

ANDERSO CARLO PIVA

**ESTUDOS DE PRÉ-TRATAMENTOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO BAGAÇO DE CEVADA PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES
FERMENTESCÍVEIS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como
requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia
Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul.

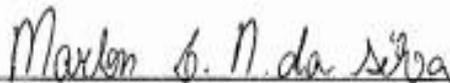
Orientador: Prof^o Dr. João Paulo Bender

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em: 03 / 12 / 2015

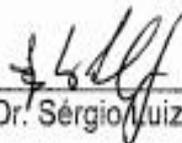
BANCA EXAMINADORA



Prof^o Dr. João Paulo Bender



Prof^o Me. Marlon Luiz Neves da Silva – UFFS



Prof^o Dr. Sérgio Luiz Alves Jr. - UFFS

ESTUDOS DE PRÉ-TRATAMENTOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CEVADA PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

Anderso Carlo Piva*
João Paulo Bender**
Guilherme Martinez Mibielli***

Resumo

Com o aumento da produção industrial grandes quantidades de resíduos são geradas que além, de trazer custos extras para as empresas podem contaminar o meio ambiente se não possuírem uma destinação correta. Entre eles, encontra-se o bagaço de cevada que é produzido em grandes quantidades e pode ser aproveitado para produção de etanol de segunda geração. A viabilidade da utilização deste resíduo somente torna-se interessante se obtivermos um produto seco e com grandes quantidades de açúcares disponíveis para fermentação. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a cinética de secagem do bagaço e verificar a eficácia dos pré-tratamentos físicos na hidrólise enzimática através da obtenção dos açúcares redutores presentes na biomassa. Dentro dos estudos realizados foi possível verificar que o bagaço de cevada possui umidade entorno de 75,24%, sendo necessária a realização da etapa de secagem para poder conservá-lo por um período mais prolongado. Para avaliar o efeito das variáveis agitação, redução de tamanho e explosão a vapor, empregou-se a técnica de planejamento fatorial de experimentos e análise de superfície de resposta. Dentre as variáveis investigadas, a agitação e o tamanho das partículas foram as que apresentaram efeitos significativos na obtenção de açúcares fermentescíveis. Em contrapartida, a explosão a vapor apresentou efeito negativo. Esse efeito pode ser explicado pela baixa temperatura (121°C) empregada no processo. A concentração máxima de açúcares redutores foi de 10,98 g.L⁻¹, obtida na seguinte condição experimental: bagaço de cevada triturado (material que passou pela peneira de 18 mesh); com agitação (100rpm) e; sem explosão a vapor. Assim, torna-se evidente que a combinação de pré-tratamentos possibilita um maior rendimento no processo de extração dos Açúcares Redutores Totais (ART) e o bagaço de cevada tem potencial para ser utilizado na produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: Secagem. Delineamento experimental. Material lignocelulósico.

Introdução

A bebida alcoólica teve sua origem ainda na antiguidade, sendo a cerveja uma das mais antigas, tendo iniciado sua produção por volta de 8.000 anos a.C. (CARVALHO; ROSSI; SILVA, 2007). No Brasil em 2012, a produção de cerveja foi de 13,74 bilhões de litros, gerando em torno de 2,74 milhões de toneladas de bagaço de cevada, segundo pesquisa realizada pelo Sistema de Controle de Produção de Bebidas (SICOBE). No ano de 2014, em levantamento realizado pelo

* Acadêmico do curso de Engenharia Ambiental, da Universidade Federal da Fronteira Sul.

** Professor Orientador, da Universidade Federal da Fronteira Sul.

*** Professor Coorientador, da Universidade Federal da Fronteira Sul.

SICOBEB em conjunto com Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRA), a produção desta bebida foi de 14,1 bilhões de litros, gerando um resíduo estimado em 3 milhões de toneladas. Com a produção média de 13,74 bilhões de litros nos últimos anos o Brasil aparece em terceiro lugar, ficando apenas atrás de China e dos Estados Unidos.

O malte é a matéria prima utilizada para produção da cerveja. Estes grãos são ricos em açúcar e, obtido a partir da germinação parcial da semente dos cereais. O trigo e milho podem ser utilizados para obtenção do malte, porém o cereal mais usado é a cevada, do gênero *Hordeum Vulgare*. Esta escolha deve-se a cevada ser rica em amido e possuir um alto teor de proteínas suficiente para fornecer os aminoácidos necessários para o crescimento da levedura (CARVALHO, 2007).

A cevada chega às maltarias onde passam por um processo de classificação para verificar a viabilidade da germinação, não sendo viável, seguem para outro fim. Para seguir para o processo de germinação a cevada passa por um teste com aplicação de um reagente que identifica a porcentagem de germinação, sendo necessário um percentual acima de 95% (CARVALHO, 2007). A cevada selecionada segue para o processo de malteação, que consiste em imergir a cevada em água, para que o processo de germinação dê início, com ativação do metabolismo da semente. No decorrer do processo retira-se a cevada da água, para que se desenvolva o processo final de germinação em temperatura e umidade controladas por um período de três a quatro dias, a partir daí o processo é interrompido e o malte passa por um processo de secagem e segue para a cervejaria (CARVALHO, 2007).

Na cervejaria o malte passa por vários processos, sendo uma das etapas principais a mosturação. Nesta etapa o malte é triturado e imerso em água a temperatura controlada e, como produto final tem-se o mosto que segue para as próximas etapas na produção de cerveja. O mosto é um material líquido que contém açúcares fermentescíveis, que através da ação das leveduras produziram o álcool da cerveja, sendo separado da parte sólida através da filtração, o resíduo obtido nesta etapa é denominado bagaço de cevada. Em estudo apresentado por Brochier e Carvalho (2009) observaram que a quantidade de resíduo gerado em uma determinada indústria cervejeira foi de 132,02 kg de resíduo para cada 100 kg de cevada utilizado no processo, ficando evidente que estas indústrias apresentam-se como um grande gerador de resíduo. Outros resíduos também são gerados durante a produção de cerveja, como por exemplo, o excesso de levedura obtido após a etapa de fermentação. No entanto, o bagaço de cevada é o principal, o que corresponde aproximadamente 85% do total de resíduos gerados, o que o faz ser considerado o subproduto mais importante proveniente do processo de produção da cerveja (REYNOLD, 1997 apud DRAGONE, 2007).

Esse grande volume de resíduo gerado pelas indústrias cervejeiras podem contaminar o meio ambiente caso não for dado um destino correto, e podendo, inclusive, ocorrer punição a estes estabelecimentos pelos órgãos de fiscalização ambiental devido a lançamentos sem tratamento prévio do resíduo. Segundo Diniz et al. (2011), o chorume do bagaço de cevada pode contribuir na degradação do solo, devido ao aumento salinização e, acompanhada de dispersão da fração de argila devido à concentração de magnésio solúvel. O bagaço pode ser considerado um resíduo, não perigoso de classe II, de acordo com a NBR 10.004 (ABNT, 1994). Entretanto, em estudo realizado por Brochier e Carvalho (2007) verificou-se que o

chorume do bagaço apresentou um valor para demanda química de oxigênio (DQO) de 10.769,0 mg_{O₂}.L⁻¹ e para demanda biológica de oxigênio (DBO)₅ de 659 mg_{O₂}.L⁻¹, equivalentes a alguns resultados obtidos em dejetos de suínos.

O resíduo produzido na indústria cervejeira possui em torno de 80% de umidade, o que reduz o seu tempo útil para consumo in natura e pode elevar os gastos de sua utilização em áreas distantes da indústria cervejeira (BROCHIER; CARVALHO, 2007). Este resíduo apresenta disponibilidade o ano todo e pode ser obtido a baixo custo e, aliado a crescente necessidade de aumento de produção de energia tem movimentado pesquisadores em direção ao desenvolvimento da tecnologia dos biocombustíveis, através do aproveitamento de resíduos industriais, evitando que áreas agricultáveis sejam utilizadas somente para produção de material energético.

A obtenção de etanol a partir de biomassa envolve basicamente quatro etapas: (1) Caracterização química da biomassa; (2) Pré-tratamento, a fim de disponibilizar os açúcares presente no resíduo; a (3) Hidrólise dos polissacarídeos, gerando mono e dissacarídeos e, por fim, a etapa de (4) Fermentação dos monos e dissacarídeos em etanol (OGEDA; PETRI, 2010). A composição química do bagaço de cevada pode variar de acordo com a variedade e época de colheita da cevada, condições de moagem do malte e tipo de adjuntos (milho, arroz e trigo) adicionados ao processo de fermentação (SANTOS, 2003 apud MELLO et al., 2013).

As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais componentes: celulose, lignina e hemicelulose, que são unidas entre si por ligações covalentes, criando proteção da parede celular contra ataques microbianos (JEFFRIES, 1990 apud CASTRO, 2009). Mello et al. (2013) obteve no bagaço de cevada empregado em seu trabalho um elevado teor de fibras do tipo insolúvel (61,83%), com 12,29% de celulose, 26,13% de lignina e 23,41% de hemicelulose.

A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza (BRAGATTO, 2010), sendo um polissacarídeo estrutural e principal componente das fibras dos vegetais, e através da hidrólise completa produz glicose como monossacarídeo. A celulose é um biopolímero de glicose com áreas de configuração ordenada, rígida, com uma parte de estrutura inflexível (celulose cristalina) e outra área de estrutura flexível (celulose amorfa) (BRAGATTO, 2010). A parede celular dos vegetais consiste de camadas entrecruzadas de longas fibrilas de celulose muito resistentes, a celulose é encontrada em plantas sob a forma de micro fibrilas de 2 a 20 nm de diâmetro e entre 100 a 40000 nm de comprimento, tendo entre 2000 – 25000 unidades de glicose (OLIVEIRA, 2010).

A hemicelulose atua como uma ponte química entre a celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada formada pela combinação de diferentes açúcares, entre eles, pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose), além de alguns ácidos e radicais acetila (AGBOR, 2011 apud OLIVEIRA, 2012). A ausência de cristalinidade e da estrutura micro fibrilar orientada da celulose torna a hemicelulose mais susceptível a hidrólise enzimática (PARAJÓ, 1998 apud OLIVEIRA, 2010), porém a obtenção de etanol através das pentoses não é possível, pois a levedura tradicional não consegue quebrar a estrutura dos açúcares de cinco carbonos sendo necessária a utilização de outra levedura. Além disso, as hemiceluloses diferem das celulosas por

apresentarem varias unidades de diferentes açúcares, cadeias ramificadas e massa molar mais baixa, e tem como principal componente a xilose, (BRAGATTO, 2010).

A lignina é um polímero heterogêneo complexo, formando redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades de fenilpropano interligadas por ligações covalentes e de hidrogênio cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos, intimamente combinada com a celulose (BRAGATTO, 2010). As ligninas, quando degradadas a frações de massas molares menores, podem ser utilizadas na fabricação de espumas de poliuretanas, resinas fenólicas e epóxi e como fontes de fenol e etileno (LORA, 2002 apud OGEDA; PETRI, 2010).

A obtenção de açúcares redutores não é simples, devido às interações entre hemiceluloses e celulosas presentes na parede celular dos vegetais e, para dificultar o acesso a estas estruturas encontra-se a lignina que diminui a eficiência da hidrólise enzimática, por esta razão, torna-se necessário a realização de um pré-tratamento para poder romper estas ligações e facilitar o acesso das enzimas a biomassa. A realização de pré-tratamento em materiais lignocelulósicos para extração de açúcares fermentescíveis pode alcançar rendimentos de até 90% (OGEDA; PETRI, 2010; OLIVEIRA, 2012). Os pré-tratamentos podem ser classificados em químicos, físicos ou biológicos. Todos os processos apresentam vantagens e desvantagens e, muitos dos quais têm sido avaliados visando melhorar a etapa de extração de açúcares redutores totais, entre eles, os métodos de explosão a vapor e trituração.

A explosão a vapor consiste em aquecer o material lignocelulósico a temperaturas entre 180 e 240°C e por tempos de residência máximos de 20 min, seguindo-se de uma rápida descompressão do reator e transporte do material para um ciclone (CASTRO, 2009). O vapor penetra na biomassa e condensa, formando água líquida dentro das fibras, com a descompressão, ocorre a quebra acentuada na estrutura da biomassa, devido à rápida evaporação da água intracelular e o transporte para o ciclone a velocidades elevadas (MASON, 1996 e BABCOCK, 1932 apud SAAD, 2010).

A solução obtida de uma amostra submetida à explosão a vapor mostra a ruptura da lignina da parede celular e formação de glóbulos na superfície das células do material, a separação da celulose é realizada com a solubilização da lignina em soluções de hidróxido de sódio (CASTRO, 2009). A explosão a vapor aumenta a área superficial da biomassa facilitando à hidrólise ácida e/ou enzimática. Por esta razão, o método tem sido proposto para a conversão do material lignocelulósico a etanol de segunda geração (Ohgren, 2007 apud GOUVEIA; NASCIMENTO; SOUTO-MAIOR, 2009). Existe ainda uma carência quanto à comprovação da viabilidade econômica do pré-tratamento por explosão a vapor.

A trituração aparece como um pré-tratamento físico essencial no auxílio a quebra da estrutura do bagaço de cevada reduzindo o tamanho médio dos resíduos com aplicação de forças de impacto, compressão e abrasão (STREIT, 2000). A vantagem na redução de tamanho no processo é devido ao aumento da relação superfície/volume, em alguns casos, redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose, aumentando a eficiência de operações posteriores, como o acesso das enzimas para extração de açúcares redutores (OGEDA; PETRI, 2010),

além disso, a uniformidade do tamanho das partículas do bagaço auxilia na realização dos estudos. A trituração ou moagem apesar de aumentar a superfície de exposição não consegue aumentar consideravelmente a taxa de conversão de açúcar, pois não retira a lignina do resíduo.

A hidrólise pode ser realizada por adição de soluções químicas ou por enzimas, estas por sua vez, produzem menores quantidades de compostos que inibem o processo de fermentação. A hidrólise da celulose gera glicose e celobiose, em contrapartida, a hidrólise de ligninas e hemiceluloses gera pentoses e hexoses e subprodutos (entre eles, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana e sua conversão em etanol (OGEDA; PETRI, 2010).

Para hidrólise da biomassa é utilizado um complexo de enzimas denominadas celulasas que são biocatalisadores e atuam de forma sinérgica quebrando as longas cadeias de celulose em duas unidades fermentáveis de glicose (SAAD, 2010). Estes açúcares são os que despertam maior interesse, pois podem ser utilizados para produção de etanol de segunda geração. Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas estão subdivididas em três classes: endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exoglucanases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e, as β -glucosidases que hidrolisam a celobiose à glicose (BRAGATTO, 2010).

Grande esforço vem sendo realizado em pesquisas na fase piloto para geração de açúcares redutores através da hidrólise da biomassa, a fim de reduzir custos e aumentar rendimentos (OLIVÉRIO; SOARES, 2005). Segundo Macedo (2007) os processos de hidrólise e fermentação para etanol poderão ser conjugados, incluindo fermentação de pentoses e hexoses. Esses processos poderiam recuperar 52% da energia da biomassa, superior aos 35% da atualidade. O valor econômico das enzimas empregadas na hidrólise enzimática é ainda o principal obstáculo para conversão da biomassa em biocombustíveis.

Metodologia

Biomassa Lignocelulósica

Para os ensaios de secagem e hidrólise enzimática utilizou-se amostra do bagaço de cevada, provenientes de um mesmo lote de produção, e gentilmente fornecidas pela Empresa Dalla Microcervejaria, localizada na Cidade de Chapecó, na região oeste de Santa Catarina – Brasil. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e levadas ao freezer com temperatura em torno de $-15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Antes de sua utilização para realização dos ensaios de secagem, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas manualmente.

Determinação de Umidade e Curvas de Secagem

O experimento de secagem foi iniciado com a determinação da umidade inicial em base seca (b.s) do bagaço de cevada, duplicata, utilizando o método padrão em estufa. Uma determinada massa de amostra foi levada a estufa na temperatura de 105°C , durante 24 horas. Em seguida, foi colocada em dessecador até atingir equilíbrio com a temperatura ambiente. A massa inicial e final de cada

amostra foram pesadas em balança digital modelo UX 6200H marca Shimadzu com precisão de $\pm 0,001$ g determinando-se assim, sua massa seca.

Com a obtenção das massas de bagaço úmido (tempo zero) e seco (tempo 24h) foram calculadas a umidade em base seca e úmida, através do emprego das Equações 1 e 2, respectivamente.

$$X(b.s) = \frac{M_{úmida} - M_{seca}}{M_{seca}} \quad (1).$$

$$X(b.u) = \frac{X(b.s)}{[X(b.s)+1]} * 100 \quad (2).$$

Em que: $X(b.s)$ é a razão entre a massa de água e a massa de sólido sem esta umidade; $M_{úmida}$, é a massa de sólido e água presente na amostra e, M_{seca} é a massa seca obtida após 24 horas de secagem, ambas as unidades em gramas (g) e $X(b.u)$ é a porcentagem de umidade no resíduo.

Para os ensaios de secagem, o bagaço de cevada foi submetido às temperaturas de (40, 60, 80°C) e para cada temperatura citada foram realizados ensaios com três espessuras distintas (0,5 cm, 1,0 cm e 2,0 cm). O bagaço de cevada foi distribuído em formas de alumínio, homogeneizado, a fim de manter um padrão nas amostras e realizados em duplicata, posteriormente levado à estufa de secagem com circulação e renovação de ar modelo AL – 1021480 marca American lab.

Durante a secagem, o monitoramento da massa do resíduo foi realizado a cada 15 minutos. Com os dados experimentais coletados, passou-se para a construção de curvas de secagem, através de gráficos no Microsoft® Excel.

Obtidas as curvas de secagem, determinou-se a condição das variáveis temperatura e espessura do bagaço de cevada que minimizasse o gasto energético e maximizasse a taxa de secagem. Com esses parâmetros definidos realizou-se a secagem de toda a biomassa necessária para a realização de todos os ensaios de pré-tratamento e hidrólise enzimática, evitando assim uma possível deterioração da amostra ao longo do tempo de armazenamento. Os ensaios de secagem foram desenvolvidos no Laboratório de Solos, enquanto que os ensaios de hidrólise foram realizados no Laboratório de Resíduos Sólidos da UFFS, Campus Chapecó.

Pré-tratamento

Após o processo de secagem e armazenamento do bagaço no freezer, a biomassa foi descongelada e dividida em quatro partes para a realização dos processos de pré-tratamento físico, como segue:

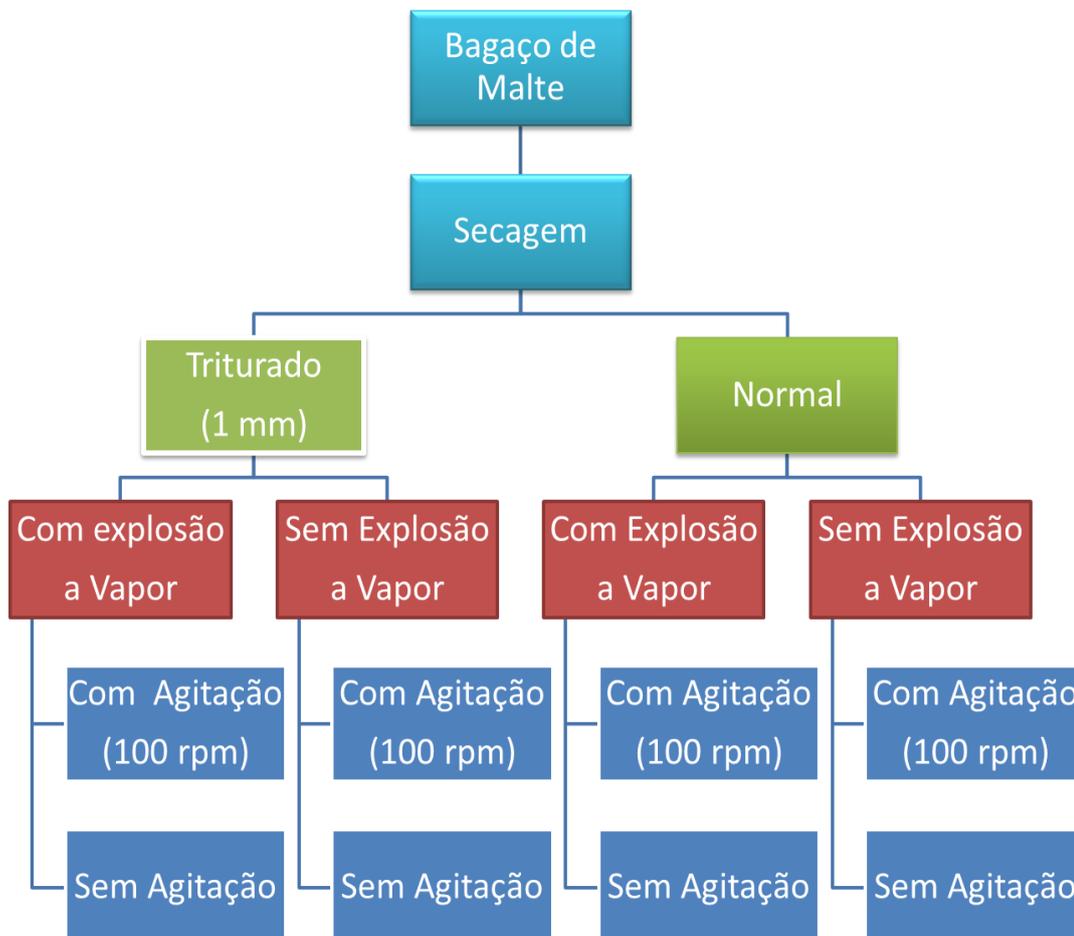
- (1) A primeira parcela foi armazenada sem a realização de pré-tratamento, sendo denominada de bagaço de cevada normal, ou seja, sem tratamento físico.
- (2) Uma segunda parcela da amostra, denominada de bagaço de cevada triturado, foi exposta ao processo de pré-tratamento de redução de tamanho.
- (3) A terceira parcela, além de triturada conforme supracitado, foi exposta ao processo de pré-tratamento por explosão a vapor.

(4) E, finalmente, a última parcela consistiu em submeter o bagaço de cevada normal ao processo de explosão a vapor.

Em seguida, as amostras foram incubadas em Shaker modelo SL – 223 da marca Solab durante 6 horas, sendo uma parte das amostras sob agitação de 100 rpm e as demais sem agitação.

A sequência de realização dos ensaios mencionada anteriormente pode ser mais facilmente compreendida através do organograma apresentado na Figura 1.

Figura 1: Organograma das Etapas Realizadas nos Ensaio de Hidrólise Enzimática



Fonte: Elaborado pelo autor.

A trituração do bagaço de cevada foi realizada com um liquidificador da marca Anton, por aproximadamente um minuto, com objetivo de analisar a influência do tamanho da partícula na liberação de açúcares fermentescíveis. Depois de triturado a amostra passou por homogeneização das partículas com utilização de uma peneira de 18 mesh (abertura de 1 mm). Para o pré-tratamento através da explosão a vapor foi utilizada uma autoclave vertical modelo AV-75 da marca Phoenix com reator de aço inox, provido de sensores para acompanhamento da pressão e da temperatura, além de válvulas de controle para a entrada e saída de vapor. O bagaço foi exposto á vapor de água saturado à alta pressão em torno de 1 atm e

temperatura de 121°C durante 20 minutos seguido de uma descompressão brusca em condições atmosféricas.

Enzima Celulase

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com a enzima celulase de *Trichoderma reesei* (NS50013) adquirida junto à empresa Novozymes Brasil. As reações foram realizadas com a enzima diluída numa proporção de 1:20 – 1 mL de enzima em aproximadamente 19 mL de solução tampão acetato de sódio 0,2M, em pH 4,8. A razão sólido/líquido, pH e a temperatura ótimas, foram determinados em estudos prévios, não reportados neste trabalho.

Atividade Enzimática

Antes de iniciar o estudo aplicando as enzimas celulase, ensaios foram realizados destinando-se a determinação da atividade enzimática.

A atividade enzimática da celulase foi determinada utilizando-se a metodologia padrão de Mandels et al. (1976) e Ghose (1987). Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,0 mL de tampão acetato e em seguida, 50 mg de papel filtro Whatman nº1, enrolado em forma de espiral totalmente submerso na solução tampão. Os tubos de ensaio foram vedados com plástico filme para evitar a evaporação e colocados em banho-maria a 50°C para garantir equilíbrio térmico, após 10 minutos, foram adicionados 0,5 mL de extrato enzimático diluído e incubados novamente em banho-maria a 50°C durante 1 h.

Uma unidade de celulase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 µmol de celulose por minuto. Os resultados são apresentados em termos de Unidade de Papel Filtro (UPF) por mL, sendo a Equação 3 utilizada para o cálculo da atividade.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{ART} * V_t}{0,18 * V_c * t_h} \quad (3)$$

Em que:

- ART = Concentração de ART (mg.mL⁻¹);
- V_t = Volume total utilizado na hidrólise (mL);
- 0,18 = Massa equivalente a 1 µmol de glicose (mg);
- V_c = Volume de enzima utilizado na hidrólise (mL);
- t_h = tempo da hidrólise (min).

A dosagem de Açúcares Redutores Totais (ART) foi realizada através de uma adaptação do método colorimétrico de DNS – descrito por Miller (1959) – para microplacas de 96 poços de fundo plano, (SANTOS, 2014). Em cada poço da microplaca, foram adicionados 25 µL de amostra (diluídas conforme necessidade, de modo que suas leituras estivessem dentro da curva de calibração) e 25 µL de reativo DNS (10 g.L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g.L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 M (NaOH). As curvas de calibração, com seis concentrações, na faixa de 0 a 2,0 g.L⁻¹ de glicose, foram montadas em todas as microplacas lidas.

Depois de pipetados as amostras e o reativo, as microplacas foram seladas com filme plástico, incubadas em banho-maria por 5 minutos e, em seguida, resfriadas em gelo. Depois do resfriamento da amostra, o filme plástico foi retirado para adição de 330 μL de água a cada poço. As microplacas foram levadas ao leitor de microplacas e as amostras foram lidas a 490 nm (com um feixe emitido por vez no centro de cada poço). As concentrações, em g.L^{-1} de ART, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorbância obtidas em planilhas do Microsoft® Excel.

Delineamento Estatístico para Desenvolvimento dos Experimentos de Hidrólise

Visando avaliar o efeito das variáveis investigadas nos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis, empregou-se a técnica de planejamento de experimentos, através do emprego de delineamento experimental fatorial completo com três variáveis e dois níveis de variação (2^3). As três variáveis investigadas nesta etapa foram: (1) agitação; e os tipos de pré-tratamentos físicos, (2) explosão a vapor e (3) redução de tamanho, conforme podem ser visualizado na Tabela 1, item resultados e discussões. O delineamento experimental foi composto por oito ensaios, sendo as análises realizadas em triplicata.

As massas de bagaço de cevada para cada ponto estudado, bem como a massa do complexo enzimático, foram determinadas e medidas em balança analítica e pipetas volumétricas. Primeiramente em um erlenmeyer de 50 mL pesou-se 1 g da massa sólida seca pré-tratada, conforme planejamento apresentado na Tabela 1. Em seguida adicionou-se uma alíquota de 10 mL de tampão acetato de sódio com pH 4,8 e 2,0 mL de extrato enzimático, previamente diluído numa proporção de 1:20 (1mL de enzima celulase + 19 mL de tampão acetato de sódio). Posteriormente foram vedados com plástico filme e encaminhados para o shaker orbital onde transcorreu o processo de hidrólise enzimática nas condições previamente estabelecidas através do planejamento de experimento, mantendo-se fixa as variáveis temperatura (50°C), pH (4,8), razão sólido/líquido (0,083 m/v) e tempo de (6h). Conforme estudos não reportados neste trabalho

A glicose liberada foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), com adaptação para microplacas, conforme descrito anteriormente.

Os resultados das variáveis respostas de cada um dos oito experimentos foram tratados por meio do software Statística® 7.0, sendo utilizada uma análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos a fim de avaliar a predição ou não do modelo matemático. Nos modelos, foi observada a significância da regressão pelo teste F e pelo coeficiente de determinação. Para se visualizar o efeito das variáveis independentes nas respostas avaliadas foram realizados gráficos de superfície de resposta quando a análise de variância mostrou-se significativa.

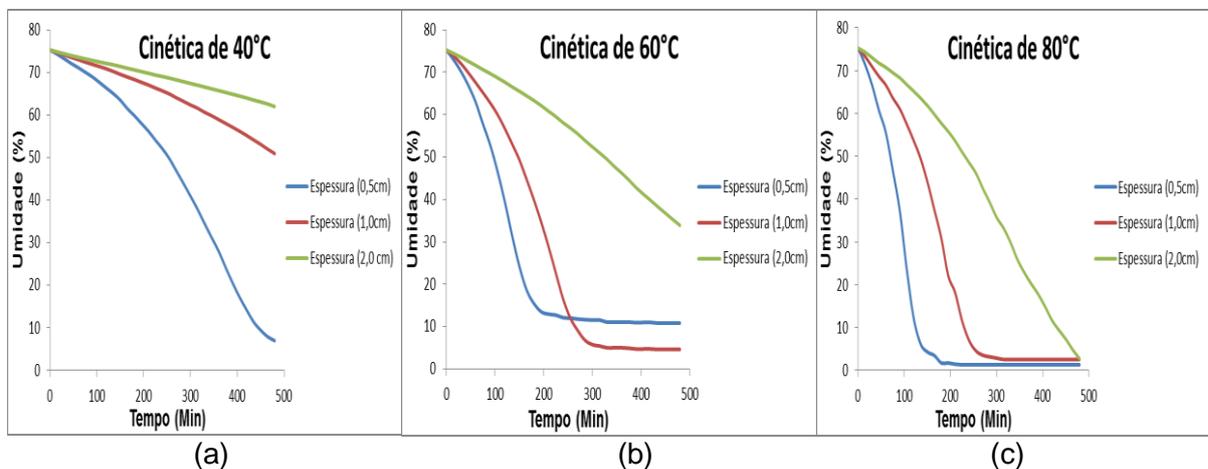
Resultados e Discussão

Determinação da Umidade e Curvas de Secagem do Bagaço

A primeira parte do trabalho consistiu na determinação da umidade inicial do bagaço de cevada, o qual apresentou uma umidade de $75,24 \pm 2\%$, demonstrando que o resíduo possui em sua estrutura uma grande quantidade de água. O valor encontrado nesse trabalho está coerente com o apresentado na literatura, como podemos observar no trabalho apresentado por Cordeiro et al. (2012), onde os autores reportaram uma umidade de 75,45% para o resíduo bagaço de cevada.

Com a finalidade de avaliar o comportamento da massa do resíduo em função do tempo e da temperatura, realizou-se, posteriormente a determinação da umidade, estudos cinéticos de secagem, os quais são apresentados na forma de isotermas de secagem na Figura 2.

Figura 2: Cinéticas de Secagem. (a) Isoterma de 40°C. (b) Isoterma de 60°C. (c) Isoterma de 80°C.



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Analisando a Figura 2, observa-se que com o aumento da temperatura ocorre um incremento na taxa de secagem, o que proporciona uma maior redução da umidade ao longo do tempo e, conseqüentemente, um menor tempo de secagem é requerido para a retirada de umidade presente no bagaço. Além disso, analisando especificamente a Figura 2 (b), na espessura de 1,0 cm, podemos observar dois períodos característicos das curvas de secagem: Taxa constante, encontra-se no período compreendido entre o tempo (30 min) até (210 min), onde a perda de água se mantém constante até o ponto denominado de umidade crítica; No segundo período, no intervalo entre (210 min) e (315 min) a taxa de perda de água vai diminuindo com o tempo, denominado de taxa decrescente, essas duas etapas ocorrem devido à estrutura do material, no início a uma maior quantidade de água livre nos poros do bagaço e com o passar do tempo vai restando apenas à água que faz parte das ligações e das partes inferiores que necessita deslocar-se entre a estrutura do material até chegar à superfície e, então, ser evaporada.

Segundo Park e Antônio (2006) a água pode estar presente na amostra sob forma de água livre e água ligada, a primeira está simplesmente adsorvida no material, sendo a mais abundante, podendo ser facilmente retirada em torno da temperatura de ebulição, por outro lado, a água ligada faz parte da estrutura da biomassa, necessitando de temperaturas maiores para sua remoção.

Na Figura 2 é possível analisar também que o aumento da temperatura diminui o ponto de equilíbrio da umidade, ou seja, período em que não ocorrem mais perdas de água na estrutura do resíduo. Comparando as Figuras 2 (b) e 2 (c), é possível visualizar que na temperatura de 60°C o ponto de equilíbrio ocorre em torno de 10% de umidade e para temperatura de 80°C fica próximo a 2% de umidade. Conforme citado anteriormente, o líquido presente na biomassa encontra-se sob duas formas, para poder retirar maiores quantidades de água são necessárias temperaturas mais elevadas, como de fato realmente ocorre, essa mudança pode acarretar mudança na estrutura do bagaço de cevada.

A temperatura de 40°C apresentou tempo de secagem elevado em comparação com as demais, assim torna-se necessário, períodos mais prolongados para retirar a umidade presente no bagaço. Para temperatura de 80°C, o resíduo apresentou uma coloração mais escura com o tempo, isso se deve à exposição a altas e prolongadas temperaturas de secagem favorecendo a reação de Maillard, devido à presença de açúcares e proteínas no resíduo, podendo trazer mudanças na estrutura do bagaço.

Em todas as amostras com espessura de 2,0 cm foi possível verificar a formação de uma crosta na superfície, esta barreira diminui a retirada de água do resíduo. A formação da crosta deve-se muitas vezes ao acúmulo de açúcar próximo a superfície como acontece, por exemplo, com soluto de ameixa, este material possui açúcar depositado na superfície que, durante a secagem, forma uma crosta diminuindo a velocidade de secagem (PARK et al., 2007).

Segundo Park (2007) a parede celular é submetida à tensão e o líquido contido nela é submetido à compressão. Conforme procede a secagem, diminui a pressão que o líquido exerce contra a parede celular, causando encolhimento do material. Conforme o material encolhe, a superfície do material endurece por sofrer o impacto da secagem, assim o material deforma-se e fissa-se.

Portanto, dependendo da utilização deste resíduo, torna-se necessário uma avaliação criteriosa e cuidadosa na escolha da temperatura de secagem. O bagaço de cevada utilizado para os testes de pré-tratamento e hidrólise enzimática foi seco em estufa a 60 °C e 1,0 cm para facilitar a estocagem e evitar perdas por degradação biológica durante a realização dos ensaios, a fim de manter o resíduo o mais próximo das condições iniciais, além da otimização do tempo de secagem.

Atividade enzimática da celulase

A quantificação de atividade enzimática é uma variável importante no processo de hidrólise, diferente dos reagentes químicos, os quais são fixados por base mássica, as enzimas são avaliadas tendo por base sua velocidade de reação. Com a finalidade de verificar o nível de ação da enzima celulase, realizou-se, antes do processo de hidrólise, a medida da atividade enzimática. As análises, realizadas em triplicata, demonstraram que a enzima comercial celulase possui uma atividade média de 18,8 UPF. (mL)⁻¹, indicando que a enzima está com suas funções ativas, podendo ser utilizada para os testes de hidrólise do bagaço de cevada.

Quantificação de açúcares

A razão sólido/líquido utilizado para a realização da etapa de hidrólise enzimática foi de 0,083 (m/v), a qual garantia que todo o substrato ficasse submerso na solução tampão, facilitando o acesso da enzima ao substrato. Como o resíduo foi previamente seco, razões maiores que a utilizada foram testadas. No entanto, não

foi possível obter um meio reacional adequado, ou seja, partes do resíduo não ficavam em contato com a solução tampão, previamente diluída com a enzima e, devido à absorção da solução pelo bagaço, não restavam amostras para quantificação de açúcares redutores.

Os resultados do planejamento experimental para a determinação da influência das variáveis independentes; (explosão a vapor, tamanho de partícula e agitação) no processo de extração de açúcares redutores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Planejamento Experimental e Rendimento do Processo de Extração Enzimática de ART

Ensaio	Agitação (rpm)	Explosão	Tamanho (mm)	ART(g/L)
1	-1 (0)	-1(sem)	-1(1)	9,88
2	+1(100)	-1(sem)	-1(1)	10,98
3	-1 (0)	+1(com)	-1(1)	8,77
4	+1(100)	+1(com)	-1(1)	10,24
5	-1 (0)	-1(sem)	+1(normal)	9,42
6	+1(100)	-1(sem)	+1(normal)	9,22
7	-1 (0)	+1(com)	+1(normal)	7,88
8	+1(100)	+1(com)	+1(normal)	9,11

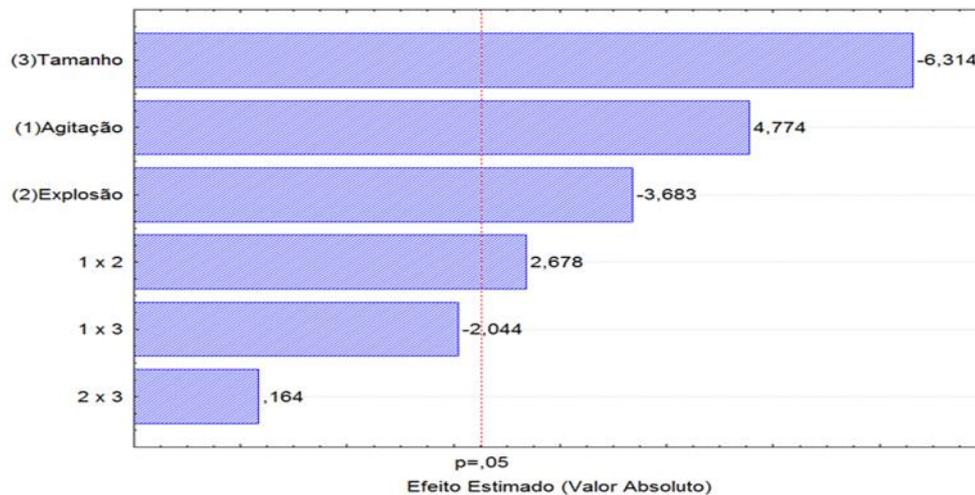
Através da Tabela 1 é possível verificar que o maior rendimento em ART foram obtidos nos ensaios 2 e 4, 10,98 e 10,24 g.L⁻¹, respectivamente. Observa-se que as condições experimentais de hidrólise enzimáticas empregadas nos ensaios 2 e 4 foram utilizando o bagaço triturado com agitação de 100 rpm. No entanto, a diferença entre esses dois ensaios está no processo de explosão a vapor, onde o ensaio 2 não passou pela etapa de explosão, enquanto que o bagaço utilizado no ensaio 4 foi submetido a etapa de explosão a vapor. Os valores apresentados na Tabela 1 foram tratados estatisticamente através do Software Statistica 7.0, o que permitiu gerar o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 3.

Influência das Variáveis Analisadas

Analisando o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 3 podemos afirmar, com 95% de confiança, que as variáveis independentes redução de tamanho (1 mm), agitação e sem explosão a vapor apresentaram efeito significativo no processo de hidrólise enzimática. A interação entre as variáveis agitação (1) e explosão a vapor (2), também apresentaram valores positivos, demonstrando que, com agitação e sem o processo de explosão, a vapor melhor será o rendimento do processo de hidrólise enzimática em açúcares fermentescíveis. Dentre as variáveis investigadas, a variável que apresentou maior influência no processo de hidrólise foi o tamanho da partícula (-6,314), a qual apresentou um efeito significativo negativo, demonstrando que quanto menor o tamanho da partícula, maior será o rendimento em ART. Este fenômeno pode ser explicado em função do aumento da superfície de contato entre o substrato e o catalisador, ficando evidente que quanto menor for a granulometria do resíduo maior será a área de contato da enzima com o substrato, possibilitando desta forma o acesso da enzima aos açúcares presentes no resíduo.

A segunda variável de maior influência nesse processo foi a agitação (4,774), onde percebe-se que a presença da agitação promove aumento no rendimento em açúcares fermentescíveis. Com relação a variável independente agitação, pode-se concluir que a mesma contribui de maneira positiva no processo de hidrólise enzimática devido ao fenômeno de transferência de massa favorecendo o aumento de contato entre o substrato e a enzima.

Figura 3: Gráfico de Pareto



Em contrapartida, a explosão a vapor realizada em autoclave a 121°C e 1 atm apresentou um efeito significativo negativo, assim o processo de explosão empregado nesse trabalho não favoreceu o incremento no rendimento em ART nas amostras submetidas a explosão. A justificativa para tal comportamento pode estar relacionada a condições de temperatura e pressão empregadas neste trabalho, as quais não foram suficientes para favorecer o processo de hidrólise. As condições ótimas de temperatura e tempo de exposição para o material lignocelulósico podem variar de 160 °C a 260 °C, por períodos de 1 a 20 minutos, sendo que, em condições severas, ocorre perda considerável de açúcar (SUN; CHENG, 2002). Para Castro (2009), as temperaturas ideais para o pré-tratamento com explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar gira entre 180 e 210°C, além de serem combinadas com a adição de compostos ácidos.

Através da análise estatística, Figura 3, verificou-se que a interação explosão a vapor e tamanho não apresenta efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na faixa estudada. O parâmetro respectivo a esta interação foi então retirado do modelo e adicionado à falta de ajuste.

A partir das variáveis significativas, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) que é apresentada na Tabela 2.

O valor obtido para o R^2 foi de 0,91, indicando que 91% dos dados experimentais são explicados pelo modelo. Este valor é considerado satisfatório para obtenção de um modelo válido. Segundo Box et al. (1978), para que uma regressão não seja apenas significativa, mas também útil para fins preditivos, a relação de $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ deve ser superior a três. Assim, o modelo empírico encontrado nesse trabalho apresentou uma relação do $F_{\text{calculado}}$ 4,33 vezes maior

que o F_{tabelado} , permitindo a validação do modelo, conforme apresentado na Tabela 2. O modelo validado permitiu construir a superfície de resposta apresentada na Figura 4.

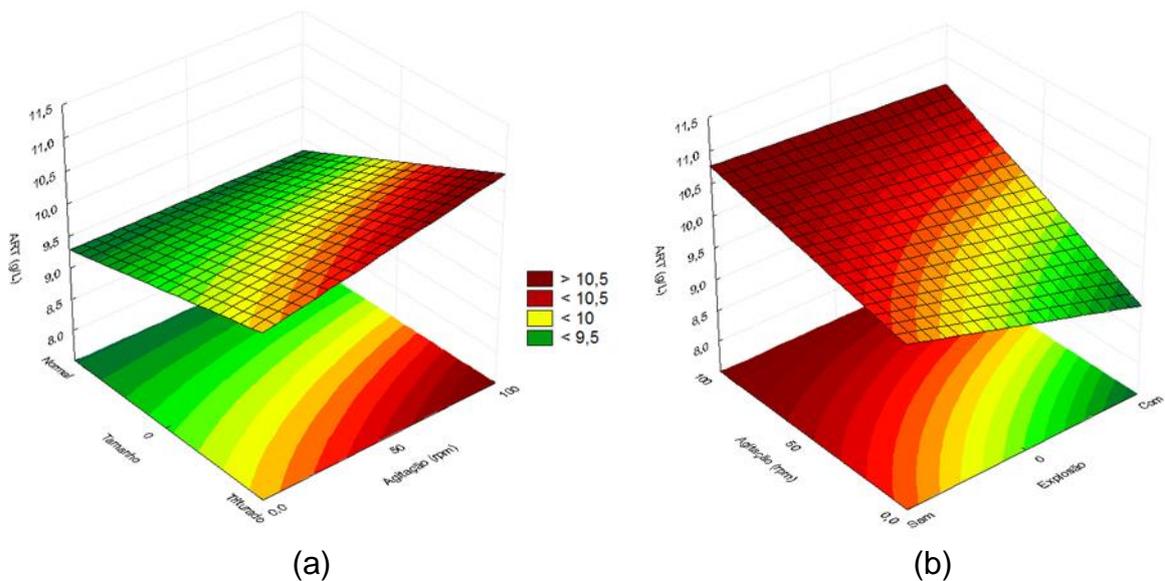
Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para hidrólises de açúcares fermentescíveis em amostra de bagaço de cevada.

	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	$F_{\text{CALCULADO}}$
Regressão	10,49	6	1,75	14,60
Resíduo	1,08	9	0,12	
Erro	1,08	9	0,11	
Total	11,56	15		

$$F_{\text{Tabelado};95\%;6;9} = 3,37, R^2 = 0,91.$$

A partir da superfície de resposta, apresentada na Figura 4 (a), percebe-se que com agitação e menor tamanho de partícula maior foi a quantidade de ART obtida pelo processo de hidrólise enzimática. Na condição de agitação de 100 rpm e tamanho de partícula de 1mm foi possível extrair cerca de 10,98 g.L⁻¹ de ART. Outra interação que apresentou bons resultados foi agitação e com ausência da explosão a vapor. De acordo com a Figura 4 (b), a superfície de resposta demonstra que agitação a 100 rpm e ausência de explosão a vapor apresentou rendimento considerável, muito próximo ao encontrado na interação tamanho e agitação. Através desta análise, fica evidente que a combinação de pré-tratamentos possibilita um maior rendimento no processo de extração dos açúcares redutores totais.

Figura 4: Superfícies de resposta na determinação de ARTs (g.L⁻¹) em amostra de bagaço de cevada em função das variáveis agitação, tamanho e explosão a vapor.



Comparando com a literatura, Pietrobon (2008) realizando hidrólise com bagaço de cana-de-açúcar conseguiu extrair uma concentração média de açúcares redutores totais em torno de 3,95 g. L⁻¹, utilizando uma concentração de enzima de

0,0048 g.(mL)⁻¹ e explosão a vapor a 121°C. No mesmo trabalho, foram realizados outros dois processos extração de ART utilizando ácido sulfúrico e hidróxido de cálcio, seguido de explosão a vapor. Para amostra contendo ácido foi possível extrair 26,35 g. L⁻¹ e 13, 84 g. L⁻¹ para amostra com hidróxido de cálcio. Analisando os dados obtidos é possível verificar que o incremento de soluções ácidas e básicas favorece a disponibilidade de açúcares fermentescíveis, em contrapartida somente utilizando explosão a vapor os resultados se apresentaram bem inferiores, muito próximos ao encontrado no presente trabalho, tornando evidente a necessidade de adaptações nas fases de pré-tratamentos, a fim de melhorar o aproveitamento de energia proveniente do material lignocelulósico.

Conclusões

A partir do trabalho realizado foi possível verificar que o bagaço de cevada possui grande quantidade de água em sua composição sendo necessário retirar parte desta umidade a fim de evitar desperdício da biomassa devido à atuação de microrganismos que aceleram o processo de degradação do resíduo. As isotermas de secagem demonstraram que a escolha da temperatura se torna essencial para obtenção de um material íntegro, pois longos períodos exposta a temperaturas elevadas podem causar injúrias na biomassa que dependendo da finalidade do bagaço de cevada pode acarretar desvalorização do resíduo. Com referência aos pré-tratamentos empregados, a redução de tamanho da partícula apresentou um valor significativo para extração de açúcares redutores totais, por outro lado, a explosão a vapor não apresentou dados satisfatórios, pois sem este pré-tratamento foi obtido maiores valores de ART. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao fator temperatura, que neste trabalho foi utilizado 121°C, inferior a utilizados em outros trabalhos realizados. O experimento que resultou em uma maior quantidade de açúcares redutores foi empregado, quando utilizadas as variáveis agitação, bagaço triturado e sem explosão a vapor. Assim, em estudos futuros seria interessante utilizar tratamentos da biomassa combinado com outras técnicas, podendo dessa maneira aumentar a eficiência de extração de açúcares redutores. De uma forma geral, pode-se concluir que o bagaço de cevada tem grande potencial para aproveitamento em processos biotecnológicos. Além de que, existem poucos trabalhos relacionados à hidrólise enzimática do bagaço de cevada para geração de etanol de segunda geração.

STUDIES PRETREATMENT AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BARLEY BAGASSE TO PRODUCE FERMENTABLE SUGARS

Abstract

With the increase in industrial production large quantities of waste are generated which in addition, bring extra costs for businesses can contaminate the environment if they are not a correct destination. Among them is the barley residue which is produced in large quantities and can be used to second generation ethanol. The feasibility of using this waste only becomes interesting if we get a dry product with large amounts of sugars available for fermentation. Thus, this study aimed to

evaluate the bagasse drying kinetics and verify the effectiveness of physical pretreatment on enzymatic hydrolysis by obtaining the reducing sugars present in biomass. Within the studies it observed that the barley bagasse has moist 75.24% being necessary to perform the drying step in order to preserve it for a longer period. To evaluate the effect of varying agitation, reduction in size and steam explosion, we used the technique factorial design experiments and response surface analysis. Among the variables investigated, the excitement and the particle size showed the significant effects in obtaining fermentable sugars. In contrast, steam explosion showed a negative effect. This effect can be explained by the low temperature (121 ° C) employed in the process. The maximum concentration of reducing sugars was 10.98 g L⁻¹, obtained in the following experimental conditions: crushed barley bagasse (material that passed through 18 mesh sieve); with agitation (100 rpm) and; without steam explosion. Thus, it becomes apparent that the combination of pre-treatment allows a higher yield in the extraction process of total reducing sugars (TRS) and barley residue has the potential to be used in the production of biofuels.

Keywords: Drying. Experimental design. Lignocellulosic material.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Normas Técnicas. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Classificação de Resíduos Industriais. NBR 10.004, setembro/1994. Disponível em: <http://www.ccs.ufrj.br/images/biosseguranca/classificacao_de_residuos_solidos_nbr_10004_abnt.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building. Nova York: Editora Wiley, 1978.
- BRAGATTO, Juliano. **Avaliação do potencial da casca de Eucalyptus spp. para a produção de bioetanol**. 2010. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/>>. Acesso em: 18 mai. 2015.
- BROCHIER, M. A.; CARVALHO. S. Aspectos ambientais, produtivos e econômicos do aproveitamento de resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cordeiros em sistema de confinamento. Ciência Agrotécnica. v.33, n.5, p.1392-1399, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1>>. Acesso em: 26 mar. 2015.
- CARVALHO, J. D. V. Dossiê Técnico: Cultivo de Cevada. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UNB, Brasília. p 23, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/Downloads/DT/MTQ2>>. Acesso em: 21 abr. 2015.
- CARVALHO, B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2ª parte – A fermentação. Revista Analytica, Nº 26. Dezembro 2006/Janeiro 2007. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/157084135/Processo-Cervejeiro-2-Fermentacao-Rev-Analitica#scribd>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

CARVALHO, L. G. Dossiê Técnico: Produção de cerveja. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p 55. mar. 2007. Disponível em: <[http://www.respostatecnica.org.br/dossiê técnico/downloads](http://www.respostatecnica.org.br/dossiê_técnico/downloads)>. Acesso em: 11 mai. 2013.

CASTRO, H.F de. Processos químicos industriais: Papel e celulose. Escola de Engenharia de Lorena, EEL, USP. Lorena- SP, 2009. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/karinamiranda94/apostila-processos-quimicos-industriais> >. Acesso em: 13 mar. 2014.

CASTRO, Aline Machado de. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, Rio de Janeiro, v. 33, n. 01, p.181-188, 24 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

CERVBRASIL – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Dados. Disponível em: < <http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=dados-do-setor>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

CORDEIRO, Luana Gomes; EL-AOUAR, Ânoar Abbas; GUSMÃO, Renan Pereira. caracterização do bagaço de cevada oriundo de cervejarias. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012. Disponível em: <<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/>> Acesso em: 21 set. 2015.

DINIZ, M. S.; CASTRO, R. S.; LIMA, L. S. Risco potencial de poluição difusa do resíduo úmido de cervejaria utilizado em propriedades rurais. Apresentado no SEPIIE (Seminário de Pesquisa, Pós – Graduação, Inovação e Extensão). IFMA, Instituto Federal do Maranhão. Maranhão, 2011.

DRAGONE, Solange Inês Mussatto. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. 2007. 175 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007. Disponível em: <http://bd.eel.usp.br/tde_arquivos/2/TDE-2002-01-23T192329Z-73/Publico/BIT07001.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2015.

GHOSE T. K. Measurement of Cellulase Activities. Pure & Applied Chemistry, v.59, p.257-268, 1987. Disponível em: <[http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/427823/PBI5214/Ghose 1987 Media satividadecelulase.pdf](http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/427823/PBI5214/Ghose%201987%20Media%20atividade%20de%20celulase.pdf)>. Acesso em: 23 jul. 2015.

GOUVEIA, Ester Ribeiro; NASCIMENTO, Renata Trajano do; SOUTO-MAIOR, Ana Maria. Validação da Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-Açúcar. Química Nova, Lorena, v. 32, n. 6, p.1500-1503, fev. 2009. Mensal. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/26.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2015.

MACEDO, Isaias C. Situação Atual e Perspectivas do Etanol. Revista Estudos Avançados, n. 59, p.77-91. Edição jan./abril. Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/cana2_000g7quvbee02wx5ok0wtedt39a3i85k.pdf>. Acesso em: 22 set. 2015.

MANDELS, M; STERNBERG, D. Recent Advances in Cellulase Technology. J. Ferment. Technol., v. 54, p. 267-286, 1976.

MELLO, Léa Rita Pestana Ferreira; VERGÍLIO, Renata Machado; MALI, Suzana. Caracterização Química e Funcional do Resíduo Fibroso da Indústria Cervejeira. BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 2, n. 3esp, p. 191-194, 2013; Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/15746>>. Acesso em: 26 mar. 2015.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. v. 31, p. 426-428, 1959; SORIANO, J. R. M. Central de cevada. São Paulo. Disponível em: <<http://puls.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 20 mai. 2015.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise F.S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. Química Nova, São Paulo, v. 33, p.1549-1558, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n7/a23v33n7.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 15.

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de Diferentes Pré-tratamentos e Deslignificação Alcalina na Sacarificação da Celulose de Palha de Cana.** Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de Lorena, USP. 2010; Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

OLIVEIRA, Luís Ricardo Martins. **Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose.** 2012. Tese de Doutorado - Curso de Ciências, Escola de Engenharia de Lorena. Universidade Federal de São Paulo. Lorena, 2012. Disponível em:< <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde-30082013-142751/pt-br.php>>. Acesso em: 21 set. 2015.

OLIVÉRIO, José Luiz; SOARES, Paulo Augusto. O Processo DHR: Dedini Hidrólise Rápida. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.ie.ufrj.br/oldroot/infosucro/>>. Acesso em: 26 out. 2015.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C.; OLIVEIRA, R. A. & PARK, K. J. B. Conceitos de processo e Equipamentos de secagem. Campinas, 2007. Disponível em:< <http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/concproceqse>> Acesso em: 16 jun. 2015.

PARK, K.J.; ANTONIO, G.C. Análises de Materiais Biológicos. P.21. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006. Disponível em:< http://www.feagri.unicamp.br/ctea/manuais/analise_matbi>. Acesso em: 01 fev. 2015.

PIETROBON, Vivian Cristina. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais.** 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/111138/tde-18112008-154538/pt-br.php>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

SAAD, Marcelo Brant Wurthmann. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado – Curso de Ciências, Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Lorena, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97131/tde>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

SANTOS, Angela Alves dos. **Metabolização da Celobiose por Leveduras Isoladas a partir de Biomassa Lignocelulósica em Decomposição**. 2014. 21 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2014.

SICOBÉ - Sistema de Controle de Produção de Bebidas. Produção cervejas e refrigerantes. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/PessoaJuridica/Bebida>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of Ligno-cellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002. Disponível em: <<http://stl.bee.oregonstate.edu/courses/ethanol/restricted/>>. Acesso em: 06 nov. 2015.

STREIT, Fernanda. Redução de Tamanho: Moagem. 2000. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/alimentus1/feira/optransf/opt_moa>. Acesso em: 15 maio 2015.