamento hidrotérmico de baixa severidade proporcionou menores valores de perda de massa, remoção de glicanas e remoção de arabinoxilanas, de um modo geral. Deve-se considerar o fato de que, após a remoção dos componentes da biomassa que encontravam-se mais prontamente disponíveis, com tratamento de baixa severidade, as frações remanescentes necessitariam de uma maior energia de ativação para a sua hidrólise, o que justifica a existência desses valores. Além disso, em todos os casos em que a biomassa foi tratada previamente à auto-hidrólise, as concentrações de açúcares monoméricos nos hidrolisados resultantes foram inferiores. Porém tal fato é pertinente, diante da ampla remoção de açúcares prontamente disponíveis, conforme foi explicitado anteriormente no item 6.1 desse documento.

6.5 Hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados obtidos nas condições de desejabilidade

Os resultados da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados na condição de desejabilidade para etanol (150°C , 60 minutos, $4\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), em termos dos rendimentos de glicose, encontram-se denotados a partir da Figura 28(a). Em termos gerais, o coquetel enzimático 50:50 (50% de Cellic CTec 2 e 50% de Cellic HTec 2) foi aquele que ofereceu a melhor solubilização de glicose no hidrolisado enzimático, de modo que os melhores rendimentos foram obtidos para o bagaço de malte lavado (DEL). Contudo, mesmo com uma carga enzimática de $50\text{ FPU}\cdot\text{g}^{-1}$, os rendimentos foram de apenas 50,2% em termos de glicose. Ou seja, nessa condição apenas metade das glicanas da biomassa foram solubilizadas na forma de monômeros de glicose. Isso indica que ao fixar a variável RG em seu nível mínimo (menos desejável), a temperatura de 150°C fornecida pelo modelo computacional, pode ter sido insuficiente para remover uma quantidade de arabinoxilanas da biomassa que permita uma eficaz acessibilidade enzimática às hexoses do bagaço de malte.

Figura 28 – Rendimentos da hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados nas condições de desejabilidade para a produção de etanol (a) e biogás (b).



De fato, os valores médios da variável RX obtidas nos cenários DE e DEL foram respectivamente iguais a 34,9 e 38,5%. Além disso, mesmo atribuindo à variável RSIA o seu nível máximo (mais desejável), o sinergismo entre as variáveis do modelo apontou uma condição em que a remoção de SIA's (RSIA) foi de apenas 27% em média para a condição DE. Em todos os casos (cenários para a produção de etanol e biogás), houve uma grande variação entre os valores oferecidos pelas replicatas para a quantificação da RSIA. No caso das

condições DEL, DB1L e DB2L o valor da variável RSIA foi adotado como nulo, uma vez que possíveis reações de recondensação da lignina ocasionaram um aumento dos teores de SIA's ao ponto de tornarem a RSIA negativa.

Contudo, os resultados da hidrólise enzimática foram melhores para o bagaço lavado. Muito embora as concentrações de glicose no hidrolisado enzimático tenham sido similares para uma carga enzimática de 50 FPU.g⁻¹ (14,8 g.L⁻¹ para o bagaço bruto e 14,2 g.L⁻¹ para o bagaço lavado). Isso aponta a perspectiva de que as proteínas do bagaço de malte, supostamente removidas durante o tratamento hidrotérmico de baixa severidade, podem representar um fator impeditivo à acessibilidade enzimática maior do que a própria lignina da biomassa. Estudos posteriores podem adotar a utilização de proteases durante a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, a fim de avaliar a possibilidade de melhores rendimentos em termos de glicose.

Interessante observar que na pesquisa realizada por Paz et al.(2019), os autores verificaram que em todos os casos estudados, não foram obtidos bons resultados da hidrólise enzimática, o que os autores atribuíram a uma interferência causada pela maltose do bagaço de malte. Isso pode ser verificado a partir da comparação entre os RHE obtidos a partir das frações bruta (FS-DE) e lavada (FS-DEL) (Figura 28(a)), em que observou-se que os maiores rendimentos, em termos gerais, foram obtidos a partir da fração lavada. Acredita-se que a maltose (α -glicana) constitua parte dos açúcares não ligados da biomassa, que foram removidos a partir do tratamento de baixa severidade. De fato, Paz et al.(2019) verificaram concentrações desses açúcares após lavarem o bagaço de malte a 50°C durante 4 horas. Em relação a esse aspecto, denota-se a possibilidade da complementação do coquetel enzimático com α -amilases em estudos posteriores, a fim de avaliar melhores rendimentos em termos de glicose. Tal possibilidade justifica-se pelo fato de o coquetel enzimático utilizado no presente estudo conter glicosidades, que agem especificamente na quebra das ligação do tipo β -1,4 entre os monômeros de glicose.

Mesmo utilizando o tratamento alcalino, o maior rendimento da hidrólise enzimática obtido por Paz et al.(2019) foi de apenas 31,73% de conversão de glicanas à glicose e 37,05% de conversão de xilanas à xilose, utilizando a enzima comercial Ultraflo® L. (Novozymes) de atividade enzimática igual a 25 U.mL⁻¹. Vale salientar que no caso do melhor rendimento da hidrólise enzimática

indicado pela Figura 28(a) (DEL, 50 FPU.g⁻¹, coquetel enzimático 50:50), houve uma solubilização de 52,8% da celulose em celobiose e glicose, além de 17,5% de solubilização de arabinoxilanas em xilose e arabinose.

Vale salientar que Caetano et al.(2013) obtiveram um rendimento de 72% da hidrólise de polissacarídeos da biomassa, após submeterem o bagaço de malte a um processo de duas etapas, em que os autores promoveram a hidrólise enzimática simultaneamente ao pré-tratamento ácido. Nesse caso, os autores utilizaram primeiramente o pré-tratamento com HCl (1% v.v⁻¹) e a enzima Glucanex 100g, ajustando o pH a 4,5, e em um segundo estágio utilizando o ácido HNO₃ (1% v.v⁻¹) e a enzima Ultraflo L, ajustando o pH para 6.

Os resultados obtidos com a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados nas condições de desejabilidade para a produção de biogás DB1L e DB2L, utilizando o coquetel enzimático 50:50 (50% de Cellic CTec 2 e 50% de Cellic HTec 2), encontram-se denotados a partir da Figura 28(b). A análise do gráfico da Figura 28(b) permite inferir que as condições estabelecidas para a produção de biogás proporcionaram uma maior acessibilidade enzimática às hexoses da biomassa, uma vez que em todos os casos foram obtidos rendimentos da hidrólise enzimática superiores aos obtidos nas condições DE e DEL. Isso aponta a perspectiva de que as arabinoxilanas da biomassa representam um fator limitante à ação enzimática, pois nesses casos, as RX's observadas foram respectivamente iguais a 67,4% e 78,4%, valores estes aproximadamente o dobro dos valores obtidos nos cenários de desejabilidade para a produção de etanol.

A condição de desejabilidade DB2L foi aquela que apresentou o melhor resultado da hidrólise enzimática, utilizando uma carga de 50 FPU.g⁻¹ do coquetel 50:50, cujo valor foi de 86% em termos de conversão de celulose à glicose, tendo havido em média 87,1% de conversão de celulose em celobiose e glicose, além de 84,5% de conversão de arabinoxilanas em xilose e arabinose. Tais resultados são interessantes, no entanto, é válido ressaltar que as condições de desejabilidade para biogás buscaram condições que proporcionavam maiores perdas de massa, ou seja, tratamentos de maior severidade, sendo assim, apesar de ter sido atingidos bons rendimentos de hidrólise enzimática para as frações sólidas geradas nas condições DB1L e DB2L a partir da fração sólida, é válido ressaltar que uma elevada quantidade de

carboidratos são solubilizadas nestas condições durante o pré-tratamento, o que indica a necessidade da utilização da fração líquida oriunda do pré-tratamento para produção de outros produtos como o biogás.

Contudo, a concentração de glicose no hidrolisado enzimático obtido pela condição DB2L foi de apenas 26,7 g.L⁻¹, o que segundo Mussatto et al.(2008) representa uma concentração insuficiente para o processo fermentativo a etanol, cujo valor adequado segundo os autores seria de no mínimo 59 g.L⁻¹. As concentrações de glicose obtidas foram superiores àquelas apontadas por Santiago (2013) (22 g.L⁻¹), que utilizaram o tratamento alcalino do bagaço de malte e a metade da carga enzimática da enzima Cellubrix, complementada com a enzima Novozyme 188.

Diante da limitação quanto à concentração de glicose no hidrolisado, estudos posteriores podem contemplar a adoção de RLS menores do que 10 mL.g⁻¹ (valor utilizado no presente estudo) durante a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados, como uma maneira de avaliar a possibilidade de obtenção de maiores concentrações de glicose no hidrolisado enzimático. Outra solução seria promover um aumento da concentração da solução de glicose através da evaporação parcial da solução, embora esse manejo demande certa quantidade de energia térmica, o que contribui para a redução da eficiência energética do processo. Porém, a melhor das soluções para solucionar o problema seria a recarga de sólidos pré-tratados, mediante a avaliação da cinética de remoção de glicose, durante o período de hidrólise enzimática da biomassa. Tal manejo pode ser útil para a obtenção de soluções de glicose mais concentradas, uma vez que a RLS reduz à medida que se promove a adição de sólidos pré-tratados, o que acarreta no aumento da concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática.

A carga enzimática que proporcionou os melhores resultados da hidrólise enzimática (50 FPU.g⁻¹) foi similar àquela utilizada por Mussatto et al.(2008), que utilizaram a enzima comercial Celluclast® 1.5L (Novozymes), extraída a partir dos fungos do gênero *Trichoderma reesei*, a uma carga de 45 FPU.g⁻¹, a 45°C durante 96 horas, utilizando uma RLS de 50 mL.g⁻¹ e uma velocidade de rotação de 100 rpm. Porém nesse caso, o bagaço de malte foi tratado previamente a partir de um processo termoquímico em duas etapas, utilizando primeiramente H₂SO₄ (1,25% m.v⁻¹) a 120°C durante 17 minutos, com uma RLS de 8 g.g⁻¹, e em um segundo instante, utilizando NaOH (2% m.v⁻¹) a 120°C por 90 minutos,

com uma RLS de 20 g.g⁻¹. Em relação a esse aspecto, destaca-se que o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa possui uma série de vantagens comparativamente aos tratamentos químicos, como facilidade operacional e redução de custos.

Resultados similares em termos da solubilização de arabinoxilanas na melhor condição (DB2L), foram obtidos por Marcolongo et al.(2014), que verificaram 85,8% de solubilização das pentoses do bagaço de malte, após submeterem a biomassa tratada alcalinamente à ação de um coquetel enzimático com uma carga enzimática igual a 27,2 U.g⁻¹, preparado com as enzimas Cellulase C2730 (isolada de uma cepa modificada dos fungos do gênero *Trichoderma reesei*), Cellobiase C6105 (isolada dos fungos de gênero *Aspergillus niger*), Xylanase X3876 (isolada a partir dos fungos do gênero *Trichoderma viride*) e β -Xylosidade X3504 termoestável, suplementado com a enzima α -L-arabinofuranosidase isolada a partir de uma cepa modificada dos fungos do gênero *Pleurotus ostreatus*.

Vale salientar que López-Linares et al.(2019) obtiveram um rendimento da hidrólise enzimática de 82% em termos da solubilização de carboidratos da biomassa, após submeterem o bagaço de malte pré-tratado simultaneamente por auto-hidrólise (192,7°C, 5,4 minutos) e micro-ondas, à ação da enzima Cellic CTec 2 (Novozyme), utilizando uma carga enzimática de apenas 15 FPU.g⁻¹. Isso corrobora a perspectiva apontada anteriormente de que os tratamentos combinando mais de uma tecnologia podem ser mais eficientes para a obtenção de bioprodutos.

Interessante observar o resultado da hidrólise enzimática aproximadamente igual ao máximo teórico, obtido por Pierre et al.(2011). Porém nesse caso, anteriormente ao tratamento por explosão a vapor (164,9°C, 7 bar, 15 minutos), os autores submeteram o bagaço de malte a uma solução de H₂SO₄ (3% v.v⁻¹) a 120°C durante 60 minutos, a fim de removerem as hemiceluloses e o amido residual do bagaço de malte. Em relação a esse aspecto, ressalta-se a importância da remoção das pentoses da biomassa a fim de aumentar os resultados da hidrólise enzimática, assim como foi apontado anteriormente para as condições DB1L e DB2L.

O processo de hidrólise enzimática em três etapas realizado por Pierre et al.(2011), utilizou primeiramente um coquetel enzimático contendo 32 U.L⁻¹ da α -

amilase Fungamyl® 800L (isolada a partir dos fungos do gênero *Aspergillus orizae*), a 50°C durante 120 minutos. Na segunda etapa, os autores utilizaram uma carga de 1,5 U.L⁻¹ da glicoamilase AMG 300L (obtida a partir dos fungos do gênero *Aspergillus niger*), a 65°C durante 60 minutos. Na etapa final, os sólidos foram submetidos a ação da enzima Celluclast® 1,5L, utilizando uma carga de 480 FPU.L⁻¹, suplementada com a enzima Novozyme® 188 a uma carga de 125 FPU.L⁻¹, durante 20 horas, sendo todos os ensaios realizados a 50°C sob uma velocidade de agitação de 600 rpm. Isso corrobora com a perspectiva apontada anteriormente acerca da adoção de α -amilases em estudos posteriores, com relação à obtenção de melhores rendimentos em termos de glicose.

Vale salientar que a fração líquida do cenário para a produção de etanol (FL-DE), apresentou concentrações de glicanas e arabinoxilanas respectivamente iguais a 47,5 e 15,4 g.L⁻¹, o que levanta a perspectiva de que bons resultados poderiam ser obtidos a partir da hidrólise enzimática dessa fração líquida. Embora não seja parte do escopo dessa pesquisa, tal fração possui potencial para a produção de etanol, devido a elevada concentração de glicanas no hidrolisado. Em relação a esse aspecto, considera-se que menores cargas enzimáticas poderiam ser utilizadas para hidrolisar os glico-oligossacarídeos na forma de glicose, comparativamente às cargas utilizadas nesse estudo, para hidrolisar as glicanas da fração sólida pré-tratada.

6.6 Análises das cinéticas de produção de CH₄ e biodegradabilidades anaeróbias dos hidrolisados obtidos com o pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade

A análise da evolução nas concentrações de um determinado produto metabólico de interesse econômico em função do tempo, constitui um dos objetivos dos estudos cinéticos (SCHMIDELL et al.,2001). Em processos biotecnológicos, a concentração de microrganismos de interesse é proporcional à formação de produtos, de tal forma que as velocidades instantâneas de crescimento são traduzidas pelas inclinações das retas tangentes à curva de ajuste cinético (SCHMIDELL et al.,2001). Assim, após a inoculação do meio de cultura sob temperatura e agitação favoráveis ao crescimento de microrganismos de interesse econômico, os processos de transformação do

substrato em produtos, ocorrem segundo uma série de etapas características (SCHMIDELL et al., 2001).

O modelo cinético de Gompertz modificado foi aquele que melhor representou a produção de metano a partir dos testes de BMP, utilizando as frações líquidas resultantes do tratamento da biomassa nas condições de desejabilidade, pois ele apresentou os maiores coeficientes de determinação (superiores a 0,97) e os menores valores de RMSE, NRMSE e AIC, sendo portanto, escolhido como representativo para a estimativa das produções específicas de metano. Assim, esse modelo é capaz de prever satisfatoriamente ao menos 97% dos dados experimentais, valor este ligeiramente superior ao obtido por Baêta et al.(2016a) e ligeiramente inferior ao obtido por Baêta et al.(2016) e Adarme et al.(2017) a partir do mesmo modelo cinético. Os parâmetros cinéticos das produções de metano, obtidas a partir dos testes de BMP, encontram-se indicados a partir da Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros da análise cinética da produção específica de metano.

Amostra	Modelo	P	μ_m	λ	k_1	R ²	RMSE	NRMSE	AIC
FL-TBS1	Gompertz modificado	128,99	24,52	12,26	-----	0,99	5,95	4,25	202,19
	Primeira ordem	182,39	-----	-----	0,0323	0,79	27,20	19,44	360,77
FL-TBS2	Gompertz modificado	172,27	9,54	1,33	-----	0,98	7,11	4,03	100,18
	Primeira ordem	199,02	-----	-----	0,0557	0,98	8,65	4,90	107,58
FL-DEL	Gompertz modificado	263,77	15,13	4,97	-----	0,99	10,36	3,84	118,23
	Primeira ordem	295,30	-----	-----	0,0457	0,92	29,58	10,97	166,58
FL-DB1	Gompertz modificado	266,64	22,80	3,93	-----	0,97	17,41	6,02	143,13
	Primeira ordem	301,98	-----	-----	0,0606	0,93	29,28	10,13	166,09
FL-DB1L	Gompertz modificado	224,23	14,63	2,05	-----	0,97	14,57	6,13	134,59
	Primeira ordem	265,92	-----	-----	0,0557	0,96	16,87	7,10	139,64
FL-DB2	Gompertz modificado	272,09	20,41	3,45	-----	0,97	17,49	6,11	143,36
	Primeira ordem	301,87	-----	-----	0,0613	0,93	28,37	9,91	164,58
FL-DB2L	Gompertz modificado	292,98	17,21	2,31	-----	0,97	16,68	5,51	141,08
	Primeira ordem	324,58	-----	-----	0,0580	0,96	23,14	7,65	154,80

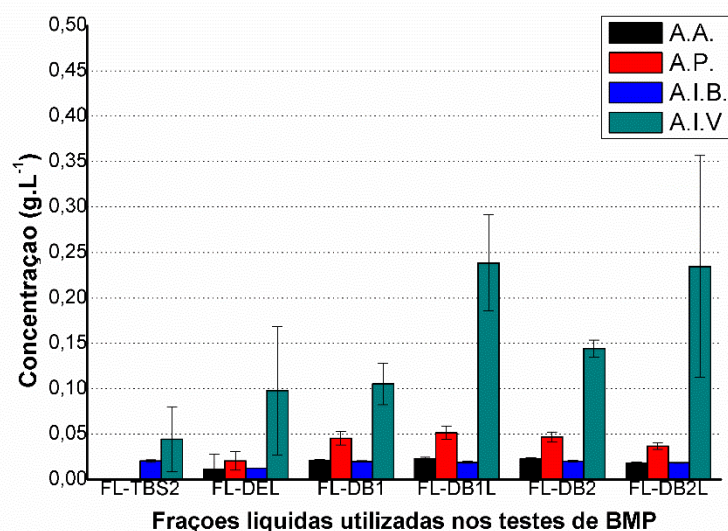
P: produção máxima de CH₄ (NmL.g⁻¹COD_{adic.}), μ_m : taxa de produção de metano (NmL.dia⁻¹.g⁻¹COD_{adic.}), λ : fase lag (dia), k_1 : constante cinética de primeira ordem (dia⁻¹), RMSE: raiz quadrada do erro médio (NmL.g⁻¹COD_{adic.}), NRMSE: raiz quadrada do erro médio normalizada, AIC : Critério de informação de Akaike , R²: coeficiente de determinação.

Segundo Baêta et al.(2016), o acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGV's) em sistemas anaeróbios pode incorrer em um desequilíbrio microbiano, restrições termodinâmicas e cinéticas, comprometendo assim, a produção de CH₄. Adarme et al.(2017) avaliaram a rota metabólica predominante a partir das razões entre ácido acético (A.A) e ácido butírico (A.B.) em relação ao total de AGV's. Nesse caso os autores verificaram que proporções de 18,5% e 16,6%, para ambas relações indicaram a predominância da rota acética. Portanto, pode-se afirmar que em todos os testes de BMP realizados nesse estudo, a rota metanogênica foi predominante, pois as relações entre as concentrações de A.A. e a concentração total de AGV's foram inferiores a 10,87%, não tendo ocorrido a acumulação de A.B. em nenhum dos testes.

Santos et al.(2018) também verificaram a predominância da rota acética mediante acumulações de ácido acético e ácido propiônico (A.P.) ao final dos testes de BMP. Por outro lado, os autores também verificaram que as maiores produções de CH₄ nos testes de BMP estiveram relacionadas à baixas acumulações de ácido isobutírico (A.I.B).

As concentrações de AGV's nos testes de BMP utilizando as frações líquidas resultantes do pré-tratamento do bagaço de malte nos cenários estabelecidos estão indicadas a partir da Figura 29.

Figura 29 – Concentrações de AGV's ao final dos testes de BMP com as frações líquidas resultantes do pré-tratamento do bagaço de malte nas condições de desejabilidade.



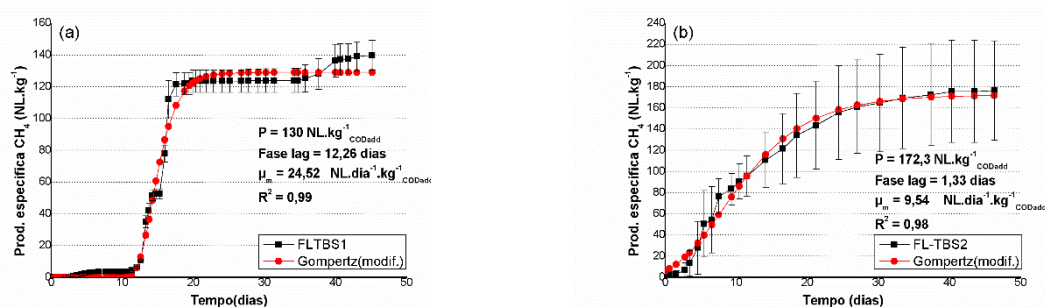
Percebeu-se que os testes de BMP realizados com as frações lavadas da biomassa (FL-DB1L e FL-DB2L) apresentaram menores fases de adaptação do que às obtidas nas frações brutas (FL-DB1 e FL-DB2) (Tabela 13), o que pode estar associado às reduzidas concentrações de HMF e fenóis nesses hidrolisados, devido à sua toxicidade à microbiota (Tabela 11). Porém, os testes de BMP com as frações lavadas da biomassa, apresentaram maiores acumulações de ácido isovalérico (A.I.V.) ao final dos testes, comparativamente às frações não lavadas nos mesmos cenários. Isso pode estar atribuído às maiores concentrações de FF nesses hidrolisados, comparativamente às frações não lavadas (FL-DB1 e FL-DB2), indicando que o FF é mais tóxico do que o HMF às bactérias acetogênicas.

6.6.1 Cinéticas de produção de CH₄ e biodegradabilidades anaeróbias das FL-TBS1 e FL-TBS2

Os testes de BMP realizados com os hidrolisados obtidos a uma baixa severidade de tratamento, apresentaram produções específicas de metano (CH₄), em torno de 139,9 NL.kg⁻¹COD_{add} (FL-TBS1) e 176,4 NL.kg⁻¹COD_{add} (FL-TBS2), com biodegradabilidades médias de 39,5% e 49,8%, respectivamente. No caso da FL-TBS2, a demanda química de oxigênio do substrato ao final do teste foi de 31,25% da COD de entrada, ou seja, nesse caso, 68,75% da COD de entrada foi convertida em COD para a produção de metano.

As produções específicas de CH₄ observadas e previstas pelo modelo de Gompertz modificado estão descritas a partir da Figura 30.

Figura 30 – Produções específicas de CH₄ observadas nos testes de BMP e previstas pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-TBS1 (a) e a FL-TBS2 (b).



Os resultados do teste de BMP com a FL-TBS1 e a FL-TBS2 (primeiro e segundo testes com a FL-TBS) apresentaram produções de 3,4 e 2,4 mmol de CH₄, e embora as produções de CH₄ nesses testes tenham sido as menores dentre os demais, elas foram maiores do que as observadas por Santos et al.(2018) (90 NL.kg⁻¹CO_Dadd) e Adarme et al.(2017) (0,157 mmol de CH₄), ao submeterem o hidrolisado da ozonização do bagaço de cana-de-açúcar, em um sistema de digestão em um único estágio.

Embora o hidrolisado obtido com o pré-tratamento de baixa severidade do bagaço de malte, tenha apresentado uma produção de CH₄ inferior à maioria dos resultados reportados na revisão de literatura para o bagaço de malte, apenas Weger et al. (2017) abordou o aproveitamento energético de uma fração de açúcares, prontamente disponíveis na superfície da biomassa. Nesse caso, os autores utilizaram a fração líquida resultante da prensagem mecânica do bagaço de malte, como substrato na digestão anaeróbia, obtendo uma produção específica de biogás de 725 L.kg⁻¹_{sv}, com uma concentração de CH₄ de 65%.

A adição de carvão ativado em pó nos testes de BMP com a FL-TBS2, proporcionou uma redução da fase lag (Tabela 13), um aumento na biodegradabilidade do hidrolisado e uma produção de específica de metano aproximadamente 26% maior do que à obtida no teste com a FL-TBS1. No entanto, o incremento na produção específica de CH₄ foi bastante inferior aos obtidos por Santos et al.(2018), que verificaram que a adição de carvão ativado em pó nos testes de BMP produziram incrementos nas produções específicas de CH₄ de 2,4 a 1,8 vezes.

Embora a fase lag da digestão da FL-TBS2 tenha sido a menor entre os demais ensaios (Tabela 13), nesse caso houve também a menor taxa de produção de CH₄. Isso pode ser decorrente da baixa concentração de açúcares no hidrolisado, em torno de 16,6 g.L⁻¹ de GLU e 3,4 g.L⁻¹ de ARX. Embora não tenham sido identificados furfuraldeídos (FF e HMF) nesse hidrolisado, deve-se considerar que compostos nitrogenados, advindos das proteínas do bagaço de malte, podem ter sido extraídos durante o tratamento de baixa severidade. Tal prerrogativa embasa-se sobre os resultados reportados por Qin et al.(2018), que obtiveram 65% de remoção de proteínas do bagaço de malte com o pré-tratamento por auto-hidrólise, utilizando 60°C durante 60 minutos e uma RLS de 40 mL.g⁻¹.

Cabe salientar que os efeitos inibitórios à atividade metanogênica notificados por Panjičko et al.(2017), foram causados pela presença de amônia, advinda dos altos teores protéicos do bagaço de malte. Segundo Cassini (2003), a faixa de valores da relação entre carbono e nitrogênio (C/N), favorável à atividade metanogênica está entre 20:1 a 30:1. Porém, Panjičko et al.(2017) verificaram que o bagaço de malte possui uma relação C/N entre 3:1 e 5:1, com um teor de nitrogênio total médio de $12 \text{ g.kg}^{-1}_{\text{BU}}$. Bougrier et al. (2018) verificaram teores de nitrogênio similares, em torno de $10,9 \text{ g.kg}^{-1}_{\text{BU}}$ para a mesma biomassa, o que os autores consideram uma concentração muito alta para a digestão anaeróbia.

Diante disso, acredita-se que melhores resultados na produção de CH_4 a partir do hidrolisado resultante do tratamento de baixa severidade, possam ser atingidos em sistemas de co-digestão com materiais carbonáceos, a fim de adequar a relação C/N. Em relação a esse aspecto, estudos posteriores podem ser direcionados a investigar a co-digestão anaeróbia da FL-TBS e dos hidrolisados resultantes da auto-hidrólise do bagaço de malte, abordando proporções diversas entre esses substratos como forma de se obter incrementos na produção específica de CH_4 .

Embora a fase de adaptação, no caso do teste de BMP com a FL-TBS1, tenha sido a maior dentre os demais ensaios, esse foi o ensaio que apresentou a maior taxa de produção de CH_4 (Tabela 13). De acordo com Schmidell et al.(2001), a fase exponencial é caracterizada pela máxima velocidade específica de crescimento, o que pode ser traduzida pelos maiores coeficientes angulares das retas tangentes ao gráfico. Assim, acredita-se que após a síntese enzimática para o metabolismo das proteínas solubilizadas na FL-TBS1, esses compostos possam ter contribuído para elevadas taxas de crescimento microbiano.

Apesar das diferenças cinéticas nos ensaios de BMP com a FL-TBS1 e FL-TBS2, em ambos os casos, a concentração média de CH_4 no biogás atingiu valores máximos em torno de $0,543 \text{ mol.mol}^{-1}$, por volta do 24º dia após iniciado o experimento. Tais concentrações assemelham-se às obtidas por Vitanza et al.(2016), ao alimentarem um reator contínuo com bagaço de malte sem tratamento sob condições mesofílicas. Porém nesse caso, os autores obtiveram uma produção bastante superior de CH_4 ($429 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{SV}}$) e uma biodegradabilidade do substrato em torno de 81%.

Deve-se considerar contudo, que o teste de Shapiro-Wilk das amostras FL-TBS1 e FL-TBS2, apresentou um valor de W (valor do teste) igual a 0,7759 e um valor de p igual a 0.06556. Assim, como o valor de p é maior do que 5% (nível de significância), diz-se que as produções específicas de CH₄ referentes aos testes de BMP com as FL-TBS1 e FL-TBS2 (primeiro e sendo testes com a FL-TBS) apresentam uma distribuição normal. Uma vez verificada a normalidade dos dados, o teste t de Student revelou um valor de p igual a 0,4649, ou seja, como p é maior do que 5%, isso indica que as diferenças entre as produções específicas de ambos tratamentos (TBS1 e TBS2) não são significativas. Os resultados dos testes encontram indicados no ANEXO 2.

6.6.2 Cinética de produção de CH₄ e biodegradabilidade anaeróbia da FL-DEL

No cenário estabelecido para priorizar a produção de etanol (150°C, 60 minutos, 4 mL.g⁻¹), percebeu-se que os melhores rendimentos da hidrólise enzimática foram obtidos com a biomassa lavada. Logo, nesse cenário tem-se duas frações líquidas resultantes dos pré-tratamentos, sendo uma delas a FL-TBS (hidrolisado do tratamento de baixa severidade) e a outra, o hidrolisado resultante da auto-hidrólise do bagaço de malte lavado (FL-DEL). Dessa forma, os testes de BMP contemplaram apenas a análise de biodegradabilidade anaeróbia da fração líquida resultante do tratamento da biomassa lavada (FL-DEL).

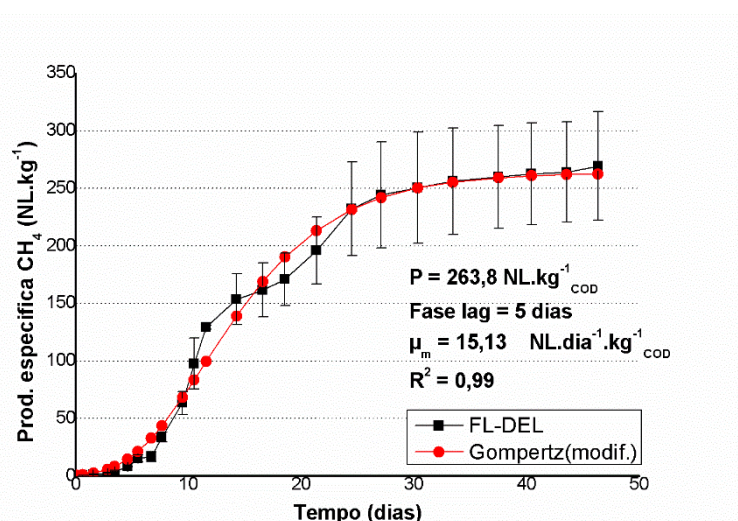
Os testes de BMP utilizando como substrato a FL-DEL, forneceram produções específicas de metano em torno de 269,4 NmL.g⁻¹_{CODadd} (345,65 NL.kg⁻¹_{SV}) ou 326 NmL.g⁻¹_{CODrem}, apresentando uma biodegradabilidade média de 76% e uma conversão de 82,7% da COD de entrada no teste para a produção de CH₄. Nesses ensaios, a concentração máxima média de metano no biogás foi de 0,69 mol.mol⁻¹, ocorrida por volta do 25º dia após iniciado o experimento. As produções específicas de H₂ foram desprezíveis, com valores em torno de 0,05 NmL.g⁻¹_{CODadd}.

A produção específica de CH₄ obtida no ensaio de BMP com a FL-DEL, assemelha-se com um dos resultados obtidos por Bougrier et al.(2018), com a digestão anaeróbia do bagaço de malte sem tratamento, após a suplementação

do meio com uma solução com uma baixa carga de macro e micronutrientes, em que a produção específica de CH_4 foi de $266 \text{ NmL.g}^{-1}_{\text{CODadd}}$. No entanto, a concentração de metano no presente estudo foi ligeiramente superior àquela obtida pelos autores, que obtiveram concentrações de metano entre 60% e 65%. Além disso, as concentrações obtidas nos testes com a FL-DEL assemelham-se às obtidas por Ezeonu e Okada (1996) (66%), que utilizaram o bagaço de malte sem tratamento como substrato em um sistema de co-digestão, muito embora a produção de CH_4 no caso da FL-DEL tenha sido bem maior.

A Figura 31 indica a produção específica de CH_4 observada nos testes de BMP com a FL-DEL e aquela prevista pelo modelo Gompertz modificado.

Figura 31 – Produção específica de CH_4 observada nos testes de BMP e prevista pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-DEL.



A produção de CH_4 obtida com a digestão anaeróbia da FL-DEL foi ligeiramente inferior à obtida por Santos et al.(2018), que submeteram o hidrolisado obtido por ozonização do bagaço de cana-de-açúcar na condição DC5 ($282 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{CODadd}}$), à digestão anaeróbia em testes de BMP. No entanto, a taxa de produção de CH_4 nesse estudo (Tabela 13), foi ligeiramente superior à obtida pelos autores. Considerando o ajuste cinético de primeira ordem, a constante cinética obtida durante a digestão anaeróbia da FL-DEL assemelha-se àquela obtida por Lima et al.(2018) ($0,046 \text{ dia}^{-1}$), quando os autores utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento em um sistema de co-digestão, muito embora, a produção específica de CH_4 no caso da FL-DEL, tenha sido aproximadamente três vezes maior.

Além disso, os resultados obtidos com a digestão anaeróbia da FL-DEL, em termos da produção específica de metano, foram bastante superiores aos reportados por Panjičko et al.(2017). Porém, nesse caso os autores utilizaram o pré-tratamento químico do bagaço de malte com ácido clorídrico, submetendo o hidrolisado em um reator granular e obtiveram uma produção específica de CH₄ igual a 234 L.kg⁻¹_{sv}. Em relação a esse aspecto, ressalta-se que o tratamento hidrotérmico do bagaço de malte na condição DEL, além de não demandarem a utilização de produtos químicos, proporcionaram a obtenção de um hidrolisado com maior potencial bioquímico de CH₄.

Os ensaios de BMP com a FL-DEL apresentaram uma produção específica de CH₄, inferior à maioria dos demais ensaios nos cenários visando a produção de biogás. Essa baixa produção de CH₄, pode estar atribuída à acumulação de AGV's de cadeia longa, traduzida pela proporção entre A.I.V. e o total de AGV's, identificada ao final do teste de BMP, que foi de 68,5%, e que segundo Santos et al.(2018), pode ser um limitante para a atividade acetogênica do inóculo.

Verificou-se nesse teste, a maior fase de latência dentre os cenários estabelecidos (tabela 13). Embora tenham sido identificadas pequenas concentrações de furfuraldeídos tóxicos nesse hidrolisado, acredita-se que a elevada fase de adaptação possa estar associada às baixas concentrações de açúcares monoméricos no hidrolisado (Tabela 11), comparativamente aos cenários para a produção de biogás.

Conforme mencionado no item 6.6 desse documento, percebeu-se que a FL-DEL apresentou a maior diferença entre as concentrações de açúcares monoméricos e oligoméricos, o que justifica um maior período de adaptação dos microrganismos ao substrato, composto sobretudo por oligômeros de cadeias longas, devido à severidade mediana do pré-tratamento nesse caso. Além disso, nesse hidrolisado foi identificada uma baixa concentração de ácido acético (0,78 g.L⁻¹), comparativamente aos demais hidrolisados (Tabela 11), e segundo Chernicharo et al.(1997), durante a digestão anaeróbia, o acetato é utilizado por bactérias metanogênicas acetoclásticas para a produção de 60 a 70% de toda a produção de metano (CHERNICHARO, 1997).

Vale salientar que Carvalheiro et al.(2004) observaram oligossacarídeos com o maior grau de polimerização após submeterem o bagaço de malte ao

tratamento por auto-hidrólise a 150°C durante 120 minutos, utilizando uma relação sólido-líquido (RLS) de 8 g.g⁻¹. Interessante observar que, os autores perceberam que o tratamento do bagaço de malte a 150°C durante 60 minutos, sob a mesma RLS proporcionou a obtenção de um hidrolisado contendo uma concentração de 0,73 g.L⁻¹ de ácido acético, valor esse bastante inferior ao obtido na FL-DE, cujo valor foi de 1,69 g.L⁻¹. Isso indica que, ao submeter a biomassa a um tratamento preliminar de baixa severidade, as arabinoxilanas remanescentes da biomassa tornam-se mais susceptíveis ao ataque radicalar da fase aquosa, durante o tratamento por auto-hidrólise posterior. Isso justifica os maiores teores de ácido acético e FF encontrados na FL-DEL comparativamente à FL-DE.

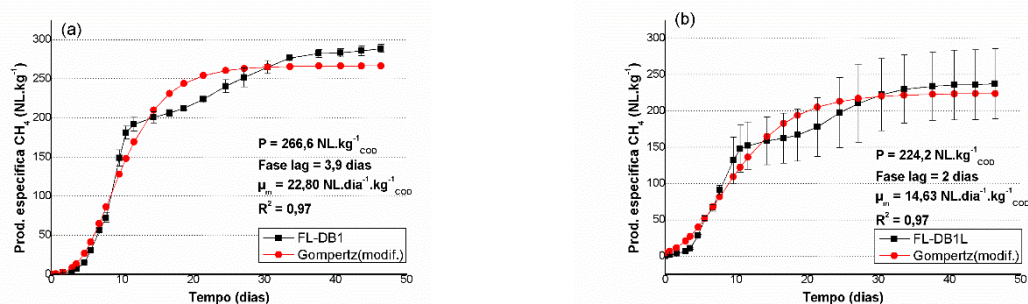
6.6.3 Cinéticas de produção de CH₄ e biodegradabilidades anaeróbias das FL-DB1 e FL-DB1L

Os testes de BMP utilizando como substratos as FL-DB1 e FL-DB1L (hidrolisados da auto-hidrólise do bagaço bruto e do bagaço lavado na condição DB1), forneceram produções específicas médias de CH₄ respectivamente iguais a 288,9 e 237,5 NmL.g⁻¹_{COD_{adic.}} (ou ainda, 387,9 e 318,9 NmL.g⁻¹_{SV_{adic.}}), com biodegradabilidades médias de 81,5 e 67,0%, com remoções de 94,5% e 87,8% da COD de entrada no teste. As produções específicas de H₂ nos ensaios com a FL-DB1 e FL-DB1L foram nulas. As concentrações máximas de metano obtidas no biogás apresentaram praticamente os mesmos valores em torno de 0,8065 mol.mol⁻¹, ocorridas por volta do 10º dia após o experimento ter sido iniciado.

Isso indica que o tratamento hidrotérmico preliminar de baixa severidade, proposto nesse estudo (80°C, 30 minutos, 10 mL.g⁻¹), não afetou a concentração de CH₄ no biogás obtido em relação ao primeiro cenário, muito embora a produção específica de metano no ensaio com a FL-DB1 tenha sido em torno de 21,6% maior do que no caso da FL-DB1L. Isso provavelmente ocorre devido às maiores concentrações de glico-oligômeros e monômeros de glicose e celobiose na FL-DB1 comparativamente à FL-DB1L (Figura 27).

As produções específicas de CH₄ observadas nos testes de BMP, bem como aquelas previstas pelo modelo de Gompertz modificado estão indicadas a partir da Figura 32.

Figura 32 – Produção específica de CH₄ observada nos testes de BMP e prevista pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-DB1 (a) e FL-DB1L (b).



Embora a FL-DB1L tenha apresentado uma concentração de fenóis em torno de 11% menor do que a FL-DB1 (Tabela 11), o potencial bioquímico de CH₄ na fração lavada foi cerca de 17,8% menor, comparativamente à fração não lavada. Deve-se admitir contudo, que, maiores produções de CH₄ no caso da FL-DB1, podem estar relacionadas às maiores concentrações de glucanas e oligoglucanas presentes no hidrolisado, quando comparado as condições com lavagem prévia (FL-DB1L e FL-DB2L) conforme pode ser visto na Figura 27. Além disso, foi possível perceber que para todas as condições submetidas ao pré-tratamento em dois estágios a relação de ARX e GLU (A/G) foi maior quando comparado as condições em um único estágio. Maiores valores dessa variável indica que o hidrolisado possui uma predominância de pentoses, ao passo que menores valores indicam predominância de hexoses entre os açúcares totais presentes no meio. Esses resultados indicam que o inóculo usado no presente estudo para digestão anaeróbia apresentou melhor desempenho no processo quando alimentados com hidrolisados com predominância de açúcares na forma de hexoses. Indicando, uma melhor aceitação a tais açúcares.

Outra observação interessante, são as menores relações de (HMF/FF) observadas nos hidrolisados obtidos após o pré-tratamento por auto hidrólise em uma única etapa (FL-DB1 e FL-DB2). Menores valores dessa relação indicam que o hidrolisado apresenta uma maior predominância de FF. Em relação a esse aspecto, nas FL-DB1L e FL-DB1 as relações entre HMF e FF em ambos substratos foram respectivamente iguais a 28,2% e 51,9% (Tabela 12). Tais valores indicam que a menor produção de CH₄ no caso da FL-DB1L, pode estar atribuída a uma maior proporção de FF entre o total de aldeídos tóxicos

observadas neste substrato (FL-DB1L). Em todos os casos observados a FL gerada durante o pré-tratamento em uma única etapa apresentou hidrolisados com menores proporções de FF e maiores proporções de hexoses, e conseqüentemente a produção de biogás para estes substratos foram superiores aos obtidos pelas FL gerada pelo pré-tratamento em duas etapas (FL-DB1L, FL-DB2L e FL-DEL). Isto indica que a digestão anaeróbia é favorecida em ambientes com menores concentrações de FF e maiores concentrações de hexoses em relação as pentoses.

Tais resultados, corroboram a perspectiva apontada por Baêta et al.(2016), que mencionam que apenas a massa de açúcares monoméricos no hidrolisado, não foi suficiente para otimizar a produção de CH₄ a partir da digestão anaeróbia de hidrolisados hemicelulósicos. Em relação a esse aspecto, ressalta-se que a cinética de produção de CH₄ possa estar relacionada não somente à massa de açúcares e furfuraldeídos, mas também às suas proporções no hidrolisado.

A segunda maior produção de CH₄ dentre os ensaios de BMP, foi obtida com a FL-DB1. Nesse caso, houve a maior taxa de produção de CH₄ dentre os ensaios de BMP com as frações líquidas resultantes da auto-hidrólise. Isso pode estar atribuído às maiores concentrações de açúcares no hidrolisado, comparativamente a FL-DB1L, mas também à relação A/G, cujo valor foi de aproximadamente 50% (Tabela 11 e Tabela 12).

Curiosamente, a FL-DB2 (segundo cenário) apresentou concentrações de GLU e ARX ligeiramente menores do que a FL-DB1 (primeiro cenário) e a mesma relação A/G, o que acarretou uma taxa de produção de CH₄ ligeiramente menor. Além disso, a relação HMF/FF na FL-DB1 (primeiro cenário) foi de aproximadamente 51,9% enquanto no caso da FL-DB2 (segundo cenário) a relação entre esses aldeídos foi de 48,8% (Tabela 12). Ou seja, a ligeira redução na taxa de produção de CH₄, no caso dos testes de BMP com a FL-DB2 pode estar atribuída a uma pequena predominância de FF sobre o total de aldeídos.

Vale salientar que no caso da FL-DB1L, houve a segunda menor produção de CH₄, sendo esse valor superior apenas aos resultados obtidos com a FL-TBS. Além disso, nesse caso, houve a menor taxa de produção de CH₄ dentre os ensaios de BMP com as frações líquidas resultantes da auto-hidrólise (Tabela 13). Embora a FL-DB1L tenha apresentado a maior relação A/G, dentre todos os

hidrolisados, nesse caso houve também a menor relação HMF/FF (Tabela 12). Isso corrobora a perspectiva apontada por Santos et al.(2018), ao mencionarem que a severidade do pré-tratamento e a quantidade de açúcares no hidrolisado não são necessariamente aspectos para se obter as melhores produções de biogás.

Essas observações apontam a perspectiva de que não somente a CAH deva ser considerada como variável explicativa para a obtenção de cenários para a produção de biogás, mas também a concentração total de ARX e GLU, bem como a proporção entre esses açúcares, pois as maiores taxas de produção de CH₄ obtidas nesse estudo (exceto a obtida com a FL-TBS1), estiveram relacionadas à proporções iguais entre as concentrações de ARX e GLU (Tabela 12 e Tabela 13). Além disso, não somente as concentrações de aldeídos pode ser utilizada como variável explicativa, mas também a proporção entre HMF e FF, pois a segunda menor produção de CH₄, dentre todos os testes de BMP, estiveram associadas à maior proporção de FF em relação ao total de aldeídos (Tabela 12 e Tabela 13). Dessa forma, estudos posteriores podem contemplar a adoção dessas variáveis a fim de otimizar a produção de CH₄.

Em relação a esse aspecto, ressalta-se que as concentrações de HMF e FF não foram utilizadas como variáveis dependentes na modelagem do processo de auto-hidrólise, pois esses compostos somente foram identificados nos hidrolisados dos ensaios cujas temperaturas foram superiores a 160°C (ensaios 2 e 9). Dessa forma, planejamentos experimentais em estudos posteriores, utilizando-se de temperaturas acima de 160°C, essas variáveis explicativas, representadas pelas concentrações de HMF e FF, podem ser úteis no sentido da obtenção de novos cenários para a otimização da produção de biogás.

Ao final dos testes de BMP, a análise de AGV's revelou que, no caso da FL-DB1, ocorreu a menor proporção entre A.I.V e o total de AGV's, dentre os demais ensaios, cujo valor foi de 55%, o que justifica a elevada produção de CH₄, pois conforme mencionado anteriormente, de acordo com Santos et al.(2018), a acumulação de AGV's de cadeia longa pode comprometer o volume e as taxas de produção de CH₄.

Os resultados obtidos no primeiro cenário para a produção de biogás, foram superiores aos obtidos por Schumacher et al.(2014), que submeteram a palha de cevada tratada por explosão a vapor (190°C, 30 minutos) à digestão

anaeróbia em testes de BMP. Interessante observar as similaridades do primeiro cenário para a produção de biogás (180°C , 31 minutos, 5 mL.g^{-1}) e as condições operacionais utilizadas por Schumacher et al.(2014), muito embora as biomassas não sejam as mesmas.

Schumacher et al.(2014) obtiveram uma produção específica de CH_4 de $251 \text{ NmL.g}^{-1}_{\text{SV}}$, embora a produção específica da amostra controle (biomassa bruta) tenha sido apenas 11% menor. Vale salientar que nessa ocasião, os autores utilizaram 400 gramas de inóculo e de 1,2 a 1,8 gramas de sólidos voláteis da biomassa. Ou seja, os autores utilizaram uma relação alimento-microrganismo bastante inferior àquela utilizada no presente estudo.

Interessante observar que a produção específica de metano no cenário DB1 ($387,9 \text{ NmL.g}^{-1}_{\text{SVadic}}$) foi ligeiramente superior à máxima produção potencial obtida por Bougrier et al.(2018), que obtiveram $374 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{SVadic}}$, utilizando um reator anaeróbio contínuo operado durante 200 dias, suplementado com uma baixa carga de nutrientes, para a digestão anaeróbia do bagaço de malte sem tratamento. Além disso, a produção específica de metano no cenário DB1L ($318,9 \text{ NmL.g}^{-1}_{\text{SVadic}}$) foi ligeiramente superior à máxima produção de metano relatada por Poulsen et al. (2017), que obtiveram $311 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{SVadic}}$ durante a codigestão do bagaço de malte sem tratamento, esterco bovino e dejetos suínos. Nessa ocasião, os autores utilizaram as proporções entre os materiais de 83:9:8 em termos de sólidos voláteis.

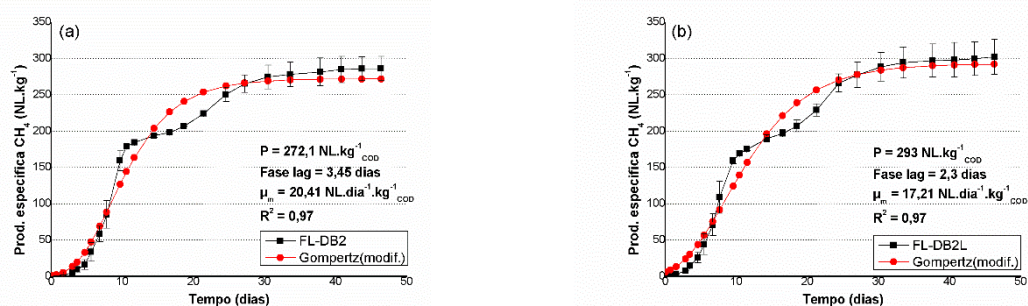
Contudo, o teste de Shapiro-Wilk das amostras FL-DB1 e FL-DB1L, apresentou um valor de W (valor do teste) igual a 0.81071 e um valor de p igual a 0.1229. Assim, como o valor de p é maior do que 5% (nível de significância), diz-se que as produções específicas de CH_4 referentes aos testes de BMP com as FL-DB1 e FL-DB1L apresentam uma distribuição normal. Uma vez verificada a normalidade dos dados, o teste t de Student revelou um valor de p igual a 0,3688, ou seja, como p é maior do que 5%, isso indica que as diferenças entre as produções específicas de ambos tratamentos (DB1 e DB1L) não são significativas. Os resultados dos testes encontram-se indicados no ANEXO 2.

6.6.4 Cinéticas de produção de CH₄ e biodegradabilidades anaeróbias das FL-DB2 e FL-DB2L

Os testes de BMP, que utilizaram como substratos as FL-DB2 e FL-DB2L (hidrolisados da auto-hidrólise do bagaço bruto e do bagaço lavado na condição DB2) como substratos na digestão anaeróbia, forneceram produções específicas médias de CH₄ respectivamente iguais a 286,2 e 302,4 NmL.g⁻¹_{CODadic.} (ou ainda, 345,0 e 344,1 NmL.g⁻¹_{SVadic.}), com concentrações máximas de CH₄ de 0,773 e 0,681 mol.mol⁻¹, ocorridas durante o 11º e o 25º dias desde que o experimento foi iniciado. Em ambos ensaios não houve formação de H₂. As biodegradabilidades médias do substrato estiveram em torno de 81,8 e 85,3%, tendo havido uma conversão de 68,3% e 67,7% da COD de entrada no teste.

As produções específicas de CH₄ observadas nos testes de BMP com as FL-DB2 e FL-DB2L, bem como aquelas previstas pelo modelo cinético de Gompertz modificado, encontram-se indicadas a partir da Figura 33.

Figura 33 – Produção específica de CH₄ observada nos testes de BMP e prevista pelo modelo de Gompertz modificado para a FL-DB2 (a) e FL-DB2L (b).



A produção específica média de CH₄ nos cenários DB2 e DB2L (345,6 NmL.g⁻¹_{SVadic.}) foi ligeiramente inferior à máxima produção referenciada por Ferreira (2013), que obtiveram 370 NmL.g⁻¹_{SVadic.} nos testes de BMP, utilizando o bagaço de malte pré-tratado por explosão ao vapor (170°C, 5 minutos) na digestão anaeróbia. Segundo a autora, pré-tratamentos hidrotérmicos com valores de severidade superiores a 3,5 tendem a proporcionar valores decrescentes de biodegradabilidade do substrato durante a digestão anaeróbia.

De fato, comparando o primeiro e o segundo cenários de produção de biogás, cujas severidades dos tratamentos foram de 3,45 e 3,74, no caso das

frações brutas do bagaço de malte (FL-DB1 e FL-DB2), houve um pequeno decréscimo na produção específica de metano. Porém, no caso das frações lavadas, o segundo cenário (DB2L) apresentou uma produção específica de CH₄ 27,3% maior do que a do primeiro cenário (DB1L).

Embora Santos et al.(2018) mencionem que a acumulação de AGV's de cadeia longa em sistemas anaeróbios pode reduzir as produções volumétricas e as taxas de produção de CH₄, as maiores produções observadas (FL-DB2L) estão associadas à uma relação entre A.I.V. e o total de AGV's de 66,7%. No entanto, no caso da FL-DB2L, ocorreram as menores razões obtidas entre as concentrações de A.A., A.P. e A.I.B. em relação à concentração total de AGV's, cujos valores foram respectivamente iguais a 5,12%, 10,43% e 5,25%.

No caso dos testes de BMP com a FL-DB2, houve a terceira maior produção de CH₄, e embora as relações entre A.A., A.P. e A.I.B. e o total de AGV's, tenham sido ligeiramente inferiores às apresentadas no caso da FL-DB1 (segunda maior produção de CH₄), nesse caso, a relação entre A.I.V. e o total de AGV's foi de 61,7%. Contudo, esses não devem ser fatores considerados isoladamente, pois no caso da FL-DB2L, a razão entre ARX e GLU foi a segunda maior dentre os demais hidrolisados (76,4%), o que segundo Baêta et al.(2016), pode favorecer as maiores produções de metano, devido a alta quantidade de pentoses. Dessa forma, a maior produção de CH₄ no caso da FL-DB2L pode estar associada também à reduzida concentração de compostos fenólicos (Tabela 11), pois nesse caso a concentração de fenóis foi em torno de 19,7% menor do que na FL-DB2. Isso pode ser avaliado a partir da Tabela 13, que mostra que a fase de adaptação dos microrganismos (fase lag) foi menor no caso dos testes de BMP com as frações lavadas.

No entanto, apesar da FL-DB2 ter apresentado um menor potencial bioquímico de metano, comparativamente à FL-DB2L, deve-se considerar que as concentrações de CH₄ foram em torno de 13,1% maiores do que às obtidas com a FL-DB2L. Além disso, as taxas de produção de CH₄ (Tabela 13) no caso dos testes de BMP com a FL-DB2 foram cerca de 18,6% maiores do que no caso da FL-DB2L. Embora as concentrações de fenóis na FL-DB2 tenham sido maiores do que na FL-DB2L (Tabela 11), deve-se considerar que as relações entre as concentrações de HMF e FF em ambos ensaios foram de 48,8% e 32,6%, respectivamente. Ou seja, existe uma maior proporção de FF e o total de

aldeídos no caso da FL-DB2, o que pode justificar a sua menor produção de CH₄, comparativamente à FL-DB2L.

Vale salientar que a cinética dos ensaios do segundo cenário para a produção de biogás apresentaram uma fase de crescimento linear mais curta em relação aos ensaios do primeiro cenário (Figuras 31 e 32). Isso pode ser decorrente de uma menor quantidade de xilo-oligossacarídeos e uma maior quantidade de açúcares monoméricos presentes nas FL-DB2 e FL-DB2L, devido à maior severidade do pré-tratamento. Vale salientar que em processos biotecnológicos, a fase de desaceleração (posterior à fase de crescimento linear) ocorre em detrimento de um esgotamento de componentes no meio de cultura, ou ainda pelo acúmulo de metabólitos inibidores (SCHMIDELL et al.,2001), nesse caso representados respectivamente por oligômeros e AGV's.

Interessante ressaltar que, embora o modelo de Gompertz modificado seja capaz de prever satisfatoriamente mais de 97% dos dados experimentais, a cinética de produção de biogás, na maioria dos casos houve um ponto de inflexão em que a curva de produção específica muda de concavidade, criando dois patamares em momentos distintos (Figura 32), o que indica que houve uma desaceleração nas taxas de crescimento microbiano, possivelmente devido a um esgotamento dos açúcares no hidrolisado e/ou à acumulação de AGV's.

Salienta-se portanto, que o teste de Shapiro-Wilk com as amostras FL-DB2 e FL-DB2L, apresentou um valor de W (valor do teste) igual a 0.97606 e um valor de p igual a 0.8785. Assim, como o valor de p é maior do que 5% (nível de significância), diz-se que as produções específicas de CH₄ referentes aos testes de BMP com as FL-DB2 e FL-DB2L apresentam uma distribuição normal. Avaliada a normalidade dos dados, o teste t de Student revelou um valor de p igual a 0,5217, ou seja, como p é maior do que 5%, isso indica que as diferenças entre as produções específicas de ambos tratamentos (DB2 e DB2L) não são significativas. Os resultados dos testes encontram indicados no ANEXO 2.

6.6.5 Análise estatística das produções específicas de CH₄

O teste de Shapiro-Wilk demonstrou que as produções específicas de CH₄ de todos os testes de BMP, não possuem uma distribuição normal, pois o valor de p calculado foi igual a 0,03863, ou seja, menor do que 5% (nível de

significância). As transformações dos dados utilizando o inverso, a raiz quadrada e o logaritmo neperiano ocasionaram valores de p, respectivamente iguais a 0,003068; 0,02156 e 0,01145, no teste de Shapiro-Wilk, ou seja, de toda forma, os dados não possuem uma distribuição normal. Uma vez comprovada a não-normalidade dos dados, o teste de Fligner-Killeen revelou um valor de p igual a 0,04888, ou seja, o valor de p ligeiramente menor do que 5% indica que não há homocedasticidade dos dados, ou seja, as variâncias das produções específicas de CH₄ não são homogêneas. Portanto, não havendo normalidade e homocedasticidade dos dados, o teste de Kruskal-Wallis revelou um valor de p igual a 0,1271 ou seja, como p é maior do que 5% isso indica que não há diferenças significativas entre os cenários.

Vale salientar que excetuando-se do conjunto de dados, as produções específicas de CH₄ obtidas com a FL-TBS1, o delineamento inteiramente casualizado apresentou valores de p dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente iguais a 0,08416 e 0,6711, ou seja, nesse caso os dados possuem normalidade e homocedasticidade. Diante dessas condições a ANOVA revelou um valor de p igual a 0,0823, ou seja, como p é maior do que 5%, não existem diferenças significativas entre os cenários, com relação às produções específicas de CH₄. De fato, o teste de Tukey confirmou que não existem diferenças significativas entre os cenários. Os resultados dos testes estatísticos encontram indicados no ANEXO 2.

6.7 Análise da eficiência energética das condições de desejabilidade

Os valores utilizados para estimar a eficiência energética dos pré-tratamentos do bagaço de malte nas condições de desejabilidade, encontram-se na Tabela 14. Os balanços de energia foram positivos em todos os cenários estabelecidos, ou seja, a energia térmica recuperada a partir da queima do biogás em um sistema CHP, é capaz de suprir a energia térmica demandada para promover o tratamento da biomassa, gerando um saldo energético térmico passível de ser utilizado para suplementar a energia térmica no processo de produção de cerveja, contribuindo para redução de combustíveis fósseis usados nas etapas que envolvem aquecimento no processo de produção de cerveja,

além de gerar energia elétrica que pode ser usada nas próprias unidades industriais.

Tabela 14 – Parâmetros utilizados no cálculo das eficiências energéticas dos pré-tratamentos do bagaço de malte nas condições de deseabilidade.

Parâmetros	FL-TBS	FL-DB1	FL-DB1L	FL-DB2	FL-DB2L	FL-DEL
PBM (Nm ³ .kg ⁻¹ CO _D adic.)	0,17644	0,2889	0,23752	0,30238	0,28616	0,26945
CO _D FL (kg.L ⁻¹)	0,0512	0,1128	0,1022	0,097	0,0706	0,0686
k (L.kg ⁻¹)	6,8523	4,334	4,1429	4,9775	4,3895	1,8765
K _{TBS} (kg.kg ⁻¹)	-----	-----	0,748146	-----	0,748146	0,748146
T _{PT} (K)	353,15	453,15	453,15	453,15	453,15	423,15
RLS (kg.kg ⁻¹)	10	5	5	5,5	5,5	4
E _{biogás} (MJ.kg ⁻¹)	1,18	2,69	1,43	2,63	1,34	0,49
E _{biogás} (adicional) (MJ.kg ⁻¹)	-----	-----	1,18	-----	1,18	1,18
E _{elétrica} (kWh.kg ⁻¹)	0,178	0,403	0,214	0,394	0,200	0,075
E _{elétrica} (adicional) (kWh.kg ⁻¹)	-----	-----	0,178	-----	0,178	0,178
E _{PT} (MJ.kg ⁻¹)	0,08	0,81	0,81	0,81	0,81	0,56
E _{PT} (adicional) (MJ.kg ⁻¹)	-----	-----	0,08	-----	0,08	0,08
ΔE (MJ.kg⁻¹)	1,10	1,88	1,73	1,83	1,63	1,03

Tais resultados mostram que o bagaço de malte, sendo gerado em grandes quantidades durante todo o ano, pode ser direcionado a um novo método de manejo, a fim de promover utilizações mais nobres para esse resíduo. Vale salientar que a energia elétrica recuperada a partir da queima do biogás em um sistema CHP, pode ser utilizada como fonte alternativa à energia fornecida pelas concessionárias de eletricidade, contribuindo ainda mais para o conceito de sustentabilidade ambiental. Porém, deve-se ressaltar que o saldo de energia gerado nas condições em que o tratamento hidrotérmico em duas etapas foi feito, foram, apesar de balanços positivos, menores que os obtidos para o tratamento em uma única etapa.

Embora o saldo de energia dos cenários considerando o pré-tratamento em duas etapas foram menores que os observados para o pré-tratamento em

uma etapa, ressalta-se que apenas o saldo energético da queima do biogás produzido pela FL-TBS, é capaz de suprir a demanda por energia térmica para o tratamento de baixa severidade e para os pré-tratamentos por auto-hidrólise, mesmo nas condições mais severas (DB1L e DB2L) contempladas nesse estudo. Além disso, as biomassas que foram tratadas em duas etapas apresentaram uma maior acessibilidade enzimática, o que representa uma vantagem competitiva do tratamento hidrotérmico em duas etapas quando o objetivo do pré-tratamento converge para à obtenção de etanol celulósico.

Em relação a recuperação final de energia obtida considerando a queima do biogás gerado pela digestão anaeróbia das correntes líquidas do pré-tratamento, observou-se que os processos em uma única etapa geraram mais energia livre de retorno. A produção de CH_4 a partir da FL-DB1 foi a segunda maior entre os demais ensaios ($288,9 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{COD}}$), de modo que a queima do CH_4 produzido em um sistema de CHP, é capaz de gerar a maior quantidade de energia térmica, com valores em torno de $2,69 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$, além de uma quantidade de energia elétrica correspondente a $0,403 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$. No entanto, para promover o pré-tratamento da biomassa nessa condição (180°C , 31 min, 5 mL.g^{-1}), é necessário utilizar um montante de energia térmica equivalente a $0,81 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$, o que resulta em um saldo de energia térmica de $1,88 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$.

No caso da FL-DB1L, embora essa fração tenha apresentado a segunda menor produção de CH_4 ($237,5 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{COD}}$), o cenário DB1L foi aquele que proporcionou a terceira maior recuperação energética. Ressalta-se que a energia térmica recuperada pela queima do biogás é proporcional à COD do hidrolisado e ao volume recuperado após o pré-tratamento, e por esse motivo a recuperação energética não pode estar vinculada somente ao volume de biogás produzido. No caso do cenário DB1L, por exemplo, a produção de biogás, considerando a produção da FL-TBS e da FL-DB1L, foi em torno de 43,3% maior do que a obtida no cenário DB1.

Considerando apenas o tratamento de baixa severidade, a queima do biogás produzido pela FL-TBS é capaz de gerar uma energia térmica de $1,18 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ e uma energia elétrica correspondente a $0,178 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$. Considerando que a energia demandada no tratamento de baixa severidade é de $0,08 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$, nessa condição ocorre um saldo de energia térmica de $1,10 \text{ MJ.kg}$. Considerando esse saldo de energia térmica e assumindo que a energia

demandada para o pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço lavado no cenários mais severos (DB1L e DB2L) é de $0,81 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$, a queima do biogás produzido com a FL-TBS é capaz de suprir a demanda energética para o pré-tratamento por auto-hidrólise, restando ainda ao final desse processo um saldo de $0,29 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$.

Dessa forma, toda a energia térmica obtida pela queima do biogás produzido na segunda etapa de pré-tratamento, torna-se livre para ser aproveitada em outros processos, uma vez que a energia demandada no tratamento em duas etapas é suprida apenas pela queima do biogás produzido pela FL-TBS. Isso demonstra a eficiência da remoção de açúcares livres da biomassa com o tratamento de baixa severidade e que a destinação para a produção de biogás torna mais atrativos os tratamentos posteriores por auto-hidrólise.

Assim, a queima do biogás gerado com a FL-DB1L produz uma energia térmica de $1,43 \text{ MJ.kg}^{-1}$ e cerca de $0,214 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$. Porém o tratamento da biomassa nesse cenário demanda uma energia térmica de $0,81 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{COD}}$, o que resulta em um saldo de energia térmica de $0,63 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$, que somado às energias recuperadas da FL-TBS ($1,10 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia térmica e $0,178 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia elétrica), resultam em um saldo total de cerca de $1,73 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ e $0,392 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$.

No caso da FL-DB2, embora a sua produção de CH_4 tenha sido a terceira maior dentre os ensaios de BMP ($286,2 \text{ NL.kg}^{-1}_{\text{COD}}$), nesse caso houve a segunda maior recuperação de energia térmica. Assim, a queima do CH_4 produzido pela FL-DB2 em um sistema CHP, fornece uma energia térmica de $2,63 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ e uma energia elétrica de $0,422 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$. Porém, o tratamento da biomassa demanda um montante de energia térmica de $0,81 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$, o que fornece um saldo de energia térmica de $1,83 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$.

Comparativamente, a produção de CH_4 a partir do cenário DB2L, proporcionou a obtenção de um volume de metano em torno de 67% maior do que no cenário com a FL-DB2, considerando as produções de CH_4 da FL-TBS e FL-DB2L, no entanto com uma recuperação energética em torno de 11% menor do que a obtida no caso da FL-DB2.

Conforme mencionado anteriormente, apenas a queima do biogás gerado pelo hidrolisado de baixa severidade é capaz de suprir a demanda térmica do

tratamento em duas etapas, fornecendo um pequeno saldo de energia térmica ($0,29 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$) e elétrica ($0,178 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$). Por sua vez, a queima do biogás gerado a partir da FL-DB2L é capaz de produzir um montante de $1,34 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia térmica e $0,200 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia elétrica, que somadas às energias recuperadas a partir da FL-TBS, fornecem um saldo de $1,63 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ e $0,378 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$.

Por fim, o pré-tratamento por auto-hidrólise na condição DEL (15°C , 60 min, 4 mL.g^{-1}) demanda um total de $0,56 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia térmica, o que representa uma quantidade maior do que aquela oferecida pela queima do biogás produzido nessa condição. Ou seja, a queima do biogás gerado pela FL-DEL em um sistema CHP fornece uma energia térmica de $0,49 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ e $0,075 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia elétrica, representando um déficit de energia térmica de $0,07 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$. Porém nesse caso, ocorre um saldo positivo de energia térmica apenas devido ao biogás produzido pela FL-TBS, que promove um saldo positivo de energética térmica nesse cenário. Ou seja, quando as energias recuperadas da fração FL-TBS ($1,10 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia térmica e $0,178 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia elétrica) são somadas a esse déficit, ocorre um saldo positivo de $1,03 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia térmica além de $0,253 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia elétrica.

Tais resultados demonstram que o potencial de geração energética a partir do pré-tratamento hidrotérmico em duas etapas do bagaço de malte é inferior ao caso da biomassa tratada em uma única etapa. No caso dos cenários para a produção de biogás, o tratamento em duas etapas não mostrou ser eficiente para aumentar os ganhos energéticos a partir da digestão anaeróbia dos hidrolisados, de modo que nos dois cenários, os saldos energéticos foram menores do que no caso das biomassas tratadas em um estágio. Contudo, considerando apenas o tratamento hidrotérmico de baixa severidade, o potencial de geração de metano dos açúcares não-ligados da biomassa demonstrou ser compensatório, uma vez que para extraí-los é necessária uma pequena energia térmica, correspondente a apenas 6,8% da energia recuperada pela queima do biogás gerado a partir da FL-TBS.

Considerando que a produção de cerveja no Brasil no ano de 2016 foi de 14,1 bilhões de litros de cerveja (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2017), e admitindo que a produção de bagaço de malte seja aproximadamente 200 gramas por litro de cerveja produzido (NIGAM,

2017), então no ano de 2016, o país foi responsável pela geração de 2,82 milhões de toneladas de bagaço de malte. Admitindo que o bagaço de malte possui em torno de 80% de umidade (WEGER et al., 2017), esse montante representa cerca de 564 mil toneladas de bagaço de malte em base seca. Assim, se todo o bagaço de malte gerado no Brasil fosse conduzido ao manejo através do cenário DB1, seria possível gerar no ano de 2016, em torno de 1060,32 TJ de energia térmica e 227,2 GWh de energia elétrica.

Blüml (2008) *apud* Weger et al.(2016) menciona que a energia térmica específica demandada por cervejarias é de $1,188 \text{ MJ.L}^{-1}$. Ou seja, considerando a energia térmica recuperada a partir do cenário DB1, no ano de 2016 seria possível gerar um montante de energia suficiente para produzir 892,5 milhões de litros de cerveja, o que corresponde a cerca de 6,33% da produção de cerveja nacional. Considerando que uma demanda mensal média por energia elétrica de aproximadamente 150 kWh por residência (valor próximo à média brasileira), e supondo que toda a produção de bagaço de malte no ano de 2016 fosse destinada ao cenário DB1, estima-se que a queima do biogás produzido em um sistema CHP, seria capaz de produzir um montante de energia capaz de suprir a demanda de cerca de 126222 residências anualmente. Dessa forma, o bagaço de malte possui uma importância estratégica para a implementação do conceito de sustentabilidade ambiental no país, podendo ser adotado como uma biomassa alternativa para geração de energia. Ou seja, o bagaço de malte, nessa condição, deixa de ser um passivo ambiental para se tornar um insumo importante na indústria de cerveja, na forma de biogás, complementando a sua demanda por energias de origem fóssil.

Comparando os resultados obtidos na melhor condição apontada neste trabalho (DB1), com os resultados apontados por Weger et al.(2016), verificou-se que no presente estudo foi gerada uma produção volumétrica de biogás em torno de 1,57 vezes maior (ou seja, $0,1765 \text{ m}^3.\text{kg}^{-1}_{\text{bs}}$ comparativamente a $0,1125 \text{ m}^3.\text{kg}^{-1}_{\text{bs}}$), com uma concentração de CH_4 no biogás 15% maior (80% comparativamente a 65%). Além disso, considerando um teor de 80% no bagaço de malte (WEGER et al., 2016), a produção de CH_4 a partir da água extraída com a prensagem do bagaço de malte, e a sua queima em sistema CHP, foi capaz de produzir uma quantidade de energia térmica de $1,51 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ e energia elétrica de $0,219 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ (WEGER et al., 2016). Tais resultados foram

inferiores ao obtido na condição DB1, que considerando as eficiências térmica e elétrica utilizadas pelos autores (58% e 35%, respectivamente), é capaz de apontar um montante de $2,4 \text{ MJ.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia térmica e $0,344 \text{ kWh.kg}^{-1}_{\text{bs}}$ de energia elétrica, o que indica que o tratamento hidrotérmico na condição apontada (DB1) é mais vantajoso do que o tratamento mecânico do bagaço de malte utilizado por Weger et al.(2016).

Os valores dos saldos energéticos dos cenários não possuem normalidade e homocedasticidade, pois os testes de Shapiro-Wilk e Fligner-Killeen apresentaram valores de p, respectivamente iguais a 0,03344 e 0,04738. Após a transformação dos dados, o teste de Shapiro-Wilk apresentou valores de p iguais a 0.007515; 0.02605 e 0.01845, ou seja, de qualquer forma os dados não possuem uma distribuição normal. Porém, o teste de Kruskal-Wallis apresentou um valor de p igual a 0,115; ou seja, não existem diferenças significativas entre os saldos energéticos obtidos nos cenários estabelecidos. Os resultados dos testes estatísticos dos saldos energéticos encontram-se indicados no ANEXO 3.

As Figuras 34, 35, 36, 37 e 38 representam os fluxogramas através dos quais são indicados os balanços de massa e energia, respectivamente para os cenários DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL.

Figura 34 – Balanços de massa e energia para o cenário DB1

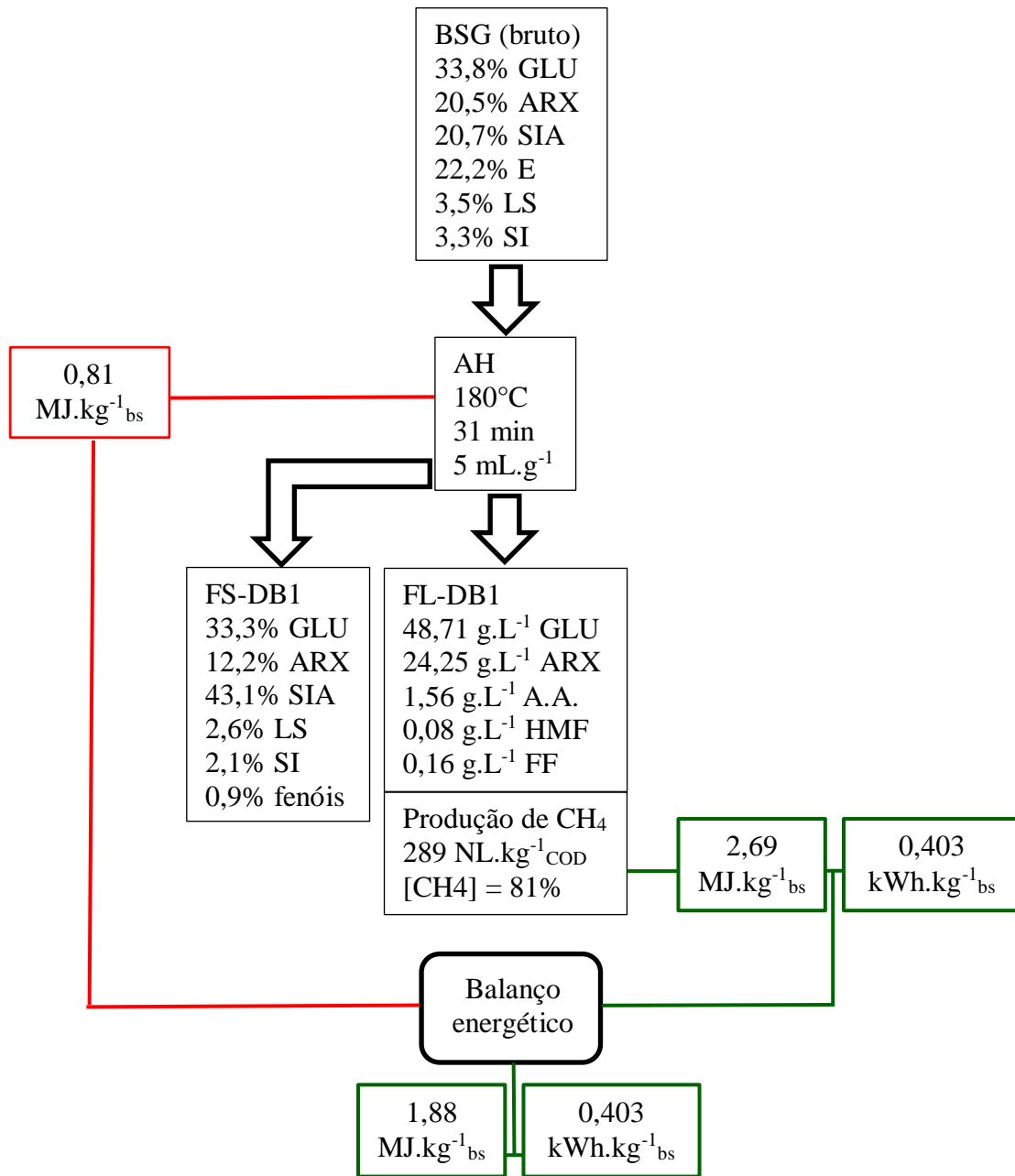


Figura 35 – Balanços de massa e energia para o cenário DB1L

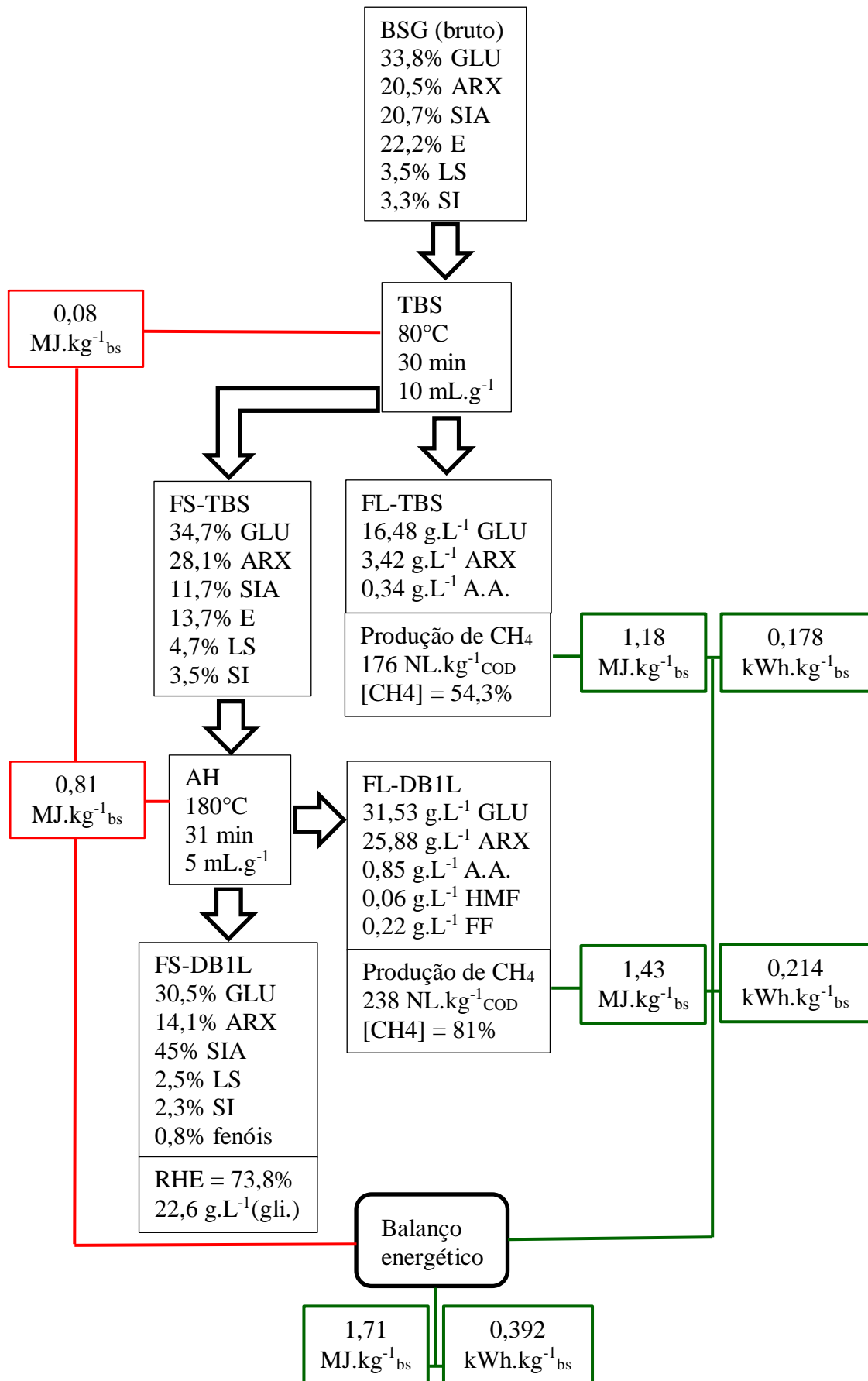


Figura 36 – Balanços de massa e energia para o cenário DB2

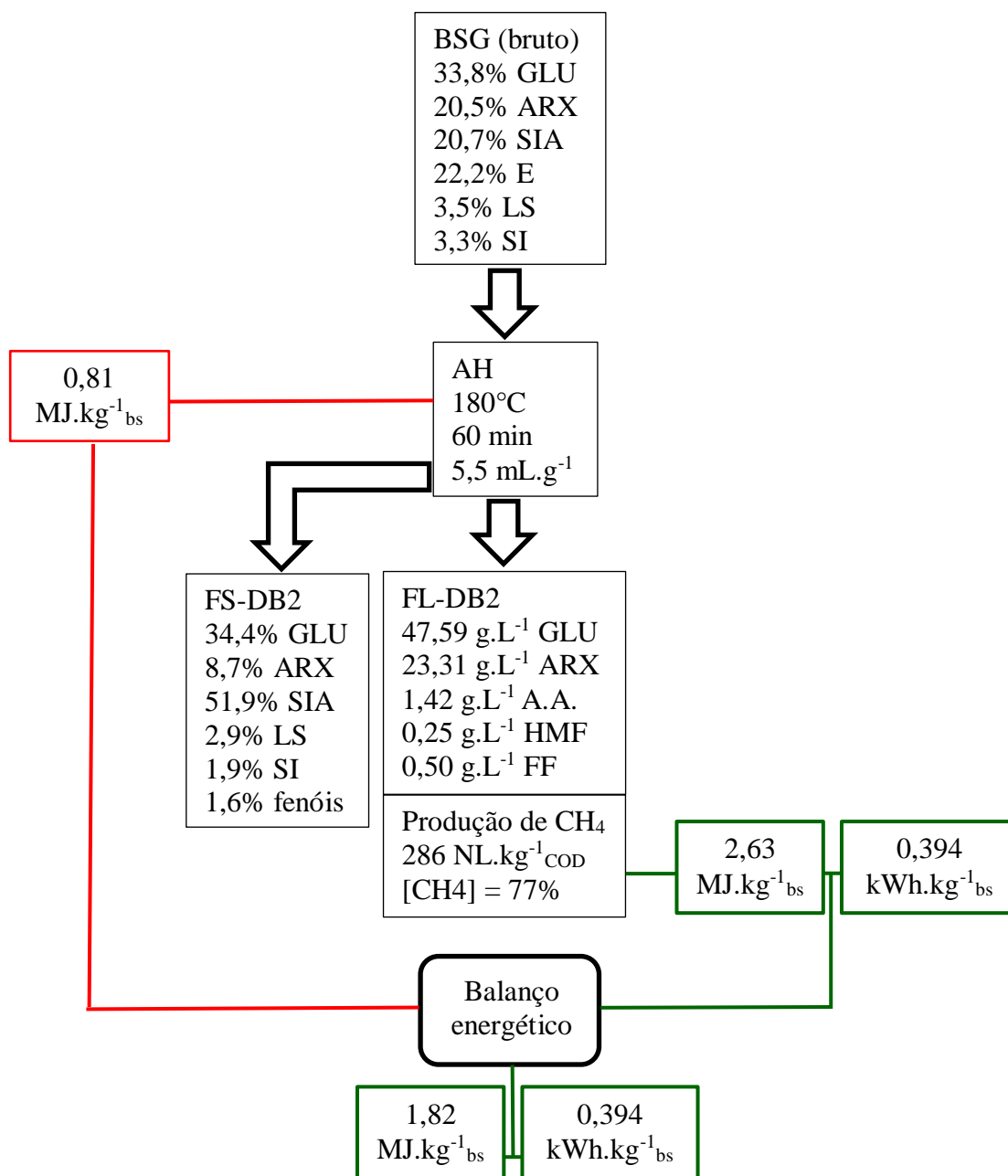


Figura 37 – Balanços de massa e energia para o cenário DB2L

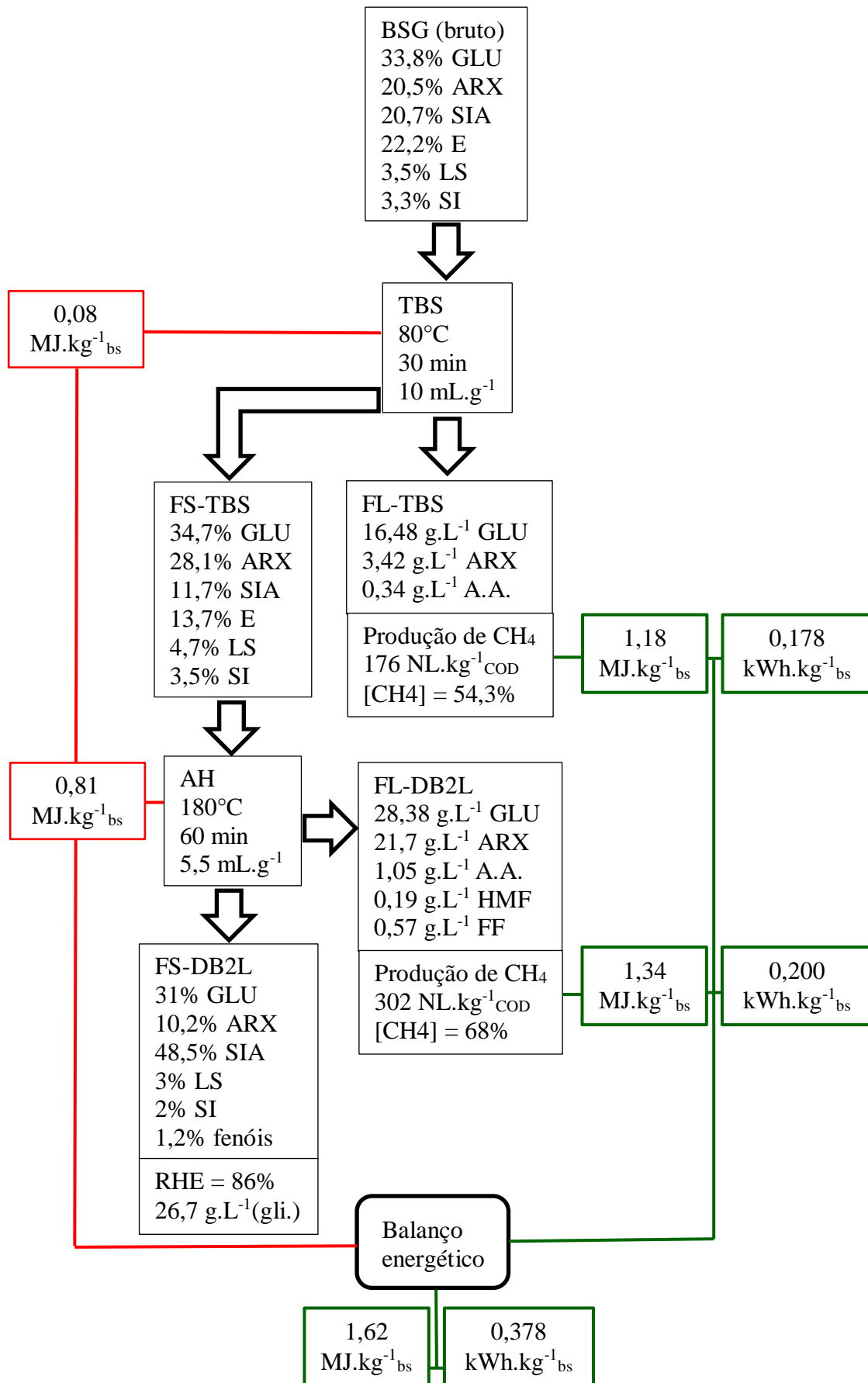
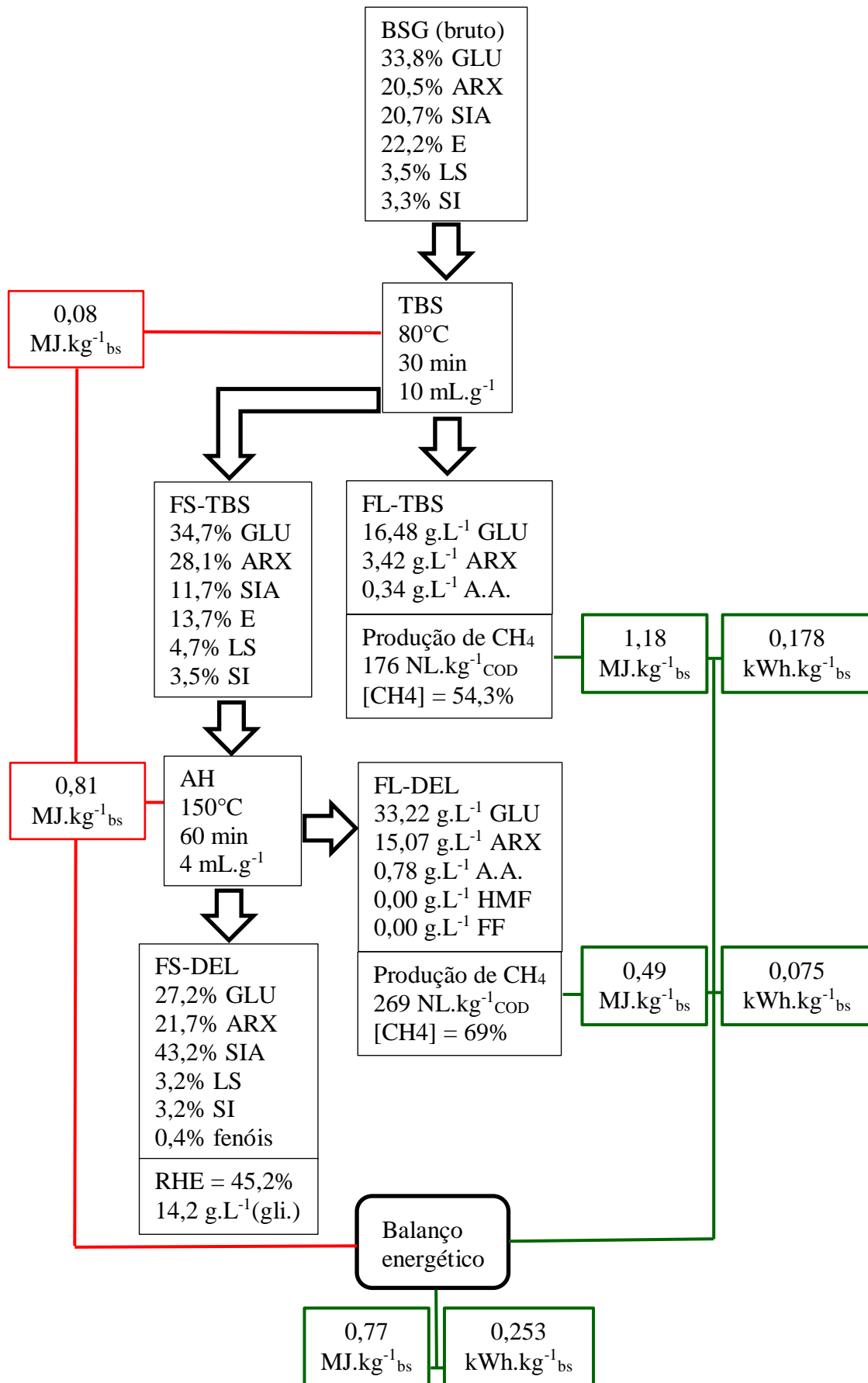


Figura 38 – Balanços de massa e energia para o cenário DEL



7 CONCLUSÕES GERAIS

O pré-tratamento hidrotérmico de baixa severidade possibilitou a remoção de uma grande quantidade de açúcares oligoméricos adsorvidos à superfície da biomassa. Tais açúcares advem do processo de produção do mosto, sendo constituídos em sua maioria de glicanas. Após o tratamento de baixa severidade percebeu-se um enriquecimento da biomassa em termos de açúcares, sobretudo arabinoxilanas, em detrimento de uma redução em termos dos teores de sólidos insolúveis em ácido e extrativos orgânicos.

O tratamento preliminar de baixa severidade (TBS) proporcionou uma maior acessibilidade enzimática dos sólidos pré-tratados por auto-hidrólise, refletida nos maiores rendimentos da hidrólise enzimática, observados para as frações sólidas geradas pelas condições DEL, quando comparado com as frações geradas pelas condições DE. Além disso, devido à remoção de glicanas prontamente solúveis da biomassa no tratamento de baixa severidade, houve uma menor formação de 5-hidroximetil-2-furfuraldeído durante o processo posterior de auto-hidrólise do bagaço de malte.

Porém, observou-se uma maior formação de ácido acético e 2-furfuraldeído, pois ao remover esses açúcares não-ligados durante o TBS, as arabinoxilanas da biomassa tornaram-se mais susceptíveis ao ataque radicalar da fase aquosa, sofrendo reações de desidratação. Apesar disso, nos testes de avaliação do potencial bioquímico de metano, feitos com os hidrolisados resultantes da auto-hidrólise de biomassas previamente tratadas em duas etapas, houve uma menor fase de adaptação (fase lag), possivelmente devido a uma maior concentração de ácido acético nesses hidrolisados.

Os maiores rendimentos da hidrólise enzimática foram obtidos a partir do coquetel 50:50 (50% de Cellic CTec 2 e 50% de Cellic HTec 2), o que indica que as arabinoxilanas não reativas da biomassa atuam como barreiras à acessibilidade enzimática, pois ao se utilizar uma maior proporção de xilanasas no coquetel enzimático (comparativamente ao coquetel 85:15), houve um maior rendimento em termos de glicose. Isso foi verificado devido aos maiores rendimentos da hidrólise enzimática da fração sólida gerada nos cenários para a produção de biogás, em que maiores severidades dos pré-tratamentos ocasionaram uma maior remoção de hemicelulose da biomassa.

Verificou-se que a cinética de produção de metano possui relações intrínsecas com outras variáveis não analisadas. Como por exemplo, avaliou-se que as maiores taxas de produção de metano foram obtidas nos hidrolisados que possuíam não somente as maiores concentrações de açúcares oligoméricos, mas sobretudo esse efeito foi observado nos hidrolisados com as menores proporções de pentoses e 2-furfuraldeído.

Embora a maior produção de metano tenha sido observada no cenário DB2L, verificou-se que o saldo da recuperação de energia para a condição de pré-tratamento térmico em duas etapas foi menor do que em uma única etapa, pois, a energia recuperada a partir da queima do biogás foi ligeiramente menor do que na condição em que a biomassa foi tratada em uma única etapa. O primeiro cenário para a produção de biogás (DB1) demonstrou ser o mais viável dentre os cenários analisados, pois, além de oferecer uma recuperação energética em torno de 2,66% maior do que o segundo cenário (DB2), o pré-tratamento da biomassa nessa condição, necessita de um tempo de reação 48,3% menor, o que possibilita uma maior capacidade de produção do reator de auto-hidrólise por unidade de tempo.

De forma geral é possível concluir que a inclusão da etapa de pré-tratamento de baixa severidade é eficiente para hidrólise enzimática e que quando o objetivo é maximizar a recuperação de produtos a partir do bagaço de malte, o melhor fluxograma de processo deve considerar a etapa de pré-tratamento de baixa severidade com o aproveitamento da energia térmica e elétrica advinda do biogás gerado a partir da FL-TBS ($1,18 \text{ MJ.kg}_{\text{BSG}}^{-1}$ e $0,178 \text{ kWh.kg}_{\text{BSG}}^{-1}$), pré-tratamento por auto hidrólise (180°C , 31 min e 5 mL.g^{-1}) seguido da hidrólise enzimática da fração sólida ($73,8\%$ e $22,6 \text{ g}_{\text{glicose.L}^{-1}}$) e aproveitamento da energia térmica e elétrica advinda do biogás gerado pela FL-DB1L ($1,43 \text{ MJ.kg}_{\text{BSG}}^{-1}$ e $0,214 \text{ kWh.kg}_{\text{BSG}}^{-1}$). Um valor de saldo de energia térmica e elétrica positivas de respectivamente, $1,71 \text{ MJ.kg}_{\text{BSG}}^{-1}$ e $0,392 \text{ kWh.kg}_{\text{BSG}}^{-1}$, já considerando os gastos com as duas etapas de pré-tratamento.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Um dos aspectos mais limitantes nesse trabalho foi compreender o comportamento da variável remoção de sólidos insolúveis em ácido, pois devido ao seu comportamento irregular, a modelagem do processo de auto-hidrólise apresentou algumas limitações. Dessa forma, acredita-se que a quantificação dos teores de proteínas, especialmente para o bagaço de malte, seja importante para compreender os processos de remoção dos constituintes da biomassa, por advento dos pré-tratamentos. Ao compreender os teores de sólidos insolúveis em ácido e os teores de proteínas, a quantificação dos teores de lignina poderia ser feita mediante a diferença entre ambos componentes.

A quantificação dos teores de proteínas no hidrolisado resultante do pré-tratamento de baixa severidade pode auxiliar na melhoria dos processos de produção de metano, visto que a compreensão da relação entre carbono e nitrogênio pode subsidiar o processo decisório quanto à adoção de materiais carbonáceos para adequar o substrato da digestão anaeróbia. Em relação a esse aspecto denota-se a possibilidade de melhorias na cinética de produção de metano mediante a co-digestão do hidrolisado obtido no tratamento de baixa severidade e dos hidrolisados resultantes da auto-hidrólise do bagaço de malte.

Um aspecto interessante a ser abordado é a hidrólise enzimática dos hidrolisados obtidos com a auto-hidrólise do bagaço de malte bruto, posto que as concentrações de glicanas nesses substratos é bastante elevada. Acredita-se que menores cargas enzimáticas possam ser utilizadas para bons rendimentos em termos de glicose. O uso de imagens de microscopia eletrônica de varredura e de técnicas de difração de raios-X podem auxiliar na compreensão da recalcitrância da biomassa e cristalinidade da celulose, orientando o processo decisório acerca do pré-tratamento da biomassa para a produção de etanol celulósico. Além disso, a adoção de α -amilases e proteases nos coquetéis utilizados para a hidrólise enzimática do bagaço de malte pode reduzir a necessidade do uso de elevadas cargas enzimáticas. Não obstante, a utilização de menores razões líquido-sólido e a recarga de sólidos durante a hidrólise enzimática podem permitir a obtenção de soluções com uma maior concentração de glicose.

Planejamentos experimentais contemplando um maior número de investigações entre as temperaturas de 160°C e 200°C são válidos para compreender a cinética de degradação dos açúcares da biomassa. Percebeu-se que as concentrações de 2-furfuraldeído e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído, bem como a relação entre esses valores pode ser útil para aumentar a compreensão acerca da digestão anaeróbia dos hidrolisados resultantes da auto-hidrólise do bagaço de malte.

9 REFERÊNCIAS

ADARME, O. F. H.; BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F.. Methane and hydrogen production from anaerobic digestion of soluble fraction obtained by sugarcane bagasse ozonation. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 288-299, 2017. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.08.040.

AKAIKE, A.. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 16, p. 716-723, 1974. DOI 10.1109/TAC.1974.1100705.

ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, J. L.; GUWY, A. J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P.; VAN LIER, J. B.. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. **Water Science & Technology**, v. 59, n. 5, p. 927-934, 2009. DOI 10.2166/wst.2009.040.

APHA, American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21 ed. Washington, 2005. p. 2-59. ISBN 0-87553-047-8

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.. **Biotecnologia Industrial**. v. 4. São Paulo: Editora Blucher, 2001. p. 4-8 e 91-144. ISBN 978-85-212-0281-3.

BAÊTA, B. E. L.; LUNA, H. J.; SANSON, A. L.; SILVA, S. Q.; AQUINO, S. F. Degradation of a model azo dye in submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR) operated with powdered activated carbon (PAC). **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 462– 470, 2013. DOI 10.1590/0104-6632.20160334s20150031.

BAÊTA, B. E. L.. **Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria**. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; ADARME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F.. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137-146, 2016. DOI 10.1016/j.biortech.2015.10.003.

BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; BALENA FILHO, J. G.; ADARME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F.. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 436-446, 2016a. DOI 10.1016/j.biortech.2016.06.113.

BELDMAN, G.; HENNEKAM, J.; VORAGEN, A. G. J.. Enzymatic Hydrolysis of Beer Brewers' Spent Grain and the Influence of Pretreatments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 668-671, 1987. DOI 10.1002/bit.260300511.

BLUML, S.. **Brauindustrie**, v. 9, p. 42-45, 2008.

BOCHMANN, G.; DROSG, B.; FUCHS, W.. Anaerobic Digestion of Thermal Pretreated Brewers' Spent Grains. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 34, n. 4, p. 1092-1096, 2015. DOI 10.1002/ep.12110.

BOUGRIER, C.; DOGNIN, D.; LAROCHE, C.; RIVERO, J. A. C.. Use of trace elements addition for anaerobic digestion of brewer's spent grains. **Journal of Environmental Management**, v. 223, p. 101-107, 2018. DOI 10.1016/j.jenvman.2018.06.014.

CAETANO, N. S.; MOURA, R. F.; MEIRELES, S.; MENDES, A. M.; MATA, T. M.. Bioethanol from brewer's spent grains: acid pretreatment optimization. **Chemical Engineering Transactions**, v. 35, p. 1021-1026, 2013. DOI 10.3303/CET1335170.

CANETTIERI, E. V.. **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. 2004. 146 f. Tese (Doutorado em Mecânica) – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2004.

CANO, R.; PÉREZ-ELVIRA, S. I.; FDZ-POLANCO, F.. Energy feasibility study of sludge pretreatments: A review. **Applied Energy**, v. 149, p. 176-185, 2015. DOI 10.1016/j.apenergy.2015.03.132.

CARVALHEIRO, F.; ESTEVES, M. P.; PARAJÓ, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F. M.. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 93-100, 2004. DOI 10.1016/S0960-8524(03)00148-2.

CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F. M.. Kinetic modeling of brewery's spent grain autohydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 233-243, 2005. DOI 10.1021/bp049764z.

CASSINI, S. T.. **Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogás**. Rio de Janeiro: ABES, RiMa, 2003. p. 121-130. ISBN 85-86552-68-2.

CHERNICHARO, C. A. D. L.. **Reatores anaeróbios**. v. 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1997. p. 23-78. ISBN 85-7041-130-8.

CORDEIRO, P. H. M.. **Avaliação da biometanização do hidrolisado hemicelulósico obtido pela auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em sistemas anaeróbios de duplo estágio e um estágio na presença de carvão ativado em pó**. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

DASHTBAN, M.; KEPKA, G.; SEIBOTH, B.; QIN, W.. Xylitol production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 554-569, 2013. DOI 10.1007/s12010-012-0008-y.

DRIEMEIER, C.; CALLIGARIS, G. A.. Theoretical and experimental developments for accurate determination of crystallinity of cellulose I materials. **Journal of Applied Crystallography**, n. 44, p. 184-192, 2011. DOI 10.1107/S0021889810043955.

DUQUE, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; SAEZ, F.; BALLESTEROS, M.. Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 775-781, 2013. DOI 10.1016/j.procbio.2013.03.003.

DUQUE, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; SAEZ, F.; BALLESTEROS, M.. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. **Fuel**, v. 134, p. 448-454, 2014. DOI 10.1016/j.fuel.2014.05.084.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T.. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1 – naturally occurring xylans structures, procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000. DOI 10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7.

EZEONU, F. C.; OKAKA, A. N. C.. Process Kinetics and Digestion Efficiency of Anaerobic Batch Fermentation of Brewer's Spent Grains (BSG). **Process Biochemistry**, v. 31, p. 7-12, 1996. DOI 10.1016/0032-9592(94)00064-6.

FABICOOVICOVÁ, K.; LUCAS, M.; CLAUS, P.. From barley straw to valuable polyols: a sustainable process using ethanol/water mixtures and hydrogenolysis over ruthenium-tungsten catalyst. **ChemSusChem**, v. 9, p. 2804-2815, 2016. DOI 10.1002/cssc.201600695.

FENGEL, D.; WEGENER, G.. **Wood : chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlim: Walter de Gruyter, 1984. 613 p. ISBN 3 11 0084813.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; PLAZA, P. E.; COCA, M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GANZÁLEZ-BENITO, G.; LUCAS, S.. Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. **Industrial Crops & Products**, v. 130, p. 409-419, 2019. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.12.087.

FERREIRA, L. C. G.. **Evaluación de la biodegradabilidad anaeróbia de residuos orgânicos pre-tratados térmicamente**. 2013. 324 f. Tesis Doctoral – Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Valladolid, Valladolid, 2013.

FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G.. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 463-471, 2006. DOI 10.1016/j.jclepro.2005.01.002.

GARCÍA-TORREIRO, M.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A.; LEMA, J. M.. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 486-492, 2016. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.05.036.

GHOSE, T. K.. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987. DOI 10.1351/pac198759020257.

GIACOBBE, S.; PISCITELLI, A.; REGANATI, F.; LETTERA, V.; SANNIA, G.; MORZOCHELLA, A.; PEZZELLA, C.. Butanol production from laccase-pretreated brewer's spent grain. **Biotechnology for Biofuels**, v.12, n. 47, 8 p., 2019. DOI 10.1186/s13068-019-1383-1.

GONÇALVES, I. C.; FONSECA, A.; MORÃO, A. M.; PINHEIRO, H. M.; DUARTE, A. P.; FERRA, M. I. A.. Evaluation of anaerobic co-digestion of spent brewery grains and na azo dye. *Renewable Energy*, v. 74, p. 489-496, 2015. DOI 10.1016/j.renene.2014.08.053.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; MORALES, P. C.; GULLÓN, B.. Estimating the environmental impacts of a brewery waste-based biorefinery: Bio-ethanol and xylooligosaccharides joint production case study. **Industrial Crops & Products**, v. 123, p. 331-340, 2018. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.07.003. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.07.003.

GRIFFITH, G. L.; RIBEIRO Jr., G. O. R.; OBA, M.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.. Fermentation of ammonia fiber expansion treated and untreated barley straw in a rumen simulation technique using rumen inoculum from cattle with slow versus fast rate of fiber disappearance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-10, 2016.

GURGEL, L. V. A.. **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: preparação de novos materiais quelantes para adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (VI) e Cu (II)**. 2007. 178 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

GURGEL, L. V. A.. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2010. 291 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

HAN, M.; KANG, K. E.; KIM, Y.; CHOI, G. W.. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 488-495, 2013. DOI 10.1016/j.procbio.2013.01.007.

HEINZE, O. J.. Cellulose: Structure and properties. **Advances in Polymer Science**, v. 271, p. 1-52, 2016. DOI 10.1007/12_2015_319.

IMHOFF, K. R.. **Manual de tratamento de águas residuárias**. Tradução de Max Lothar Hess. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1996. p. 60-64. ISBN: 85-212-0132-X.

KAN, X.; ZHANG, J.; TONG, Y. W.; WANG, C. H.; Overall evaluation of microwave-assisted alkali pretreatment for enhancement of biomethane production from brewers' spent grain. **Energy Conversion and Management**, v. 158, p. 315-326, 2018. DOI 10.1016/j.enconman.2017.12.088.

KEMPPAINEN, K.; ROMMI, K.; HOLOPAINEN, U.; KRUUS, K.. Steam explosion of brewer's spent grain improves enzymatic digestibility of carbohydrates and affects solubility and stability of proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 94-108, 2016. DOI 10.1007/s12010-016-2085-9.

KIM, S. B.; LEE, J. H.; OH, K. K.; LEE, S. J.; LEE, J. Y.; KIM, J. S.; KIM, S. W.. Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 725-732, 2011. DOI 10.1007/s12257-010-0305-7.

KIM, Y.; YU, A.; HAN, M.; CHOI, G. W.; CHUNG, B.. Enhanced enzymatic saccharification of barley straw pretreated by ethanosolv technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 143-152, 2011. DOI 10.1007/s12010-010-9023-z.

LIGUORI, R.; SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. D. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; IONATA, E.; MARCOLONGO, L.; FARACO, V.. Selection of the Strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Its Application to Brewers' Spent Grain Conversion into Lactic Acid. **BioMed Research International**, 9 p., 2015. DOI 10.1155/2015/240231.

LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.. **Biotecnologia industrial**. v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. p. 1-39. ISBN 85-212-0280-6.

LIMA, D. R. S.; ADARME, O. F. H.; BAËTA, B. E. L.; GURGEL, L. V. A., AQUINO, S. F. D.. Influence of different thermal pretreatments and inoculum selection on the biomethanation of sugarcane bagasse by solid-state anaerobic digestion: a kinetic analysis. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 684-693, 2018. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.11.048.

LIU, X.; HILIGSMANN, S.; GOURDON, R.; BAYARD, R.. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomasses pretreated with *Ceriporiopsis submermispora*. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p. 154-162, 2017. DOI 10.1016/j.jenvman.2017.01.075.

LOPEZ, S. D.; TISSOT, M.; DELMAS, M.. Integrated cereal straw valorization by an alkaline pre-extraction of hemicellulose prior to soda-anthraquinone pulping. Case study of barley straw. *Biomass and Bioenergy*, v. 10, n. 4, p. 201-211, 1996. DOI 10.1016/0961-9534(95)00031-3.

LÓPEZ-LINARES, J.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.. Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 368, p. 1045-1055, 2019. DOI 10.1016/j.cej.2019.03.032.

LYNCH, K. M.; STEFFEN, E. J.; ARENDT, E. K.. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, p. 553-568, 2016. DOI 10.1002/jib.363.

MALAKHOVA, D. V.; EGOROVA, M. A.; PROKUDINA, L. I.; NETRUSOV, A. I.; TSAVKELOVA, E. A.. The biotransformation of brewer's spent grain into biogas by anaerobic microbial communities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 2015-2023, 2015. DOI 10.1007/s11274-015-1951-x.

MARABEZI, K.. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARCOLONGO, L.; IONATA, E.; CARA, F. L.; AMORE, A.; GIACOBBE, S.; PEPE, O.; FARACO, V.. The effect of *Pleurotus ostreatus* arabinofuranosidase and its evolved variant in lignocellulosic biomasses conversion. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 162-167, 2014. DOI 10.1016/j.fgb.2014.07.003.

MESQUITA, P. L.; LEITE, G.S.; AFONSO, R. J. C.; AQUINO, S. F.. Validation of a liquid chromatography methodology for the 5 simultaneous analyses of seven volatile fatty acids (VFA) 6 intermediates of anaerobic digestion. **Eng. Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 295-302, 2013. DOI 10.1590/S1413-41522013000400001.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brasil é o terceiro no ranking mundial de produção de cerveja**. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/08/brasil-e-o-terceiro-no-ranking-de-producao-mundial-de-cerveja>>. Acesso em 16 jul. 2019.

MONTUSIEWICZ, A.; PASIECZNA-PATKOWSKA, S.; LEBIOCKA, M.; SZAJA, A.; SZYMANSKA-CHARGOT, M.. Hydrodynamic cavitation of brewery spent grain diluted by wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 946-956, 2017. DOI 10.1016/j.cej.2016.10.132.

MOTULSKY, H.; CHRISTOPOULOS, A.. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting**. San Diego: GraphPad Software Inc, 2003. p. 143-148. Disponível em: <<http://www.facm.ucl.ac.be/cooperation/Vietnam/WBI-Vietnam-October-2011/Modelling/RegressionBook.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C.. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potencial applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006. DOI 10.1016/j.jcs.2005.06.001.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; ROBERTO, I. C.. Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 218-223, 2007. DOI 10.1016/j.carbpol.2007.03.021.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C.. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, p. 711-721, 2008. DOI 10.1007/s10570-008-9215-7.

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

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D.. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 20-28, 2007. DOI 10.1016/j.carbpol.2006.08.020.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Lehninger princípios de bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 3. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2002. P. 409-436. ISBN: 85-7378-125-4.

NIGAM, P. S.. An overview: Recycling of solid barley waste generated as a by-product in distillery and brewery. **Waste Management**, v. 62, p. 255-261, 2017. DOI 10.1016/j.wasman.2017.02.018.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A.. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta - parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017. DOI 10.21577/1984-6835.20170070.

OLIVEIRA, J. V.; ALVES, M. M.; COSTA, J. C.. Biochemical methane potential of brewery by-products. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, p. 435-440, 2018. DOI 10.1007/s10098-017-1482-2.

OLSZEWSKI, M. P.; ARAUZO, P. J.; WADRZYK, M.; KRUSE, A.. Py-GC-MS of hydrochars produced from brewer's spent grains. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 140, p. 255-263, 2019. DOI: 10.1016/j.jaap.2019.04.002.

OUTEIRIÑO, D.; COSTA-TRIGO, I.; PAZ, A.; DEIVE, F. J.; RODRÍGUEZ, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.. Biorefining brewery spent grain polysaccharides through biotuning of ionic liquids. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 265-274, 2019. DOI 10.1016/j.carbpol.2018.09.042.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; BAKKER, R. R.; BUDDE, M. A. W.; VRIJE, T. D.; CLAASSEN, P. A. M.; KOUKIOS, E. G.. Fermentative hydrogen production from pretreated biomass: A comparative study. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6331-6338, 2009. DOI 10.1016/j.biortech.2009.07.011.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; BAKKER, R. R.; VRIJE, T. D.; KOUKIOS, E. G.. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 11204-11211, 2011. DOI 10.1016/j.biortech.2011.09.090.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; BAKKER, R. R.; VRIJE, T. D.; CLAASSEN, P. A. M.; KOUKIOS, E. G.. Dilute-acid pretreatment of barley straw for biological hydrogen production using *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 11727-11734, 2012. DOI 10.1016/j.ijhydene.2012.05.124.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; LIGNOS, G. D.; BAKKER, R. R.; KOUKIOS, E. G.. Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Journal of Cleaner Production**, v. 32, p. 45-51, 2012a. DOI 10.1016/j.jclepro.2012.03.019.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; KARAOGLANOGLU, L. S.; KOULLAS, D. P.; BAKKER, R. R.; CLAASSEN, P. A. M.; KOUKIOS, E. G.. Technical suitability mapping of feedstocks for biological hydrogen production. **Journal of Cleaner Production**, v. 102, p. 521-528, 2015.

PANJIČKO, M.; ZUPANČIĆ, G. D.; FANEDL, L.; LOGAR, R. M.; TIŠMA, M.; ZELIĆ, B.. Biogas production from brewery spent grain as a mono-substrate in a two-stage process composed of solid-state anaerobic digestion and granular biomass reactors. **Journal of Cleaner Production**, v. 166, p. 519-529, 2017. DOI 10.1016/j.jclepro.2017.07.197.

PATEL, A.; MIKES, F.; BUHLER, S.; MATSAKAS, L.. Valorization of Brewers' Spent Grain for the Production of Lipids by Oleaginous Yeast. **Molecules**, v. 23, 16 p., 2018. DOI 10.3390/molecules23123052.

PAZ, A.; OUTEIRIÑO, D.; GUERRA, N. P.; DOMÍNGUEZ, J. M.. Enzymatic hydrolysis of brewer's spent grain to obtain fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 402-409, 2019. DOI 10.1016/j.biortech.2018.12.082.

PECES, M.; ASTALS, S.; MATA-ALVAREZ, J.. Effect of moisture on pretreatment efficiency for anaerobic digestion of lignocellulosic substrates. **Waste Management**, v. 46, p. 189-196, 2015. DOI 10.1016/j.wasman.2015.08.022.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Tradução de Sueli Fumie Yamada et al. v. 1. 2. ed. São Paulo: Editora Pearson Makron Books, 1997. p. 250. ISBN 85-346-0196-8.

PIERRE, G.; SANNIER, F.; GOUDE, R.; NOUVIAIRE, A.; MAACHE-REZZOUG, Z.; REZZOUG, S. A.; MAUGARD, T.. 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. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.06.004.

PLAZA, P. E.; GALLEGO-MORALES, L. J.; PEÑUELA-VÁSQUEZ, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.. Biobutanol production from brewer's spent grain hydrolysates by *Clostridium Beijerinckii*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 166-174, 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2017.07.139.

POLADYAM, A.; TRCHOUNIAN, K.; VASSILIAN, A.; TRCHOUNIAN, A.. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: Optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. **Renewable Energy**, v. 115, p. 931-936, 2018. DOI 10.1016/j.renene.2017.09.022.

POULSEN, T. G.; ADELARD, L.; WELLS, M.. Improvement in CH₄/CO₂ ratio and CH₄ yield as related to biomass mix composition during anaerobic co-digestion. **Waste Management**, v. 61, p. 179-187, 2017. DOI: 10.1016/j.wasman.2016.11.009.

PROCENTESE, A.; RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; REHMANN, L.; MARZOCHELLA, A.. Deep Eutectic Solvents pretreatment of agro-industrial food waste. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, 12 p., 2018. DOI 10.1186/s13068-018-1034-y.

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

RACHBAUER, L.; GABAUER, W.; SCHEIDL, S.; ORTNER, M.; FUCHS, W.; BOCHMANN, G.. Closing the Nutrient Cycle in Two-Stage Anaerobic Digestion of Industrial Waste Streams. **Energy & Fuels**, v. 29, p. 4052-4057, 2015. DOI 10.1021/ef502809e.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, S.; ABU-GHANNAM, N.; JAISWAL, A. K.. A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 272-279, 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2017.06.039.

RAVINDRAN, R.; SARANGAPANI, C.; JAISWAL, S.; LU, P.; CULLEN, P. J.; BOURKE, JAISWAL, A. K.. Improving enzymatic hydrolysis of brewer spent grain with nonthermal plasma. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 520-524, 2019. DOI 10.1016/j.biortech.2019.03.071.

REGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; DIXON, R. A.; GILNA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NASKAR, A. K.; SADDLER, J. N.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E.. Lignin valoration: improving lignina processing in the biorefinery. **Science**, v. 344, p. 709-720, 2014. DOI 10.1126/science.1246843.

ROJAS-CHAMORRO, J. A.; ROMERO, I.; RUIZ, E.; CARA, C.; CASTRO, E.. Comparison of Fermentation Strategies for Ethanol Production from Pretreated Brewers Spent Grain. **Chemical Engineering Transactions**, v. 61, p. 637-642, 2017. DOI 10.3303/CET1761104.

ROJAS-CHAMORRO, J. A.; CARA, C.; ROMERO, I.; RUIZ, E.; ROMERO-GARCÍA, J. M.; MUSSATTO, S. I.; CASTRO, E.. Ethanol production from brewers' spent grain pretreated by dilute phosphoric acid. **Energy & Fuels**, v. 32, 35 p., 2018. DOI 10.1021/acs.energyfuels.8b00343.

ROMMI, K.; NIEMI, P.; KEMPPAINEN, K.; KRUUS, K.. Impact of thermochemical pre-treatment and carbohydrate and protein hydrolyzing enzyme treatment on fractionation of protein and lignin from brewer's spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 79, p. 168-173, 2018. DOI 10.1016/j.jcs.2017.10.005.

RUIZ, H. A.; THOMSEN, M. H.; TRAJANO, H.L.. **Hydrothermal processing in biorefineries: production of bioethanol and high added-value compounds of second and third generation biomass**. Editora Springer. 511 p. 2017. ISBN 978-3-319-56457-9.

SÁEZ, F.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.. Enzymatic hydrolysis from carbohydrates of barley straw pretreated by ionic liquids. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, p. 937-941, 2013. DOI 10.1002/jctb.3925.

SANTOS, L. C.; ADARME, O. F. H.; BAÊTA, B. E. L.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F.. Production of biogas (methane and hydrogen) from anaerobic digestion of hemicellulosic hydrolysate generated in the oxidative pretreatment of coffee husks. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 601-612, 2018. DOI 10.1016/j.biortech.2018.05.037.

SAHA, B. C.. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003. DOI 10.1007/s10295-003-0049-x.

SANTIAGO, B. L. S.. **Avaliação do tratamento alcalino do bagaço de malte e seu efeito sobre a conversão das frações açucaradas em etanol**. 2013. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

SCHUMACHER, B.; WEDWITSCHKA, H.; HOFMANN, J.; DENYSENKO, V.; LORENZ, H.; LIEBETRAU, J.. Desintegration in biogás sector – Technologies and effects. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 2-6, 2014. DOI 10.1016/j.biortech.2014.02.027.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.. **Biotechnologia industrial**. v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. p. 93-120. ISBN 85-212-0279-2.

SCHNEIDER, L.; HAVERINEN, J.; JAAKKOLA, M.; LASSI, U.. Effective saccharification of lignocellulosic barley straw by mechanocatalytical pretreatment using potassium pyrosulfate as a catalyst. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 1-7, 2017. DOI 10.1016/j.biortech.2017.03.020.

SEŽUN, M.; GRILC, V.; ZAPANČIČ, G. D.; LOGAR, R. M.. Anaerobic Digestion of Brewery Spent Grain in a Semi-Continuous Bioreactor: Inhibition by Phenolic Degradation Products. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, p. 158-166, 2011. PMID: 24061957.

SHEIKH, M. M. I.; KIM, C. H.; PARK, H. H.; NAM, H. G.; LEE, G. S.; JO, H. S.; LEE, J. Y.; KIM, J. W.. A synergistic effect of pretreatment on cell wall structural changes in barley straw (*Hordeum vulgare* L.) for efficient bioethanol production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 843-850, 2015. DOI 10.1002/jsfa.7004.

SILVA, P. H. F.. **Fracionamento da biomassa lignocelulósica pelo processo organosolv**. 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Química e Biológica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D.. Determination os structural carbohydrates and lignina in biomass. **NREL**, 2012. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

SOUSA, M. de F. B.. **Separação e identificação dos constituintes do bagaço de cana e sua conversão em insumos químicos pelo processo organosolv**. 1984. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

SPIRIDON, L.; POPA, V. I.. Hemicelluloses: major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANIDINI, A. (Ed.). **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Editora Elsevier, 2008. p. 289-304. ISBN 978-0-08-045316-3.

STEINER, J.; PROCOPIO, S.; BECKER, T.. Brewers' spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. **European Food Research and Technology**, 2015. DOI 10.1007/s00217-015-2461-7.

STURM, B.; BUTCHER, M.; WANG, Y.; HUANG, Y.; ROSKILLY, T.. The feasibility of the sustainable energy supply from bio wastes for a small scale brewery – A case study. **Applied Thermal Engineering**, v. 39, p. 45-52, 2012. DOI 10.1016/j.applthermaleng.2012.01.036.

THOMAS, K. R.; RAHMAN, P. K. S. M.. Brewery wastes. Strategies for sustainability. A review. **Aspects of Applied Biology**, v. 80, p. 147-153, 2006. Disponível em: <<https://research.tees.ac.uk/ws/files/6416889/112860.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

TIŠMA, M.; JURIĆ, A.; BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PANJIČKO, M.; PLANINIĆ, M.. Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. **Journal of the Institute of Brewing**, 2018. DOI 10.1002/jib.479.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. Tradução de Aristóbolo Mendes da Silva et al.. 10. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. p. 775-776. ISBN 978-85-363-2606-1.

TREIMO, J.; WESTERENG, B.; HORN, S. J.; FORSELL, P.; ROBERTSON, J. A.; FAULDES, C. B.; WALDRON, K. W.; BUCHERT, J.; EIJSINK, G. H.. Enzymatic solubilization of brewers' spent grain by combined action of carbohydrases and peptidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 3316-3324, 2009. DOI 10.1021/jf803310f.

VANDEBOSSCHE, V.; BRAULT, J.; VILAREM, G.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, O.; VIVALDO-LIMA, E.; HERNÁNDEZ-LUNA, M.; BARZANA, E.; DUQUE, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; MATA, J.; CASTELLÓN, E.; RIGAL, L.. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 258-266, 2014. DOI 10.1016/j.indcrop.2014.02.022.

VARGAS, F.; DOMÍNGUEZ, E.; VILA, C.; RODRÍGUEZ, A.; GARROTE, G.. Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 263-270, 2015. DOI 10.1016/j.biortech.2015.05.035.

VARGAS, F.; DOMÍNGUEZ, E.; VILA, C.; RODRÍGUEZ, A.; GARROTE, G.. A biorefinery scheme for residual biomass using autohydrolysis and organosolv stages for oligomers and bioethanol production. **Energy & Fuels**, v. 30, n. 10, p. 8236-8245. 2016. DOI 10.1021/acs.energyfuels.6b00277.

VITANZA, R.; CORTESI, A.; GALLO, V.; COLUSSI, I.; ARANA-SARABIA, M. E. De. Biovalorization of brewery waste by applying anaerobic digestion. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 30, n. 3, p. 351-357, 2016. DOI 10.15255/CABEQ.2015.2237.

WANG, J.; YIN, Y.. **Biohydrogen production from organic wastes**. Green Energy and Technology, p. 123-195, 2017. ISBN 978-981-10-4675-9.

- WATERS, D. M.; JACOB, F.; TITZE, J.; ARENDT, E. K.; ZANNINI, E.. Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 767-778, 2012. DOI 10.1007/s00217-012-1805-9.
- WEGER, A.; BINDER, S.; FRANKE, M.; HORNUNG, A.; RUß, W.; MAYER, W.. Solid biofuel production by mechanical pre-treatment of brewers' spent grain. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 661-666, 2014. DOI: 10.3303/CET1437111.
- WEGER, A.; JUNG, R.; STENZEL, F.; HORNUNG, A.. Optimized energetic usage brewers' spent grains. **Chemical Engineering & Technology**, v. 40, n. 2, p. 306-312, 2017. DOI 10.1002/ceat.201600186.
- WEBER, B.; STADLBAUER, E. A.. Sustainable paths for managing solid and liquid waste from distilleries and breweries. **Journal of Cleaner Production**, v. 149, p. 38-48, 2017. DOI 10.1016/j.jclepro.2017.02.054.
- WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K.; WALKER, G. M.. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1175-1184, 2008. DOI 10.1111/j.1567-1364.2008.00390.x.
- WILKINSON, S.; SMART, K. A.; JAMES, S.; COOK, D. J.. Bioethanol production from brewers spent grains using a fungal consolidated bioprocessing (CBP) approach. **Bioenergy Research**, v. 10, p. 146-157, 2017. DOI 10.1094/ASBCJ-2014-0327-02.
- WOLTERS, N.; SCHABRONATH, C.; SCHEMBECKER, G.; MERZ, J.. Efficient conversion of pretreated brewer's spent grain and wheat bran by submerged cultivation of *Hericium erinaceus*. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 123-129, 2016. DOI 10.1016/j.biortech.2016.09.121.
- WON, K. Y.; KIM, Y. S.; OH, K. K.. Comparison of bioethanol production of simultaneous saccharification & fermentation and separation hydrolysis & fermentation from cellulose-rich barley straw. **Journal of the Korean Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 1341-1346, 2012. DOI 10.1007/s11814-012-0019-y.
- WU, J.; EIN-MOZAFFARI, F.; UPRETI, S.. Effect of ozone pretreatment on hydrogen production from barley straw. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 344-349, 2013. DOI 10.1016/j.biortech.2013.07.001.
- XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P.. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 213-224, 2008. DOI 10.1016/j.indcrop.2008.02.004.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P.. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 4, 12 p. 2009. DOI 10.1186/1754-6834-2-4.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P.. Biotechnological potencial of brewery's spent grain and its recente applications. **Waste Biomass Valor**, v. 3, p. 213-232, 2012. DOI 10.1007/s12649-012-9108-8.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; ZHANG, J.; KEINÄNEN, M.; PAPPINEN, A.. Effect of dilute acid pretreatment on the conversion of barley straw with grains to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 444-450, 2013. DOI 10.1016/j.biortech.2013.07.107.

YANG, Y.; BRAMMER, J. G.; MAHMOOD, A. S. N.; HORNUNG, A.. Intermediate pyrolysis of biomass energy pellets for producing sustainable liquid, gaseous and solid fuels. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 794-799, 2014. DOI 10.1016/j.biortech.2014.07.044.

YANG, M.; KUITTINEN, S.; ZHANG, J.; VEPSÄLÄINEN, J.; KEINÄNEN, M.; PAPPINEN, A.. Co-fermentation of hemicellulose and starch from barley straw and grain for efficient pentoses utilization in acetone–butanol–etanol production. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 128-135, 2015. DOI 10.1016/j.biortech.2014.12.005.

ZHANG, X.; NGHIEM, N. P.; HICKS, K. B.; JOHNSTON, D. B.; HECTOR, R. E.. Ethanol production by high-solids simultaneous saccharification and fermentation of cellulose-enriched barley straw and hull residues obtained by alkaline hydrogen peroxide pretreatment. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 292-298, 2014. DOI 10.1089/ind.2013.0031.

ZHANG, J.; ZANG, L.. Enhancement of biohydrogen production from brewers' spent grain by calcined-red mud pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 73–79, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.110.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F.M.; RIET, K. V.. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881.

ANEXO 1 - Análises de variância (ANOVA)

Tabela 15 – Análise de variância do modelo representativo da variável PM.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
t	262,416	1	262,416	20,9105	0,003799
t ²	0,361	1	0,361	0,0288	0,870924
T	634,542	1	634,542	50,5631	0,000389
T ²	1550,592	1	1550,592	123,5579	0,000032
RLS	8,117	1	8,117	0,6468	0,451929
RLS ²	30,983	1	30,983	2,4689	0,167179
t.T	0,445	1	0,445	0,0355	0,856818
t.RLS	42,190	1	42,190	3,3619	0,116414
T.RLS	24,253	1	24,253	1,9326	0,213852
Erro	75,297	6	12,54952		
Soma total	2604,218	15			

R² = 0,97109; R²(ajustado) = 0,92772

Tabela 16 – Análise de variância do modelo representativo da variável RG.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
t	130,407	1	130,407	92,556	0,002384
t ²	41,705	1	41,705	29,600	0,012192
T	1818,430	1	1818,430	1290,629	0,000047
T ²	938,390	1	938,390	666,021	0,000128
RLS	74,290	1	74,290	52,727	0,005389
RLS ²	4,238	1	4,238	3,008	0,181263
t.T	0,833	1	0,833	0,592	0,856818
t.RLS	0,405	1	0,405	0,287	0,497833
T.RLS	40,271	1	40,271	28,582	0,629038
Falta de ajuste	193,631	3	64,544	45,810	0,005267
Erro puro	4,227	3	1,409		
Soma total	3263,769	15			

R² = 0,93938; R²(ajustado) = 0,84844

Tabela 17 – Análise de variância do modelo representativo da variável RX.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
t	1275,204	1	1275,204	143,2235	0,001255
t ²	51,562	1	51,562	5,7911	0,095318
T	1031,812	1	1031,812	115,8872	0,001714
T ²	2155,403	1	2155,403	242,0825	0,000577
RLS	24,793	1	24,793	2,7846	0,193768
RLS ²	13,535	1	13,535	1,5202	0,305400
t.T	145,107	1	145,107	16,2976	0,027340
t.RLS	3,305	1	3,305	0,3713	0,585366
T.RLS	1,206	1	1,206	0,1354	0,737310
Falta de ajuste	252,003	3	84,001	9,4345	0,0048893
Erro puro	26,711	3	8,90359		
Soma total	5063,808	15			

R² = 0,94496; R²(ajustado) = 0,8624**Tabela 18 – Análise de variância do modelo representativo da variável RSIA.**

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
t	33,519	1	33,519	1,53918	0,302921
t ²	5,064	1	5,064	0,23254	0,662640
T	952,600	1	952,600	43,74289	0,007038
T ²	223,818	1	223,818	10,27759	0,049111
RLS	13,135	1	13,135	0,60317	0,493984
RLS ²	33,721	1	33,721	1,54845	0,301725
t.T	260,864	1	260,864	11,97872	0,040610
t.RLS	0,000	1	0,000	0,00000	0,998954
T.RLS	23,049	1	23,049	1,05838	0,379273
Falta de ajuste	399,455	3	133,152	6,11426	0,085592
Erro puro	65,332	3	21,77725		
Soma total	1994,655	15			

R² = 0,76698; R²(ajustado) = 0,41746

Tabela 19 – Análise de variância do modelo representativo da variável RHE.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
t	34,3737	1	34,3737	7,41194	0,072397
t ²	6,4075	1	6,4075	1,38165	0,324616
T	138,8914	1	138,8914	29,94889	0,011995
T ²	23,3231	1	23,3231	5,02912	0,110698
RLS	1,4471	1	1,4471	0,31204	0,615417
RLS ²	4,2077	1	4,2077	0,90729	0,411105
t.T	21,0864	1	21,0864	4,54683	0,122740
t.RLS	64,1830	1	64,1830	13,83966	0,033803
T.RLS	3,5842	1	3,5842	0,77286	0,444060
Falta de ajuste	143,1722	3	47,7241	10,29065	0,043539
Erro puro	13,9128	3	4,637613		
Soma total	433,5306	15			

R² = 0,63766; R²(ajustado) = 0,09415

Tabela 20 – Análise de variância do modelo representativo da variável CAH.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
t	0,70574	1	0,70574	5,19181	0,107078
t ²	0,48780	1	0,48780	3,58850	0,154492
T	0,43781	1	0,43781	3,22076	0,170592
T ²	1,60161	1	1,60161	11,78230	0,041461
RLS	5,15116	1	5,15116	37,89462	0,008626
RLS ²	0,00099	1	0,00099	0,00725	0,937502
t.T	0,57950	1	0,57950	4,26307	0,130902
t.RLS	0,00285	1	0,00285	0,02099	0,893984
T.RLS	0,08524	1	0,08524	0,62705	0,486276
Falta de ajuste	0,97778	3	0,325927	2,39769	0,245703
Erro puro	0,40780	3	0,1359337		
Soma total	10,58258	15			

R² = 0,86907; R²(ajustado) = 0,67267

ANEXO 2 - Análises estatísticas das produções específicas de CH₄

Tabela 21 – Resultados do teste Shapiro-Wilk para as produções específicas de CH₄.

Cenários	W	Valor de p
TBS1 e TBS2	0,77590	0,06556
DB1 e DB1L	0,81071	0,12290
DB2 e DB2L	0,97606	0,87850
TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	0,86744	0,03863
TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	0,87862	0,08416

Tabela 22 – Resultados do teste t de Student para comparação das produções específicas de CH₄.

Cenários	t	Graus de liberdade	Valor de p
TBS1 e TBS2	-1,0795	1,0804	0,4649
DB1 e DB1L	1,5073	1,0238	0,1229
DB2 e DB2L	-0,78729	1,7919	0,5217

Tabela 23 – Resultados do teste de Fligner-Killeen para as produções específicas de CH₄.

Cenários	Qui-quadrado	Graus de liberdade	Valor de p
TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	12,654	6	0,04888

Tabela 24 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis para as produções específicas de CH₄.

Cenários	Qui-quadrado	Graus de liberdade	Valor de p
TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	12,654	6	0,04888

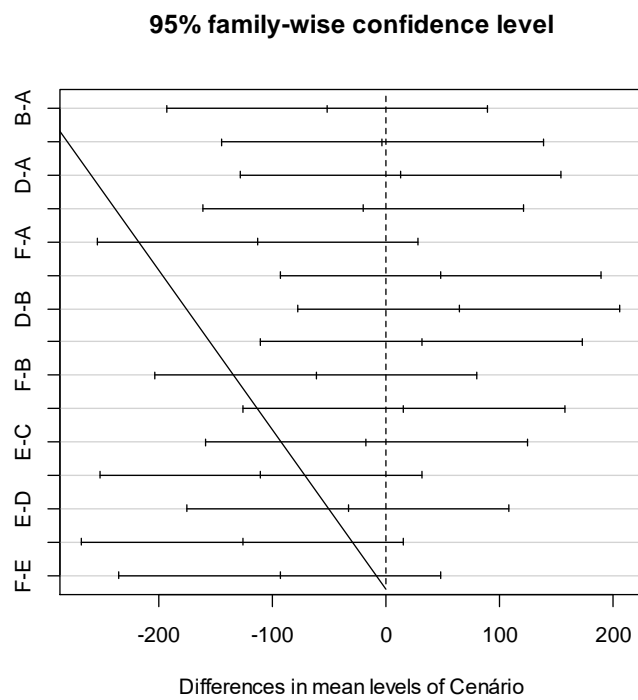
Tabela 25 – Resultados do teste de Bartlett para as produções específicas de CH₄.

Cenários	Qui-quadrado	Graus de liberdade	Valor de p
TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	9,9429	5	0,1271

Tabela 26 – Análise de variância (ANOVA) dos valores de produções específicas de CH₄ (exceto o cenário TBS1).

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
Cenários	21785,7	5	4357,1	3,4398	0,08228
Resíduos	7600,2	6	1266,7		

Nível de confiança = 10%

Figura 39 – Gráfico de Tukey para as produções específicas de CH₄

Cenários: A (DB1), B (DB1L), C (DB2), D (DB2L), E (DEL), F (TBS2).

ANEXO 3 - Análises estatísticas dos saldos energéticos obtidos

Tabela 27 – Resultados do teste Shapiro-Wilk para os saldos energéticos dos cenários estabelecidos.

Cenários	W	Valor de p
TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	0,86295	0,03344

Tabela 28 – Resultados do teste de Fligner-Killeen para os saldos energéticos dos cenários estabelecidos.

Cenários	Qui-quadrado	Graus de liberdade	Valor de p
TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	12,738	6	0,04738

Tabela 29 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis para os saldos energéticos dos cenários estabelecidos.

Cenários	Qui-quadrado	Graus de liberdade	Valor de p
TBS1, TBS2, DB1, DB1L, DB2, DB2L e DEL	10,237	6	0,115