

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Luciana Luft

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE MALTE USANDO
TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS VISANDO À OBTENÇÃO DE
AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Santa Maria, RS
2016

Luciana Luft

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE MALTE USANDO TECNOLOGIAS
ALTERNATIVAS VISANDO À OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luft, Luciana
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE MALTE USANDO
TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS VISANDO À OBTENÇÃO DE AÇÚCARES
FERMENTESCÍVEIS / Luciana Luft.- 2016.
133 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Coorientador: Juliana R. F. da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2016

1. Bagaço de Malte 2. Hidrólise Enzimática 3. Açúcares
Fermentescíveis 4. Ultrassom 5. Dióxido de Carbono
Supercrítico I. Mazutti, Marcio Antonio II. F. da Silva,
Juliana R. III. Título.

Luciana Luft

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE MALTE USANDO TECNOLOGIAS
ALTERNATIVAS VISANDO À OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovado em 26 de julho de 2016:

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)
Presidente/Orientador

Juliana R. F. da Silva, Dra. (UFSM)
Co-orientadora

Sergio Luiz Jahn, Dr. (UFSM)

Wagner Luiz Priamo, Dr. (IFRS)

Santa Maria, RS
2016

*Dedico este trabalho ao meu avô, Ottmar Luft (in memorian),
pelo zelo eterno e pelos ensinamentos de vida...
Dedico também aos meus pais e ao meu Amor,
por toda dedicação e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, meu porto seguro, pelo dom da vida e por estar sempre a meu lado iluminando o caminho.

Aos meus melhores e mais brilhantes mestres, meus pais, **Clério e Elisete**, pelo amor incondicional. Ensinarão-me qual o verdadeiro sentido da vida...minha infinita gratidão.

Ao meu amado, **Diego**, pelo amor, pelo incentivo sem fim, pela paciência, e principalmente encorajamento nas horas difíceis mostrando que para tudo há uma solução.

Ao meu orientador Prof.^o Dr. **Marcio Antonio Mazutti**, por ter acreditado na minha capacidade e prestado todo o suporte necessário para a realização deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos e pela confiança.

A todos os meus **familiares**, por sempre vibrarem e torcerem por mim...

À minha querida amiga **Ruziele**, por ter mostrado o caminho quando eu havia perdido as esperanças e também por ter aberto as portas da sua casa para me receber.

Ao casal de amigos, **Tássia e Izelmar**, que madrugaram e pernoitaram comigo no laboratório, principalmente durante a realização dos experimentos com o sistema supercrítico, sem falar das caronas e conversas de todos os dias.

Aos **colegas e amigos** pelos bons momentos que partilhamos durante esses dois anos de convívio diário.

À minha co-orientadora, Dr^a. **Juliana R. F. da Silva**, por todo o auxílio e disposição.

Aos professores Prof.^o Dr. **Sergio Luiz Jahn** e Prof^a. Dr^a. **Laura Plazas Tovar** pela gentileza e colaboração prestadas durante a realização deste trabalho.

Agradeço à **UFSM**, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e a todos os professores e técnicos pelos ensinamentos compartilhados durante esta trajetória.

À **CAPES** por conceder a bolsa de estudos para a realização do mestrado.

Meus sinceros agradecimentos.

*“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre os ramos muito leves,
sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”*

Victor Hugo

RESUMO

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE MALTE USANDO TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS VISANDO À OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

AUTORA: Luciana Luft
ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti

Este trabalho teve como objetivo estudar a hidrólise enzimática do bagaço de malte, utilizando agitação mecânica, sonda de ultrassom e CO₂ supercrítico. A hidrólise enzimática foi realizada sobre o amido granular. Para tanto, foi utilizado um complexo amilolítico comercial próprio para este tipo de hidrólise, STARGEN™ 002. Para cada tecnologia foram estudadas diferentes variáveis. O primeiro planejamento foi realizado para a hidrólise assistida por agitação mecânica e as variáveis estudadas foram temperatura (°C), concentração de enzima (% m/m) e concentração de substrato no meio (m/m). Foram encontradas concentrações de ART de até 75,5 g por kg de substrato e todas as variáveis apresentaram efeito significativo sobre a resposta. Essa concentração de ART, foi definida como rendimento mássico do processo e este valor foi corroborado com uma cinética, desenvolvida nas mesmas condições do melhor ensaio, com leve aumento apenas na temperatura (70°C), e indicou valor concernente ao anterior além de provar que o tempo de 4 horas de hidrólise foi suficiente. A partir deste primeiro planejamento, as variáveis temperatura (70°C), concentração de enzima (8,2%) e concentração de substrato (170 g.L⁻¹) foram fixadas para a realização da hidrólise assistida por ultrassom, de forma direta e indireta. As variáveis investigadas neste segundo planejamento foram amplitude (%) e fator de pulso (-) durante 2 horas de reação. Com aplicação de sonicação direta, foi possível alcançar 100% de eficiência no processo de conversão do amido. A resposta encontrada para o melhor ensaio (5) foi de 370,86 g.kg⁻¹. Já com aplicação de sonicação indireta, a eficiência do processo caiu pela metade e o melhor resultado foi para o ensaio de número 6, com concentração de 162,96 g ART/ kg de substrato. Uma cinética para o melhor ensaio de sonicação direta foi desenvolvida durante 3 horas, atestando que o ultrassom aumenta a velocidade da reação resultando no melhor rendimento em menor tempo comparado às outras técnicas. Para as reações com CO₂ supercrítico, foi estudada a influência da umidade, da temperatura e pressão, onde o melhor resultado obtido, entre todas as reações, foi com a utilização de pressão de 175 bar, temperatura de 40°C e 80% de água adicionada ao bagaço, resultando em 104,28 g de ART por kg de bagaço seco. Esse valor corresponde a 11,53% de eficiência da reação de hidrólise do amido em açúcares redutores totais. De um modo geral, os processos obtiveram um bom desempenho na obtenção de açúcares fermentescíveis, destacando-se o ultrassom em relação as demais tecnologias testadas.

Palavras chave: Bagaço de Malte. Hidrólise Enzimática. Açúcares Fermentescíveis. Agitação mecânica. Ultrassom. Dióxido de carbono supercrítico.

ABSTRACT

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MALT BAGASSE USING ALTERNATIVE TECHNOLOGIES AIMING THE OBTAINMENT OF FERMENTABLE SUGARS

AUTHOR: Luciana Luft
ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti

This work aimed to study the enzymatic hydrolysis of malt bagasse, using mechanical agitation, ultrasonic probe and supercritical CO₂. Enzymatic hydrolysis was performed on granular starch. For this, was used a commercial amylolytic complex suitable for this type of hydrolysis, STARGEN™ 002. For each technology were studied different variables. The first planning was carried out for the hydrolysis assisted by mechanical agitation and the variables studied were temperature (°C), enzyme concentration (% m/m) and substrate concentration in the medium (m/m). TRS concentrations were found up to 75.5 g per kg of substrate and all variables had a significant effect on the response. This concentration of TRS was defined as mass yield of the process and this yield was corroborated by a kinetic, developed under the same conditions, with slight increase in temperature (70°C). From this initial planning, the temperature variables (70°C), enzyme concentration (8.2%) and substrate concentration (170 g.L⁻¹) were fixed to carry out the hydrolysis assisted by direct and indirect ultrasound. The variables were investigated in the second planning were amplitude (%) and pulse factor (-) for 2 hours of reaction. With the application of direct sonication, it was possible to achieve 100% efficiency in the starch conversion process. The TRS for the best essay (5) was 370.86 g.kg⁻¹. For indirect sonication TRS concentration at the best condition (run 6) was 162.96 g / kg of substrate. A kinetic assay for the best condition under direct sonication was carried out for 3 hours, confirming that the ultrasound increases the reaction rate resulting in better yields in less time compared to the other techniques. For reactions with supercritical CO₂ was studied the influence of the moisture content, temperature and pressure, where the best result among all the reactions was using at pressure 175 bar, 40 °C for temperature and moisture content of 80%, resulting in 104.28 g of TRS per kg of dry pulp. Ultrasound showed better results than other technologies investigated in this study.

Keywords: Malt bagasse. Enzymatic Hydrolysis. Fermentable sugars. Mechanical agitation. Ultrasound. Supercritical carbon dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Refinaria de petróleo versus biorrefinaria.	34
Figura 2 - Conceito da Biorrefinaria de Duas Plataformas.	35
Figura 3 - Desenho esquemático do processo produtivo de cerveja.	38
Figura 4 - Desenho esquemático do grão de cevada e exemplificação da mudança ocorrida no endosperma.	40
Figura 5 - Representação esquemática do grânulo de amido.	44
Figura 6 - Esquema das ligações glicosídicas presentes em cadeias de amido.	45
Figura 7 - Estrutura linear da amilose.	47
Figura 8 – Estrutura da amilopectina.	48
Figura 9 - Estrutura de cluster mostrando as cadeias de amilopectina.	48
Figura 10 - Ação catalítica das enzimas.	51
Figura 11 - Enzimas que podem ser empregadas para a hidrólise do amido.	52
Figura 12 - Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas.	53
Figura 13 - Esquema do fenômeno de cavitação.	58
Figura 14 - Diagrama de fases para uma substância pura.	60
Figura 15 - Fluxograma de uma cervejaria.	64
Figura 16 - (a) Bagaço de malte in natura; (b) Bagaço de malte após secagem e (c) Bagaço de malte após moagem.	65
Figura 17 - Moinho de sapatas.	66
Figura 18 - Analisador de umidade por Infravermelho.	67
Figura 19 - Sistema Soxhlet para determinação de extrativos.	69
Figura 20 - Biorreator - Agitação mecânica.	72
Figura 21 - Sonicação direta de ultrassom.	74
Figura 22 - Sonicação Indireta de ultrassom.	75
Figura 23 - Vista parcial da unidade para utilização de CO ₂ supercrítico (sem cilindro).	76
Figura 24 - Unidade experimental do sistema supercrítico.	77
Figura 25 - Extração de açúcar fermentável após hidrólise com CO ₂ supercrítico.	78
Figura 26 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com agitação mecânica.	93

Figura 27 - Curva de contorno mostrando a influência da temperatura e concentração de enzima sobre produção de ART na hidrólise com agitação mecânica.....	95
Figura 28 - Curva de contorno mostrando a influência da concentração de substrato e de enzima sobre a produção de ART na hidrólise com agitação mecânica.....	96
Figura 29 - Curva de contorno mostrando a influência da concentração de substrato e temperatura sobre a produção de ART na hidrólise com agitação mecânica.....	96
Figura 30 - Cinética da hidrólise enzimática com agitação mecânica.....	97
Figura 31 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com sonicação direta.....	99
Figura 32 - Curva de contorno mostrando a influência da temperatura e concentração de enzima sobre produção de ART na hidrólise com sonicação direta.	101
Figura 33 - Cinética da hidrólise enzimática com ultrassom.	102
Figura 34 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com sonicação indireta.	104
Figura 35 - Curva de contorno mostrando a influência da temperatura e concentração de enzima sobre produção de ART na hidrólise com sonicação indireta.....	105
Figura 36 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com CO ₂ supercrítico.....	108
Figura 37 - Cinética da hidrólise enzimática com CO ₂ supercrítico.	109
Figura A.1 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise com agitação mecânica (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).....	132
Figura A.2 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise assistida por ultrassom com sonicação direta (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).....	132
Figura A.3 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise assistida por ultrassom com sonicação indireta (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).....	133
Figura A.4 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise com CO ₂ supercrítico (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação da composição química da cevada e do malte (% b.s).	41
Tabela 2 - Classificação das enzimas segundo o tipo de reação catalisada.....	51
Tabela 3 - Valores característicos das propriedades físicas dos gases, líquidos e fluidos supercríticos.....	61
Tabela 4 - Características do complexo enzimático.	65
Tabela 5 - Composição do reagente original de DNS.	70
Tabela 6 - Níveis de variáveis independentes investigadas no delineamento composto central rotacional.	73
Tabela 7 - Níveis de variáveis independentes investigadas no DCCR para hidrólise com ultrassom (sonicação direta e indireta).	75
Tabela 8 - Níveis de variáveis independentes investigadas no delineamento composto central rotacional para CO ₂ supercrítico.	78
Tabela 9 – Composição química parcial do bagaço de malte.	88
Tabela 10 - Composição lignocelulósica do bagaço de malte.....	90
Tabela 11 - Composição lignocelulósica (% w/w) do bagaço de malte previamente relatada na literatura.....	91
Tabela 12 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, 2 ³	92
Tabela 13 - Coeficientes de regressão para a resposta ART com agitação mecânica.	94
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA).	94
Tabela 15 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR (US- SD).....	98
Tabela 16 - Coeficientes de regressão para a resposta ART com sonicação direta.	99
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) – Sonicação direta.....	100
Tabela 18 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, SI.....	103
Tabela 19 - Coeficientes de regressão para a resposta ART com sonicação indireta.	104
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) – SI.....	105
Tabela 21 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, 2 ³ (supercrítico).	107
Tabela 22 - Resultados obtidos nos processos de hidrólise estudados.....	112
Tabela A.1 – Dados das curvas de calibração.....	129

Tabela A.2 – Resultados obtidos (triplicatas) por CLUE posteriormente utilizados nos cálculos de quantificação dos carboidratos.....	130
Tabela A.3 – Dados das curvas analíticas.....	131
Tabela A.4 - Quantificação do teor de açúcares nos licores dos diferentes processos de hidrólise.....	131

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	67
Equação (2).....	70
Equação (3).....	79
Equação (4).....	79
Equação (5).....	79
Equação (6).....	81
Equação (7).....	82
Equação (8).....	82
Equação (9).....	82
Equação (10).....	83
Equação (11).....	83
Equação (12).....	84
Equação (13).....	85
Equação (14).....	85
Equação (15).....	94
Equação (16).....	100
Equação (17).....	104

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 FONTES ALTERNATIVAS DE ENERGIA E MATERIAIS: PERSPECTIVAS...31	
3.1.1 Biomassa e os resíduos agroindustriais	31
3.1.2 Biorrefinaria	33
3.2 MATÉRIA-PRIMA.....	36
3.2.1 Cerveja e o seu processamento	36
3.2.1.1 Malte de cevada	39
3.2.1.2 Bagaço de Malte (BM)	41
3.2.2 Matérias-primas amiláceas	43
3.2.2.1 Amido	44
3.2.2.1.1 Amilose.....	46
3.2.2.1.2 Amilopectina	47
3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	49
3.3.1 Hidrólise enzimática de materiais amiláceos	49
3.3.2 Enzimas	50
3.3.2.3 Enzimas amilolíticas	52
3.3.3 Hidrólise do amido granular	54
3.4 TECNOLOGIAS USADAS NA HIDRÓLISE	56
3.4.1 Agitação Mecânica.....	56
3.4.2 Ultrassom.....	57
3.4.3 Dióxido de carbono supercrítico.....	59
4 MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	63
4.2 ENZIMAS UTILIZADAS.....	64
4.3 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA	65
4.3.1 Secagem em estufa a 60°C	65
4.3.2 Moagem.....	66
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	66

4.4.1	Determinação de umidade	66
4.4.2	Teor de umidade após secagem	67
4.4.3	Determinação granulométrica	67
4.4.4	Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)	68
4.4.5	Determinação do teor de amido	68
4.4.6	Teor de amilose e amilopectina.....	68
4.4.7	Determinação de proteínas	68
4.4.8	Determinação de extrativos.....	69
4.4.9	Determinação de pH	70
4.5	DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS E COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	70
4.5.1	Dosagem de Açúcares Redutores Totais (ART)	70
4.5.2	Quantificações por cromatografia líquida (UPLC)	71
4.6	REAÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	71
4.6.1	Hidrólise enzimática usando agitação mecânica.....	71
4.6.1.1	Equipamento	71
4.6.1.2	Procedimento experimental	72
4.6.1.3	Delineamento composto central rotacional	72
4.6.2	Hidrólise enzimática assistida por ultrassom.....	73
4.6.2.1	Equipamento	73
4.6.2.2	Sonicação Direta.....	73
4.6.2.3	Sonicação indireta.....	74
4.6.2.4	Delineamento composto central rotacional	75
4.6.3	Hidrólise enzimática com CO ₂ supercrítico	76
4.6.3.1	Equipamento	76
4.6.3.2	Procedimento experimental	77
4.6.3.3	Determinação de açúcares redutores totais.....	77
4.6.3.4	Delineamento composto central rotacional	78
4.6.4	Rendimento e eficiência de hidrólise	79
4.6.5	Análise estatística	80
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	80
4.7.1	Preparação da biomassa lignocelulósica para caracterização	80
4.7.1.1	Hidrólise ácida concentrada.....	80
4.7.1.2	Hidrólise ácida diluída	81
4.7.1.3	Determinação da lignina insolúvel.....	81

4.7.1.4 Determinação de cinzas	81
4.7.1.5 Determinação da lignina solúvel na fração líquida	82
4.7.1.6 Quantificação de carboidratos	82
4.7.1.7 Teor de furfural e hidroximetilfurfural	84
4.7.1.8 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	87
5.2 HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS	92
5.2.1 Hidrólise enzimática usando agitação mecânica	92
5.2.2 Hidrólise enzimática usando ultrassom.....	98
5.2.2.1 Sonicação Direta	98
5.2.2.2 Sonicação Indireta.....	103
5.2.3 Hidrólise enzimática usando CO ₂ supercrítico	106
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
REFERÊNCIAS	115
APÊNDICE.....	129

1 INTRODUÇÃO

Em pleno século XXI, a população se depara com numerosos problemas limitantes do seu progresso. Como consequência, surge a necessidade imprescindível pela busca de alternativas que busquem solucioná-los, ou que ao menos possam amenizá-los momentaneamente. Com o passar dos anos, o uso indiscriminado das fontes fósseis tem resultado não apenas em preocupações devido ao impacto ambiental que causam, mas também, a um inevitável esgotamento das mesmas. Uma possível solução para estes problemas é foco de muitas pesquisas que visa a substituição de materiais oriundos destas fontes não-renováveis, por outros que possam ser provenientes de fontes renováveis, resultando concomitante e diretamente na solução de outro problema atual: o grande acúmulo de resíduos no meio ambiente (CINELLI, 2012).

A utilização de resíduos agroindustriais e de matérias-primas renováveis oriundas de biomassa de diversas origens, é instigada e tem fundamental importância para a construção de diversos setores da bioeconomia, baseada em inovações de biocombustíveis e bioprodutos. A biomassa é definida como qualquer matéria orgânica de origem vegetal e, assim como os fósseis, é um material rico em carbono, apresentando-se como uma alternativa viável de grande potencial para atender aos desafios da sustentabilidade (RODRIGUES, 2011).

Por trás desta busca desenfreada por alternativas que possibilitem o uso da biomassa como fonte de energia para novos produtos e que em conjunto resulte no melhor rendimento desta biotransformação está inserido o conceito de biorrefinaria. Existem várias plataformas que podem ser empregadas em uma biorrefinaria, porém as plataformas mais importantes são a plataforma de açúcar e de gás de síntese (ZAFAR, 2015). Convém ressaltar que a plataforma de açúcar é baseada em uma rota bioquímica que “quebra” a biomassa em diferentes tipos de açúcares para uma fermentação posterior ou outro processamento biológico e que ainda requer melhoramentos das características da matéria-prima e da eficácia das enzimas, além de outras melhorias importantes (WILLIAMSON, 2011).

A fim de colaborar com as deficiências presentes nas biorrefinarias de forma eficaz e sem que haja um encarecimento de processo, surgem a cada dia novas pesquisas em busca de tecnologias que possam agregar mais valor aos produtos. Uma destas pesquisas envolve a seleção de matérias-primas ideais para o processo

de conversão. Os requisitos para estas matérias-primas incluem vários fatores tais como: disponibilidade, preço e qualidade em relação ao processo de conversão (BOMTEMPO, 2010).

O aproveitamento de resíduos provenientes da agroindústria como matéria-prima pode ajudar a resolver problemas ambientais associados à disposição dos mesmos no meio ambiente e ao mesmo tempo impactar positivamente na economia. A biomassa oriunda dos resíduos agrícolas caracteriza-se pela elevada quantidade de material lignocelulósico e amido em sua composição (LIGUORI, 2015; MUSSATO, 2006).

O bagaço de malte é um resíduo oriundo da indústria cervejeira formado pela parte sólida obtida de filtração do mosto após a maceração (SANTOS, RIBEIRO, 2005). O setor cervejeiro brasileiro é o mais importante do mercado sul-americano e um dos maiores do mundo. Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil) o Brasil produziu 14 bilhões de litros de cerveja no ano de 2014. Sabe-se, que em média, a cada 100 L de cerveja são gerados 20 kg de bagaço (REINOLD, 1997); logo, no ano de 2014 foram geradas aproximadamente 2,8 milhões de toneladas de bagaço de malte. Até o momento, o bagaço de malte tem sido mais utilizado para alimentação animal (principalmente bovinos) ou então depositado em aterros. No entanto, estudos recentes revelaram o seu potencial para a produção de uma ampla gama de bioprodutos de alto valor agregado (MUSSATO, 2006; 2014).

A obtenção de açúcares a partir de matérias-primas amiláceas requer processos que envolvam a hidrólise do material, a qual consiste em converter o amido em açúcares fermentescíveis, geralmente por meio de um processo enzimático a elevadas temperaturas adotadas para a gelatinização e hidrólise do amido. As principais enzimas que atuam como catalisadoras dessa reação de hidrólise são as amilases, como a glicoamilase e a α -amilase (CINELLI, 2012).

Com o intuito de reduzir os custos decorrentes da elevada demanda energética da hidrólise, surge como alternativa a hidrólise realizada em temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização do amido, ou seja, sobre o amido granular (processo conhecido como *cold hydrolysis*) (ROBERTSON et al., 2006). Diferentemente dos processos convencionais, neste processo, é necessária a ação conjunta de um “complexo” enzimático sobre o amido na forma granular, eliminando os processos de liquefação e cozimento e permitindo a redução no consumo de energia (GALVEZ, 2005).

Além disso, com o avanço das tecnologias, surgem novas e eficientes formas de realizar o processo de hidrólise além do processo convencional usando agitação mecânica. Uma delas é o uso do ultrassom, onde há efeitos físicos como a cavitação que melhoram a transferência de massa. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (MARTINEZ et al., 2000). Outra tecnologia promissora nos processos de hidrólise é a supercrítica, a qual tem sido implantada e incentivada com a descoberta de que enzimas podem manter a atividade biocatalítica em altas pressões. O uso de fluidos supercríticos no pré-tratamento ou diretamente na hidrólise são utilizados para aumentar a digestibilidade do substrato deixando o polímero mais acessível ao ataque enzimático (ALVIRA et al., 2010). O solvente mais utilizado nesta tecnologia é o dióxido de carbono pois permite operações supercríticas com pressões relativamente baixas e temperaturas próximas à ambiente.

Neste contexto, o presente trabalho teve como finalidade investigar o uso das tecnologias de ultrassom e dióxido de carbono supercrítico comparada a agitação mecânica na hidrólise do amido granular do bagaço de malte para obtenção de açúcares fermentescíveis, empregando enzimas que atuam em baixas temperaturas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um processo de hidrólise enzimática para a obtenção de açúcares fermentescíveis a partir de um resíduo agroindustrial rico em amido (bagaço de malte), com a utilização de diferentes tecnologias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a hidrólise enzimática do bagaço de malte com agitação mecânica (método convencional);
- ✓ Realizar a hidrólise enzimática do bagaço de malte assistida por ultrassom (sonicação direta e indireta);
- ✓ Realizar a hidrólise enzimática do bagaço de malte com o uso de CO₂ supercrítico;
- ✓ Comparar os rendimentos de açúcares fermentescíveis das hidrólises de bagaço de malte;
- ✓ Realizar a caracterização química do bagaço de malte *in natura*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FONTES ALTERNATIVAS DE ENERGIA E MATERIAIS: PERSPECTIVAS

Nos dias atuais as necessidades energéticas do planeta ainda são baseadas principalmente nos combustíveis fósseis. As reservas destes depósitos são limitadas e a sua exploração tem causado sérios problemas ambientais, tais como o efeito estufa causado pela queima dos gases e graves acidentes, como o ocorrido na explosão da plataforma da *British Petroleum* no Golfo do México. Em decorrência, a busca por fontes alternativas renováveis tem se intensificado para suprir o constante aumento de demanda energética e de matéria-prima (RODRIGUES, 2011).

Pesquisadores tem redirecionado seus interesses em biocombustíveis que tem como fonte a biomassa, e estes parecem ser a única alternativa lógica para o desenvolvimento sustentável no contexto econômico e ambiental. Fontes renováveis são avaliadas globalmente a partir da biomassa agrícola e de outros resíduos, os quais podem ser transformados em biocombustíveis líquidos assim como em outros materiais. Contudo, o processo de conversão, ou a transformação química, enquanto utilizada em larga escala comercial de biocombustíveis ainda é bastante cara. Logo, ainda há necessidade de muitas pesquisas em busca de um processo de conversão efetivo economicamente e ao mesmo tempo eficiente (NIGAM; SINGH, 2010).

Na corrida para desenvolver os novos produtos e processos que formarão a bioindústria do futuro, a busca por matérias primas adequadas é crucial, principalmente no caso dos processos baseados em biotecnologia. Para muitos destes, e provavelmente para os mais inovadores, o açúcar é a matéria prima de eleição (BOMTEMPO, 2011).

3.1.1 Biomassa e os resíduos agroindustriais

A biomassa é uma das poucas fontes que tem potencial para atender os desafios de sustentabilidade e aparenta ser uma alternativa viável frente aos recursos fósseis para a produção de combustíveis de transportes e de produtos químicos, já que assim como os fósseis, é um material rico em carbono (RODRIGUES, 2011).

A biomassa é um recurso renovável quimicamente complexo, formada por carboidratos, lignina, proteínas, gorduras e numa menor extensão, por várias outras

substâncias (NREL, 2016). Em geral, a biomassa é definida como qualquer matéria orgânica de origem vegetal e a sua produção, como resultado da reação de fotossíntese, depende essencialmente da energia solar e da presença de água e dióxido de carbono, além de outros requisitos importantes associados à incorporação de nutrientes, como a fertilidade do solo, por exemplo. A energia é armazenada nas ligações químicas dos componentes estruturais da biomassa mediante processos fotossintéticos (BNDES, 2008). Esta energia, denominada como bioenergia, está disponível de forma sustentável e pode ser obtida a partir de produtos animais e seus resíduos, da produção de alimentos e rações agrícolas, de culturas herbáceas ou lenhosas, de resíduos ou subprodutos agroindustriais e/ou industriais, de plantas aquáticas, entre outros, incluindo alguns resíduos urbanos (NREL, 2016).

Os resíduos agroindustriais despertam grande interesse, visando a sua conversão em uma gama de bioprodutos de maior valor agregado. A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis, como o etanol, apresenta vantagens, principalmente econômicas e ambientais, frente aos processos industriais que utilizam cultivos de biomassa de composição amiláceas. O aproveitamento de resíduos provenientes de outros processos propicia o uso de insumos de baixo custo, evita o acúmulo indesejado dessas biomassas no meio ambiente, e sua utilização pode ser implantada sem que haja competição direta com a alimentação humana (PANDEY et al., 2000; RATTANACHOMSRI et al., 2009).

De acordo com Leitão et. al. (2010) as diversas atividades agrícolas de vários países e regiões estão direcionando a pesquisa para soluções tecnológicas regionais considerando uma gama de vantagens assim como sua complexidade tecnológica. Uma grande variedade de substrato tem sido considerada, da mais simples para a mais complexa: açúcares (da cana de açúcar, beterraba, melão, sorgo e frutas) que podem ser convertidos diretamente a etanol; amido (do milho, mandioca e trigo); e biomassa (principalmente dos resíduos agrícolas e madeira).

Segundo Rodrigues (2011) para cada tipo de biomassa deve ser empregada uma estratégia específica. Para a produção de moléculas definidas a hidrólise de biomassa é mais adequada. Entretanto, estratégias hidrolíticas não são adequadas para todos os tipos de biomassa, como aquelas ricas em triglicéridos ou lignina. Pirólise e gaseificação são mais adequadas para frações de baixo conteúdo de carboidratos. Por outro lado, frações enriquecidas em carboidratos são preferidas

pelos métodos biológicos para geração de álcoois e especialidades químicas em uma biorrefinaria totalmente integrada.

3.1.2 Biorrefinaria

Um complexo fabril análogo ao de uma refinaria de petróleo, chamado “biorrefinaria”, tem sido proposto para produzir combustíveis, produtos químicos de valor agregado e energia a partir da conversão da biomassa (NREL, 2016). Através da produção de vários produtos, a biorrefinaria leva vantagem de maximizar o valor derivado a partir da matéria-prima. A biorrefinaria poderia, por exemplo, produzir produtos químicos em baixo volume, mas de alto valor, ou então de alto volume, mas de baixo valor, como combustíveis líquidos de transporte como o biodiesel ou bioetanol. Os projetos da biorrefinaria são focados na fabricação de combustíveis, solventes, químicos, plásticos e alimentos para o consumo humano. Em alguns países estes produtos são produzidos a partir da biomassa residual (ZAFAR, 2015).

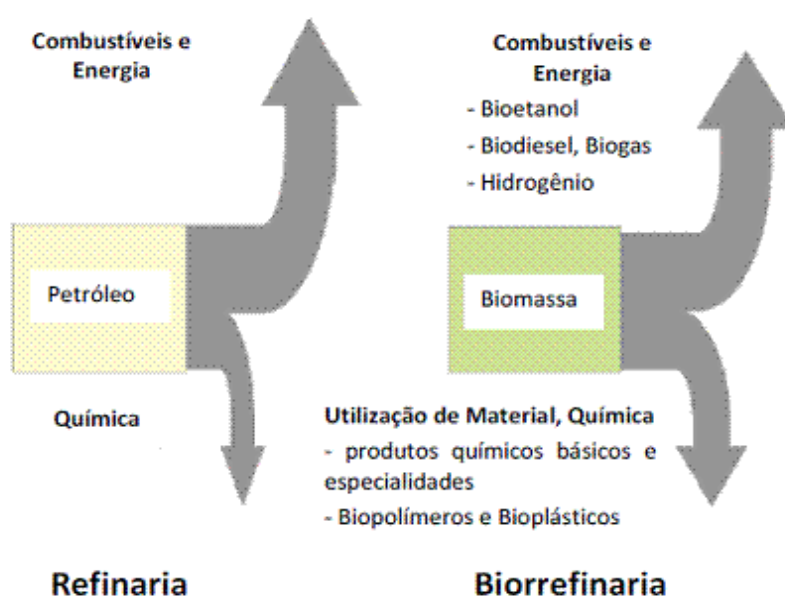
Segundo Kamm et. al. (2006) a conversão biotecnológica irá se tornar, com a conversão química, uma grande jogada no futuro (Figura 1). Como descrito, o funcionamento de uma biorrefinaria baseia-se no princípio das refinarias de petróleo, onde o conteúdo da biomassa é sintetizado naturalmente e a sua estrutura é totalmente diferente daquela usada pela refinaria de petróleo.

Diferentemente do petróleo, a composição da biomassa é heterogênea, ou seja, as fontes de biomassa são grãos, madeira, grama e resíduos biológicos contendo carbono, hidrogênio e oxigênio, além de constituintes bem menores formados principalmente por nitrogênio e enxofre. A vantagem desta ampla variedade na composição da biomassa é que as biorrefinarias podem produzir um conjunto maior de classes de produtos do que as refinarias de petróleo, já que são alimentadas por amplas variedades de matérias-primas. A desvantagem é que um número bem maior de processos tecnológicos é necessário, além do que muitos destes processos ainda se encontram em estágio de desenvolvimento (KAM, 2006).

Acredita-se que a biorrefinaria baseada em materiais lignocelulósicos poderá ter sucesso através da combinação de diferentes tecnologias e estratégias de processamento da biomassa para a produção de diversos combustíveis e produtos químicos. Os desafios a serem superados devem ser baseados em: desenvolvimento continuado de estratégias robustas para a produção de plataformas químicas de

moléculas; aplicações de plataformas químicas para a produção de especialidades químicas e hidrocarbonetos; estratégias simples para a desconstrução da biomassa; métodos para a combinação sinérgica de processos hidrolíticos e termoquímicos em biorrefinarias totalmente integradas; implementação de processos em cascata combinados com o desenvolvimento de esquemas simples de separação e purificação de produtos e, metodologias para a utilização de lignina (RODRIGUES, 2011).

Figura 1 - Refinaria de petróleo versus biorrefinaria.



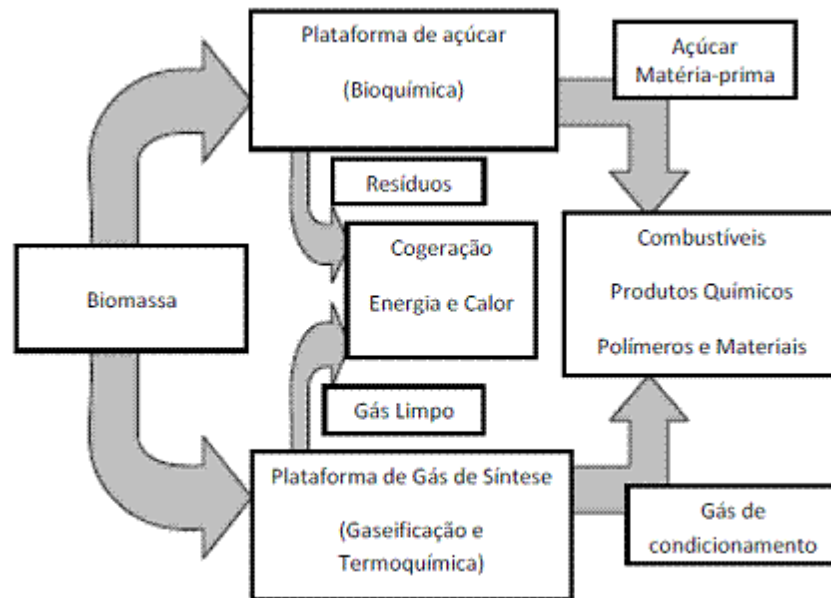
Fonte: Adaptado de KAMM et al. (2006).

Existem diversas plataformas que podem ser empregues em uma biorrefinaria (Figura 2), sendo as mais importantes a plataforma de açúcar e a plataforma termoquímica (também conhecida como plataforma de gás de síntese). A plataforma de açúcar da biorrefinaria quebra a biomassa em diferentes tipos de açúcares para posterior fermentação ou outro processamento biológico em vários combustíveis e produtos químicos. A plataforma de gás de síntese é baseada nos processos de conversão termoquímica e focada na gaseificação da biomassa e bioprodutos (ZAFAR, 2015).

A rota bioquímica ainda requer melhoramento das características ideais da matéria-prima a fim de maximizar a sua eficiência de conversão, redução de custos por meio de processos adequados de pré-tratamento, melhoramento da eficácia das enzimas, redução dos custos de produção, integração de processo e melhorias em

geral. Segundo especialistas a rota termoquímica, um processo mais maduro e há muito tempo em operação em processos de conversão de carvão e gás natural, tem menores oportunidades de redução de custos (WILLIAMSON, 2011).

Figura 2 - Conceito da Biorrefinaria de Duas Plataformas.



Fonte: Adaptado de KAMM et al. (2006).

As biorrefinarias podem ajudar na utilização do potencial energético de resíduos orgânicos e também podem resolver os problemas de gestão de resíduos e emissões de gases de efeito estufa. Os resíduos de biomassa podem ser convertidos, por meio de tratamento enzimático/químico apropriado. A densidade de energia e propriedades físicas dos resíduos de biomassa agrícolas são fatores críticos para certas matérias-primas e precisam ser entendidas de forma a coincidir com uma tecnologia de matéria-prima e processamento. Há seis tecnologias de processamento de biomassa genéricas com base na combustão direta (para energia), na digestão anaeróbia (para gás rico em metano), na fermentação (de açúcares para álcoois), na extração de óleo (para o biodiesel), na pirólise (para gás e óleos) e na gaseificação (para monóxido de carbono e gás de síntese rico em hidrogênio). Estas tecnologias podem então ser seguidas por um conjunto de tratamentos secundários

(estabilização, desidratação, atualização de refino), dependendo dos produtos finais específicos (ZAFAR, 2015).

Algumas dessas novas tecnologias ainda estão em fase de desenvolvimento e pesquisa, guiadas por requisitos ambientais, mas, cada vez mais, também por determinantes econômicos, uma vez que respondem a desafios para o crescimento da demanda por fontes de matérias-primas e energia, como são fontes de crescimento econômico potencial e lucros extraordinários da inovação em uma nova revolução tecnológica (BASTOS, 2012).

3.2 MATÉRIA-PRIMA

Em um contexto mundial, a utilização das biomassas residuais vem sendo cada vez mais explorada. Problemas ambientais, como a disposição de resíduos provenientes da indústria no meio ambiente, podem ser solucionados com o aproveitamento destes. Uma estratégia que aparece com grande potencial para que isso se torne possível seria o desenvolvimento de processos biotecnológicos que aproveitem estes resíduos. Além da possibilidade de agregar valor a uma matéria-prima subutilizada a sua utilização pode ocorrer sem que haja competição com a produção de alimentos (CINELLI, 2012).

Todas essas questões têm impulsionado a busca por inovações em processos e por diferentes matérias-primas. A procura pelas matérias-primas ideais evolui rapidamente, os requisitos para estas incluem vários fatores, dificilmente conciliáveis, tais como: disponibilidade, preço, qualidade em relação ao processo de conversão, sempre levando em conta a sustentabilidade ambiental (BOMTEMPO, 2010).

3.2.1 Cerveja e o seu processamento

A cerveja, assim como o vinho, pode ser considerada uma das bebidas mais antigas do mundo. Os historiadores datam os primeiros indícios do surgimento da cerveja na Palestina em 8.000 antes de Cristo. Os egípcios e os sumérios produziam cervejas há mais de 5.000 anos e há indícios que os babilônios já fabricavam mais de dezesseis tipos de cerveja de cevada, trigo e mel há mais de 4.000 anos a.C. (CERVESIA, 2016). Com o passar dos séculos, os processos bioquímicos básicos na produção de malte e de cerveja têm permanecido os mesmos: germinação da cevada em malte para produzir enzimas, mosturação para que estas atuem e formem os

açúcares fermentáveis e, finalmente, a fermentação do açúcar para álcool e dióxido de carbono (KUNZE, 2004).

Segundo a legislação brasileira, Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, art.36 a art.43: “Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo” (ANVISA, 2016). As matérias-primas essenciais para a fabricação da cerveja são: água, malte, lúpulo e levedura. Parte do malte de cevada pode ser substituída por outros cereais, maltados ou não, como milho, arroz, trigo, aveia, centeio ou sorgo, os quais são denominados adjuntos. No entanto, para que a bebida seja denominada cerveja é necessário que possua uma proporção de malte de cevada maior ou igual a 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares (SIQUEIRA, 2008).

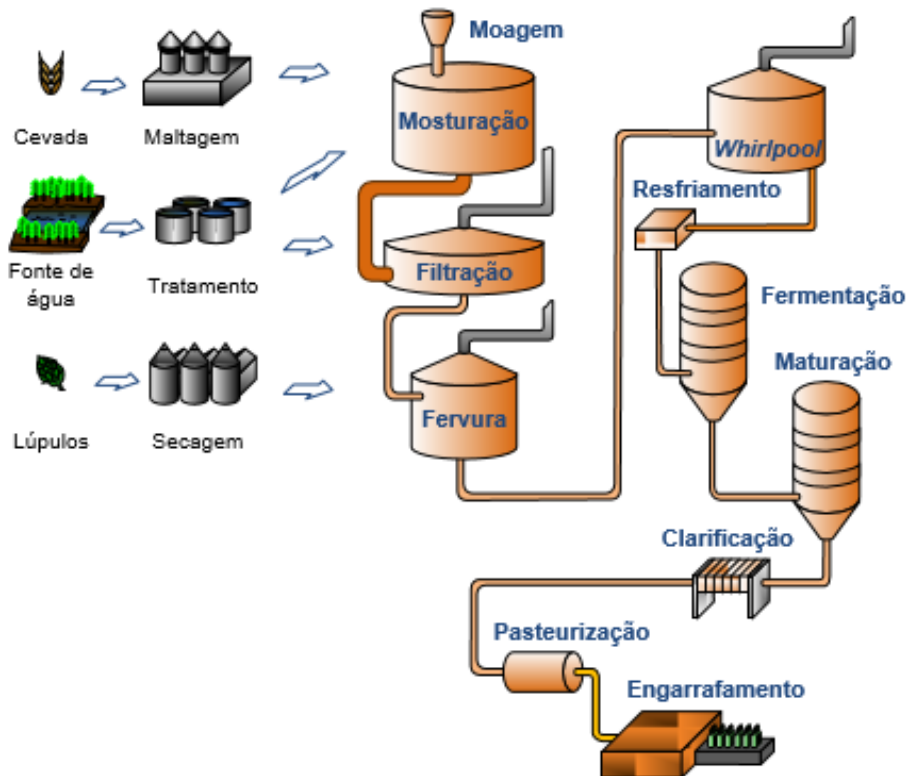
Conforme a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil), mesmo ocupando a posição de terceiro maior produtor de cerveja do mundo, 13 bilhões de litros anuais, atrás apenas da China (40 bilhões) e Estados Unidos (35 bilhões), e tendo a cerveja como a bebida alcóolica mais consumida no país, o Brasil ainda encontra uma distância significativa entre o potencial produtivo/consumidor de cervejas industriais e artesanais (MARDEGAN et al., 2013; SEBRAE, 2014). Em 2014, o Brasil produziu 14 bilhões de litros de cerveja, mantendo o terceiro lugar no ranking mundial de produção, segundo dados da *Kirin Beer University*. O consumo per capita do mercado brasileiro ainda tem um enorme potencial de crescimento. O país ocupa a 27ª posição mundial, com consumo de 66,9 litros por pessoa (CERVBRASIL, 2015).

O processo de produção nas cervejarias envolve as etapas de moagem do malte, mosturação, fervura, fermentação e maturação. O processo tradicional de produção da cerveja é representado esquematicamente na Figura 3, podendo apresentar variações de acordo com o tamanho da indústria e seus objetivos. A mosturação tem por objetivo promover a hidrólise do amido a açúcares fermentescíveis (maltose, glicose e maltotrioses) juntamente com dextrinas de cadeias curtas ou longas. São extraídos aproximadamente 65 % dos sólidos totais do malte, que em suspensão constituirão o mosto para a fermentação da cerveja (KUNZE, 2004).

Após a mosturação, o mosto é separado e cozido juntamente com o lúpulo a aproximadamente 100°C. Durante esta etapa há inativação das enzimas e esterilização do mosto. Há também formação de compostos responsáveis pela cor e

sabor do produto, através da reação de Maillard e caramelização, e extração de compostos de amargor e aromáticos do lúpulo. Nesta etapa é possível remover, por evaporação, compostos voláteis indesejáveis, como o dimetil sulfito (DENK, 2000).

Figura 3 - Desenho esquemático do processo produtivo de cerveja.



Fonte: AMBROSI (2016).

Da etapa de fervura, o mosto segue para um novo recipiente, no qual a entrada de forma tangencial à superfície do recipiente provoca um movimento circular do líquido, criando um vórtice, *whirlpool*, que aglomera as proteínas e o material particulado no centro do tanque. O mosto é separado e segue para a etapa de resfriamento, que deve ser realizada rapidamente para evitar a sua oxidação em altas temperaturas (BAMFORTH, 2006; BRIGGS et al., 2004; PRIEST; STEWART, 2006).

No processo de fermentação, a levedura é adicionada no mosto aerado, e se reproduz rapidamente devido à quantidade de O_2 dissolvido no meio, oxidando o piruvato até CO_2 e água. Depois que todo o oxigênio é consumido, as células de levedura passam a utilizar o açúcar de forma anaeróbica, fermentando esses

açúcares em etanol e CO₂. Os principais produtos formados durante a fermentação são etanol, glicerol, ácido láctico e dióxido de carbono, mas há a formação de vários outros compostos em baixas concentrações, resultantes do metabolismo de açúcares e aminoácidos (STEWART, 2000).

Após a fermentação principal, a cerveja verde, que ainda possui uma suspensão de leveduras e uma parte de material fermentescível, passa por uma fermentação secundária chamada maturação. Esta etapa do processo é realizada sob temperaturas de 0 a 3°C, e contribui para a clarificação da cerveja e melhoria do seu sabor (AQUARONE; ALMEIDA LIMA; BORZANI, 1983). O processo de maturação propriamente dito dura em torno de 7 dias, contando com a fermentação o processo leva em média 14 dias. Após este tempo, antes da etapa de engarrafamento, faz-se uma carbonatação adicional. A cerveja é então pasteurizada e procede-se à etapa de sacarificação, que é monitorada com auxílio de iodo para determinar o ponto correto da adição de açúcar. Em seguida, o mosto é filtrado em filtro prensa, e o que sobra é o bagaço (REBELLO, 2009).

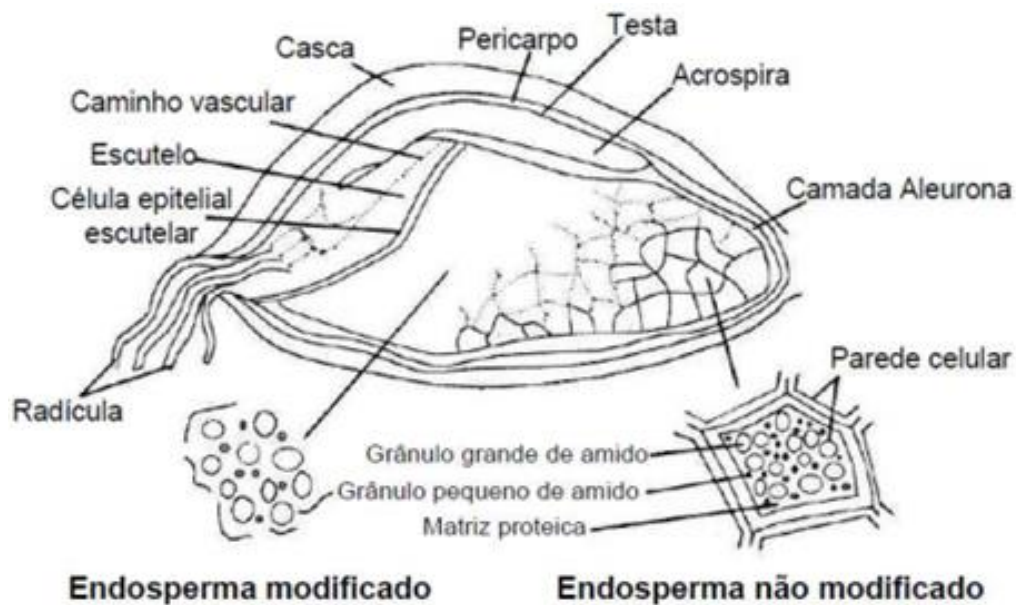
3.2.1.1 Malte de cevada

Entendem-se por malte os grãos germinados de cereais, sob condições controladas de desenvolvimento da radícula, pelo que se estimula o desenvolvimento das enzimas amilolíticas e se modificam as proteínas e os carboidratos constituintes do grão (REGULY, 1996). O processo de fabricação do malte chama-se maltagem, que envolve o controle do umedecimento com água e posterior germinação sob condições controladas de temperatura e aeração com o intuito de formação das enzimas necessárias à hidrólise dos polissacarídeos e do amido presente no grão (SIQUEIRA, 2008; BRIGGS, 2004).

Durante a maltagem, a reserva de amido do endosperma do grão – a porção amilácea que ocupa quase todo o grão- é usada como fonte energética no processo respiratório, que se inicia com a germinação. Esta ocorre no gérmen ou embrião, formação pequena, existente na base do grão, onde, pela oxidação dos carboidratos simples, redutores e prontamente utilizáveis (glicose e açúcar invertido) se liberam as primeiras energias para: a) biossíntese de proteína enzimática; b) biossíntese de proteína de estrutura do futuro vegetal. Esgotados de açúcares redutores, as hidrolases formadas e em formação, vão atuar sobre a reserva de amido,

transformando-a em produtos de menor peso molecular, assimiláveis, por se tornarem solúveis e paulatinamente redutores: dextrinas-maltose-isomaltose-glicose (Figura 4).

Figura 4 - Desenho esquemático do grão de cevada e exemplificação da mudança ocorrida no endosperma.



Fonte: SENAI (1997).

Outros cereais além da cevada são usados na elaboração do malte, são estes: trigo, centeio, aveia, milho, arroz e sorgo. A cevada maltada tem sido o principal cereal escolhido, porque além de apresentar casca com capacidade de formar um leito filtrante, possui elevada quantidade de amido e alto conteúdo de enzimas que degradam o amido em açúcares fermentáveis para as leveduras. E apenas os três primeiros são usados em escala industrial. Isto, porque cevada, trigo e centeio desenvolvem alfa e beta amilases durante a germinação, além de pequena quantidade de glicosidase; enquanto os demais produzem essencialmente apenas alfa-amilase. A cevada é o cereal mais maltado em escala mundial, por isso, quando se diz “malte”, sem especificar, simplesmente se trata de cevada maltada (REGULY, 1996; BAMFORTH, 2006). Segundo MUNCK (1991), aproximadamente 86% das β -glucanas são degradadas a oligossacarídeos durante a maltagem, enquanto outros componentes como peptídeos e açúcares são produzidos em altas quantidades (Tabela 1).

Tabela 1 - Variação da composição química da cevada e do malte (% b.s).

Componentes	Cevada cervejeira	Malte
Amido	64	60
B-glucanas	3,5	0,5
Lipídios	2,5	2,5
Nitrogênio total	9,5	9,5
Aminoácidos e peptídeos	0,5	1,5
Açúcares	2,7	7,5

Fonte: LIZARAZO (2003).

Pela germinação, dois tipos de malte devem ser distinguidos: o malte cervejeiro e o malte para destilarias; o primeiro possui menor atividade ou poder enzimático, porque o malte nesse caso é, antes, matéria-prima para o preparo do mosto – a futura cerveja; o malte para as destilarias tem maior poder enzimático, já que ele é usado como agente sacarificante dos mostos, que a seguir serão submetidos à fermentação alcoólica (REGULY, 1996).

3.2.1.2 Bagaço de Malte (BM)

Os subprodutos de natureza orgânica da indústria cervejeira constituem o maior grupo sobre o ponto de vista de volume gerado. A geração de bagaço de malte (malte processado) é particularmente abundante, correspondendo aproximadamente a 85% dos bioprodutos gerados, logo, é possível afirmar, que o BM é quantitativamente o principal subproduto de produção de cerveja (REINOLD, 1997; COSTA, 2006). Em média, o bagaço de malte corresponde a 31% do malte em peso, representando aproximadamente 20 kg a cada 100 L de cerveja produzida (TOWNSLEY, 1979; REINOLD, 1997).

O bagaço de malte é um subproduto formado pela parte sólida obtida de filtração do mosto após a maceração. Este consiste principalmente de restos de polpa e casca de malte, mas também de adjuntos, como o arroz, milho e trigo (SANTOS, RIBEIRO, 2005). Dependendo da uniformidade da maltagem o endosperma amiláceo e as paredes de células de aleurona podem permanecer. Resíduos de lúpulo introduzidos na maceração também poderão estar presentes dependendo do regime

de infusão. Assim, os principais componentes de BM serão as paredes do revestimento casca-pericarpo da semente, que são ricos em celulose e polissacarídeos não celulósicos e lignina, podendo conter alguns lipídeos e proteínas. A casca também contém quantidades consideráveis de sílica e a maior parte dos componentes polifenólicos do grão de cevada (MACLEOD, 1979).

O bagaço de malte é predominantemente fibroso (70% massa seca) e protéico (15 a 25% massa seca), apresentando também em sua composição lipídeos, minerais, vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos (Aliyu e Bala, 2011; Lima 2010; Robertson et al., 2010; Mussato et al., 2006). A polpa contém 9,92% de fibra bruta e umidade aproximada de 75-80% (SILVA, 2010). Devido à sua elevada umidade e teores de açúcares fermentáveis, o BM é um material muito instável e susceptível a rápida deterioração devido à atividade microbiana. A secagem é uma alternativa possível para a preservação BM com a vantagem de que ela também reduz o volume do produto, e, portanto, diminui os custos de armazenagem e de transporte (SANTOS et al., 2003).

A principal aplicação do BM tem sido com alimentação animal, principalmente de bovinos, não apenas pela sua disponibilidade e baixo custo, mas devido ao seu alto conteúdo de proteínas e fibras (ÖZTÜRK et al., 2002; VIEIRA; BRAZ, 2009). Porém, a elevada disponibilidade deste subproduto no Brasil, de aproximadamente dois milhões de toneladas/ano, tem impulsionado a busca por novas alternativas através da pesquisa (LIMA, 1993; KOTLAR et al., 2013; LIGUORI et al., 2015; CORDEIRO, 2011).

Devido ao fornecimento contínuo, ao custo relativamente baixo e ao potencial de valor nutricional, o BM pode ser considerado como um complemento atrativo de inúmeros benefícios para a dieta humana. O BM pode ser utilizado, por exemplo, para fazer pães ricos em proteínas, o que poderá ser muito útil nas regiões mais pobres do mundo, onde a comida é escassa. Além disso, a ingestão de BM ou produtos derivados fornece vários benefícios de saúde. A sua utilização como nutracêutico, especialmente para o tratamento de colite ulcerativa, parece ser uma importante estratégia clínica possível para o futuro (MUSSATTO, 2006). Devido ao elevado conteúdo proteico do BM, Kotlar et al. (2013) investigaram as propriedades funcionais e antimicrobianas deste a partir de hidrólise enzimática e observaram uma melhora nas propriedades funcionais e uma forte atividade antimicrobiana.

Por outro lado, considerando que os carboidratos são os principais componentes, mais atenção deve ser dada para a sua conversão em açúcares solúveis e fermentáveis. Atualmente, um número de bioprodutos de valor agregado, tais como ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, etanol, butanodiol, entre outras, são produzidos por fermentação utilizando glicose ou xilose como substratos (MUSSATTO, 2006). Outra proposta para o uso do BM é em produção energética, através de combustão direta ou por fermentação para produzir biogás. Considerando a crise energética mundial esta seria uma interessante alternativa para este bioproduto (REINOLD, 1997; MUSSATTO, 2006; 2014).

Segundo Mussatto (2006) outra possibilidade que deve ser considerada é a produção de polímeros e resinas de BM. Um grande número destes compostos são produzidos a partir de produtos químicos, tais como etileno, propileno, benzeno, tolueno ou xileno. Os compostos aromáticos (benzeno, tolueno e xileno) podem ser produzidos a partir da lignina presente no BM, enquanto que os compostos alifáticos de baixo peso molecular (de etileno e propileno) podem ser derivados a partir de etanol produzido pela fermentação de açúcares gerados a partir de celulose e arabinoxilano.

Embora haja um número inestimado de usos para o BM, o maior impedimento para a sua utilização é o custo de transporte (especialmente da forma úmida) e/ou secagem. O consequente benefício da utilização de subprodutos industriais a partir do BM como matéria-prima é a geração de mais empregos. Além disso, do ponto de vista ambiental, a eliminação de subprodutos industriais representa uma solução para os problemas de poluição (MUSSATTO, 2006).

3.2.2 Matérias-primas amiláceas

Além da fração lignocelulósica presente no bagaço de malte, há um outro tipo de carboidrato, que pode ser hidrolisado para açúcares fermentáveis, o amido. Podemos considerar três classes gerais de matérias-primas derivadas de biomassa que são apropriadas para a produção, por exemplo, de combustíveis renováveis: matérias-primas amiláceas (incluindo os açúcares), matérias-primas de triglicérides e matérias-primas lignocelulósicas. Matérias-primas amiláceas são aquelas compostas por polissacarídeos de glicose unidas por ligações glicosídicas, como amilose e amilopectina, que são facilmente hidrolisados para monômeros de açúcar, tornando-os acessíveis a fermentação (ALONSO; BOND; DUMESIC, 2010).

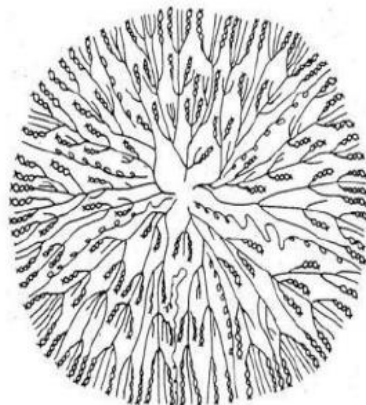
O amido é, depois da celulose, o carboidrato mais encontrado na natureza. Os cereais (como o milho, o arroz, cevada e outros), os seus produtos do beneficiamento, (os farelos), bem como os tubérculos (batata, mandioca, batata doce, entre outros) são as principais fontes de amido (REGULY, 1996).

3.2.2.1 Amido

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas podendo ser obtido de diversas fontes vegetais. Formado por n unidades de glicose ($C_6H_{10}O_5$), o amido é o único polissacarídeo armazenado sob a forma de grânulos (Figura 5), que possuem forma e tamanho dependente de sua origem e que apresentam um certo grau de organização molecular, o que confere aos mesmos um caráter semicristalino (YOUNG, 1984; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

Os grânulos de amido variam em tamanho e forma (poligonal, esférica, lenticular) e podem variar muito em relação ao conteúdo, a estrutura e a organização das moléculas de amilose e amilopectina. Os grânulos podem ocorrer individualmente ou agrupados. Em trigo, milho, cevada, centeio e sorgo, os grânulos são simples, pois cada plastídeo contém um grânulo. Já em arroz e aveia os grânulos são compostos, quando muitos destes estão dentro de cada amiloplasto (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004). O amido de cevada consiste em uma mistura de grânulos grandes, lenticulares (15-25 μ m) – TIPO A e menores, irregulares (<10 μ m) – TIPO B (YOU; IZYDORCZYK, 2002).

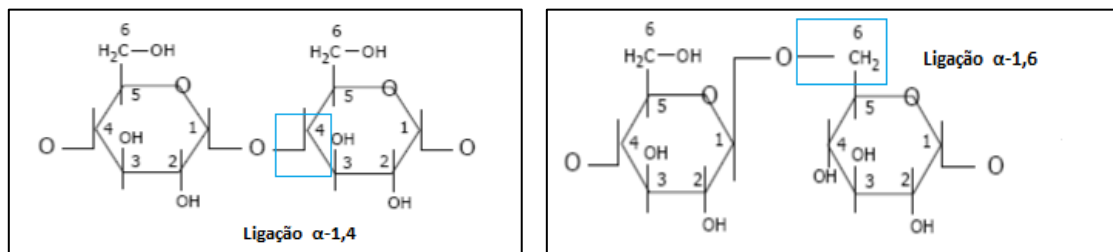
Figura 5 - Representação esquemática do grânulo de amido.



Fonte: FENIMAN (2004).

Estruturalmente, como representado na Figura 6, o amido é composto por unidades de glicose ligadas entre si pelos carbonos C1-C4 e C1-C6, através de oxigênio, formando ligações glicosídicas α (1-4) e α (1-6). Os dois principais componentes macromoleculares de amido são amilose e amilopectina, com estruturas e funcionalidade diferentes (SURMELY et al., 2003; BEMILLER; WHISTLER, 2009). Além destes, alguns estudos têm mostrado a presença de um terceiro componente denominado material intermediário (BILIADERIS, 1991; WANG et al., 1993).

Figura 6 - Esquema das ligações glicosídicas presentes em cadeias de amido.



Fonte: Adaptado de COLLARES (2011).

As variações nas proporções entre os componentes e a diversidade sob a forma podem resultar em grânulos de amido com propriedades funcionais e físico-químicas diferentes, podendo afetar as suas aplicações industriais (COPELAND, 2009; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). O tamanho do grânulo poderá afetar, por exemplo, a suscetibilidade enzimática, as características de cozimento, a propriedade de inchamento e cristalinidade, dentre outras (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004).

O teor de umidade dos grânulos de amido nativo é geralmente cerca de 10%. Amilose e amilopectina compõem 98-99% do peso seco dos grânulos, com o restante compreendendo pequenas quantidades lipídeos, fósforo, proteínas, minerais e sais. Na superfície desses grânulos estão presentes, além das proteínas, enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos (BULÉON et al., 1998; HOOVER, 2001).

De acordo com Buléon et al. (1998), a presença de lipídeos pode alterar significativamente as propriedades e funcionalidades do amido. A formação de complexo do amido com lipídeos reduz a solubilidade do amido em água, altera suas propriedades reológicas, diminui sua capacidade de inchaço, provoca o aumento da

temperatura de gelatinização, reduz a rigidez do gel, retarda a retrogradação e causa, ainda, menor susceptibilidade à hidrólise enzimática (COPELAND et al., 2009).

O termo “gelatinização” é utilizado para descrever a expansão e hidratação dos grânulos de amido quando estes são aquecidos na presença de água. A gelatinização do amido é seguida do rompimento da ordem das moléculas dentro dos grânulos de amido com mudanças irreversíveis nas propriedades, como o aumento dos grânulos, fusão de cristais, perda da cristalinidade, aumento da viscosidade (SINGH et al., 2003). Na temperatura de gelatinização as ligações de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina tornam-se mais fracas e são rompidas, promovendo redução da cristalinidade, o que possibilita a entrada de água e inchaço dos grânulos (HOOVER, 2001). Essas temperaturas de gelatinização variam entre os amidos de diferentes fontes. SINGH et al. (2003) citam valores na faixa de 61 a 72°C para a batata, 68 a 74°C para o milho, 65 a 79°C para o arroz e 56 a 62°C para o trigo. Para a cevada, a temperatura de gelatinização pode variar de 54 a 66°C, dependendo da sua composição (MACGREGOR; FINCHER, 1993).

O fenômeno seguinte a gelatinização na dissolução do amido é conhecido como empastamento. Este envolve um inchamento granular e, eventualmente, total rompimento dos grânulos. Nesta etapa há um aumento na viscosidade da solução. Já a retrogradação do amido é o fenômeno que ocorre quando as moléculas de amido começam a reassociar em uma estrutura mais ordenada, tornando-se menos solúveis (BENINCA, 2008).

3.2.2.1.1 Amilose

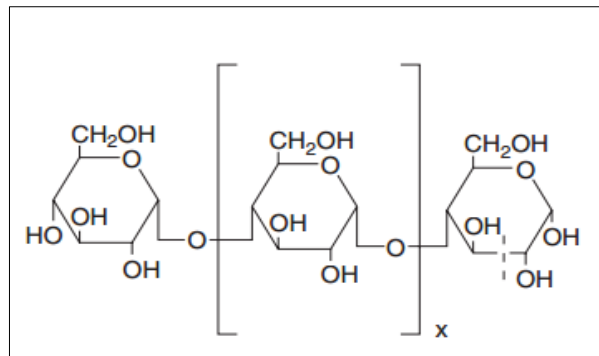
A amilose é um polímero predominantemente linear formado por unidades de D-glicose ligadas por ligações α - (1→4), que corresponde tipicamente a 20-30 % da massa total do amido, dependendo da fonte de origem. A amilose tem uma faixa de massa molar média de aproximadamente 10^5 - 10^6 g/mol e pode conter cerca de 2-11 cadeias com entre 200 e 700 resíduos de glicose por cadeia, correspondendo a um grau de polimerização de 1 000 a 10 000 (MANNERS, 1989; ELIASSON, 2004; TESTER; KARKALAS, 2001).

Como descrito, a molécula de amilose presente nos grânulos de amido são estritamente lineares, porém, podem haver algumas ramificações. Uma prova da ocorrência de pontos de ramificações na amilose é a conversão incompleta deste

polímero em maltose pela ação da β -amilase, que pode variar de 73 a 95% (MORRISON; KARKALAS, 1990).

A Figura 7 apresenta a estrutura linear da amilose do amido. Em uma das extremidades da cadeia polimérica a unidade terminal de glicose apresenta uma hidroxila primária e duas secundárias, assim como um grupamento aldeído redutor da molécula. A extremidade oposta ou final não-redutor apresenta uma unidade de glicose contendo uma hidroxila primária e três secundárias, sendo que as outras unidades de glicose do polímero apresentam uma hidroxila primária e duas secundárias (WURZBURG, 1986).

Figura 7 - Estrutura linear da amilose.

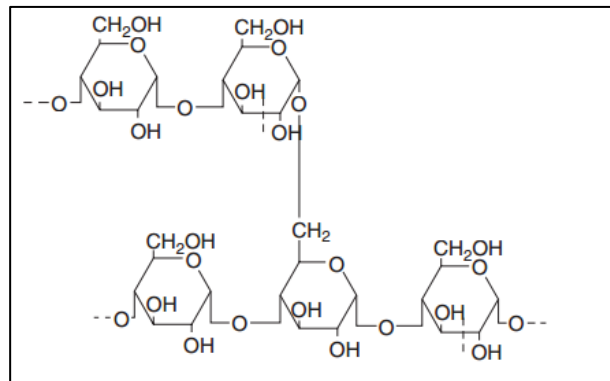


Fonte: BEMILLER; WHISTLER (2009).

3.2.2.1.2 Amilopectina

A amilopectina é um polímero altamente ramificado (Figura 8), com unidades de D-glicose ligadas através de ligações α - (1 \rightarrow 4) e ramificações em α -(1 \rightarrow 6). No que diz respeito ao tamanho, é um polímero muito maior que a amilose, com massa molar na faixa de 10^7 - 10^9 g/mol e um grau de polimerização que pode ser superior a 10^6 . A maioria dos amidos contém 60-90 % de amilopectina em massa. As ramificações conferem a este polímero características amorfas, diferente da amilose, que apresenta características cristalinas (MANNERS, 1989; ELIASSON, 2004; COPELAND et al., 2009).

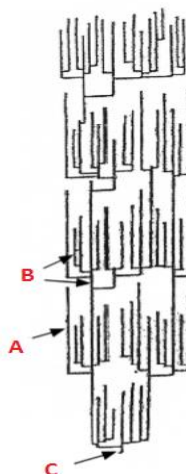
Figura 8 – Estrutura da amilopectina.



Fonte: BEMILLER; WHISTLER (2009).

A molécula de amilopectina consiste em uma cadeia principal C que carrega o grupo redutor da molécula, e numerosas cadeias ramificadas, denominadas cadeias A e B. As cadeias A não carregam qualquer ramificação, enquanto as cadeias B são substituídas por outras cadeias. Este modelo de conformação estrutural de amilopectina é o mais aceito e devido à aparência de “cacho” recebe o nome de Clusters, onde as ramificações da cadeia são formadas pelo grande número de cadeias laterais lineares curtas, arranjadas em duplas hélices (Figura 9). As estruturas de clusters são extremamente compactas, que originam regiões cristalinas e, estas regiões alternam-se com regiões amorfas, que são menos ramificadas e compactadas (HOOVER, 2001).

Figura 9 - Estrutura de cluster mostrando as cadeias de amilopectina.



Fonte: Adaptado de ELIASSON, (2004).

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise consiste na quebra de polissacarídeos (em adição de água) em açúcares simples (monoméricos), que possuem cadeias menores e que possam ser convertidos diretamente em produtos de valor agregado. Muitos métodos para hidrólise têm sido descritos, porém os métodos mais frequentemente aplicados são: a hidrólise química e a hidrólise enzimática (BALAT, 2011).

A hidrólise ácida apresenta a vantagem de ser mais rápida, entretanto apresenta muitas desvantagens, como por exemplo, os problemas de corrosão, o uso de grandes volumes de reagentes e de água, assim como a necessidade de neutralização no final do processo. A hidrólise enzimática é um método eficaz e ambientalmente correto, que tem se destacado frente a hidrólise ácida devido as condições amenas de operação, tornando-a uma rota atrativa e reduzindo a formação de produtos indesejáveis de degradação (SURMELY, 2003; BALLAT, 2011).

Em suma, dos dois métodos de hidrólise possíveis, a hidrólise ácida é eficiente e relativamente pouco dispendiosa, mas forma compostos que podem inibir seriamente a fermentação subsequente. Por outro lado, a hidrólise enzimática vem se desenvolvendo juntamente com o desenvolvimento da biotecnologia e, por conseguinte, existe uma possibilidade de melhorias relação a eficiência e aos custos (RABELO et al., 2009).

3.3.1 Hidrólise enzimática de materiais amiláceos

No processo de hidrólise de materiais amiláceos ocorre a transformação lenta do amido, originando dextrinas, (caracterizada por uma mistura de oligossacarídeos de baixo peso molecular), maltose e, finalmente, D-glicose (MORRISON, 1996). A hidrólise enzimática de amidos é vista não apenas como um processo industrial importante para a obtenção adoçantes, de xaropes, de produtos químicos (etanol, acetona, etc.), mas também como técnica que auxilia no estudo da estrutura dos grânulos de amido (LI et al., 2004). A hidrólise, também é denominada sacarificação – no sentido de adoçamento, pela maltose e glicose formadas, de sabor doce, ausente no amido original – ainda algumas vezes é designada por liquefação, devido a redução da viscosidade das dispersões coloidais do amido (REGULY, 1996).

Para que ocorra o aproveitamento do amido como fonte energética através da hidrólise enzimática, dado o seu teor de glicose, usam-se microrganismos que são: ou capazes de hidrolisar o amido disponível ou capazes de converter o amido hidrolisado em outros produtos através de fermentação (COLLARES, 2011). A hidrólise enzimática do amido granular envolve enzimas em solução agindo sobre um substrato sólido (LI et al., 2004).

Durante a hidrólise a natureza do substrato amiláceo a ser utilizado é um fator que pode contribuir ou limitar a ação da enzima. Amidos granulares de cereais são mais suscetíveis à hidrólise do que amidos de raízes e tuberosas quando digeridos por apenas uma enzima purificada. No entanto, a extensão de hidrólise também depende do tipo de enzima, quantidade de atividade da enzima, tempo de reação, temperatura e presença ou ausência de inibidores, entre outros fatores (ROBERTSON et al., 2006).

Na hidrólise enzimática podem ser usadas enzimas de origem vegetal ou microbiana. Destacam-se o malte, o farelo enzimático (cultivo de microrganismos amilolíticos, como o fungo da espécie *Aspergillus oryzae*, cujo crescimento se dá em farelo de milho, trigo, arroz ou cevada, previamente gelatinizados) e enzimas comerciais obtidas de microrganismos (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

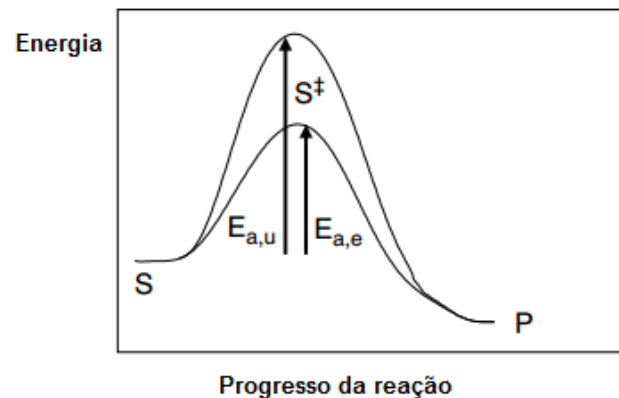
3.3.2 Enzimas

As enzimas são substâncias orgânicas compostas por sequências de aminoácidos (proteínas), que atuam como catalisadores biológicos e desempenham um papel fundamental no metabolismo dos seres vivos. Apresentam um sítio ativo onde ocorre a catálise, além de conformações com arranjos espaciais e um enovelamento específico, sendo que suas propriedades, estabilidade e função estão relacionadas com sua estrutura tridimensional (VOET; VOET, 2006; CINELLI, 2012).

Algumas enzimas são constituídas apenas de aminoácidos, enquanto outras possuem uma parte não-proteica (co-fator), a qual pode ser um metal (inorgânico) ou uma coenzima (orgânico). Uma característica das enzimas é a dupla especificidade, relacionada ao tipo de reação (especificidade reacional) ou ao tipo de substrato, onde uma enzima só pode catalisar uma reação específica ou atuar restritamente a um tipo de substrato, respectivamente (NELSON; COX, 2004).

As enzimas apresentam propriedades de alta especificidade e seletividade química, possuem grande importância em processos biotecnológicos podendo ser empregadas em diversas reações químicas. O princípio básico da catálise enzimática é a capacidade de uma enzima diminuir a energia do estado de transição. Como a velocidade de uma reação química é proporcional à concentração do complexo no estado de transição (S^\ddagger), a redução da energia de ativação conduz a um aumento da taxa de reação (Figura 10). A reação termodinamicamente favorável, passa a ser também, cineticamente favorável (MARANGONI, 2003; CINELLI, 2012).

Figura 10 - Ação catalítica das enzimas.



Fonte: Adaptado de MARANGONI, (2003).

A classificação das enzimas e a sua nomenclatura geralmente estão associadas à reação química que catalisam. De acordo com a comissão de enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular existem seis grandes classes de reações enzimáticas, apontadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação das enzimas segundo o tipo de reação catalisada.

Classificação	Reação Catalisada
Oxidoredutases (EC 1.)	Reações de oxidação-redução
Transferases (EC 2.)	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases (EC 3.)	Reações de hidrólises
Liases (EC 4.)	Eliminação de grupos para formar ligas duplas
Isomerases (EC 5.)	Isomerização
Ligases (EC 6.)	Formação de ligação com hidrólise de ATP

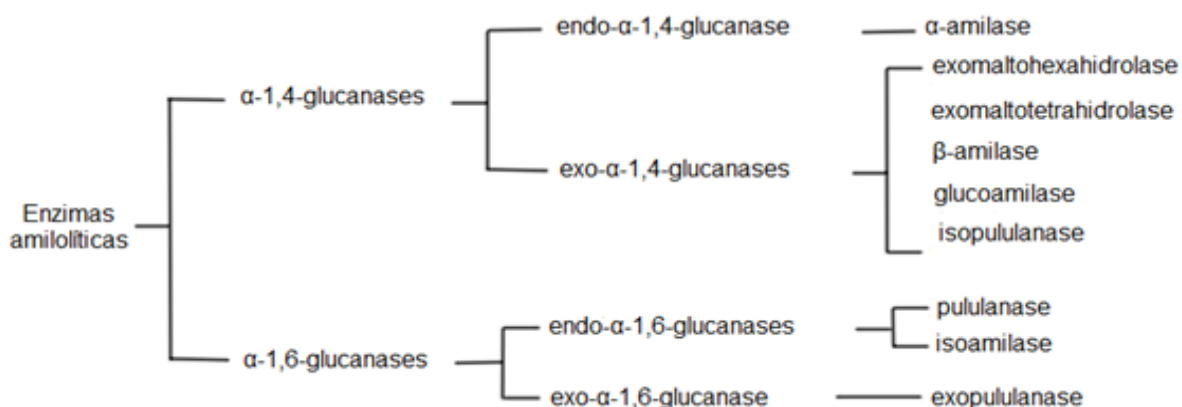
3.3.2.3 Enzimas amilolíticas

Visto que a classificação das enzimas é associada à reação química que catalisam e ao substrato sobre o qual atuam, as enzimas amilolíticas pertencem à classe das hidrolases e, mais particularmente, à categoria que catalisam as reações do amido originando diversos produtos, que incluem dextrinas e polímeros progressivamente menores compostos de unidades de glicose (WINDISH; MHATRE, 1965; MASIERO, 2012).

As enzimas responsáveis pela degradação de amido estão amplamente distribuídas na natureza. Embora as amilases possam ser derivadas de várias fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente atendem às demandas industriais. Um grande número de amilases microbianas está disponível comercialmente e tem substituído quase que completamente a hidrólise química de amido no processamento industrial. Convém ressaltar que as amilases são de grande importância para a biotecnologia com aplicações que vão desde alimentos, fermentação, têxtil às indústrias de papel (PANDEY et al, 2000b).

Segundo Gupta et al. (2003) as amilases podem ser divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases. A classificação é feita de acordo com o mecanismo de ação sobre a estrutura dos polímeros (Figura 11).

Figura 11 - Enzimas que podem ser empregadas para a hidrólise do amido.

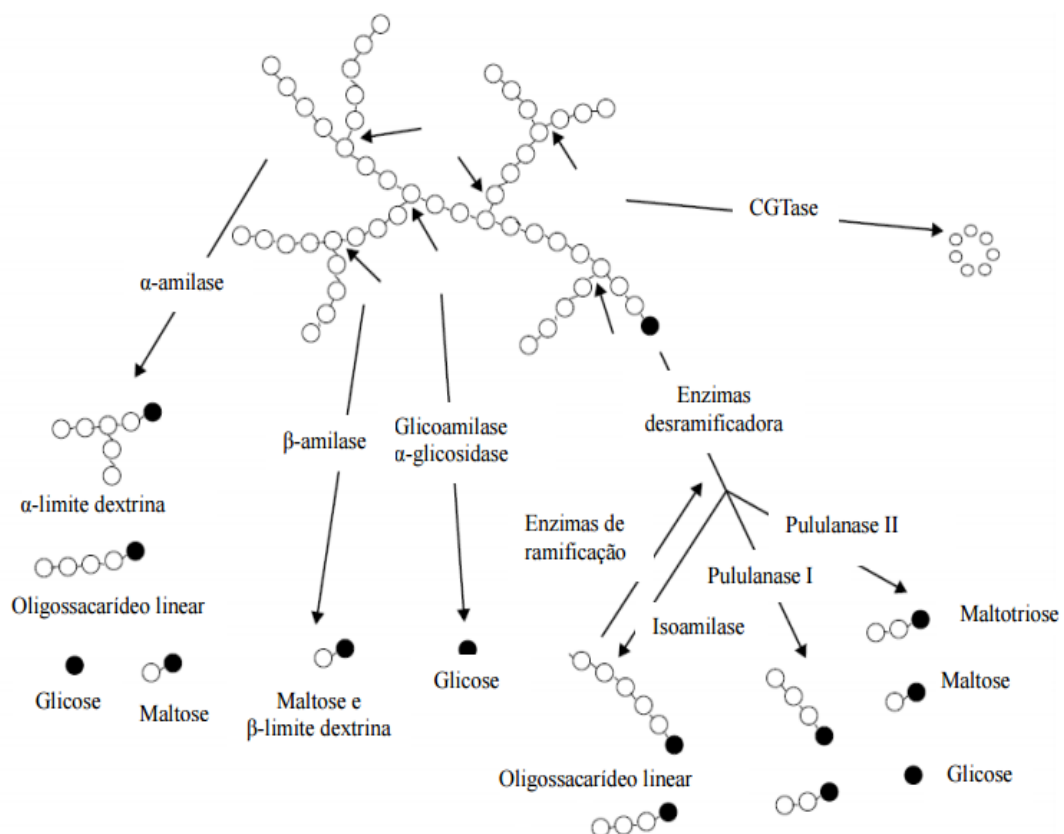


Fonte: Adaptado de LIN; TANAKA (2006).

As endoamilases catalisam aleatoriamente as ligações glicídicas no interior da molécula de amido, liberando ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de

diversos comprimentos, enquanto as exoamilases hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não redutora gerando produtos finais pequenos (GUPTA et al., 2003). Outro conceito dado por Reed (1975) mostra que amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glicoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato. Uma representação esquemática dos mecanismos de ação das diferentes amilases sobre o amido é apresentada na Figura 12.

Figura 12 - Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas.



Fonte: Adaptado de BERTOLDO; ANTRANIKIAN, (2002).

A α -amilase (endo- α -1,4-glucanase) age sobre amido clivando de forma essencialmente aleatória as ligações glicosídicas α (1-4), produzindo açúcares redutores. A hidrólise da α -amilase na fração de amilopectina do amido produz glicose, maltose e uma série de α -dextrinas limite, oligossacarídeos de quatro ou mais

resíduos de glicose, todos eles contendo ligações glicosídicas α -1,6. Uma hidrólise adicional sobre os produtos do primeiro estágio de ação da enzima ocorre lentamente, afetando a hidrólise de algumas ligações na região de ramificação da molécula (BEMILLER; WHISTLER, 1996). Dentre as enzimas amilolíticas, a α -amilase é a mais importante, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, que podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo (SANTANA, 2012). A β -amilase (α -1,4-glucan maltohidrolase), também chamada sacarógena, hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 de polissacarídeos a partir da extremidade não-redutora sobre a penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose, por uma inversão (HARGER, 1982).

A glicoamilase (1,4- α -D-glucan glicohidrolase), também conhecida como amiloglucosidase, hidrolisa ambas ligações glicosídicas α (1-4) e α (1-6) produzindo D-glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia de amido. No entanto, a taxa de hidrólise de cada tipo de ligação é dependente de cada enzima individualmente. Por exemplo, glicoamilase hidrolisa ligações glicosídicas α (1-4) cerca de 20 vezes mais rápido que α (1-6). Além disso, a temperatura, o pH da solução, a estrutura e a composição química do grânulo de amido afetam a hidrólise enzimática (MURTHY et al., 2011).

As enzimas amilolíticas atuam sinergicamente sobre seu substrato de ação. Desta forma são necessárias diversas enzimas agindo em conjunto para converter completamente o amido em glicose (MASIERO, 2012). Segundo Robertson et al. (2006) os sinergismos mais comuns são de endo e exo enzimas. Quando a amiloglucosidase age sozinha não há mudança no número de sítios do substrato até a amilose ou amilopectina serem digeridas a seus últimos resíduos. Quando as enzimas α -amilase e amiloglucosidase agem juntas, a ação endo-catalítica aumenta o número de sítios do substrato para a ação da exo-enzima, permitindo um aumento na taxa de conversão. Sabe-se, que através deste sinergismo, que o amido não gelatinizado e não inteiramente liquefeito também pode ser hidrolisado.

3.3.3 Hidrólise do amido granular

Durante séculos a hidrólise enzimática de amido granular para produção de álcool tem sido usada. Foram encontradas em vasos de cerâmica do Egito antigo evidências microscópicas da utilização do amido cru, não gelatinizado, como um

substrato para bebidas alcoólicas (SAMUEL, 1996). Durante a Segunda Guerra Mundial, pesquisas foram realizadas usando a digestão de amido cru para se obter glicose ou etanol. Enfim, estudos sobre hidrólise a frio do amido não são recentes, mas tem se intensificado nos últimos tempos (BALLS; SCHWIMMER, 1944; SAHA; UEDA, 1983; CINELLI, 2012).

Polímeros de amido nativo precisam ser completamente hidratados a fim de ficarem acessíveis para enzimas hidrolíticas. Isto ocorre geralmente por aquecimento a 70-80°C, representando um processo complexo de "descompactação" de moléculas, conhecido como gelatinização, onde a água penetra até as regiões fortemente cristalizadas dos grânulos (ROBERTSON et al., 2006). Evolutivamente, a diversidade de ambientes garantiu aos fungos filamentosos, a capacidade de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características, possibilitando-lhes uma forma de sobrevivência através do uso da matéria orgânica sólida do meio como fonte de carbono (GOUKA et al., 1997).

De acordo com Cinelli (2012) esta alternativa de hidrólise em temperaturas inferiores à de gelatinização do amido tem sido descrita como: hidrólise a frio (*cold hydrolysis*); hidrólise não convencional (*non-conventional hydrolysis*); hidrólise a baixas temperaturas (*low temperature hydrolysis*); hidrólise do amido granular (*granular starch hydrolysis*) ou, ainda, hidrólise sem cozimento do amido ou do amido cru (*non-cooking ou raw starch hydrolysis*). Diferentemente da hidrólise convencional que ocorre em fase aquosa, o substrato da hidrólise a frio é amido granular que está ainda sólido. Então, a transferência de massa entre as fases se torna um fator limitante nesse tipo de hidrólise. Como consequência, são normalmente necessárias concentrações de enzima maiores do que no método convencional (Vidal et al., 2009).

Avanços recentes na hidrólise e fermentação usando amido granular sob temperaturas abaixo de gelatinização pode levar a uma inovação na produção de etanol. Esta hidrólise do amido a frio pode proporcionar muitos benefícios, como a redução da energia de consumo e a melhoria da produção. No entanto, a sua taxa de hidrólise baixa e/ou hidrólise incompleta devido à heterogeneidade estrutural e natureza cristalina de moléculas de amido são desafios para a adoção desta tecnologia (Robertson et al., 2006).

Segundo Li, Vasanthan e Bressler (2012) a compreensão do grânulo de amido quanto as características estruturais e os fatores que influenciam a cinética da hidrólise é altamente importante para o desenvolvimento de abordagens práticas de

otimização do processo. A eficiência de conversão de amido para glicose por certas enzimas hidrolíticas depende grandemente da fonte de amido, da estrutura (por exemplo, peso molecular e comprimentos de cadeia de amilose e amilopectina, poros superficiais dos grânulos de amido, etc) e da composição.

A maioria das enzimas estudadas para a hidrólise de amido granular notificadas até o momento são pouco eficientes na hidrólise amilácea, não produzindo altos rendimentos de açúcares fermentáveis. Portanto, as enzimas que podem digerir o amido granular são economicamente atraentes, porque aumentam a gama de fontes de amido para hidrólise direta. Com os avanços tecnológicos na área da biotecnologia e da engenharia enzimática, uma nova geração de enzimas amilolíticas tem sido descoberta (UTHUMPORN, ZAIDUL, KARIM, 2010).

Enzimas comerciais estão disponíveis em uma mistura de amilases, que podem hidrolisar efetivamente o amido granular insolúvel em açúcares fermentáveis, permitindo que a despolimerização do amido para glicose numa sacarificação simultânea ao processo de fermentação para a produção de álcool (UTHUMPORN; ZAIDUL; KARIM, 2010). A Genencor desenvolveu uma mistura de enzimas α -amilase e glicoamilase, chamada *Stargen*TM, própria para hidrólise de amido granular. É sugerida, no processo proposto, uma etapa inicial onde a suspensão de amido é aquecida entre 40°C a 60°C por 30 a 90 minutos sob a ação de α -amilases termoestáveis e proteases. Em seguida, o mosto é resfriado até a temperatura de fermentação e, então, são adicionadas a *Stargen*TM e a levedura. Desta forma, liquefação, sacarificação e fermentação ocorrem simultaneamente (GENENCOR, 2008; 2010). Na linha *Stargen*TM de produtos, os preparados enzimáticos *Stargen*TM 001 ou 002 são formulados contendo α -amilase de *Aspergillus kawachi*, expressa em *Trichoderma reesei*, e glicoamilase de *Aspergillus niger* ou de *Trichoderma reesei*.

3.4 TECNOLOGIAS USADAS NA HIDRÓLISE

3.4.1 Agitação Mecânica

A agitação mecânica é uma das principais operações unitárias usadas em processos biotecnológicos e tem como função manter a homogeneidade do meio reacional, remover os gases e o calor gerado durante o experimento (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). A agitação mecânica deve ser levada em conta quando se faz a

escolha de um biorreator, pois possibilita a transferência de calor e massa entre as fases (SANTOS, 2006).

Os mecanismos responsáveis para os efeitos benéficos de mistura e agitação mecânica durante a hidrólise enzimática ainda não são bem compreendidos. Kristensen et. al. (2009) e Hsieh (2014) sugeriram que a agitação evita o acúmulo de produto e, portanto, neutraliza uma possível inibição do produto final. Pode-se também especular que a agitação aumenta a velocidade de hidrólise, contribuindo para a deslocalização das enzimas do recalcitrante para regiões degradáveis do substrato (HIMMEL et al., 2007).

3.4.2 Ultrassom

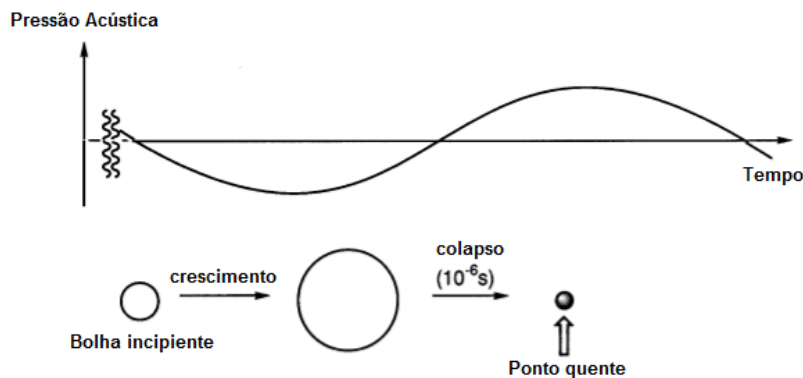
A sonicação é um processo de tratamento físico-químico que fornece energia sob a forma de ondas sonoras. De acordo com Babics (2009) ondas sonoras são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável (ar, metais, isolantes, água, entre outros). Estas ondas não devem ser confundidas com microondas eletromagnéticas e necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo.

O ultrassom é uma onda sonora oscilante fora do alcance da audição humana de frequência superior a 16-20 kHz (KARDOS; LUCHE, 2001). Este pode ser classificado em três categorias; ultrassom de baixa energia (16-100 kHz; 10-1000 W/cm²), ultrassom de alta frequência (100 kHz-1 MHz; <10 W/cm²) e ultrassom diagnóstico (1-10 MHz) (PATIST; BATES, 2008). O ultrassom de baixa intensidade tem potencial para melhorar a conversão de açúcares em etanol na etapa de fermentação, enquanto o de alta intensidade é energeticamente suficiente para ser utilizado em processos de pré-tratamento de biomassa.

O ultrassom é transmitido para um fluido, normalmente através de uma sonda sônica, ou sonotrodo, ou alguma outra forma de transdutor de som. O sonotrodo geralmente consiste de uma haste contínua, que oscila ao longo do seu eixo vertical para a frequência do ultrassom. A energia transmitida pela onda sonora é absorvida pelo líquido formando microcavidades (bolhas de cavitação), as quais crescem e colapsam num curto espaço de tempo liberando grande quantidade de energia ao meio reacional. Este fenômeno é conhecido como cavitação. Em uma faixa de 20-50 kHz, o colapso ocorre numa escala de tempo curto, que corresponde a cerca de 10⁻⁶

s, curto o suficiente para levar a um aquecimento intenso na bolha residual, isto é, um "ponto quente" (Figura 13) (KARDOS; LUCHE, 2001).

Figura 13 - Esquema do fenômeno de cavitação.



Fonte: KARDOS; LUCHE (2001).

Devido as condições extremas de temperatura e pressão que essas bolhas de cavitação podem alcançar, 5000 K e 1200 bar, as moléculas mais voláteis se vaporizam e sofrem degradação pela temperatura, gerando radicais livres (KARDOS; LUCHE, 2001). Além do efeito de lise das moléculas, o colapso pelas bolhas de cavitação gera forças mecânicas, as quais são capazes de romper moléculas, homoliticamente ou heteroliticamente, de forma não aleatória (ADEWUYI, 2001).

A sonicação pode ser aplicada direta ou indiretamente, onde em processos de fermentação envolvendo células vivas, a sonicação indireta pode ser eficaz. Nesta forma de ultrassons, o sonotrodo ou transdutor transmite a energia a um banho de fluido circundante ao recipiente que contém o material a ser processado (SULAIMAN, 2011). Já a sonicação direta transfere energia sônica para o fluido a ser processado e é mais indicado para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (CHISTI, 2003).

A cavitação sofre grande influência pelas características físico-químicas do solvente, soluto ou gases (ADEWUYI, 2001). A frequência ultrassônica, o tempo de aplicação, a energia específica e as características do substrato também influenciam o ultrassom (RINCON et al., 2014).

Os grupos de pesquisa e indústrias com experiência em atividades envolvendo o uso de ultrassom vem aumentando. Segundo Mason (2003) existem basicamente três ramos de pesquisa com ultrassom:

- Sonoquímica, com origem em química e física: esta inclui síntese, catálise e estudos fundamentais de cavitação envolvendo principalmente o meio acadêmico.
- Ultrassom de potência, com suas origens na engenharia e processamento: que inclui o processamento de limpeza, soldagem e materiais envolvendo principalmente a indústria.
- Diagnóstico de ultrassom, envolvendo ensaios não destrutivos e digitalização médica: o qual atrai grande interesse na área acadêmica e da indústria.

A despolimerização enzimática de amido mediada por ultrassons tem sido estudada, constituindo um dos raros exemplos de uso de enzimas em sonoquímica (SINISTERRA, 1992). O uso de ultrassom em reações de hidrólise enzimática requer atenção e cuidado devido a uma possível perda de atividade enzimática que as condições de calor e sonicação combinadas podem gerar (LUO; FANG; SMITH JR, 2014). Inesperadamente, a uma baixa intensidade, algumas enzimas não são desativadas (BARTON; BULLOCK; WEIR; 1996). O ultrassom de intensidade moderada ativa as enzimas em reações catalíticas e encurta significativamente o tempo da reação. A cavitação ultrassônica e os seus efeitos secundários intensificam a adsorção/dessorção sobre os locais ativos das enzimas, melhorando a eficiência da reação e reduz a possível desativação enzimática a partir de inibidores (LUO; FANG; SMITH JR, 2014).

3.4.3 Dióxido de carbono supercrítico

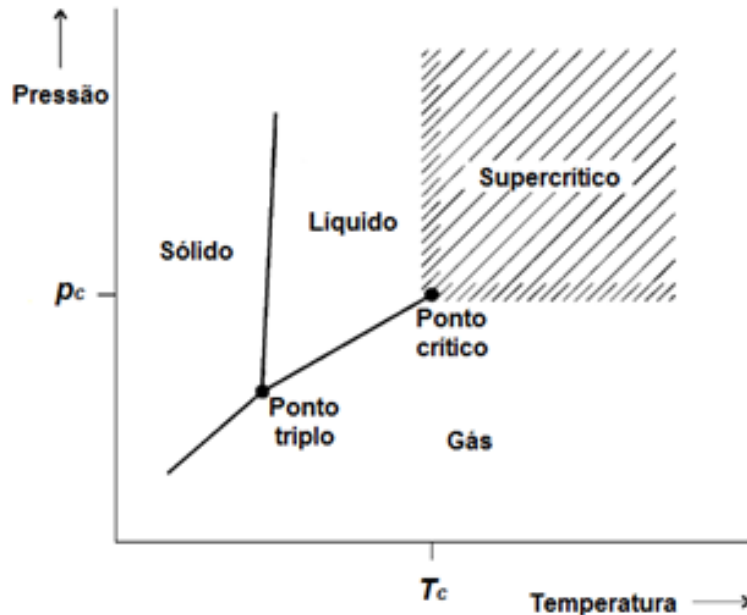
A tecnologia supercrítica se apresenta como uma alternativa atraente para aplicações de processos diferentes devido ao uso de solventes ambientalmente amigáveis e ao tempo curto de reação (Albarelli et al., 2011). O estado supercrítico foi evidenciado pela primeira vez em 1822, e em 1879, Hannay e Hogarth demonstraram a capacidade dos fluidos supercríticos em dissolver solutos, introduzindo a possibilidade de um novo meio solvente (ROMBAUT et al, 2014; HERRERO et al, 2010).

Quando submetido à temperatura e pressão maiores que as condições críticas (T_c e p_c , respectivamente) um fluido é considerado em estado supercrítico. Quando atravessam as condições críticas, como indicado na Figura 14, tanto a fase gasosa quanto a fase líquida são indistinguíveis (BRUNNER, 2005). A temperatura crítica (T_c) é considerada como a temperatura máxima, na qual o gás pode ser convertido em

líquido pelo aumento da pressão, e a pressão crítica (p_c) como a pressão máxima, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura (RIZVI et al, 1986).

A hidrólise da biomassa com fluidos supercríticos torna o processo interessante, pois surge como alternativa aos solventes convencionais. As propriedades físico-químicas exclusivas de dualidade entre gás e líquido dos fluidos supercríticos lhes conferem grande relevância, pois podem ser ajustadas nas condições de operação que permitem obter um coeficiente de difusão alto, além de um elevado grau de seletividade, um poder de solvatação e fácil separação do solvente (TORO et al., 2014; PORTO et al., 2014). Dentre estas propriedades, as mais significantes são a viscosidade e a densidade, pois a baixa viscosidade permite que haja penetração do solvente na matriz sólida, enquanto que a densidade elevada do fluido supercrítico auxilia na solubilização dos compostos (SHARIF et al., 2014).

Figura 14 - Diagrama de fases para uma substância pura.



Fonte: Adaptado de Brunner (2005).

Na Tabela 3 são listados os valores característicos para o estado gasoso, líquido e estado supercrítico. A densidade, próxima à dos líquidos, está relacionada com o poder de solvatação do solvente. Já a viscosidade, próxima a dos gases, e a

difusividade, intermediária entre a dos gases e dos líquidos, estão relacionadas com a taxa de transferência de massa entre o soluto e o fluido (BRUNNER, 2005).

Tabela 3 - Valores característicos das propriedades físicas dos gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Estado de agregação	Densidade (g.cm ⁻³)	Difusividade (cm ² .s ⁻¹)	Viscosidade (g.cm ⁻¹ .s ⁻¹)
<i>Gás</i> P=1,01 bar, T= 15-30°C	(0,6-2,0).10 ⁻³	0,1-0,4	(0,6-2,0).10 ⁻⁴
<i>Líquido</i> P=1,01 bar, T= 15-30°C	0,6-1,6	(0,2-2,0).10 ⁻⁵	(0,2-3,0).10 ⁻²
<i>FSC</i> T _c , P _c	0,2-0,5	0,7.10 ⁻³	(1-3).10 ⁻⁴
T _c , 4P _c	0,4-0,9	0,2.10 ⁻³	(3-9).10 ⁻⁴

Fonte: Adaptado de Brunner (2005).

Em biocatálise, a escolha do solvente é um dos fatores mais importantes, pois na maioria das vezes as características do solvente orgânico influenciam na transferência de massa no sistema de reação, e também tem influência sobre a estrutura da enzima (PEREIRA, 2013). O uso dos fluidos supercríticos no pré-tratamento ou diretamente na hidrólise são utilizados para deixar o polímero mais acessível para o tratamento aumentando assim a digestibilidade do substrato (ALVIRA et al., 2010).

Dióxido de carbono (CO₂) é o principal solvente utilizado, pois permite operações supercríticas com pressões relativamente baixas e temperaturas próximas à ambiente ($P_c = 73,8$ bar; $T_c = 31,04^\circ\text{C}$) (REVERCHON; DE MARCO, 2006; POULIOT et al., 2014), as quais são mais fáceis para manuseio de trabalho. Além do dióxido de carbono supercrítico ser um solvente de baixo custo e disponível com elevada pureza (BRUNNER, 2005), este é reconhecido como seguro (*Generally Recognized As Safe* – GRAS) (MANTELL et al, 2013), inerte, não tóxico e não inflamável (POULIOT et al, 2014).

O dióxido de carbono supercrítico tem muitas vantagens tais como quando em solução aquosa ocorre a formação do ácido carbônico, o que favorece a hidrólise dos polímeros. As moléculas de CO₂ são tão pequenas e podem ser comparadas ao tamanho da molécula de água podendo penetrar da mesma maneira nos pequenos

poros do material a ser hidrolisado. Este mecanismo é facilitado pela pressão elevada. Após a libertação explosiva de pressão de CO₂, acontece uma perturbação na estrutura dos polissacarídeos e conseqüentemente ocorre um aumento do tamanho da área de superfície acessível do substrato ao ataque enzimático (ALVIRA et al., 2010).

Este aumento na acidificação do meio e aumento de contato celular com CO₂ supercrítico pode acelerar a inativação das enzimas. A estabilidade e a atividade das mesmas expostas a dióxido de carbono sob alta pressão dependem da espécie enzimática, do conteúdo de água na solução e também da pressão e temperatura no sistema de reação. O fator mais importante que pode causar perda de atividade da enzima é o passo de despressurização, ou seja, em uma aplicação de enzima a longo prazo a sua atividade diminui com o aumento do número de despressurização (WIMMER; ZAREVÚCKA, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

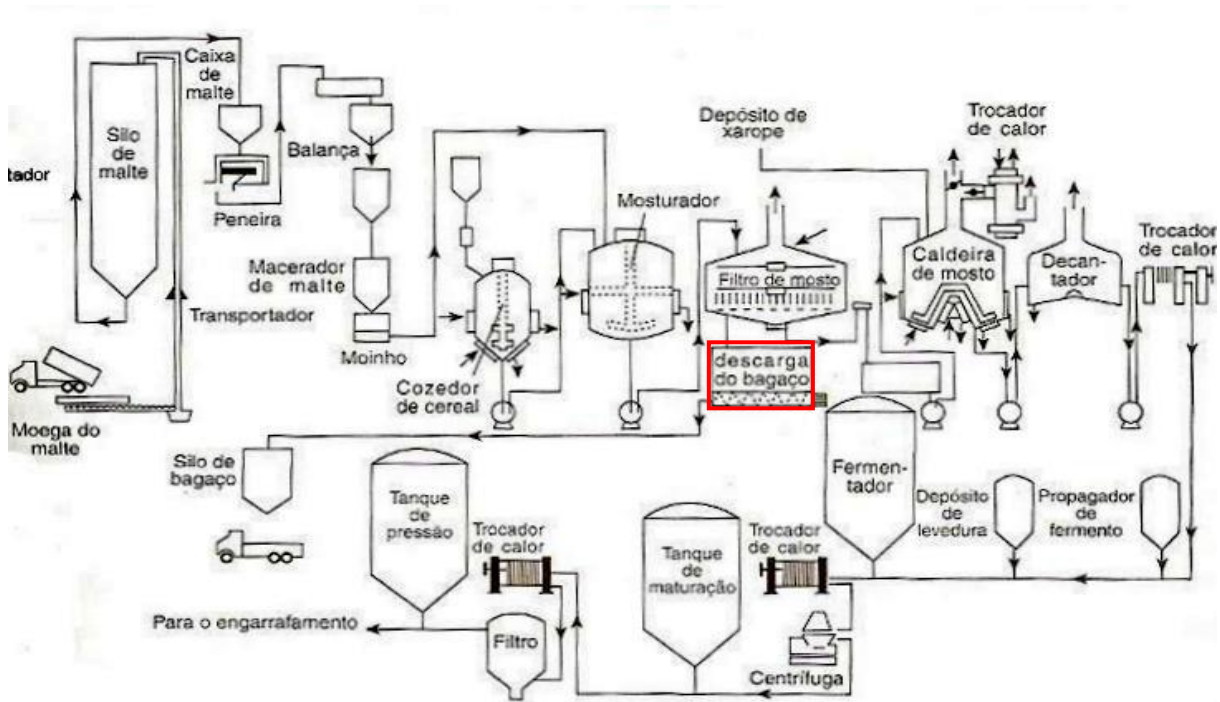
Nesta seção estão apresentados e descritos o material e os métodos utilizados para a determinação dos parâmetros de processo de hidrólise enzimática do bagaço de malte, bem como as análises de caracterização da matéria-prima. Também foi realizada uma análise da fração lignocelulósica do substrato *in natura* e determinada a eficiência para o melhor ensaio cada processo. Com o objetivo de comparar as técnicas envolvidas na hidrólise, foram realizados três planejamentos associados a cada uma das tecnologias do bagaço de malte para verificar a influência do método no rendimento. A variável resposta para os planejamentos foi o rendimento mássico (g ART/kg substrato). Foram realizadas análises de caracterização da matéria-prima (bagaço de malte) como teor de umidade, teor de açúcares, teor de amido, teor de amilose e amilopectina, teor de extrativos, teor de celulose, hemicelulose e lignina, resíduo mineral fixo (cinzas), determinação de proteínas, pH e avaliação do diâmetro médio de partícula. Com exceção das análises de teor de amido, proteína, amilose e amilopectina, todos os experimentos anteriormente citados foram realizados no Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Maria.

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O resíduo da indústria cervejeira, denominado bagaço de malte, foi fornecido pela empresa Santamate Indústria e Comércio Ltda, localizada no município de Santa Maria/RS. O resíduo composto de cascas e grãos de cevada maltada, foi coletado na empresa durante o processamento da cerveja, acondicionado em recipientes plásticos tipo estopa, de aproximadamente 20,0 kg. A matéria-prima foi coletada em dois dias de produção diferentes, Agosto/2015 (Lote 1) e Novembro/2015 (Lote 2), sendo estes misturados com a finalidade de obter uma amostragem representativa e que abrangesse a composição média do resíduo de processo de produção da cerveja, uma vez que ocorrem variações na composição dos cereais utilizados em função da época do ano e da região de plantio. Quando recebida no Laboratório de Bioprocessos, a matéria-prima foi imediatamente submetida à secagem a 60 °C para evitar a contaminação por fungos durante o período de estocagem a temperatura ambiente e acondicionada em frascos plásticos, contendo aproximadamente 2,0 kg

cada, e mantida a temperatura ambiente. A Figura 15 mostra um fluxograma do processamento de cerveja e o ponto de coleta da matéria-prima.

Figura 15 - Fluxograma de uma cervejaria.



Fonte: AQUARONE (2001).

4.2 ENZIMAS UTILIZADAS

Foi utilizado nos processos de hidrólise um complexo amilolítico comercial *STARGEN™ 002* cedido pela GENENCOR (DuPont) que contém *Aspergillus kawachi* alfa-amilase expressa em *Trichoderma reesei* e glicoamilase de *Trichoderma reesei* que atuam sinergicamente na hidrólise do amido granular em glicose. A alfa-amilase e a glicoamilase catalisam a hidrólise completa do amido granular sob uma variedade de condições de fermentação alcoólica. A Tabela 4 apresenta algumas características da *STARGEN™ 002*. Uma unidade de atividade de glicoamilase (GAU) é a quantidade de enzima que libera 1 g de açúcares redutores (calculados como glicose) por hora a partir do amido solúvel do substrato sob as condições do ensaio.

Tabela 4 - Características do complexo enzimático.

Enzima	AA^a	pH	Massa específica
<i>Stargen 002</i>	570	4,0-4,5	1,13 – 1,16 g/mL

a= AA, atividade amilolítica expressa em uma unidade de glicoamilase (GAU/g)

De acordo com o fabricante a *STARGEN™ 002* oferece muitos benefícios, tais como: a hidrólise do amido granular, sem a necessidade de gelatinização do amido ou liquefação, e a alta atividade em condições de sacarificação e fermentação simultâneas (pH e temperatura) favorecidas pela levedura para produção de etanol. De aparência líquida castanho claro, é utilizada para sacarificação de várias fontes de grãos, incluindo trigo, triticale, centeio, cevada e arroz. Há uma temperatura ótima indicada para cada tipo de fonte amilácea (GENENCOR, 2009).

4.3 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

4.3.1 Secagem em estufa a 60°C

Os dois lotes de bagaço de malte recebidos (a), foram imediatamente dispostos em bandejas de alumínio e secos (b) durante 72 horas a 60°C em estufas de secagem (Marca FANEM, Modelo 9) com circulação de ar por convecção natural. A figura 16 apresenta a matéria-prima proveniente de cada uma das etapas.

Figura 16 - (a) Bagaço de malte in natura; (b) Bagaço de malte após secagem e (c) Bagaço de malte após moagem.



Fonte: O autor.

4.3.2 Moagem

Após remoção de umidade o material foi moído em moinho de sapatas (Marca Marconi, Modelo MA 880) equipado com peneira interna de 10 mesh (Figura 17) para obtenção de partícula de tamanho apropriado para a realização dos ensaios e análises (Figura 16, c). Na sequência o substrato foi acondicionado em frascos plásticos para uso posterior.

Figura 17 - Moinho de sapatas.



Fonte: O autor.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

4.4.1 Determinação de umidade

A determinação do teor de umidade do bagaço de malte in natura foi realizada pela técnica de gravimetria seguindo a metodologia de Scipioni (2011). Este método baseia-se na quantificação da massa de uma amostra antes e depois da secagem em estufa (Med Clave, Mod. 1) a 105 °C. Para isto, foram colocadas 10 g de bagaço na estufa (105 °C) por 7 horas, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente, pesadas e, então, quantificada a umidade pela diferença de massa entre a amostra úmida e seca. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento até peso constante. A determinação de umidade do bagaço de malte foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média \pm desvio padrão.

4.4.2 Teor de umidade após secagem

O teor de umidade do material após a secagem foi determinado com 10,0 g a 20,0 g de amostra a uma temperatura de 105 °C, em um analisador de umidade por Infravermelho (GEHAKA, IV2000, Figura 18) seguindo a metodologia de Pitarelo et al. (2012). A determinação de umidade do bagaço de malte após secagem foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média ± desvio padrão.

Figura 18 - Analisador de umidade por Infravermelho.



Fonte: O autor.

4.4.3 Determinação granulométrica

O diâmetro médio das partículas de bagaço de malte foi determinado pelo método do Diâmetro Médio de Sauter de acordo com a metodologia de Soares (2015). Foi utilizado um conjunto de peneiras da série Tyler, uma balança analítica (Marte, AY220) e 10 g de amostra de bagaço de malte. O diâmetro foi calculado de acordo com a equação 1, onde: D_{ps} é o Diâmetro médio de Sauter; x_i é a fração mássica retida e d_i o diâmetro médio das partículas retidas em cada peneira.

$$D_{ps} = \frac{1}{\sum \left(\frac{x_i}{d_i} \right)} \quad (1)$$

4.4.4 Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

A concentração de ART no bagaço de malte foi determinada a partir de um branco composto por bagaço de malte e água em uma razão de 1:10 seguindo a metodologia de Silva (2013). A mistura foi incubada a uma temperatura de 40°C por um tempo de 20 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro e realizada a quantificação de açúcares redutores pelo método 3,5-dinitrossalicílico ácido (DNS) (MILLER, 1959).

4.4.5 Determinação do teor de amido

Para a determinação das frações do amido foi utilizado o método da AOAC 996.11. As amostras foram hidratadas e o amido foi hidrolisado em maltodextrinas com uma amilase termoestável, a 95 – 100°C. A temperatura e o pH foram ajustados, e os polissacarídeos foram quantitativamente hidrolisados à glicose com a amiloglucosidase altamente purificada. A glicose foi determinada com reagente peroxidase glicose-oxidase. O teor de amido foi calculado e relatado como o percentual na amostra integral. A análise foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

4.4.6 Teor de amilose e amilopectina

A quantidade de amilose nas amostras de amido foi determinada seguindo a metodologia do – Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). A amostra de amido foi dispersa em álcool etílico P.A. 95%, gelatinizada com hidróxido de sódio e acidificada com ácido acético. Após a adição de solução de iodo, o complexo formado de coloração azul foi quantificado por espectrofotômetro a 620 nm. O teor de amilopectina foi determinado por diferença. Esta análise foi realizada no Laboratório de Piscicultura da UFSM.

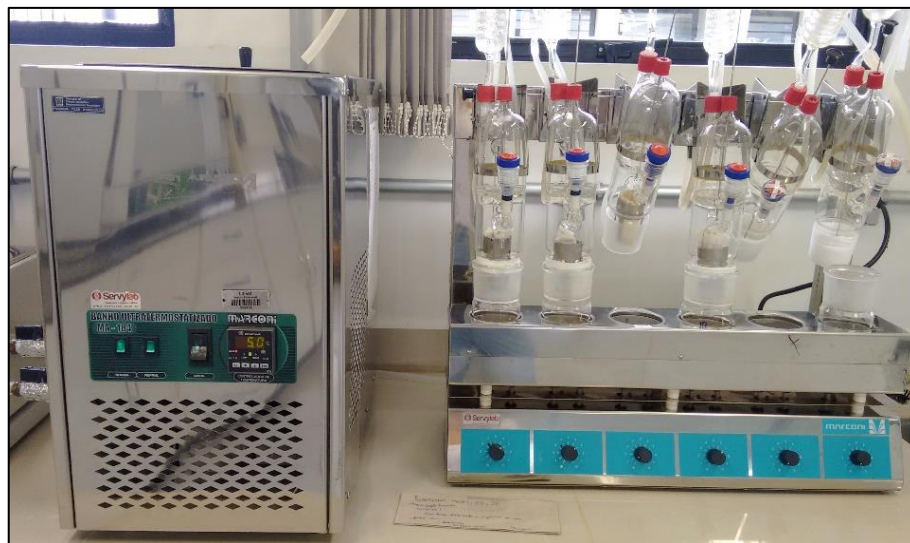
4.4.7 Determinação de proteínas

Para determinação do teor de proteínas utilizou-se o método Micro Kjeldahl, segundo a AOAC – 960-52 (1995). A análise de proteínas foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

4.4.8 Determinação de extrativos

Para determinação de extrativos, seguiu-se a metodologia Sluiter et. al. (2005) “Determination of Extractive in Biomass”, com modificações, pesaram-se amostras de 10,0 g de bagaço previamente moído e seco em papel de filtro (moldados em forma de cartucho) e colocados para ser extraídos em um aparelho Soxhlet aquecidos em sistema de multiplacas de aquecimento, da marca Marconi, modelo MA – 188 (Figura 19). Adicionaram-se 200 mL de etanol ao recipiente do extrator junto com uma quantidade de pérolas de vidro. O tempo de refluxo total foi de aproximadamente 24 horas, com troca de solvente no tempo de 12 horas. Após este tempo, os cartuchos foram retirados do extrator e lavados abundantemente com água corrente. Após a lavagem, o volume de solvente foi trocado por um volume equivalente de água destilada. Repetiu-se o mesmo procedimento de tempo de refluxo e troca de solvente.

Figura 19 - Sistema Soxhlet para determinação de extrativos.



Fonte: O autor.

Após extração com água os cartuchos foram lavados com bastante água corrente, e então secos em estufa de secagem especial da marca Marconi, modelo MA a 105°C até massa constante. As análises foram realizadas em triplicata e apenas para o bagaço de malte *in natura*. A quantificação do conteúdo de extraíveis foi determinada através da equação 2. Onde, C_{bs} é a massa do bagaço seco (g) e Cl a massa do bagaço livre de extrativos (g).

$$E (\%) = \frac{Cbs - Cl}{Cbs} \times 100 \quad (2)$$

4.4.9 Determinação de pH

A medida do pH foi realizada com o preparo de uma suspensão com 10 g da amostra em 100 mL de água destilada, seguido de agitação. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 minutos, depois o valor de pH foi medido em pHmetro (LUCADEMA, modelo LUCA-210), devidamente calibrado.

4.5 DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS E COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

4.5.1 Dosagem de Açúcares Redutores Totais (ART)

O reagente de DNS foi preparado de acordo com a metodologia MALDONADO, CARVALHO, FERREIRA (2013) seguindo-se as concentrações apresentadas na Tabela 5. O ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e o NaOH foram previamente dissolvidos e em seguida foram adicionados os demais componentes. Em meio básico e à temperatura elevada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico passa a 3-amino-5-nitrosalicílico. Desenvolve-se uma solução amarelo café que absorve a 540 nm (MILLER, 1959).

Tabela 5 - Composição do reagente original de DNS.

Componente	Quantidade
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	10,6 g
NaOH	19,8 g
Fenol	7,6 mL
Metabissulfito de sódio	8,3 g
Água Destilada	1416 mL

Fonte: MALDONADO, CARVALHO, FERREIRA (2013).

À parte, foi preparada uma solução estabilizante da cor formada do DNS, adicionando 15,1 g/L de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. Ambos foram armazenados em frascos âmbar, para evitar possíveis degradações. Elaborou-se uma

reta padrão a partir de uma solução de glicose com concentração inferior a 1 g/L e a absorbância foi lida à 540 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, modelo UV 2600). Todas as análises foram conduzidas em triplicata e os dados expressos g ART/Kg substrato (BENAZZI, 2013).

4.5.2 Quantificações por cromatografia líquida (UPLC)

Uma hidrólise ácida do bagaço de malte in natura sem extrativos foi realizada e após os perfis de carboidratos foram analisados usando cromatografia líquida de ultra eficiência (Shimadzu, UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatograph) equipada com um detector de índice de refração. Os dados para açúcares, ácido acético e inibidores estão descritos a seguir no item 4.8 (Caracterização da biomassa lignocelulósica).

4.6 REAÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

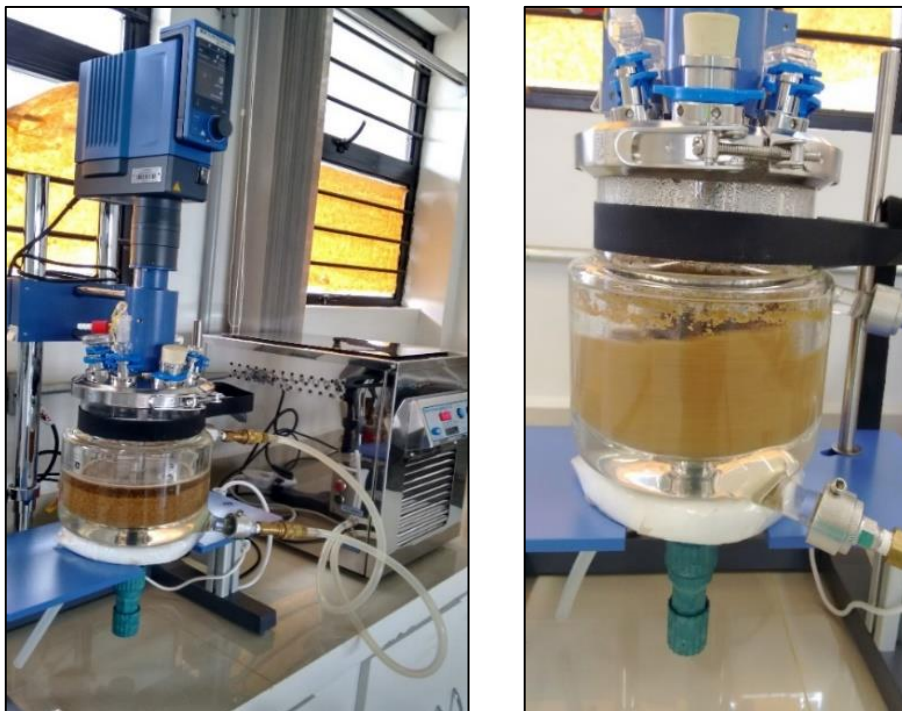
Pensando na economicidade do processo como um todo, buscou-se conduzir os processos de hidrólise num tempo curto (máximo de 4 horas) e em uma faixa de temperatura não superior ao da temperatura de gelatinização do amido. Scipioni (2011) confirma através de seu trabalho que o tempo de 4 horas é suficiente para a completa sacarificação do amido com enzimas comerciais. Outro fator empregado visando à redução dos custos do processo foi a utilização de meio aquoso (não tamponado) sem esterilização prévia.

4.6.1 Hidrólise enzimática usando agitação mecânica

4.6.1.1 Equipamento

O biorreator usado neste trabalho constitui-se por um recipiente encamisado de vidro com um volume de 2 L equipado de um agitador mecânico (IKA EUROSTAR @200controlP4 – Figura 20). A temperatura foi controlada com um banho termostático e a velocidade de rotação foi mantida a 100 rpm durante todo o tempo de reação.

Figura 20 - Biorreator - Agitação mecânica.



Fonte: O autor.

4.6.1.2 Procedimento experimental

As reações foram realizadas considerando um volume de trabalho de 1 L de água destilada com diferentes quantidades de matéria-prima. Inicialmente, a água destilada e a matéria-prima foram adicionadas ao biorreator. Depois de estabilizada a temperatura, uma quantidade de *STARGEN*[™] 002 (porcentagem mássica calculada a partir da massa de enzima em relação à massa de substrato utilizada) foi adicionada de acordo com o planejamento experimental e o tempo de reação foi de 240 minutos, sob agitação de 100 rpm. No final da reação, uma alíquota foi retirada do biorreator e após filtrada em papel filtro (Qualy). A quantidade de açúcares redutores totais (ART) liberados pela hidrólise foi medida a partir do sobrenadante pelo método DNS (MILLER, 1959). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.1.3 Delineamento composto central rotacional

A influência da concentração de enzima (x_1), temperatura (x_2) e concentração de substrato (x_3) foi avaliada por meio de um delineamento composto central

rotacional (DCCR) para três variáveis independentes, totalizando 17 ensaios. Os intervalos das variáveis investigadas estão listados na Tabela 6. Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 10 (Stasoft Inc., Tulsa, EUA), considerando um nível de significância de 95%.

Tabela 6 - Níveis de variáveis independentes investigadas no delineamento composto central rotacional.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
x_1 (wt%)	1	2,8	5,5	8,2	10
x_2 (°C)	30	38,1	50	61,9	70
x_3 (g.L ⁻¹)	50	80	125	170	200

4.6.2 Hidrólise enzimática assistida por ultrassom

4.6.2.1 Equipamento

O aparato experimental utilizado para as hidrólises assistidas por ultrassom é o mesmo citado no item anterior (4.6.1.1) acoplado a um processador de ultrassom de alta intensidade de 400 W, frequência de 24 kHz com uma amplitude regulável de 20 a 100% e fator de pulso ajustável entre 0 e 100% (Hielscher, modelo 400S), equipado com uma sonda de titânio, de 22 mm (modelo H22L2D) que apresenta uma intensidade máxima de ultrassons 86 W.cm⁻².

4.6.2.2 Sonicação Direta

As condições das reações para hidrólise usando sonicação direta de ultrassom (Figura 21) foram determinadas a partir dos resultados do planejamento para agitação mecânica, onde concentração de enzima (8,2%), temperatura (70°C) e concentração de substrato (170 g.L⁻¹) foram fixadas. O volume, assim como o procedimento para adição da enzima foi o mesmo anterior. O tempo de reação foi de 120 minutos, menor do que o tempo de reação para agitação mecânica, devido ao efeito que o ultrassom pode causar sobre a atividade da enzima. No final da reação, uma alíquota foi retirada do biorreator e após filtrada em papel filtro (Qualy). A quantidade de açúcares redutores totais (ART) liberados pela hidrólise foi medida a partir do sobrenadante.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 21 - Sonicação direta de ultrassom.

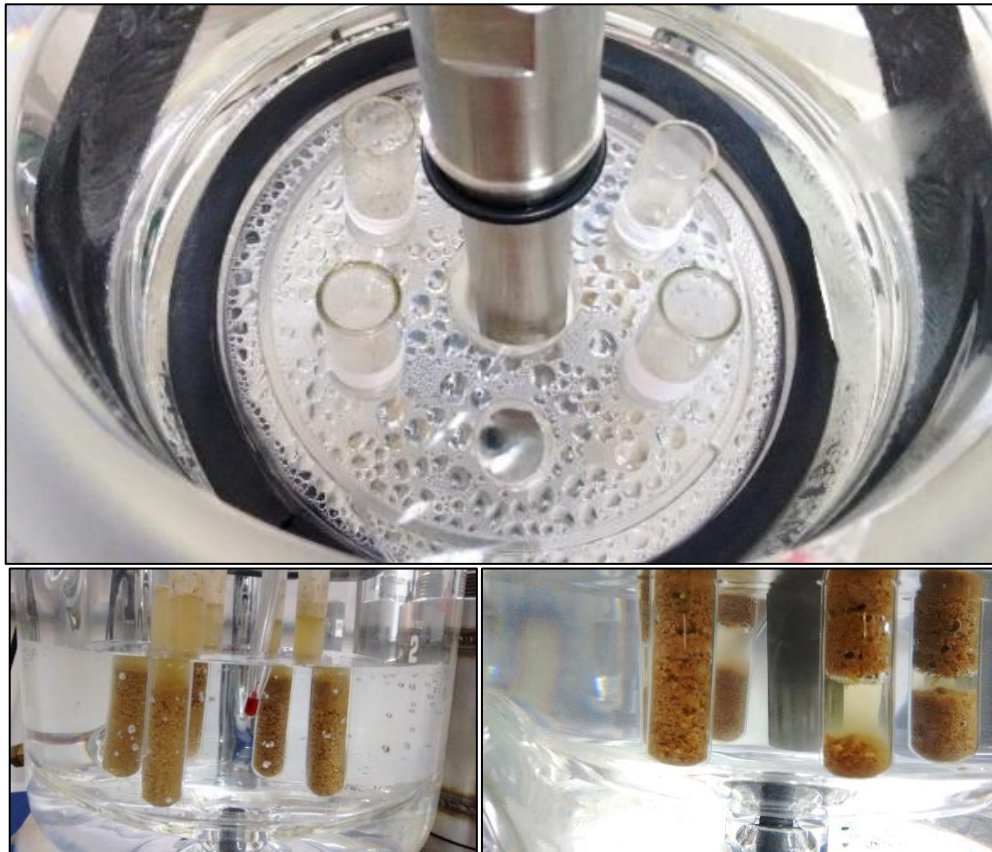


Fonte: O autor.

4.6.2.3 Sonicação indireta

Para sonicação indireta a sonda de ultrassom foi colocada no centro do biorreator (Figura 22). Cinco tubos de ensaio contendo 1,7 g de bagaço seco foram imersos no biorreator a um raio de 10 cm da sonda. Após a estabilização da temperatura (70°C), a enzima foi adicionada ao meio de reação. O tempo de reação foi de 2 horas. Embora o volume de reação foi muito inferior ao de sonicação direta, a razão das concentrações foi mantida (1:10), e é importante ressaltar que a potência de ultrassom dissipada por volume de líquido é idêntico em ambos os sistemas (1000 ml).

Figura 22 - Sonicação Indireta de ultrassom.



Fonte: O autor.

4.6.2.4 Delineamento composto central rotacional

A influência da amplitude (x_1) e fator de pulso (x_2) foi avaliada por meio de um DCCR para duas variáveis independentes, totalizando 11 ensaios. Os intervalos das variáveis investigadas estão listados na Tabela 7. Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 10 (Stasoft Inc., Tulsa, EUA), considerando um nível de significância de 95%.

Tabela 7 - Níveis de variáveis independentes investigadas no DCCR para hidrólise com ultrassom (sonicação direta e indireta).

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
x_1 (%)	20	28,7	50	71,3	80
x_2 (%)	0,23	0,40	0,55	0,87	1,00

4.6.3 Hidrólise enzimática com CO₂ supercrítico

4.6.3.1 Equipamento

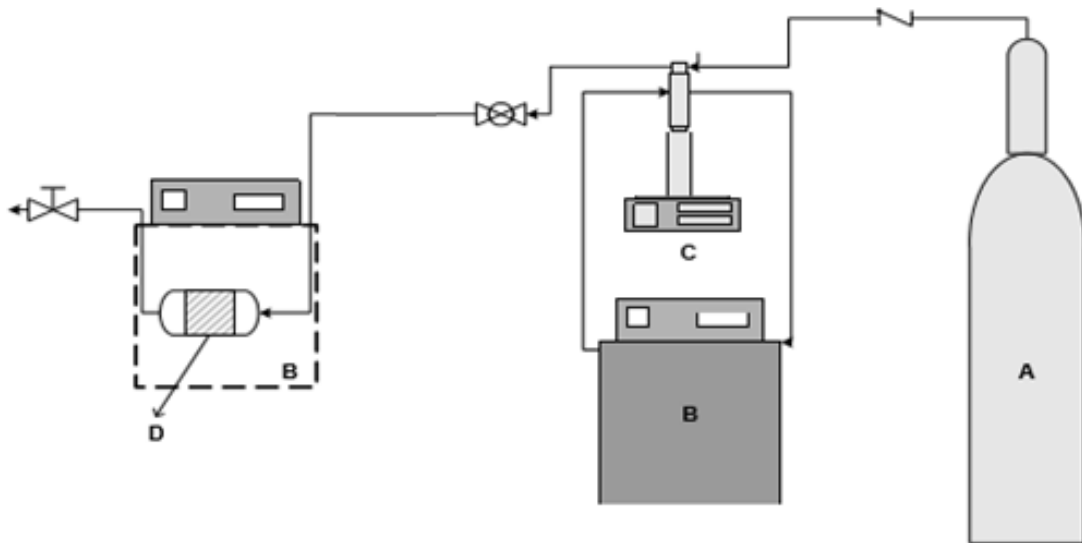
A hidrólise enzimática do BM com CO₂ supercrítico foi realizada em uma unidade laboratorial (Figura 23), que consiste basicamente, de um cilindro de CO₂ (A), dois banhos de regulação térmica (B), uma bomba de alta pressão (ISCO 500D, C) e uma célula encamisada de aço inoxidável com um volume interno de 100 mL (D). Entre a bomba e o reservatório de solvente encontra-se uma válvula (HIP 15-41AF1 T-316SS) utilizada para evitar que o fluxo de solvente pressurizado volte para o reservatório. Duas válvulas adicionais (HIP 15-11AF2 316SS) completam o aparelho experimental, uma localizada após a bomba, na entrada da célula de alta pressão, para permitir o carregamento de solvente e a outra depois da célula apenas para realizar a descarga solvente, conforme diagrama esquemático apresentado na Figura 24.

Figura 23 - Vista parcial da unidade para utilização de CO₂ supercrítico (sem cilindro).



Fonte: O autor.

Figura 24 - Unidade experimental do sistema supercrítico.



Fonte: Adaptado de SILVA (2013).

4.6.3.2 Procedimento experimental

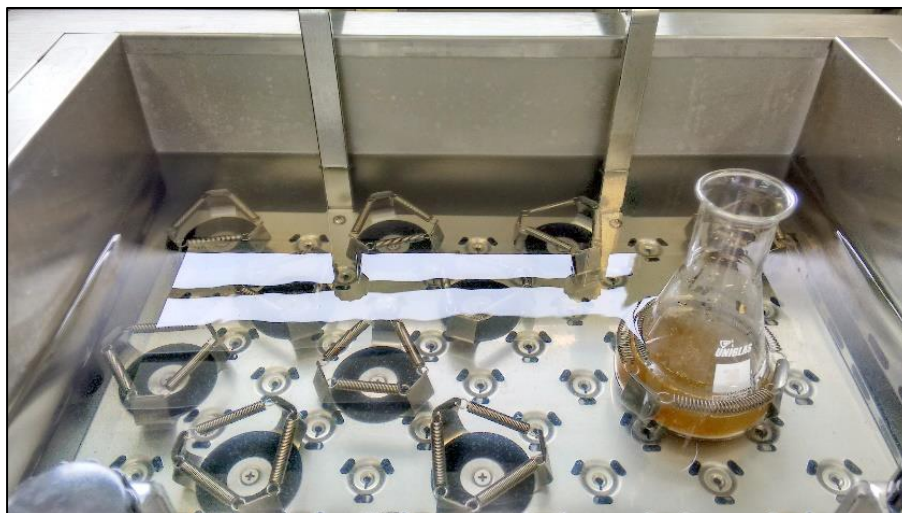
O procedimento experimental para a hidrólise do BM consistiu na adição de aproximadamente 10 g de amostra e 8,2 % (m/m) de enzima com umidade definida de acordo com o planejamento. Após este procedimento o reator foi fechado e o sistema pressurizado e aquecido até a pressão e temperatura estabelecidas. Atingida a temperatura e pressão desejada iniciava-se o experimento por um tempo de 4 horas. Ao final, o sistema era despressurizado à taxa constante e o material sólido retirado do reator e levado à extração dos açúcares de acordo com o procedimento descrito abaixo. Os efeitos do teor de umidade, pressão e temperatura sobre a hidrólise enzimática do bagaço de malte foram avaliados por meio de um DCCR.

4.6.3.3 Determinação de açúcares redutores totais

Após a hidrólise, os açúcares redutores foram extraídos a partir do material sólido utilizando água destilada a proporção sólido/líquido de 0,1 (base úmida) de acordo com a metodologia usada por Moscon et al. (2014). As extrações foram efetuadas a 30 ° C sob agitação orbital de 150 rpm durante 30 minutos (Figura 25). Em seguida, a solução foi filtrada (papel de filtro qualitativo Qualy) e o sobrenadante

foi utilizado para determinar a quantidade de açúcares fermentáveis pelo método 3,5-dinitrossalicílico ácido (DNS) (MILLER, 1959).

Figura 25 - Extração de açúcar fermentável após hidrólise com CO₂ supercrítico.



Fonte: O autor.

4.6.3.4 Delineamento composto central rotacional

As influências da temperatura (x_1), pressão (x_2) e teor de umidade foram avaliadas por meio de um DCCR para três variáveis independentes, para um total de 17 ensaios. Os intervalos das variáveis investigadas estão listados na Tabela 8. Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 10 (Stasoft Inc., Tulsa, EUA), considerando um nível de significância de 95%.

Tabela 8 - Níveis de variáveis independentes investigadas no delineamento composto central rotacional para CO₂ supercrítico.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
x_1 (°C)	30	36	40	44	50
x_2 (bar)	100	145	175	205	250
x_3 (%)	40	52	60	68	80

4.6.4 Rendimento e eficiência de hidrólise

O rendimento e a eficiência da hidrólise foram calculados apenas para o melhor ensaio de cada planejamento, ou seja, aquele que apresentou maior quantidade de ART (g) por kg de substrato (variável resposta). A eficiência do processo é calculada sobre a quantidade de amido na matéria-prima que entrou no processo. O rendimento teórico da hidrólise ($Y_{teórico}$) do amido foi obtido pela equação 3 descrita por Scipioni (2011), dos quais 180 é a massa molecular da glicose; 162 é a massa molecular do monômero de glicose na molécula de amido; (M) a massa de amido em gramas e (V) o volume do biorreator.

$$Y_{teórico} = \frac{180/162 \times M}{V} \quad (3)$$

A partir dos valores teóricos foi calculada a eficiência da hidrólise (Equação 4), sendo Y_{real} o rendimento de açúcares obtido na suspensão de ensaio (g/L), $Y_{teórico}$ o rendimento que seria obtido no rendimento que seria obtido na hidrólise total da massa do amido (g/L).

$$\text{Eficiência da Hidrólise (\%)} = \frac{Y_{real}}{Y_{teórico}} \times 100 \quad (4)$$

O fator (162/180) aparece devido à estequiometria da reação (equação 5). Deve-se lembrar que para cada n mols de glicose formada, são necessários um mol de amido e n mols de água. Dessa forma, a massa de glicose formada não é proveniente apenas do amido, uma vez que uma parcela é oriunda da água incorporada. Usando a relação estequiométrica para a conversão de amido em glicose, partindo de 900 kg de amido, tem-se a produção máxima de 1000 kg de glicose em uma hidrólise completa.



4.6.5 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância dos parâmetros do modelo para os dados dos planejamentos e dos efeitos. Para tanto, usou-se como referência o coeficiente p do teste de hipótese com intervalo de confiança de 95%. Sendo assim, para valores de p inferiores a 0,05, a hipótese nula é rejeitada e a variável é considerada estatisticamente significativa. Caso contrário, é considerada não significativa (Montgomery, 2001). O coeficiente de determinação (R^2) também foi empregado para medir o percentual da variância dos dados experimentais que pode ser explicada pelo modelo ajustado. Finalmente, a significância da regressão frente ao erro foi determinada pelo teste F com intervalo de confiança de 95%. Através da metodologia de superfície de resposta, foi avaliada a influência dos fatores sobre a produtividade de ART.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os procedimentos descritos a seguir foram baseados nas metodologias TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry*), NREL (*National Renewable Energy Laboratory*) e Gouveia et. al. (2009), e foram realizados para o material *in natura* sem extrativos.

4.7.1 Preparação da biomassa lignocelulósica para caracterização

4.7.1.1 Hidrólise ácida concentrada

Foram pesados cerca de 0,3 g de biomassa em tubos de ensaio devidamente identificados. Foi adicionado aos tubos contendo as amostras exatamente 3 mL de H_2SO_4 a 72% (m/m). Após os tubos foram incubados em banho termostático (Marca Solab) durante 1 hora, e com o auxílio de um bastão de vidro as amostras foram agitadas a cada 10 minutos, completando o tempo estabelecido. Esta agitação teve como intuito permitir que a hidrólise fosse mais eficaz para deixar o material mais homogêneo possível.

4.7.1.2 Hidrólise ácida diluída

Após o término da reação, o conteúdo dos tubos foi transferido quantitativamente para frascos Schott de 250 mL com tampa, lavando-se bem os bastões de vidro para que não houvesse nenhuma perda de massa, os recipientes foram devidamente fechados e levados à autoclave à temperatura de 121°C durante 1 hora para que houvesse uma total hidrólise dos oligômeros. Após esta etapa, os frascos foram retirados, resfriados em banho de água fria e as amostras foram filtradas em um funil com papel filtro (previamente tarado e pesado). O hidrolisado foi filtrado e transferido para um balão de 100 mL, para realizar as análises de lignina solúvel e carboidratos.

4.7.1.3 Determinação da lignina insolúvel

O material retido no papel filtro foi lavado com água destilada (aproximadamente 1,5 L) até se obter a neutralidade do pH (pH=7,0). O papel de filtro com a amostra foi colocado em estufa a 65°C até se obter massa constante. A parte deste material insolúvel é composta de cinzas, que não são solúveis em ácido. Deste modo, para que não ocorra a superestimação dos resultados de lignina insolúvel, foi realizada a metodologia para determinação de cinzas (item 4.8.1.4) no papel de filtro com amostra. A Equação 6 mostra como foi calculado o teor de lignina Klason, onde M_{pf} é a massa do papel filtro e M_{lis} é a massa da lignina insolúvel seca.

$$(\%) = \frac{M_{pf} + M_{lis} - M_{pf \text{ tarado}}}{M \text{ bagaço seca}} \times 100 - \% \text{ cinzas} \quad (6)$$

4.7.1.4 Determinação de cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana. A amostra foi calcinada durante 1h a 400°C e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla (Fornitec modelo MDS 15X15X30). Na determinação das cinzas totais, pesaram-se aproximadamente 1 g do bagaço em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação (7).

$$\% \text{ cinzas} = \frac{M_c}{M_a} \times 100 \quad (7)$$

Onde: % cinzas – percentual em massa de cinzas; M_c – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M_a – massa da amostra base seca.

4.7.1.5 Determinação da lignina solúvel na fração líquida

Uma alíquota de 250 μL da fração líquida e 130 μL de NaOH 6,5 M foram transferidos para um balão de 25,0 mL completo com água destilada (1:75). A absorbância da mistura foi lida a 280 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, modelo UV 2600). O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 8.

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (8)$$

Onde: C_{lig} - concentração de lignina solúvel, em g/L; A_T - absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{pd} = c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2$ – absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLUE (cromatografia líquida de ultra eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 $\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$. O cálculo para lignina insolúvel é dado através da Equação 9 e o fator de diluição (FD) é igual a 75.

$$\text{Lignina s. (\%)} = \frac{C \text{ lignina solúvel} \times V_{\text{filtrado}} \times \text{FD}}{M \text{ bagaço seco}} \times 100 \quad (9)$$

4.7.1.6 Quantificação de carboidratos

Os teores de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético presentes nos hidrolisados foram analisados por *Ultra-Performance_Liquid Chromatography* (Shimadzu, UPLC) objetivando a posterior quantificação das frações poliméricas (celulose, hemiceluloses e grupo acetila).

Foi utilizada a coluna BioRad Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm) em temperatura de 30°C. A fase móvel foi preparada com uma solução de H₂SO₄ 5 mM (com pH de 2,6) utilizando-se água ultrapura (Mili-Q). Após o preparo da solução a fase móvel foi filtrada a vácuo em Membrana HÁ em ésteres de celulose com 0,45 µm e 47 mm de diâmetro da marca Milipore, e em seguida levada para Ultrassom (Unique – *Ultrasonic Cleaner*).

O fluxo da fase móvel utilizado foi de 0,6 mL/min. O volume de injeção das amostras utilizado foi de 15µL. Os compostos foram separados na fase estacionária e monitorados com um detector de índice de refração (IR) a temperatura 30°C por um tempo de execução de 25 min.

As concentrações de cada componente foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e curvas padrões (previamente determinadas por padrões de D-(+) celobiose, D-glicose, D-xilose e D-arabinose).

As massas de celobiose e glicose foram convertidas em celulose, com os fatores de 0,95 e 0,90, respectivamente, como também as massas de xilose e arabinose foram convertidas a hemiceluloses, empregando-se o fator de 0,88. Os cálculos do teor de carboidratos e teor de ácido acético realizar-se-ão de acordo com a Equação 10 e 11, respectivamente:

$$\text{Açúcares (\%)} = \frac{C \times F_t \times V_t}{M_b} \times 100 \quad (10)$$

Onde,

C: concentração de açúcar quantificado por UPLC (g/L)

F_t: fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (celobiose= 0,95, glicose= 0,9, xilose e arabinose= 0,88).

V_f: volume do hidrolisado filtrado (0,087L)

M_b: massa do bagaço seco (g)

$$\text{Acetato (\%)} = \frac{C_a \times F_c \times V_f}{M_b} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

C_A : concentração de ácido acético quantificado por UPLC

F_c : fator de conversão do ácido acético, 0,72

V_f : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_b : massa do bagaço seco (g)

4.7.1.7 Teor de furfural e hidroximetilfurfural

Para as análises de furfural e de hidroximetilfurfural (HMF), as amostras previamente filtradas foram injetadas em uma coluna Nova-Pak C18, Waters, Milford, MA, utilizando como fase móvel uma solução de acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético), previamente filtrada e deaerada. As condições para a análise foram: volume injeção: 20 μ L, taxa de fluxo 0,80 mL/min, temperatura da coluna 30°C, comprimento de onda: 280 nm, temperatura do detector 30°C, detector: UV-VIS e tempo de execução: 10 minutos.

As áreas dos picos correspondentes ao furfural e HMF foram utilizadas para calcular sua concentração na amostra utilizando para isso um fator de conversão de 1,37 e 1,10, respectivamente. A Equação 12 apresenta o cálculo para furfural e HMF.

$$\text{Furfural ou HMF (\%)} = \frac{C \times F_c \times V_f}{M_b} \times 100 \quad (12)$$

Onde:

C_{UPLC} = concentração de furfural ou HMF quantificado por UPLC, em g/L

F_c = fator de conversão do furfural (1,37) ou HMF (1,20)

V_f = volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M_b = massa do bagaço (g)

4.7.1.8 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina

Os resultados obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, e HMF,

foram então utilizados para calcular as porcentagens de celulose e hemicelulose presente no bagaço de acordo com as Eqs. 13 e 14.

$$\text{Celulose} = 0,95 \text{ C\%} + 0,90 \text{ G\%} = 1,20 \text{ HMF\%} \quad (13)$$

$$\text{Hemicelulose} = 0,88 \text{ X\%} + 0,88 \text{ A\%} + 1,37 \text{ F\%} + 0,72 \text{ AA\%} \quad (14)$$

Nas Equações 13 e 14, C%, G%, HMF%, X%, A%, F%, e AA% referem-se as porcentagens de celobiose, glicose, HMF, xilose, arabinose, furfural e ácido acético no bagaço de malte. A quantidade total de lignina no bagaço foi calculada com a soma das suas fracções insolúveis e solúveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os principais resultados obtidos durante a pesquisa, bem como suas respectivas discussões, levando-se em conta os fenômenos observados e os dados reportados na literatura. O grande número de publicações ao longo dos últimos 5 anos, nas aplicações biotecnológicas do BM, representa o aumento do interesse científico sobre esta matéria-prima (XIROS; CHRISTAKOPOULOS, 2012). Durante a discussão são mencionados alguns trabalhos científicos mais recentes sobre a biotecnologia potencial do bagaço de malte e sua avaliação como matéria-prima para produtos de alto valor agregado. Dentro de um conceito de biorrefinaria, o hidrolisado de BM pode levar à obtenção de glicose, molécula chave para os processos biotecnológicos.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima de interesse utilizada neste trabalho foi o bagaço de malte. A partir deste resíduo vegetal, proveniente de um processamento industrial, buscou-se obter os nutrientes necessários para o desenvolvimento de um bioprocessamento. Desta forma, a Tabela 9 apresenta os resultados da caracterização parcial do bagaço de malte com relação aos teores em base seca de amido, proteína, açúcares redutores e cinzas. A matéria-prima foi recebida com teor de umidade de $72,3 \pm 0,11$ %, calculado através de 3 réplicas. O teor de umidade foi semelhante aos valores encontrados na literatura para o BM. Cordeiro (2011) caracterizou uma amostra com 75,45 % de umidade, e afirma que a elevada quantidade de água no bagaço úmido limita o seu tempo útil para consumo *in natura*, prejudicando seu armazenamento, uma vez que pode ocasionar a proliferação de fungos e a degradação do material, além de tornar o transporte inviável devido aos elevados custos e dificuldade de manejo. Após secagem a 60°C determinou-se a umidade do material a 105°C por Infravermelho, sendo de $5,27 \pm 0,15$ %. As demais análises também foram realizadas em triplicata.

Tabela 9 – Composição química parcial do bagaço de malte.

Componente (produto integral)	Teor em massa (%)
Amido	32,14
Proteína	18,32
Teor de açúcares redutores	0,47
Cinzas	2,19

Conforme apresentado na Tabela 9, o amido é o principal componente do bagaço (cerca de 32 %). O elevado teor de amido presente no bagaço de malte o torna uma excelente fonte amilácea. O fato deste ser um subproduto industrial justifica ainda mais o interesse por esta matéria-prima, a qual apresenta um grande potencial para a hidrólise com enzimas amilolíticas.

O teor de proteínas no bagaço de malte (18,32 %) também é maior do que os teores encontrados em outros materiais lignocelulósicos, tais como as palhas de cevada, aveia, arroz e trigo, as quais contêm entre 3,0 a 5,0 % de proteínas (THEANDER; AMAN, 1984). A maioria das proteínas abundantes em BM são hordeínas (prolaminas na cevada), glutelinas, globulinas e albuminas com hordeínas constituem a maior parte (CELUS; BRIJS; DELCOUR, 2006).

Um baixo teor de açúcares redutores (0,47 %) também foi obtido por Mathias, Mello e Servulo (2014), durante a análise de composição do BM (0,65 %). Estes baixos teores de açúcares redutores no BM podem ser justificados devido a lavagem deste resíduo para a recuperação de extrato no mosto cervejeiro. Além do mais, este valor corrobora com os dados de literatura que caracterizam o bagaço de malte como material predominantemente fibroso (ALIYU; BALA, 2011; LIMA, 2010; ROBERTSON et al., 2010; MUSSATO et al., 2006) e não rico em açúcares fermentáveis. Por fim, por ser um valor tão baixo, o teor de açúcares no material foi desconsiderado para cálculos de rendimento e eficiência.

Além dos componentes já descritos, o BM também apresenta 2,19% de cinzas, semelhante aos valores encontrados por Pereira e Santos (2014) de 2,61 a 2,97%, variando de acordo com a granulometria. Dragone (2007) realizou uma análise de espectrometria de emissão atômica revelando que diversos minerais podem estar presentes na composição deste material, os quais incluem: cálcio, sódio, potássio,

magnésio, alumínio, ferro, bário, estrôncio, manganês, cobre, zinco, fósforo, enxofre, cromo e silício. Assim como nas palhas de cereais (aveia, cevada, arroz e trigo) (THEANDER; AMAN, 1984), as cinzas do BM também são ricas em silício; entretanto, o bagaço apresenta teores mais elevados de fósforo e cálcio, minerais existentes em menores proporções nestas outras matérias-primas (DRAGONE, 2007).

Como descrito na revisão bibliográfica deste trabalho, o amido é composto basicamente por dois tipos de macromoléculas: a amilose (de cadeia linear) e a amilopectina (de cadeia ramificada). A susceptibilidade do amido ao ataque enzimático é influenciada por fatores como conteúdo destas macromoléculas, e por este motivo a análise dessas frações foi realizada. Uma forma de caracterização do conteúdo de amilose em amido baseia-se na reação de íons iodo com as cadeias lineares da amilose. Após análise, o teor de amilose mensurável foi de 3,44%. Segundo Denardin e Silva (2009), níveis entre 15% e 25% de amilose são típicos na maioria dos grãos, contudo, alguns cereais denominados cerosos (*waxy*), como milho, arroz e cevada, são virtualmente livres de amilose, o que justifica um teor tão baixo encontrado para este material. O baixo teor encontrado também pode ser justificado por tratar-se de um material já submetido a uma hidrólise anterior (no processo de produção de cerveja), onde a fração de amilose presente pôde ser convertida mais facilmente se comparada à amilopectina.

Outros componentes importantes para o processo de hidrólise e que representam grande parte da composição do BM, mas que não são foco deste trabalho (diferenciando-o da maioria reportados) são as fibras, incluindo celulose, hemicelulose e lignina. A composição lignocelulósica da amostra bagaço de malte in natura utilizado no presente estudo (Tabela 10), determinada de acordo com o método validado por Gouveia et al. (2009), foi a seguinte: 25,70% de celulose, 28,71% de hemicelulose e lignina 18,28%. De acordo com o método recomendado pelo *National Renewable Energy Laboratory* dos EUA (SLUITER, 2008), a composição química desta mesma amostra é composta por: 15,68% de glucanas, 17,38% de xilanas, 3,96% de grupos acetila, 8,77% de lignina insolúvel, 9,51% de lignina solúvel, 2,19 % de cinzas e 39,31% de extrativos.

Tabela 10 - Composição lignocelulósica do bagaço de malte.

Componente	Teor em massa (%)
Celulose	25,70 ± 0,34
Hemicelulose	28,71 ± 0,39
Lignina	18,28 ± 0,97
Extrativos	39,31 ± 0,31
Cinzas	2,19 ± 0,05

Como pode ser visto na Tabela 11, o teor de celulose entre 12,29% e 22,36%, teor de hemiceluloses entre 15,18% e 28,42%, teor de lignina entre 19,30% e 30,48% foram relatadas por outros investigadores para diferentes amostras de bagaço de malte. Tal diversidade nos dados de composição é normal uma vez que a composição química dos materiais lignocelulósicos depende, entre outros fatores, da variedade da cevada, do tempo da colheita, das condições de maltagem e mosturação, bem como da qualidade e tipo de adjuntos adicionados no processo de fabricação de cerveja (XIROS; CHRISTAKOPOULOS, 2012).

O teor de extrativos no bagaço de malte seguiu a metodologia Sluiter et. al. (2005). Os extrativos são definidos como compostos que podem ser extraídos de materiais lignocelulósicos, tanto por solventes polares quanto por apolares, que não são componentes estruturais da parede celular. Nessa categoria, incluem-se vários compostos de baixa ou de média massa molecular, incluindo uma grande variedade de moléculas, como: alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água); ácidos ou ésteres graxos; álcoois de cadeia longa; ceras; resinas; esteroides; e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) (PINO et al., 2007; TAPPI, 1997). Os extrativos correspondem a compostos intermediários do metabolismo vegetal que têm um efeito inibitório nos processos de conversão enzimática (FENGEL; WEGENER, 1989). As vitaminas presentes neste material não foram determinadas, mas alguns autores relataram a presença de biotina, colina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina e vitamina B6 (HUIGE, 1994).

Tabela 11 - Composição lignocelulósica (% w/w) do bagaço de malte previamente relatada na literatura.

Componentes*	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas
<i>Santos (2014)</i>	22,36	23,51	30,48	n.d.	2,91
<i>Meneses et. al. (2013)</i>	21,73	19,27	19,40	10,73	4,18
<i>Mussato; Rocha; Roberto (2008)</i>	16,80	28,40	27,80	n.d.	4,60
<i>Pires et. al. (2012)</i>	20,97	15,18	25,62	n.d.	2,21
<i>Dragone (2007)</i>	16,78	28,42	27,78	5,82	4,60
<i>Niemi et. al.</i>	n.d.	n.d.	19,30	n.d.	4,70
<i>Melo, Vergílio, Mali (2013)</i>	12,29	23,41	26,13	n.d.	n.d.

*Porcentagem em massa seca; n.d.= não determinado

Outro parâmetro mais simples como o pH foi analisado. O pH encontrado para o bagaço de malte foi de 4,35. Não tão similar quanto ao valor encontrado por Melo, Vergílio e Mali (2013) de 5,73, porém com caráter ácido. O valor encontrado foi determinante para o processo que visa economicidade, pois encontra-se na faixa de pH ótimo (3,3-4,5) para *STARGENTM 002* (GENENCOR, 2009), excluindo a necessidade de adição de soluções tampão para correção do parâmetro.

Quanto ao tamanho das partículas, o diâmetro médio determinado ficou em 550,3 μm e encontra-se na faixa de tamanho das partículas de farelo caracterizadas por Pereira e Santos (2014) (300-600 μm) e ROBERTSON et. al. (2010) (500 μm). Após sua caracterização, o bagaço de malte foi submetido a diferentes processos de hidrólise enzimática visando recuperar os açúcares provenientes do amido (principalmente glicose) utilizando diferentes tecnologias.

5.2 HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS

5.2.1 Hidrólise enzimática usando agitação mecânica

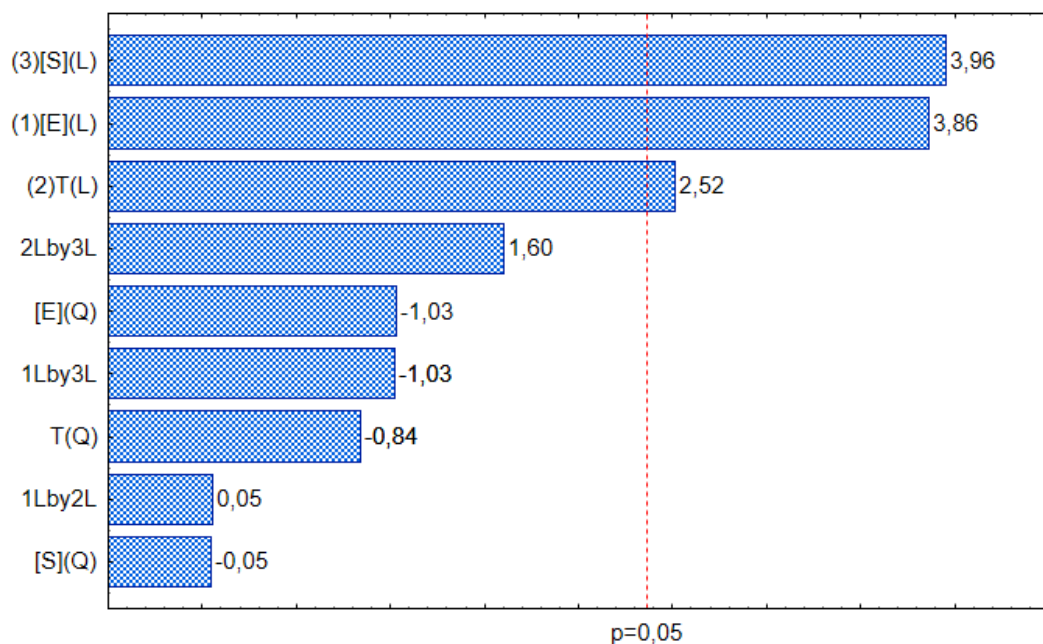
Na Tabela 12 estão apresentados os resultados experimentais obtidos no delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes, com triplicata no ponto central, para avaliar o efeito da concentração de enzima ([E]), temperatura (T) e concentração de substrato ([S]) na hidrólise enzimática do bagaço de malte usando agitação mecânica. A influência das variáveis de processo foi determinada através da hidrólise enzimática do amido e quantificada em termos da quantidade de açúcar redutor total liberado.

Tabela 12 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, 2³.

Ensaio	[E] (%)	T (°C)	[S] (g.L ⁻¹)	Rendimento ART (g.kg ⁻¹)	Eficiência (%)
1	2,8 (-1)	38,1 (-1)	80 (-1)	24,4	6,8
2	8,2 (1)	38,1 (-1)	80 (-1)	58,0	16,2
3	2,8 (-1)	61,9 (1)	80 (-1)	33,5	9,4
4	8,2 (1)	61,9 (1)	80 (-1)	50,4	14,1
5	2,8 (-1)	38,1 (-1)	170 (1)	43,5	12,2
6	8,2 (1)	38,1 (-1)	170 (1)	49,1	13,8
7	2,8 (-1)	61,9 (1)	170 (1)	52,1	14,6
8	8,2 (1)	61,9 (1)	170 (1)	75,5	21,2
9	1,0 (-1,68)	50 (0)	125 (0)	33,0	9,2
10	10 (1,68)	50 (0)	125 (0)	48,5	13,6
11	5,5 (0)	30 (-1,68)	125 (0)	32,3	9,0
12	5,5 (0)	70 (1,68)	125 (0)	51,5	14,4
13	5,5 (0)	50 (0)	50 (-1,68)	30,7	8,6
14	5,5 (0)	50 (0)	200 (1,68)	63,0	17,6
15	5,5 (0)	50 (0)	125 (0)	50,2	14,1
16	5,5 (0)	50 (0)	125 (0)	53,0	14,8
17	5,5 (0)	50 (0)	125 (0)	48,9	13,7

A partir dos resultados pode ser visto que, dependendo da condição experimental utilizada uma variação considerável na quantidade de açúcares fermentáveis foi verificada. De um modo geral, os valores ficaram dentro da faixa de 24,4 a 75,5 g.kg⁻¹. Os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 8 e 14, que foram de 75,5 e 63,0 g kg⁻¹, respectivamente. Para melhor avaliar os efeitos das variáveis independentes sobre a quantidade de açúcares fermentáveis liberada, os dados da Tabela 10 foram utilizados para calcular os seus efeitos, que são apresentados na Figura 26. A concentração de substrato, concentração de enzima e temperatura têm um efeito significativo sobre a hidrólise ($p < 0,05$).

Figura 26 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com agitação mecânica.



Os dados da Tabela 12 também foram utilizados para estimar os coeficientes de regressão (Tabela 13) cujos parâmetros representam os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas estudadas (concentração de ART liberado). No que diz respeito à concentração de ART liberado, os termos lineares para a concentração de enzima, temperatura e concentração de substrato mostraram um efeito positivo significativo. Nenhum efeito quadrático e de termos de interação apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na faixa investigada.

Tabela 13 - Coeficientes de regressão para a resposta ART com agitação mecânica.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	50,32	4,26	11,80	<0,0001
(1)[E](L)	7,73	2,00	3,86	0,0062
[E](Q)	-2,27	2,21	-1,03	0,3377
(2)T (L)	5,05	2,00	2,51	0,0401
T (Q)	-1,86	2,21	-0,84	0,4264
(3)[S](L)	7,93	2,00	3,96	0,0055
[S](Q)	-0,11	2,21	-0,05	0,9616
1L by 2L	0,13	2,62	0,05	0,9596
1L by 3L	-2,69	2,62	-1,03	0,3386
2L by 3L	4,19	2,62	1,60	0,1536

O modelo com as variáveis codificadas incluindo os parâmetros estatisticamente mais significativos a $p < 0,05$ é expresso por:

$$\text{ART} = 50,32 + 7,73[E] + 5,05T + 7,93[S] \quad (6)$$

A análise de variância (ANOVA, Tabela 14) foi aplicada para validar os parâmetros do modelo referentes à concentração de ART liberado.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{cal}
Regressão	2020,22	3	673,41	13,14
Resíduos	666,29	13	51,25	
Total	2686,51	16		

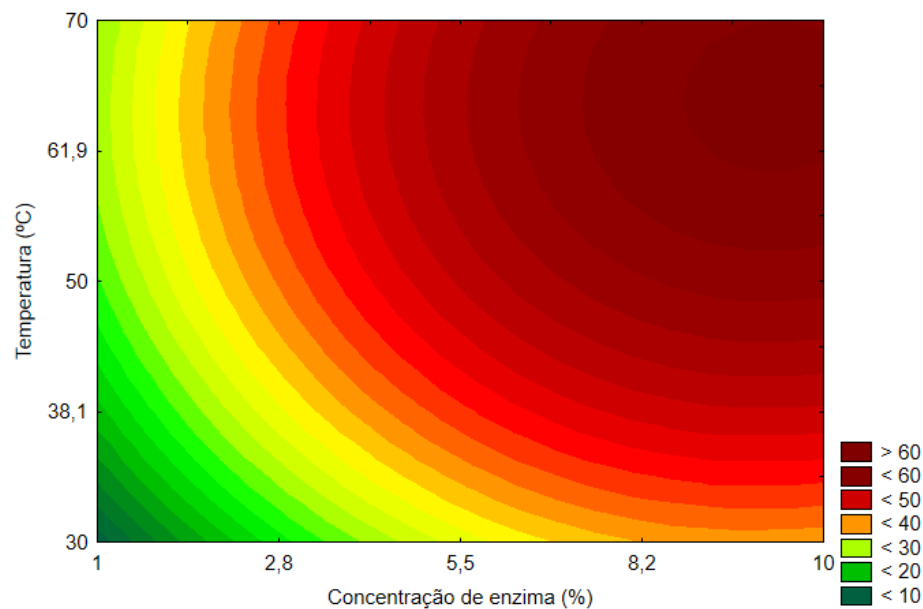
(R²) =85,72; F_{tab (3;13;0.05)}= 3,41

A ANOVA apresenta uma variação explicada de 85,72% e o F calculado para o modelo referindo-se à concentração de ART é igual a 13,14; este valor é de aproximadamente 4 vezes maior do que o tabelado. Com base na análise de variância, conclui-se que o modelo é estatisticamente significativo, proporcionando as respostas

confiáveis como funções de variáveis independentes, e por isso uma ferramenta útil para a otimização estatística do processo.

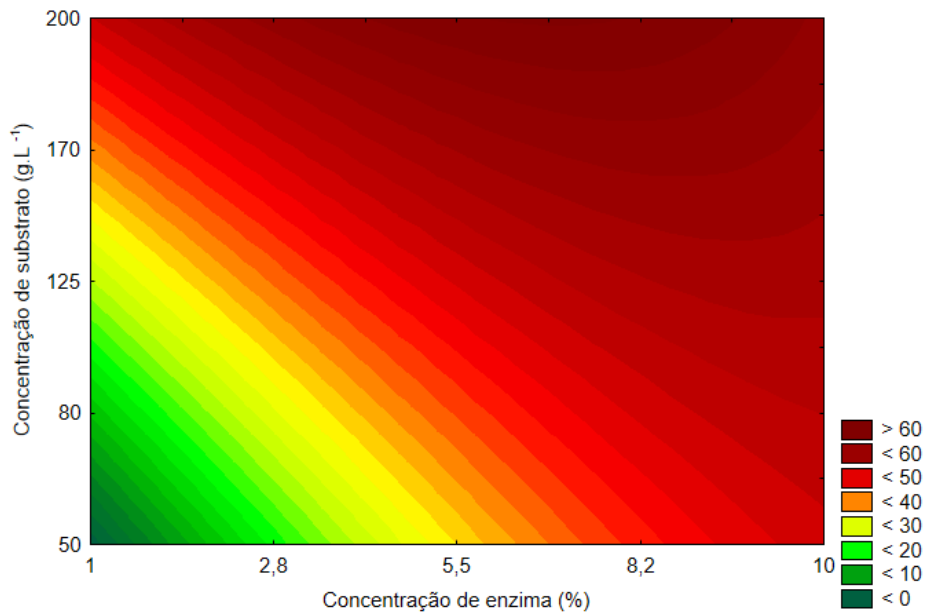
Assim, foi possível construir as curvas de contorno de ART em função das variáveis. Convém ressaltar que para a interação, a terceira variável foi fixada no ponto central. Como pode ser visualizado na Figura 27, para interação de temperatura e concentração de enzima, a máxima quantidade de ART é de cerca de 60 g.kg^{-1} para a concentração de enzima em torno de 9,5% em peso e temperatura na faixa de 60-70 °C.

Figura 27 - Curva de contorno mostrando a influência da temperatura e concentração de enzima sobre produção de ART na hidrólise com agitação mecânica.



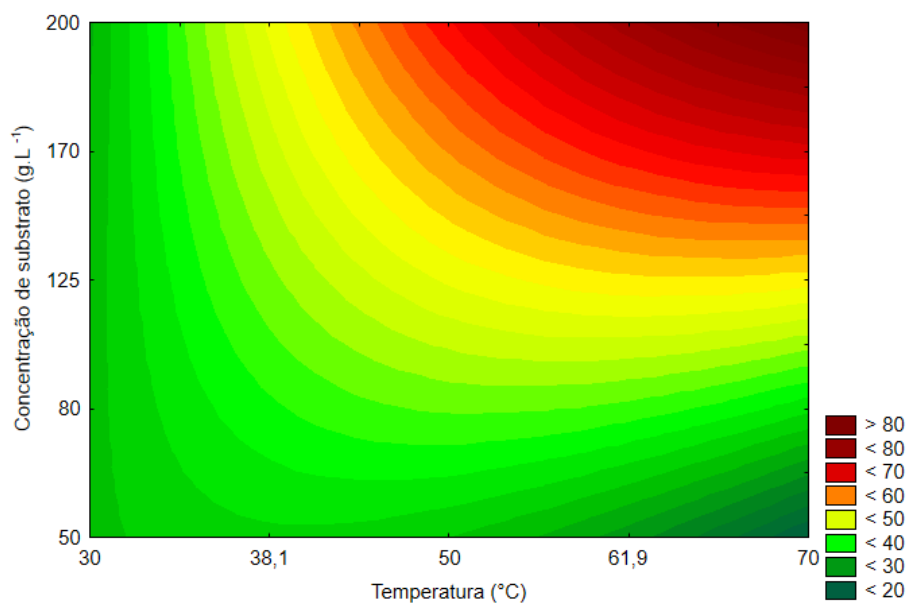
Como pode ser visualizado na Figura 28, para interação da concentração de substrato e concentração de enzima, a máxima quantidade de ART pode ser obtida acima de 200 g.L^{-1} de substrato e 8,2% de enzima. Para uma temperatura fixa no ponto central, tanto o aumento na concentração de enzima quanto o aumento da concentração de substrato são significativos, ou seja, não houve saturação do meio. O aumento na dose de enzima não acarretou em inibição enzima-substrato com redução sobre a capacidade dos sítios ativos e o aumento na concentração de substrato no meio representou aumento considerável no rendimento da hidrólise.

Figura 28 - Curva de contorno mostrando a influência da concentração de substrato e de enzima sobre a produção de ART na hidrólise com agitação mecânica.



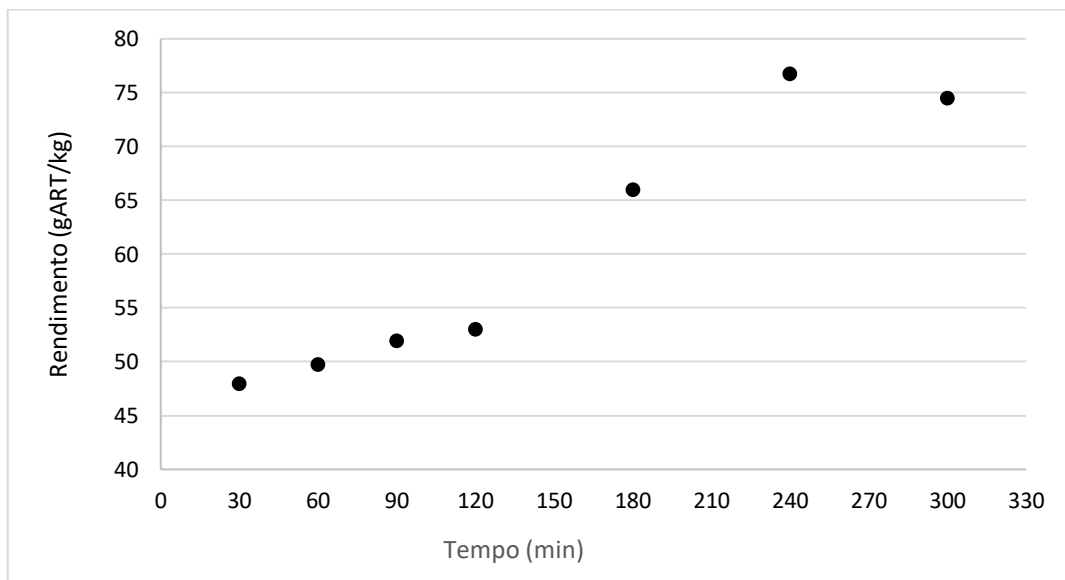
Como pode ser visualizado na Figura 29, para interação de concentração de substrato e temperatura, a máxima quantidade de ART é obtida para uma faixa de temperatura em torno de 70°C e acima de 200 g.L⁻¹ de concentração de substrato.

Figura 29 - Curva de contorno mostrando a influência da concentração de substrato e temperatura sobre a produção de ART na hidrólise com agitação mecânica.



Depois das análises do planejamento, uma cinética de hidrólise foi realizada usando agitação mecânica durante 5 h de reação. As condições de operação foram determinadas a partir do melhor ensaio do planejamento, com concentração de enzima e substrato no ponto +1 (8,2% e 170 g.L⁻¹, respectivamente); e alteração na variável temperatura, que foi determinada para o ponto +1,68 (70°C). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 30. O maior rendimento de ART foi obtido em 4 h (76,8 g kg⁻¹), semelhante ao obtido para o ensaio 8 do planejamento, comprovando que o tempo estipulado para as reações foram suficientes para que os níveis de conversão do amido fossem alcançados.

Figura 30 - Cinética da hidrólise enzimática com agitação mecânica.



É possível observar um decréscimo na concentração de ART no meio após 4 horas de reação, o qual poderia ser justificado devido a adsorção de glicose no material sólido. Porém, esta diferença pode ser simplesmente desconsiderada por estar dentro da faixa de erro experimental. De acordo com os cálculos apresentados no item 4.6.4, a eficiência da hidrólise com agitação mecânica calculada com base no melhor resultado do planejamento foi de apenas 21,15%. Valor de eficiência relativamente baixo, mas por tratar-se de um processo convencional de simples agitação mecânica e pelo elevado teor de amilopectina presente no material, o mesmo torna-se justificável.

5.2.2 Hidrólise enzimática usando ultrassom

5.2.2.1 Sonicação Direta

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados experimentais obtidos no DCCR para duas variáveis independentes, com triplicata no ponto central, para avaliar o efeito da amplitude (%) e fator de pulso (-) na hidrólise enzimática do bagaço de malte assistida por ultrassom por sonicação direta. Assim como para agitação mecânica, a influência das variáveis de processo foi determinada através da hidrólise enzimática do amido e quantificada em termos da quantidade de açúcar redutor total liberado.

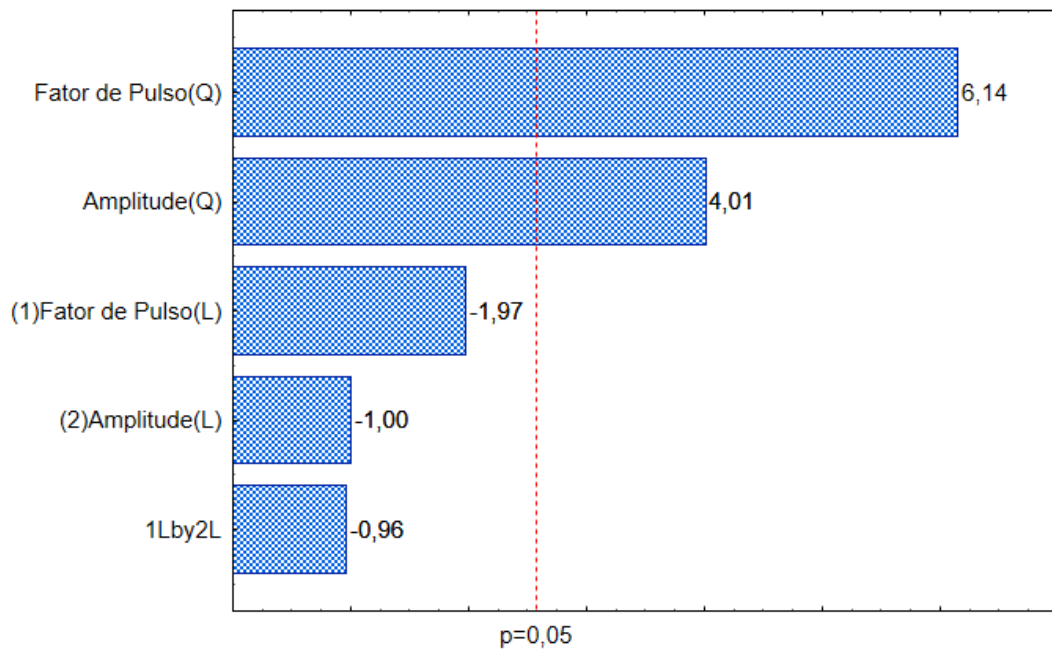
Tabela 15 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR (US- SD).

Ensaio	Amplitude (%)	Fator de Pulso	Rendimento ART (g.kg ⁻¹)	Eficiência (%)
1	28,7 (-1)	0,4 (-1)	310,37	86,94
2	28,7 (-1)	0,87 (1)	332,06	93,01
3	71,3 (1)	0,4 (-1)	287,26	80,46
4	71,3 (1)	0,87 (1)	251,80	70,53
5	50 (0)	0,23 (-1,41)	370,86	103,88
6	50 (0)	1,0 (1,41)	263,14	73,71
7	20 (-1,41)	0,55 (0)	256,80	71,93
8	80 (1,41)	0,55 (0)	270,45	75,76
9	50 (0)	50(0)	167,89	47,03
10	50 (0)	50(0)	171,29	47,98
11	50 (0)	50 (0)	158,02	44,26

Temperatura= 70,0 °C; [S]= 170 g/L e [E]= 8,2 %

É possível observar que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 5 e 2 (370,86 e 332,06 g.kg⁻¹, respectivamente) e os valores de ART encontrados ficaram dentro da faixa de 158,2 a 370,86 g.kg⁻¹. Analisando o gráfico de Pareto da Figura 31, observa-se que apenas o efeito quadrático das variáveis amplitude e fator de pulso tiveram um efeito significativo sobre a hidrólise ($p < 0,05$).

Figura 31 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com sonicação direta.



Os dados da Tabela 15 também foram utilizados para estimar os coeficientes de regressão (Tabela 16) cujos parâmetros representam os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas estudadas. Os termos quadráticos para amplitude e fator de pulso mostraram um efeito positivo significativo. Nenhum efeito linear e de termos de interação apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na faixa investigada.

Tabela 16 - Coeficientes de regressão para a resposta ART com sonicação direta.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(5)	p – valor
Média	165,62	17,16	9,66	0,0002
(1)FP(L)	-20,77	10,52	-1,97	0,1055
FP(Q)	77,18	12,56	6,14	0,0017
(2)A(L)	-10,55	10,52	-1,00	0,3623
A (Q)	50,33	12,56	4,01	0,0102
1L by 2L	-14,29	14,86	-0,9613	0,3806

O modelo com as variáveis codificadas incluindo os parâmetros estatisticamente mais significativos a $p < 0,05$ é expresso por:

$$\text{ART} = 165,62 + 77,18 \text{FP}^2 + 50 \text{A}^2 \quad (7)$$

Onde ART é a concentração de açúcares redutores totais, FP e A são os valores codificados para fator de pulso e amplitude, respectivamente. A análise de variância (ANOVA, Tabela 17) foi aplicada para validar os parâmetros do modelo referentes à concentração de ART liberado.

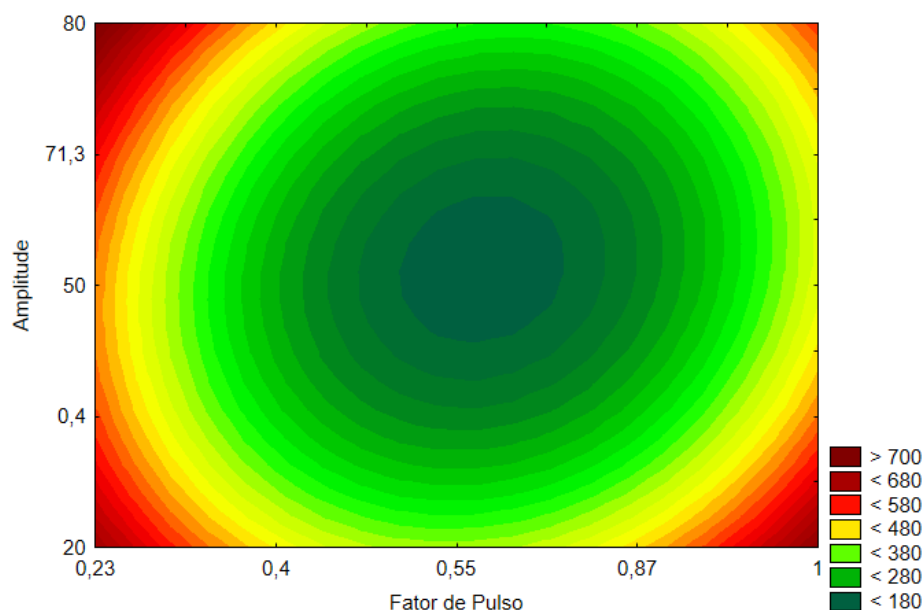
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) – Sonicação direta.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{cal}
Regressão	38114,21	2	19057,10	15,94
Resíduos	9562,21	8	1195,28	
Total	47676,42	10		

(R²) =90,73; F_{tab (2;8;0.05)}= 4,46

Com base na ANOVA, conclui-se que o modelo é estatisticamente significativo, com uma variação explicada de 90,73% e o F calculado de aproximadamente 4 vezes maior do que o tabelado. Desta forma, foram construídas curvas de contorno de ART em função da concentração da amplitude e fator de pulso (Figura 32).

Figura 32 - Curva de contorno mostrando a influência da amplitude e fator de pulso sobre produção de ART na hidrólise com sonicação direta.



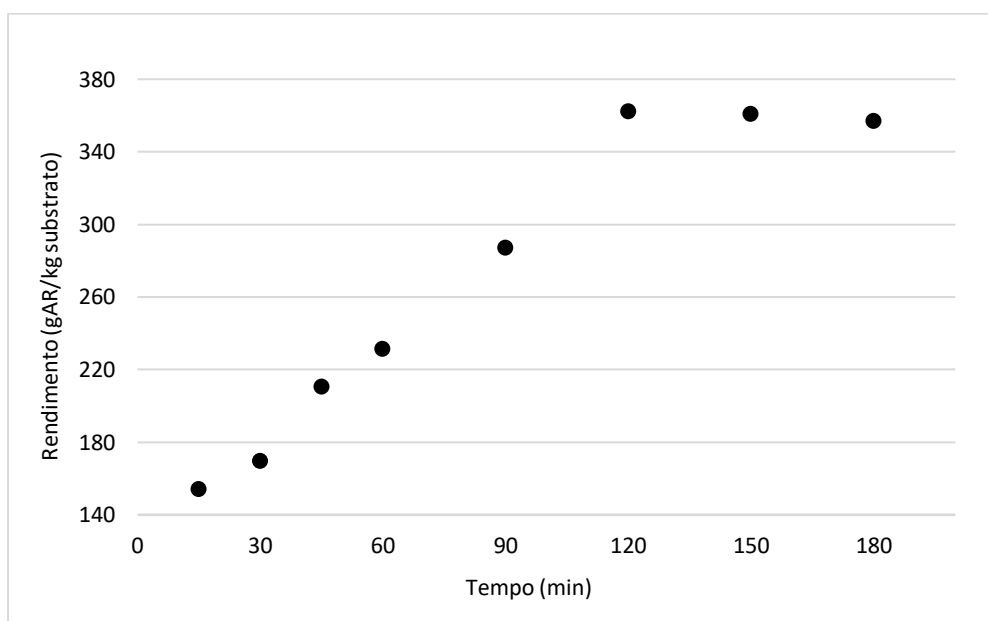
A Figura 32 explora a aplicabilidade deste modelo, apresentando um ponto mínimo, de maneira que tanto o aumento quanto a diminuição de qualquer uma das variáveis, amplitude e fator de pulso, irá resultar em um aumento na liberação de ART. O ponto de mínimo encontra-se na faixa do ponto central e os valores obtidos (167,89, 171,29 e 158,02 g.kg⁻¹) assemelham-se ao valor predito.

A utilização da irradiação com ultrassons em reações enzimáticas aparece como uma tecnologia promissora devido aos seus efeitos positivos sobre o rendimento da reação e, por esta razão vários investigadores estudaram os seus efeitos, como etapa de pré-tratamento do material ou durante hidrólise do próprio material. Lunelli et al. (2014) realizaram a hidrólise assistida por ultrassom de bagaço de cana de açúcar para a produção de açúcares fermentáveis e concluíram que o tratamento com ultrassons aumenta eficazmente a quantidade de açúcar fermentável obtida em comparação com a hidrólise na ausência dele. Ramón et. al (2015) demonstraram que o ultrassom assistido é uma tecnologia promissora que pode ser aplicada na hidrólise de matérias-primas com melhores resultados quando comparada com a hidrólise na ausência de irradiação de ultrassom.

Assim como para agitação mecânica, foi realizada uma cinética para hidrólise por sonicação direta de ultrassom, durante 3 h de reação. As condições de operação foram determinadas a partir do melhor ensaio do planejamento (5), com amplitude

(ponto 0) e fator de pulso (ponto -1) de 50% e 0,23, respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 33. O maior rendimento de ART foi obtido em 2 h (362,23 g.kg⁻¹), similar ao obtido no ensaio 5 (370,86 g.kg⁻¹) comprovando que um tempo maior de reação de hidrólise com ultrassom não é necessário, provavelmente devido a inativação que a enzima sofre após certo tempo de exposição.

Figura 33 - Cinética da hidrólise enzimática com ultrassom.



A eficiência da hidrólise com sonicação direta foi de 103,87%, calculada com base no ensaio 5 (370,86 g.kg⁻¹). De acordo com SCIPIONI (2011) valores de eficiência acima de 100% são comuns, este fato ocorre devido a adição da molécula de água (hidrólise) em cada ligação rompida da molécula de amido. Por exemplo, de 900 kg de amido, tem-se a produção máxima de 1000 kg de glicose em uma hidrólise completa, representando um rendimento de 110%.

A alta eficiência resultante do processo com sonda de ultrassom corrobora com a literatura que até o momento apresenta a intensificação ultrassônica durante bioprocessamentos, seja através de aumento de porosidade ou reforço na absorção do substrato; além de incluir vantagens como o baixo custo operacional em comparação com outras tecnologias, simplicidade de operação e requisitos de energia modestos (NAVEENA; ARMSHAW; PEMBROKE, 2015).

5.2.2.2 Sonicação Indireta

O mesmo planejamento aplicado à sonicação direta de ultrassom (Tabela 15) foi aplicado à sonicação indireta visando a realização de um comparativo entre as aplicações (Tabela 18).

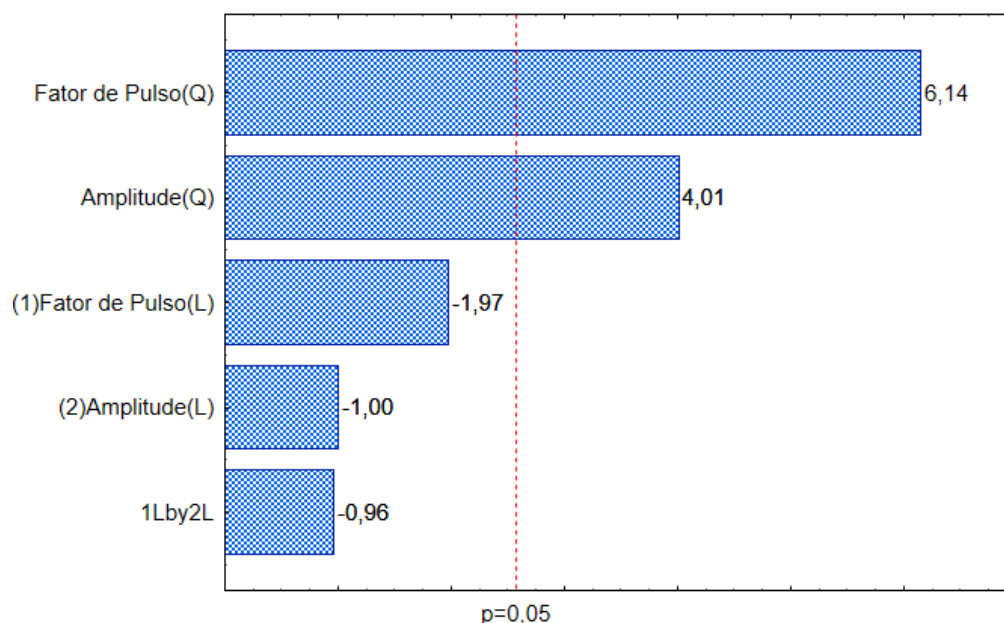
Tabela 18 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, SI.

Ensaio	Amplitude (%)	Fator de Pulso	Rendimento ART (g.kg ⁻¹)	Eficiência (%)
1	28,7 (-1)	0,4 (-1)	139,24	39,00
2	28,7 (-1)	0,87 (1)	137,64	38,55
3	71,3 (1)	0,4 (-1)	132,39	37,08
4	71,3 (1)	0,87 (1)	117,19	32,83
5	50 (0)	0,23 (-1,41)	120,46	33,74
6	50 (0)	1,0 (1,41)	162,76	45,59
7	20 (-1,41)	0,55 (0)	119,45	33,46
8	80 (1,41)	0,55 (0)	142,73	39,98
9	50 (0)	50(0)	73,61	20,62
10	50 (0)	50(0)	78,6	22,02
11	50 (0)	50 (0)	71,75	20,10

Temperatura= 70,0 °C; [S]= 1,7 g/L e [E]= 8,2 %

Os valores obtidos através da sonicação indireta ficaram dentro da faixa de 71,75 a 162,76 g.kg⁻¹. Os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 6 e 8, que foram de 162,76 e 142,73 g kg⁻¹, respectivamente. De acordo com o diagrama de Pareto (34), apenas os efeitos quadráticos foram significativos estatisticamente, a 95% de confiança.

Figura 34 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com sonicação indireta.



Os coeficientes de regressão (Tabela 19) foram estimados a partir dos resultados da Tabela 18. Em relação à concentração de ART liberado, os termos quadráticos para amplitude e fator de pulso mostraram um efeito positivo significativo. Nenhum efeito linear e de termos de interação apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na faixa investigada.

Tabela 19 - Coeficientes de regressão para a resposta ART com sonicação indireta.

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(5)	p - valor
Média	74,67	9,18	8,13	0,0005
(1)FP(L)	5,37	5,63	0,95	0,3841
FP(Q)	32,38	6,72	4,82	0,0048
(2)A(L)	0,69	5,63	0,12	0,9069
A (Q)	27,09	6,72	4,03	0,0100
1L by 2L	-3,40	7,95	-0,43	0,6868

O modelo com as variáveis codificadas incluindo os parâmetros estatisticamente mais significativos a $p < 0,05$ é expresso por:

$$\text{ART} = 74,67 + 32,38 \text{FP}^2 + 27,09 \text{A}^2 \quad (8)$$

A ANOVA (Tabela 20) foi empregada para a validação do modelo matemático codificado utilizado para a predição da liberação de ART em sonicação indireta.

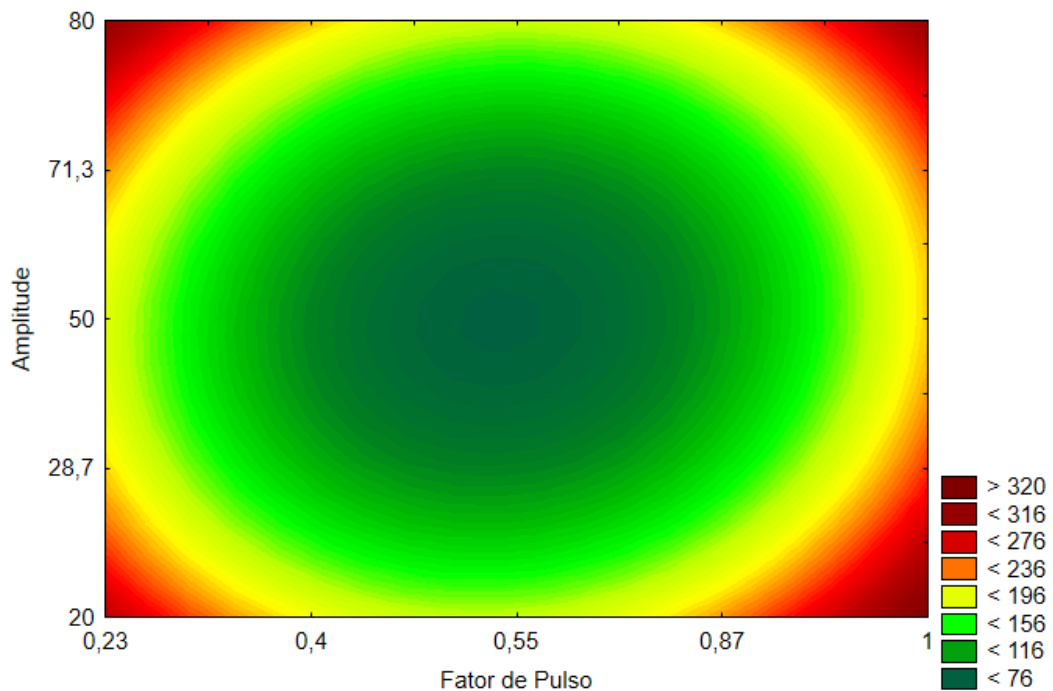
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) – SI.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{cal}
Regressão	7783,79	2	3891,90	20,14
Resíduos	1545,64	8	193,21	
Total	9329,43	10		

(R²) =86,44; F_{tab (2;8;0.05)}= 4,46

Analisando a Tabela 20, é possível observar que o F calculado é 5 vezes maior que o F tabelado, com o coeficiente de determinação de 0,86. Isso valida o modelo a seguir, com 95% de confiança. Desta forma, foi possível construir as curvas de contorno de ART em função da concentração da amplitude e fator de pulso (Figura 35).

Figura 35 - Curva de contorno mostrando a influência do fator de pulso e amplitude sobre produção de ART na hidrólise com sonicação indireta.



Pode ser observado na Figura 35 o mesmo comportamento verificado na hidrólise com sonicação direta de ultrassom, o qual apresenta um ponto mínimo em torno do ponto central. A eficiência da hidrólise com sonicação indireta foi de 45,63%, calculada com base no ensaio 6. O valor da eficiência da hidrólise com uso de ultrassom com sonicação indireta foi aproximadamente a metade do valor encontrado para sonicação direta, diferente dos resultados obtidos por Gasparotto et al. (2015), que ao realizar a hidrólise do bagaço de cana usando enzimas celulolíticas com uso de ultrassom observaram um aumento considerável no rendimento da hidrólise assistida por sonicação indireta em relação a sonicação indireta. Mas este fato pode ser explicado pela diferente natureza das enzimas envolvidas no processo e também pelas diferentes condições aplicadas na hidrólise.

5.2.3 Hidrólise enzimática usando CO₂ supercrítico

Os fluídos supercríticos são uma classe única de meios não aquosos para reações enzimáticas. Apesar das excelentes propriedades do CO₂, o mesmo pode impor uma instabilidade sobre o microambiente enzimático. Além disso, as características hidrofílicas do CO₂ frente à altas pressões podem alterar a partição entre a água e a mistura de reação enzimática, afetando negativamente a atividade da enzima (MONHEMI; HOUSAINDOKHT, 2012).

Uma análise sobre a hidrólise enzimática do BM com CO₂ supercrítico foi realizada e os resultados estão apresentados na Tabela 21. Foi realizado um DCCR para três variáveis independentes, com triplicata no ponto central, para avaliar o efeito da temperatura (T), da pressão (P) e da umidade (U), onde a variável resposta foi quantificada em termos da quantidade de açúcar redutor total liberado.

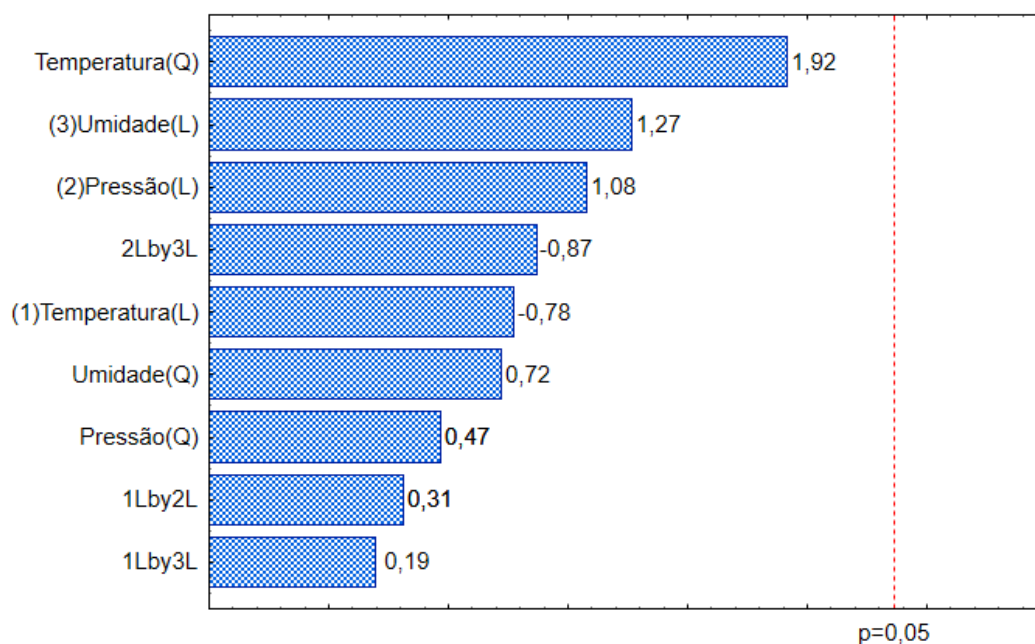
Tabela 21 - Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, 2³ (supercrítico).

Ensaio	T (°C)	P (bar)	U (%)	Rendimento ART (g.kg ⁻¹)	Eficiência (%)
1	36 (-1)	145 (-1)	52 (-1)	206,70	57,90
2	44 (1)	145 (-1)	52 (-1)	174,54	48,89
3	36 (-1)	205 (1)	52 (-1)	203,51	57,00
4	44 (1)	205 (1)	52 (-1)	210,76	59,04
5	36 (-1)	145 (-1)	68 (1)	201,57	56,46
6	44 (1)	145 (-1)	68 (1)	203,97	57,13
7	36 (-1)	205 (1)	68 (1)	189,52	53,09
8	44 (1)	205 (1)	68 (1)	177,93	49,84
9	30 (-1,68)	175 (0)	60 (0)	216,06	60,52
10	50 (1,68)	175 (0)	69 (0)	186,90	52,35
11	40 (0)	100 (-1,68)	60 (0)	130,38	36,52
12	40 (0)	250 (1,68)	60 (0)	202,00	56,58
13	40 (0)	175 (0)	40 (-1,68)	125,31	35,10
14	40 (0)	175 (0)	80 (1,68)	219,39	61,45
15	40 (0)	175 (0)	60 (0)	164,12	45,97
16	40 (0)	175 (0)	60 (0)	163,64	45,84
17	40 (0)	175 (0)	60 (0)	164,96	46,21

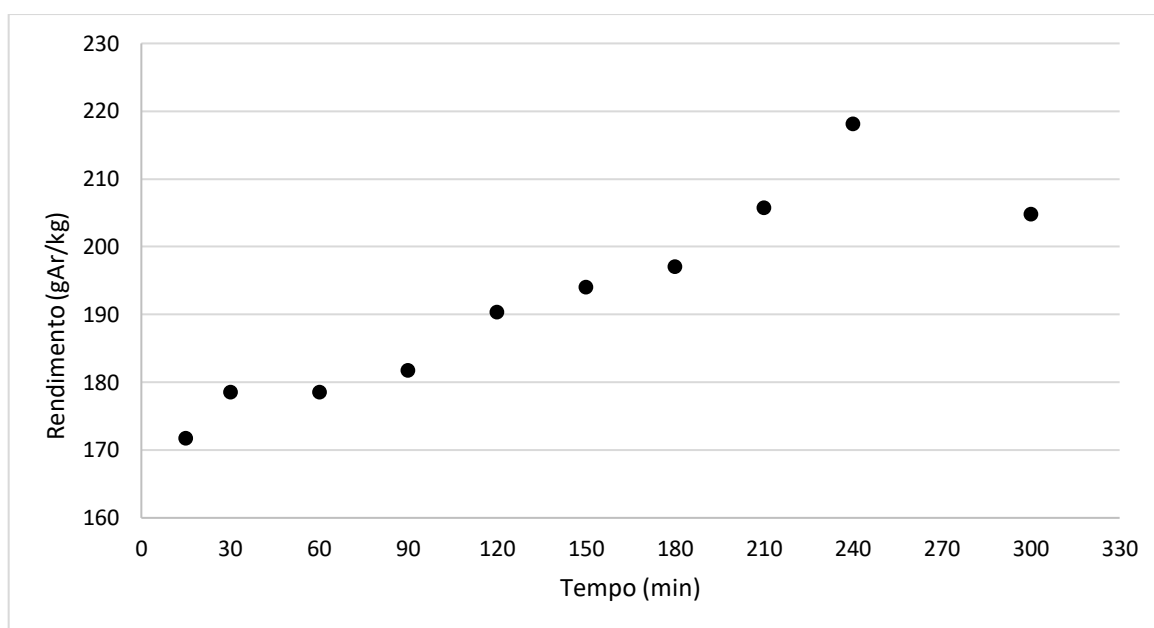
Massa substrato= 10,0 g e [E]= 8,2 %

A análise estatística dos resultados, apresentada na forma de gráfico Pareto (Figura 36), o qual determina os efeitos das variáveis, temperatura, pressão e umidade na produção de ART a partir das hidrólises enzimáticas com CO₂ supercrítico, mostra que as variáveis e a interação entre as mesmas não foram estatisticamente significativas, embora o aumento das mesmas tenha mostrado uma tendência em melhorar o rendimento dos processos.

Figura 36 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos das variáveis na obtenção de ART na hidrólise enzimática com CO₂ supercrítico.



A cinética realizada para a hidrólise com CO₂ supercrítico foi de natureza destrutiva, ou seja, para cada ponto da curva foi realizada uma reação. Isso devido a impossibilidade da retirada de alíquota do reator para análise de ART. O melhor ensaio do planejamento foi escolhido para a obtenção da cinética, estando as condições de temperatura e pressão no ponto 0 enquanto a condição de umidade no ponto +1,68 (40°C, 175 bar e 80%, respectivamente). O tempo total foi de 5 horas totalizando 10 experimentos nos tempos apresentados na Figura 37. O maior rendimento de ART foi obtido em 4 h (218,17 g.kg⁻¹), semelhante ao obtido para o ensaio 14 do planejamento, comprovando que o tempo estipulado para as reações foram suficientes.

Figura 37 - Cinética da hidrólise enzimática com CO₂ supercrítico.

A eficiência para hidrólise com CO₂ supercrítico foi de 61,45% calculada com base no ensaio 14 (219,39 g.kg⁻¹). É importante salientar que a eficiência nas reações de hidrólise com CO₂ supercrítico foi aproximadamente a metade da obtida na hidrólise assistida por ultrassom com sonicação direta, porém consideravelmente melhor que na hidrólise assistida por ultrassom de forma indireta e frente ao processo com uso de agitação mecânica (cerca de 3 vezes mais eficiente).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foram desenvolvidos processos de hidrólises enzimáticas para obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do bagaço de malte, com uso de enzimas comerciais indicadas para a hidrólise granular do amido. As tecnologias envolvidas nos processos foram agitação mecânica, ultrassom (através de sonicação direta e indireta) e CO₂ supercrítico. Abaixo são descritas as principais conclusões obtidas durante este estudo, em seguida são discutidas sugestões para trabalhos futuros.

- A caracterização química do material comprova que o BM é composto por grande fração de amido, logo, atesta que tanto a escolha da enzima quanto os processos em si não foram irrelevantes. Permite observar também, que durante o processo de produção da cerveja, grande parte deste material amiláceo oriundo da cevada não é aproveitado, ou seja, a hidrólise que ocorre durante a mosturação não é muito eficiente.

- O estudo das principais variáveis através do planejamento experimental para agitação mecânica mostrou uma forte influência positiva da concentração de enzima e da concentração de BM sobre a concentração de glicose alcançada.

- Dentre os processos estudados, pode-se concluir que a hidrólise assistida por ultrassom com sonicação direta foi a que apresentou melhores resultados (Tabela 22), uma vez que neste processo a liberação de ART foi acelerada (2 horas), obtendo-se ótimos rendimentos de ART. O maior rendimento de ART para este processo foi de 370,86 g.kg⁻¹ (ensaio 5, para amplitude igual a 50% e fator de pulso 0,23), o que representa uma eficiência de mais de 100%, a máxima eficiência de hidrólise encontrada dentre os processos.

- Nenhuma das variáveis independentes mostrou efeito positivo significativo para o processo de hidrólise com o uso de CO₂ supercrítico, porém, mesmo necessitando de uma etapa adicional para a extração de açúcares, esta tecnologia de hidrólise em meio sólido destaca-se frente ao processo convencional de hidrólise.

- Com a realização da cinética das reações de hidrólises foi possível assegurar que o tempo estipulado para cada uma das tecnologias foi suficiente para o maior rendimento de ART.

Tabela 22 – Resultados obtidos nos processos de hidrólise estudados.

Processo	Tempo (Horas)	Rendimento mássico (g/kg)	Eficiência (%)
Agitação Mecânica	4	75,5	21,15
Ultrassom (Sonicação Direta)	2	370,86	103,87
Ultrassom (Sonicação Indireta)	2	165,76	45,63
CO ₂ Supercrítico	4	219,39	61,45

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora o processo desenvolvido neste trabalho tenha apresentado possível potencial de aplicação, muito ainda precisa ser investigado e aprimorado. Desta forma, algumas sugestões para trabalhos futuros são elencadas a seguir:

- Avaliar o potencial de outras matérias-primas amiláceas além do bagaço de malte;
- Realizar a hidrólise da fração lignocelulósica do BM já que a mesma compõe grande parte do material;
- Desenvolver modelos cinéticos de hidrólise do amido granular, que, devido às suas características e complexidade com diversas enzimas e diversos substratos diferentes, são pouco relatados na literatura;
- Realizar experimentos de fermentação simultânea a hidrólise já que a enzima é própria para este tipo de processo, conjuntamente com o balanço global do processo;
- Realizar a hidrólise enzimática do BM com aplicação de ultrassom e agitação mecânica em conjunto;
- Investigar a fração residual do processo, já que é possível que a mesma possa apresentar uma composição de interesse para a alimentação animal, conferindo mais uma fonte de rentabilidade;
- Realizar uma prospecção de possíveis produtos de interesse a partir do açúcar fermentescível, que potencialmente apresentem elevada produtividade e alto valor agregado;
- Realizar um pré-tratamento do material para a hidrólise com agitação mecânica e CO₂ supercrítico com ultrassom, ou ainda realizar a hidrólise com CO₂ supercrítico assistida por ultrassom.

REFERÊNCIAS

ADEWUYI, Y. G. Sonochemistry: Environmental Science and Engineering Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, vol. 40, n. 22, p. 4681-4715, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: Acesso em: 15 de junho de 2016.

ALBARELLI, J.Q., Ensinas, A.V., Silva, M.A. Combined First and Second Generation Ethanol Production: Analysis of Supercritical Hydrolysis, **Chemical Engineering Transactions**, 29, 1165-1171, 2012.

ALONSO, D. M.; BOND J. Q.; DUMESIC J.A. Catalytic conversion of biomass to biofuels. **Green Chemistry**. 2010. Disponível em: <www.rsc.org/greenchem> Acesso em: 30 de novembro de 2015.

ALVIRA, P. E. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4851–4861, 2010.

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 324-331, 2011.

AMBROSI, A. **Desalcoolização de cerveja – Avaliação da remoção de etanol de soluções aquosas por osmose direta**. 2016. 253p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, 2016.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16th ed., 1995.

AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. 227 p.

AQUARONE, Eugênio. et al. **Biotecnologia Industrial na produção de alimentos** vol 4. Ed Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 2001.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**. 2009. 92p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) –Escola de Química – EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

BALLS, A. K. e SCHWIMMER, S. Digestion of raw starch. **J. Biol. Chem**, v.156, July 17, p.203-210. 1944.

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

BAMFORTH, C. W. **Beer: A quality perspective (Handbook of Alcoholic Beverages)**. 1 ed. California: Academic Press, 2008.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som: Influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v.15, p. 302-316,1992.

BASTOS V. D., Biorrefinarias, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento, **Revista do BNDES 38**, dez. 2012. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivo/s/conhecimento/revista/rev3803.pdf> Acesso em: 06 de março de 2016.

BEMILLER J., WHISTLER R. **Starch: Chemistry and Technology**. Third edition. 2009.

BENAZZI T.; CALGAROTO S.; ASTOLFI V.; DALLA ROSA C.; OLIVEIRA J. V.; MAZUTTI M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology 52**, pp. 247-250, 2013.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas**. 2008. 79p. Dissertação - (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação Stricto sensu Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 151-160, 2002.

BILIADERIS, C.G., The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.69, p.60-78, 1991.

BNDES. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES. 316 p., 2008.

BOMTEMPO, J. V. **O futuro dos biocombustíveis II: Por que a indústria de biocombustíveis do futuro será diferente da que conhecemos hoje?** Blog Infopetro. 2010.

BOMTEMPO, J. V. **O futuro dos biocombustíveis X: as duas corridas do açúcar**. Blog Infopetro 2011.

BOMTEMPO, J. V. **Bioeconomia em construção VIII – O potencial inovador das trajetórias baseadas em recursos naturais: a vida fora do high tech**. Blog Infopetro 2016.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 de setembro de 1997. p. 19549.

BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: Science and Practice**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press Inc., 2004.

BRIGGS, D. E. **Malts and malting**. London: Blackie Academic and Professional; Gaithersburg:Aspen, 1998. 796p.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 2005.

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V. e BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, n.2, p.85-112. 1998.

CELUS, I., BRIJS, K., DELCOUR, J.A.: The effects of malting and mashing on barley protein extractability. **J. Cereal Sci.** 44, 203–211, 2006.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT) Evaluation de La calidad culinária y molinera Del arroz: guía de estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutorial sobre El mismo tema. Contenido científico: César Martínez, Frederico Cuevas. Producción: Luz Maria Medina. Cali, Colômbia, CIAT 73p., 1989.

CERVESIA – Soluções em Tecnologia Cervejeira e Gestão de Processos – **História da Cerveja**. Disponível em: < <http://www.cervesia.com.br/historia-da-cerveja/76-a-cerveja-e-sua-historia.html>> Acesso em: 14 de junho de 2016.

CERVBRASIL – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário 2015. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf Acesso em: 14 de junho de 2016.

CETESB- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, Nota técnica sobre tecnologia de controle: **Fabricação de cervejas e refrigerantes**, NT-24, CETESB, São Paulo, 1992.- 27p.

CHISTI Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends Biotechnol**; 21: 89-93, 2003.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 200p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra, Rio de Janeiro, 2012.

COLLARES, R. M. **Otimização do Processo de Hidrólise de Mandioca “In Natura” com o Uso de Enzimas Amilolíticas e Pectinolíticas**. 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Centro de Tecnologia, UFSM, 2011.

COPELAND, L., BLAZEK, J., SALMAN, H.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v.23, n.6, p.1527-1534. 2009.

CORDEIRO, L. G. **Caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte oriundo de cervejarias para fins energéticos**. 2011. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Tecnologia, UFPB, João Pessoa, 2011.

COSTA A.D, MATTOS E.S., LIMA C.A.R., VIEIRA A.A., MATTOS M.A., FERREIRA R.A.D., SARINHO V.C., RAMALHO H.F. Composição química e energia digestível do bagaço de malte em suínos machos nas fases de crescimento e terminação. Seropédica: **Anais da Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ**; 2006.

COSTA, C. M. L. **Caracterização e análise experimental do recobrimento de sementes de jambu (*Spilanthes oleracea*) em leite fluidizado**. 2010. Tese – (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, 2010.

DENARDIM, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.3, p.945-954, mai-jun, 2009.

DENK, V. et al. **European brewery convention: manual of good practice, wort boiling and clarification**. Nuremberg: Fachverlag Hans Carl. p. 176, 2000.

DRAGONE, S. I. M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. 2007.173f. Tese - (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2007.

ELIASSON, A. C. **Starch in food: Structure, function and applications**. Taylor & Francis, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. 1989.

FENIMAN, C.M., **Caracterização de raiz de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do cultivar JAC 576-70 quanto à cocção, composição química e 73 propriedades do amido em duas épocas de colheita**, 2004, Universidade de São Paulo: Piracicaba.

GALVEZ, A. Analyzing cold enzyme starch hydrolysis technology in new ethanol plant design. **Ethanol Producer Magazine**, v.11, p.58–60. 2005.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI M. A.; FOLETTTO E. L.; KUHN R. C.; JAHN S. L.; MAZUTTI M. A. Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. **Biocatal. Agric. Biotechnol.** 175(1):560-72. 2015.

GENENCOR. **Development of improved enzyme for the Bio-Refinery**. 5th European Symposium on Enzymes in Grain Processing. Norwich, Reino Unido 2008.

_____. **Stargen™ 002: Granular Starch Hydrolyzing Enzyme for Ethanol Production** 2009.

_____. **Granular Starch Hydrolysis (GSHE) for Conversion of Grains to Ethanol** Near-term Opportunities for Biorefineries Symposium. Champaign-IL, EUA 2010.

GOUKA, R. J., PUNT, P. J. e VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, n.1, p.1-11. 1997.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, 38, 1599-1616, 2003.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 56 p., 1982.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑES, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2495–2511, 2010.

HIMMEL M. E.; DING S. Y.; JOHNSON D. K.; ADNEY W. S.; NIMLOS M. R., et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science** (2007) 315: 804–807.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, n.3, p.253-267. 2001.

HSIEH C.; CANNELLA D.; JORGENSEN H.; FELBY C.; THYGESEN C. L. G. Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. **J Agric Food Chem** (2014) 62: 3800–3805.

HUIGE, N.J. **Brewery by-products and effluents**. In: HARDWICK, W.A. (ed.). Handbook of Brewing. New York: Marcel Dekker, 1994. p.501-550.

KAMM, B., GRUBER, P.R., KAMM, M. **Biorefineries – Industrial Processes and Products**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-31027-4, 2006.

KARDOS N, LUCHE JL. Sonochemistry of carbohydrate compounds. **Carbohydr Res.**; 332:115–131, 2001.

KOTLAR, C. E., PONCE, A. G., ROURA, S.I. Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. **LWT - Food Science and Technology** 50. 378-385, 2013

KRISTENSEN J. B.; FELBY C.; JORGENSEN H. Yield-determining factors in high solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol Biofuels** 2, (2009).

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. 2004 Berlin: VLB, Germany. 3ed. ISBN: 3-921690-49-8.

LEITÃO, V. F., GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A., NEPOMUCENO, A. L., MOLINARI, H. B. C., BOM, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Valor.** 2010.1:65–76.

LI, J. H.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R.; ROSSNAGEL, B. G. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 621-632, mar, 2004.

LI, J. H.; VASANTHAN, T.; BRESSLER, D. Improved cold starch hydrolysis with urea addition and heat treatment at subgelatinization temperature. **Carbohydrate Polymers.** 87, 1649–1656, 2012.

LIGUORI, R., SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. de S., WOICIECHOWSKI, A. L., FARACO, V. Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. *Energies*, 8, 2575-2586, 2015.

LIMA, M.L. **Resíduo de cervejaria úmido: formas de conservação e efeitos sobre parâmetros ruminais.** Piracicaba. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade de São Paulo, Piracicaba; 1993. p. 98.

LIMA, U. A. **Matérias-primas dos Alimentos.** São Paulo: Ed Blucher, 2010. 402p.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.

LINDEBOOM, N., CHANG, P. R., & TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Stärke. [Starch]**, 56, 89–99, 2004.

LUNELLI, F. C.; SFALCIN P.; SOUZA M.; ZIMMERMANN E.; DAL PRÁ V.; FOLETTI E. L.; JAHN S. L.; KUHN R. C.; MAZUTTI M. A. 2014. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars. **Biosystems Engineering I** (24), pp. 24-28.

LUO, J; FANG, Z; SMITH JR, R.L. Review: Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 41, p. 56 e 93, 2014.

MACGREGOR, A. W.; FINCHER, G. B. Carbohydrates of the barley grain. In: MACGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S. **Barley - Chemistry and Technology.** St. Paul, Minnesota - USA: AACC, 1993. p. 73-128.

MACLEOD, A.M., 1979. The physiology of malting, in: Pollock, J.R.A. (Ed.), **Brewing Science**, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 145–232.

MAISON, T. J. Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. **Ultrasonics Sonochemistry** 10,175–179, 2003.

MALDONADO, I. R., CARVALHO, P. G. B., FERREIRA N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Embrapa**. Comunicado Técnico 85. Março, 2013.

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156, jan./mar. 2010

MANNERS D J, Recent developments in our understanding of amylopectin structure, **Carbohydr Polym**, 1989 11 87±112.

MANTELL, C. et al. Supercritical fluid extraction. In: RAMASWAMY, S.; HUANG, H.-J.; RAMARAO., B. V. **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. First ed. John Wiley & Sons, Ltd., p. 79–100, 2013

MARANGONI, A.G. Enzyme Kinetics: A modern Approach. **Wiley & Sons**, 2003.

MARDEGAN S. F., ANDRADE T. M. B., SOUZA NETO, E. R., VASCONCELOS, E. B. C., MARTINS, L. F. B., MENDONÇA, T. G., MARTINELLI, L. A. Stable carbono isotopic composition of Brazilian beers – a comparison between large- an small – scale breweries. **J. Food Compos. Anal.** 29, 52-57, 2013.

MARTINEZ, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI M.J. O efeito do ultrassom em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, p. 251-256, 2000.

MASIERO, S. E. **Microusinas de etanol de batata-doce: Viabilidade Econômica e Técnica**. 2012. 141p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Escola de Engenharia, UFRGS, 2012.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Caracterização de resíduos cervejeiros. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis, SC, 2014.

MELLO, L. R. P. F.; VERGÍLIO, R. M.; MALI, S. Caracterização Química e Funcional do Resíduo Fibroso da Indústria Cervejeira. **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**. BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports - ISSN 2316-5200 Número Especial v. 2, n. 3, p. 191-194, 2013.

MENESES, N. G. T. et al. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 152–158, 2013.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid and reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31, pp. 426–427, 1959.

MONHEMI, H.; HOUSAINDOKHT, M.R. How enzymes can remain active and stable in a compressed gas? New insights into the conformational stability of *Candida antarctica* lipase B in near-critical propane. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 72, p.161–167, 2012.

MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. **John Wiley & Sons**, 2001.

MORRISON, W. R.; KARKALAS, J. **Methods in plant biochemistry starch**. New York: Academic Press, p. 323 – 352, 1990.

MORRISON, R.T.; BOYD R.N., **Química Orgânica**. 1996, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

MOSCON, J. M.; PRIAMO, W. L.; BILIBLIO D.; SILVA, J. R. F.; SOUZA, M.; LUNELLI, M.; FOLETTO, E. L.; KUHN, R. C.; CANCELIER, A.; MAZUTTI, M. A. Comparison of conventional and alternative technologies for the enzymatic hydrolysis of rice hulls to obtain fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 3, p. 149-154, 2014.

MUCCILLO, R. C. S. T. **Caracterização e Avaliação de Amido Nativo e Modificado de Pinhão Mediante Provas Funcionais e Térmicas**. 2009, 156p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, UFRGS, 2009.

MUNCK, L. Advances in barley quality. Experiences and Perspectives. Options Méditerranéennes – Série Séminaires. **New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding**, n. 20, p. 9-18, 1991.

MURTHY, G. S., JOHNSTON, D. B., RAUSCH, K. D., TUMBLESÓN, M. E., SINGH V. Starch hydrolysis modeling: application to fuel ethanol production. **Bioprocess Biosyst Eng.** v.34, p. 879–890, 2011.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. Review. **Journal of Cereal Science** 43, 1–14, 2006.

MUSSATTO, S. I.; ROCHA, G. J. M.; ROBERTO, I. C. Hydrogen peroxide bleaching of cellulose pulps obtained from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, n. 4, p. 641–649, 2008.

MUSSATO, S.I. Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci. Food Agric.*, 94, 1264–1275, 2014.

NAVEENA, B.; ARMSHAW, P.; PEMBROKE, J. T. REVIEW Ultrasonic intensification as a tool for enhanced microbial biofuel yields. **Biotechnol Biofuels** , 8:140, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition.

NIEMI, P et al. Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 39, p. 9910–9917, 2012.

NIGAM, P. S.; SINGH A. **Production of liquid biofuels from renewable resources**. *Progress in Energy and Combustion Science* 37, 52-68, 2010.

NREL. National Renewable Energy Laboratory. Conceito de biorrefinaria. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinary.html>>. Acesso em: 30 de março de 2016.

NREL. National Renewable Energy Laboratory. Biomass Research: Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.htm>. Acesso em 10 abr. 2016.

ÖZTÜRK, S., ÖZBOY, Ö., CAVIDOGLU, I., KÖKSEL, H. Effects of brewers' spent grain on the quality and dietary fibre content of cookies. **Journal of the Institute of Brewing** 108, 23–27, 2002.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T., VANDENBERGHE, L. P. S. e MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.81-87. 2000a.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V.T., SINGH, D., MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem**, v.31,135-152. 2000b.

PATIST A, BATES D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innov Food Sci Emerg Technol**, 9:147–154, 2008.

PEREIRA, J.E.S. **Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática**. Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2013.

PEREIRA, G. A.; SANTOS, M. D. Caracterização química do bagaço de cevada como matéria-prima em compósitos de amido. **54º Congresso Brasileiro de Química**, nov. 2014, Natal, Rio Grande do Norte. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/13/6103-19007.html>> Acesso em: 30 de junho de 2016.

PINO, V.; AYALA, J. H.; GONZÁLEZ, V.; AFONSO, A. M. Determination of the alkyl- and methoxy-phenolic content in wood extractives by micellar solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 505-513, 2007.

PIRES, E. J. et al. A new approach on brewer's spent grains treatment and potential use as lignocellulosic yeast cells carriers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5994–5999, 2012.

PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n.8, p.1502-1509, 2012.

PORTO, C; DECORTI, D; NATOLINO, A .Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal. **J. of Supercritical Fluids** , v.87 ; p.1–8., 2014.

POULIOT, Y.; CONWAY, V.; LECLERC, P. Separation and Concentration Technologies in Food Processing. In: CLARK, S.; JUNG, S.; LAMSAL, B. **Food Processing: Principles and Applications**. Second ed. John Wiley & Sons, Ltd., p. 33–60, 2014.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. (EDS.). **Handbook of Brewing**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press Inc., 2006.

RATTANACHOMSRI, U., TANAPONGPIPAT S., EURWILAICHITR L., CHAMPREDA V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107 No. 5, 488–493, 2009.

RABELO, S. C., FILHO, R. M., COSTA, A. C. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol** 153:139–150, 2009.

RAMÓN A. P., TASCHETTO L., LUNELLI F., MEZADRI E. T., SOUZA M., FOLETTI E. L., JAHN S. L., KUHN R. C., MAZUTTI M. A. Ultrasound-assisted acid and enzymatic hydrolysis of yam (*Dioscorea* sp.) for the production of fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, pp. 98-102, 2015.

REBELLO, F. de F. P. Produção de Cerveja. Revisão. **Revista Agrogeoambiental**. p. 145-155, 2009.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., p. 62-87, 1975.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos: Fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos**. Pelotas: Universitária-UFPel, v.1, 330p, 1996.

REINOLD, M.R. **Manual prático de cervejaria**, first ed. Aden Editora e Comunicações Ltda, São Paulo. 214 p. 1997.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166, 2006.

RINCÓN, B., BUJALANCE, L., FERMOSO, F.G., MARTIN, A., BORJA, R. Effect of ultrasonic pretreatment on biomethane potential of two-phase olive mill solid waste: Kinetic approach and process performance. **Sci. World J.**, Article ID 648624, 9 pages, 2014.

RISSO, R. dos S. **Etanol de batata-doce: Otimização do Pré-Processamento da Matéria-Prima e da Hidrólise Enzimática**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, UFRGS, 2014.

RIZVI, S. S. H.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A.; DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, v. 40, n. 6, p. 55-65, 1986.

ROBERTSON, G. H.; et al. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 353-365, jan, 2006.

ROBERTSON, J. A.; l'ANSON, K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS, C. B.; BROCKLEHURST, T. F.; EIJSINK, V. G. H.; WALDRON, K. W. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 890–896, 2010.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, Vol. 34, No. 7, 1242-1254, 2011.

ROMBAUT, N. et al. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, n. 4, p. 530–544, 2012.

SAHA, B. C.; UEDA, S. Alcoholic fermentation of raw sweet potato by a nonconventional method using *Endomycopsis fibuligera* glucoamylase preparation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n.4, p. 1181-1186, 1983.

SAMUEL, D. Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. **Science**, v.273, n.5274, July 26, 1996, p.488-490. 1996.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. 2012. 73p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Itapetinga, Bahia, UESB, 2012.

SANTOS, D. M. **Aproveitamento do bagaço de malte na produção de polpa celulósica e carboximetilcelulose**. 2014. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares- Físico-química) - Universidade Estadual de Goiás, 2014.

SANTOS, M.S., RIBEIRO, F.M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB; p. 58, 2005.

SANTOS, M., JIMÉNEZ, J.J., BARTOLOMÉ, B., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., DEL NOZAL, M.J. Variability of brewers' spent grain within a brewery. **Food Chemistry** 80, 17–21, 2003.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PEREZ, V. H.; SILVA, S. S. **Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia**. Janus, Lorena, a3, n.4, 2.sem. 2006.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Biotecnologia Industrial . **Engenharia Bioquímica**. 1ªed., São Paulo: Edgar Blücher, v. II, cap. 8, 2001.

SCIPIONI, G. C. **Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas**. 2011. 95p. Dissertação – (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 2011.

SEBRAE – **Potencial de consumo de cerveja no Brasil**. 2014 Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/wpcontent/uploads/2015/12/2014_05_20_RT_Mar_Agron_Cerveja_pdf> Acesso em: 07 de março de 2016.

SENAI. **Conheça a Cerveja**. Rio de Janeiro: Setor de Documentação Bibliográfica do CENATEC de Produtos Alimentares do SENAI- DR/RJ, Vassouras, 1997.

SHARIF A,K.M, et al. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SILVA, J.B.A. Perspectivas biotecnológicas de aproveitamento de bagaço de malte. **V Simpósio Latino Americano de Cevada, Malte e Malteação**. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2010.

SILVA, J. R. F. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana utilizando gás liquefeito de petróleo e ultrassom**. 2013, 119p. Tese – (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI, Erechim, 2013.

SINDICERV- **SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE CERVEJA**. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>>. Acesso em: 07 de março de 2016.

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SINGH SODHI, N. e SINGH GILL, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.2, p.219-231. 2003.

SINISTERRA, J. V. **Ultrasonics**, v. 30, 180–185, 1992.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo da fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alim. Nutr.** v.19, n.4, p. 491-498, out./dez. 2008.

SLUITER A., HAMES B., RUIZ R., SCARLATA C., SLUITER J., TEMPLETON D., CROCKER D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Issue Date 4/25/2008. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf> Acesso em: 22 de maio de 2016.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**, v. 1617, 2005.

SOARES, J. F. **Avaliação de diferentes processos de extração na obtenção de óleo de farelo de arroz**. 2015. 82p. Dissertação – (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, 2015.

STEWART, G. G. **A brewer's delight**. Chem. Ind., v.6, n.11, p. 706-709, nov.2000.

SULAIMAN AZ, Ajit A, Yunus RM, Chisti Y. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochem Eng**; 54:141–150, 2011.

SURMELY, R.; ALVAREZ H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Hidrólise de amido. In: Cereda, M. P., et. al., (coord) Tecnologias, usos e potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. **Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Vol. 3, Fundação Cargill, 2003.

TAPPI Standard Methods T-222 om-98: **Acid-insoluble lignin in wood and pulp**. Atlanta: TAPPI Press, 1998.

TAPPI. T 204 cm-97. **Solvent extractives of wood and pulp**. 1997, 4 p.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J. The Effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. **Starch - Stärke**, v.53, n.10, p.513-519. 2001.

THEANDER, O.; AMAN, P. Anatomical and chemical characteristics. In: SUNDSTOL, F.; OWEN, E. (eds.). Straw and Other Fibrous by-Products as Feed. **Amsterdam: Elsevier**, p.45-78, 1984.

TORO, F.P.C, et al. Integrated supercritical fluid extraction and subcritical waterhydrolysis for the recovery of bioactive compounds frompressed palm fiber. **J. of Supercritical Fluids** , 2014.

TOWNSLEY, P.M. Preparation of commercial products from brewer's waste grain and trub. **MBAA Technical Quarterly** 16, 130–134, 1979.

UTHUMPORN, U., Z Aidul, I.S.M., KARIM, A.A. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. **Food and Bioproducts Processing**. 2010, v. 88, p. 47-54, 2010.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: Cereda, M. P., et. al., Tecnologias, usos e potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. **Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. Vol. 3, Fundação Cargill, 2003.

VIDAL, B. C. et al. Kinetics of Granular Starch Hydrolysis in Corn Dry-Grind Process. **Starch - Stärke**, v. 61, n. 8, p. 448-456, 2009.

VIEIRA, A. A.; BRAZ, J. M. Bagaço de cevada na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, nº3, p. 973-979, 2009. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br> Acesso em: 16 de junho de 2016.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. Panamericana, 2006.

WANG, L.Z.; P.J. WHITE, Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. **Cereal Chemistry**, 71: p. 263-268, 1994.

WILLIAMSON, K. **The biofuel generation gap**. Renewable Energy Focus. 2011 Disponível em: <http://renewableenergyfocus.com/view/20379/the-biofuel-generation-gap> Acesso em: 06 de março de 2016.

WINDISH, W.W.; MHATRE, N.S. **Microbial amylases**. In: Wayne WU, editor. *Advances in applied microbiology*, vol. 7. New York: Academic Press, 273-304, 1965.

WURZBURG, O.B. **Modified starches: properties and uses**. Boca Raton : CRC Press, 277p., 1986.

XIROS, C; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. **Waste and Biomass Valorization**, v. 3, n. 2, p. 213–232, 2012.

YOU, S.; IZYDORCZYK, M. S. Molecular characteristics of barley starches with variable amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v.49, n.1, p.33-42, 2002.

YOUNG, H. Fractionation of starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Ed.). **Starch chemistry and technology**. 2.ed. Orlando,USA: Academic Press, 1984. p. 249-283.

ZAFAR, S. **The concept of Biorefinery**. Powering Clean Energy Future. 2015 Disponível em: <http://www.bioenergyconsult.com/biorefinery/> Acesso em: 06 de março de 2016.

APÊNDICE - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste apêndice são apresentados os dados das curvas de calibração (Tabela A.1) obtidas para a quantificação de carboidratos do bagaço de malte *in natura* (Tabela A.2), os dados das curvas de calibração (Tabela A.3) obtidas para a quantificação do teor de açúcares nos licores obtidos após cada processo de hidrólise (Tabela A.4) e seus respectivos cromatogramas (Figuras A.1 a A.4). A metodologia de cálculo adotada para determinação do teor de carboidratos, bem como as condições cromatográficas utilizadas para as análises foram realizadas conforme descrito nos Materiais e Métodos.

Tabela A.1 – Dados das curvas de calibração.

Compostos	t_R (min)	Equação	(R²)
D-glicose	8,991	$y = 5,0197E-06x + 1,2932E-03$	9,9941E-01
D-arabinose	10,655	$y = 4,7185E-06x - 6,3905E-03$	9,9866E-01
D-xilose	9,648	$y = 5,2272E-06x - 1,5511E-03$	9,9968E-01
Ácido Acético	14,943	$y = 8,4806E-06x - 9,9816E-02$	9,9959E-01
Furfural	3,321	$y = 5,5780E-06x + 1,1944E-03$	9,9969E-01
HMF	2,369	$y = 7,5195E-06x + 3,5557E-04$	9,9726E-01

t_R= tempo de retenção

Tabela A.2 – Resultados obtidos (triplicatas) por CLUE posteriormente utilizados nos cálculos de quantificação dos carboidratos.

Compostos	t _R (min)			Área (nRIU)			Concentração (mg.mL ⁻¹)		
	t _{R1}	t _{R2}	t _{R3}	A1	A2	A3	C1	C2	C3
D-glicose	9,087	9,086	9,083	1,683E-05	1,65686E-05	1,70302E-05	0,9726	0,9575	0,9841
D-arabinose	10,733	10,733	10,729	6,85427E-04	6,86956E-04	6,45591E-04	0,3170	0,3177	0,2982
D-xilose	9,743	9,742	9,738	1,30641E-05	1,29425E-05	1,25799E-05	0,6813	0,6750	0,6560
Ácido Acético	15,601	15,599	15,595	1,35871E-04	1,11684E-04	1,26505E-04	0,0154	0,0051	0,0075
Furfural*	3,097	3,097	3,100	1,41776E-04	1,49618E-04	1,66445E-04	0,0803	0,0847	0,0940
HMF*	2,273	2,273	2,275	1,32429E-03	1,28041E-03	1,21643E-03	0,0103	0,0100	0,0095

*A unidade de área para os inibidores (furfural e HMF) é dada em mAU.

Tabela A.3 – Dados das curvas analíticas.

Compostos	t_R (min)	Equação	(R²)
D-glicose	8,556	y = 210383x + 14353	0,9989
D-arabinose	10,155	y = 205460x + 13627	0,9989
D-xilose	9,191	y = 200345x + 13861	0,9989
Celobiose	7,045	y = 212910x + 12591	0,9988

Tabela A.4 - Quantificação do teor de açúcares nos licores dos diferentes processos de hidrólise.

Processos	D-glicose		D-arabinose		D-xilose		Celobiose	
	Área	Concentração	Área	Concentração	Área	Concentração	Área	Concentração
	(uRIU)	(mg.mL ⁻¹)	(uRIU)	(mg.mL ⁻¹)	(uRIU)	(mg.mL ⁻¹)	(uRIU)	(mg.mL ⁻¹)
Agitação Mecânica	9330681	44,2827	50691	0,180395	77311	0,316704	598002	2,74957
Ultrassom (SD)	9846279	46,7335	25455	0,057568	73370	0,297033	550741	2,52759
Ultrassom (SI)	6919735	32,8229	56479	0,208566	51299	0,186868	386410	1,75576
CO₂ Supercrítico	3107466	14,7023	91044	0,376798	208251	0,970276	270611	1,21874

SD= sonicação direta; SI= sonicação indireta

Figura A.1 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise com agitação mecânica (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).

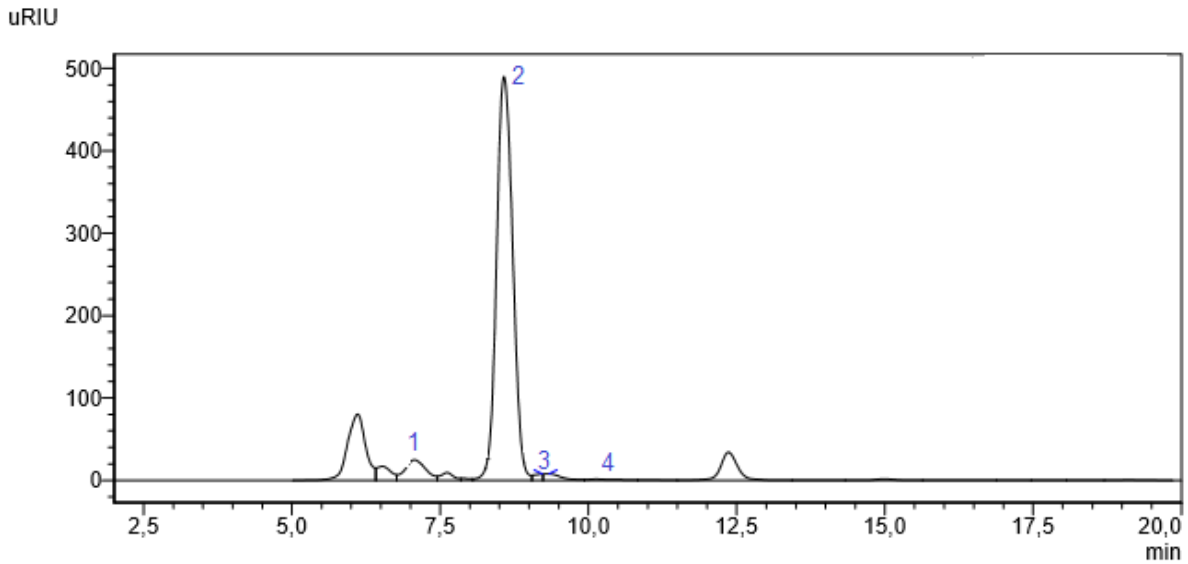


Figura A.2 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise assistida por ultrassom com sonicação direta (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).

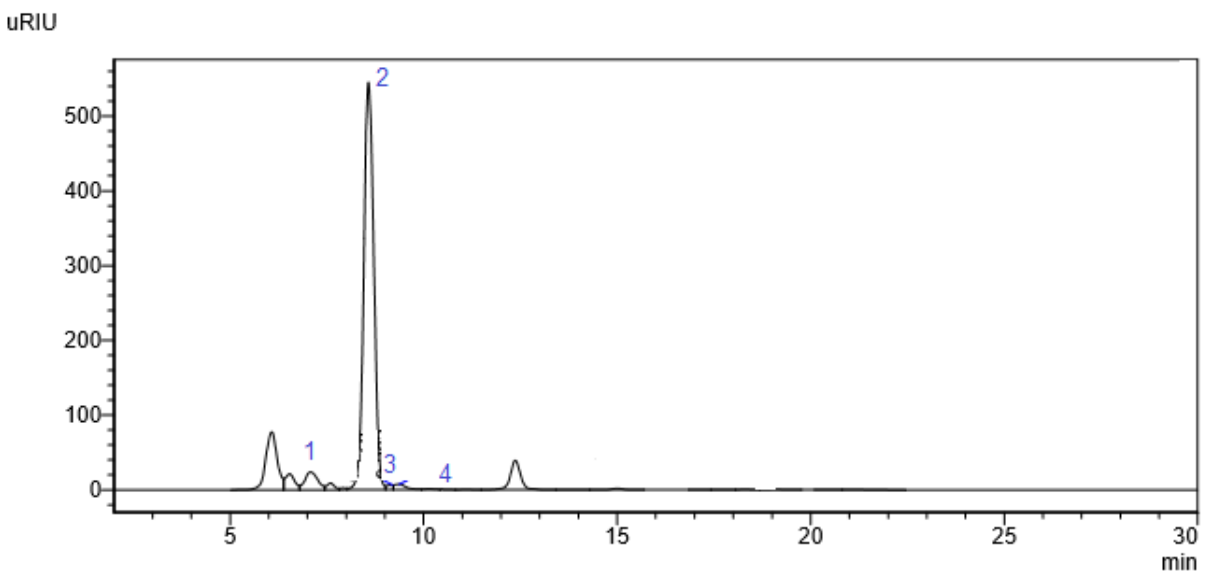


Figura A.3 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise assistida por ultrassom com sonicação indireta (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).

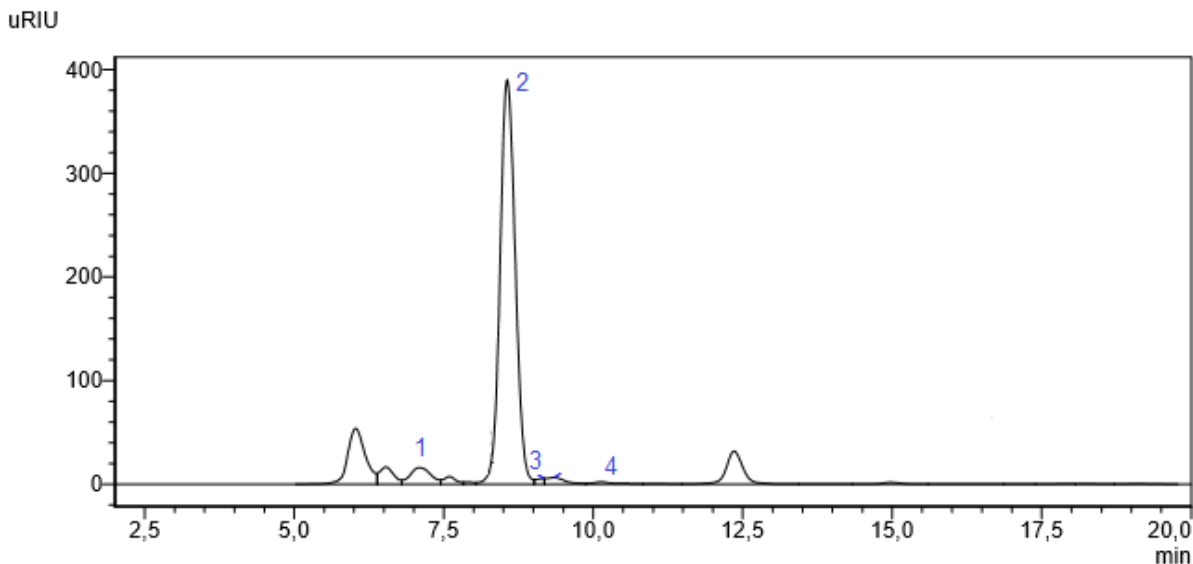


Figura A.4 - Cromatograma da análise de açúcares do licor do processo de hidrólise com CO₂ supercrítico (pico 1: celobiose; pico 2: glicose; pico 3: xilose; pico 4: arabinose).

