

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOSÉ AMÉRICO GOMES DE BRITO FILHO

INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE HIDRÓLISE ÁCIDA NA PALHA DA CEVADA E
APLICAÇÃO EM UM REATOR BATELADA

Poços de Caldas/MG

2019

JOSÉ AMÉRICO GOMES DE BRITO FILHO

INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE HIDRÓLISE ÁCIDA NA PALHA DA CEVADA E
APLICAÇÃO EM UM REATOR BATELADA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pelo Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas

Orientadora: Prof.^a. Dra. Melina Savioli Lopes.

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Adelino Sousa.

Poços de Caldas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

B862i Brito Filho, José Américo Gomes de.

Influência das variáveis de hidrólise ácida na palha da cevada e aplicação em um reator batelada / José Américo Gomes de Brito Filho. -- Poços de Caldas/MG, 2019.

72 f. –

Orientador(a): Melina Savioli Lopes.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.

Bibliografia.

1. Etanol. 2. Cevada. 3. Lignina. 4. Hidrólise. 5. Biodigestores. I. Lopes, Melina Savioli. II. Título.

CDD – 660

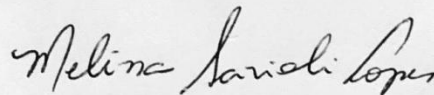
JOSÉ AMÉRICO GOMES DE BRITO FILHO

INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DE HIDRÓLISE ÁCIDA NA PALHA DA
CEVADA E APLICAÇÃO EM UM REATOR BATELADA

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Engenharia Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas.

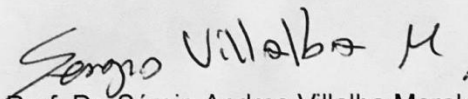
Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovado em: 11/11/2019



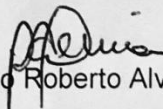
Prof.^a. Dr.^a. Melina Savioli Lopes.

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL.



Prof. Dr. Sérgio Andres Villalba Morales.

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL.



Prof. Dr. Paulo Roberto Alves Pereira.

Instituição: Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – UNIFAE.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, a minha família, em especial
minha avó, que sempre me apoiou e acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades e por ter me dado inteligência e força para que esse objetivo fosse alcançado.

Agradeço aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, em especial minha avó Nair, que sempre me apoiaram, educaram e direcionaram ao caminho correto e honesto. Hoje sou um homem de caráter, devo isso muito a eles que nunca mediram esforços para a realização dos meus objetivos.

Agradeço a professora Dra. Melina Savioli Lopes e ao professor Dr. Rogério Adelino Souza, que além de mestres, sempre foram meus amigos e que sempre me orientaram com seus conhecimentos e ideias durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus parceiros de projeto, Marcelo Vagner Gomes e Raphael Sarraf, não apenas pela companhia na elaboração do projeto, mas também pela amizade de anos.

Agradeço a todos os colegas que me apoiaram na realização deste trabalho.

E por fim, agradeço a todos os professores por compartilharem seus conhecimentos.

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

RESUMO

Fracionou-se este trabalho em duas etapas, a primeira parte teve como objetivo projetar e construir um biorreator com materiais reciclados e doados para hidrólise ácida de material lignocelulósico. A segunda etapa é o estudo da otimização do pré-tratamento, utilizando técnicas de planejamento experimental. As variáveis independentes do pré-tratamento do material lignocelulósico foram: massa de palha em solução com diferentes proporções (m/v) sólido – líquido, 5,0:10; 1,0:10; 1,5:10 e 2,0:10, e utilizando soluções de ácido sulfúrico com diferentes diluições (v/v), 0,5%; 0,8%; 1,0%; 1,5%; 2,0%, 2,5% e 3,0%. O pré-tratamento foi realizado por 40 minutos em autoclave vertical a 121 °C e 1 Kgf/cm². As variáveis respostas foram: a concentração de sólidos solúveis liberados medidos em graus Brix (°Bx) e a relação massa de glicose liberada em função da massa de biomassa de cevada inicial do (m/m). Os resultados mostraram que a condição otimizada para a liberação de glicose e também sólidos solúveis, foi a condição massa, 7:10 de (m/v) e de ácido sulfúrico a 2,6 % m/v, Nesta condição foi obtida uma concentração de 0,137g glicose (g) / de palha (g), com sólidos solúveis 2,61 °Bx.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração. Palha de cevada. Pré-tratamento ácido. Biorreator.

ABSTRACT

This work was divided into two stages, the first part aimed to design and build a bioreactor with recycled and donated materials for acid hydrolysis of lignocellulosic material. The second step is the study of pre-treatment optimization using experimental planning techniques. The independent variables of lignocellulosic material pretreatment were: straw mass in solution with different proportions (m / v) solid - liquid, 5,0:10; 1.0: 10; 1.5: 10 and 2.0: 10; and using sulfuric acid solutions with different dilutions (v / v), 0.5%; 0.8%; 1.0%; 1.5%; 2.0%, 2.5% and 3.0%. Pretreatment was performed for 40 minutes in a vertical autoclave at 121 °C and 1 kgf / cm². The response variables were: the concentration of released soluble solids measured in degrees Brix (° Bx) and the released glucose mass ratio as a function of the initial barley biomass mass of (m / m). The results showed that the optimized condition for the release of glucose and also soluble solids had a mass of 7:10 m / v and 2.6% m / v sulfuric acid condition, with a concentration of 0.137 glucose (g) / straw (g), with soluble solids 2.61 ° Bx.

Keywords: Second generation ethanol. Barley Straw. Acid pretreatment. Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Secção cruzada longitudinal do grão de cevada.....	15
Figura 2 - Estrutura da celulose	18
Figura 3 - Estrutura química da celulose com as interações das ligações de hidrogênio entre as moléculas.....	19
Figura 4 - Estrutura molecular da hemiceluloses	20
Figura 5 - Monossacarídeos que formam as hemiceluloses	20
Figura 6 - Estrutura molecular da xilana.....	21
Figura 7 - Estrutura química da lignina (álcool coniferílico, e álcool sinapílico e álcool p-cumarílico em destaque).	22
Figura 8 - Precursores primários da lignina.....	22
Figura 9 - Efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa	26
Figura 10 - Formação de componentes inibitórios	28
Figura 11 - Reações de hidrólise da celulose.....	29
Figura 12 - Biodigestor com resistência do tipo coleira	32
Figura 13 - Gráfico da distribuição granulométrica da palha da cevada triturada.....	43
Figura 14 - Gráfico da distribuição granulométrica cumulativa da palha da cevada triturada	43
Figura 15 - Diagrama de Pareto dos fatores do planejamento experimental.....	47
Figura 16 - Superfície de resposta do °Bx.....	49
Figura 17 - Curva de contorno de Sólidos Solúveis (°Bx).....	49
Figura 18 - Diagrama de Pareto da variável glicose (g) / palha de cevada (g).....	53
Figura 19 - Superfície de resposta da variável glicose (g) / palha de cevada(g)	54
Figura 20 - Curva de contorno da variável glicose (g) / palha de cevada(g)	55
Figura 21 - Curva de determinação de glicose.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de diferentes tipos de palha	17
Tabela 2 - Diferentes tipos de pré-tratamentos.	27
Tabela 3 - Comparação das condições e desempenhos dos tipos de hidrólise	30
Tabela 4 - Comparação entre os métodos químicos de hidrólise.....	30
Tabela 5 - Matriz de planejamento contendo valores codificados e reais	39
Tabela 6 - Distribuição granulométrica da palha de cevada fragmentada.....	42
Tabela 7 - Umidade residual da palha da cevada após secagem.	44
Tabela 8 - Caracterização química da palha da cevada.	44
Tabela 9 - Composição química de diferentes matérias-primas.....	45
Tabela 10 - Análise de sólidos Solúveis.....	46
Tabela 11 - Coeficientes da variável sólidos solúveis.	47
Tabela 12 - ANOVA °Bx.	48
Tabela 13 - Análise de glicose liberada no pré-tratamento ácido.....	50
Tabela 14 - Análise de glicose liberada no pré-tratamento ácido.....	51
Tabela 15 - Variável resposta massa Glicose (g) / Palha de cevada (g).....	52
Tabela 16 - Coeficientes da variável Glicose (g) / Palha de cevada (g).	52
Tabela 17 - ANOVA da variável Glicose (g) / Palha de cevada (g)	54
Tabela 18 - Análise de glicose no ponto central medido em $\lambda = 540$ nm	56
Tabela 19 - Rendimento de glicose no ponto central	56
Tabela 20 - Testes em biorreator laboratorial – Glicose (g) / Palha (g).....	57
Tabela 21 - Concentrações de açúcares nas diferentes metodologias.	57
Tabela 22 - Curva de glicose, método DNS (1959).	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
°Bx	Grau Brix
PNA	Produtos não amiláceos
1G	Etanol de primeira geração
2G-	Etanol de segunda geração
Ap	Área superficial
ART	Açúcares redutores totais
DNS	Ácido dinitrosalicílico
Hz	Hertz
R	Regressão
Fa	Falta de ajuste
r	Resíduo
ep	Erro puro
L	Litro
M	Metro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NREL	National Renewable Energy Laboratory
P	Pressão
pH	Potencial Hidrogeniônico
HPLC	High performance liquid chromatography
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.1.1	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	MATÉRIAS-PRIMAS RICAS EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS.....	14
3.2	CEVADA.....	15
3.2.1	Palha da Cevada	16
3.2.2	Celulose	18
3.2.3	Hemiceluloses	20
3.2.4	Lignina	21
3.2.5	Componentes Secundários	23
3.2.6	Planejamento Experimental	23
3.3	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	25
3.3.1	Pré – Tratamento Ácido	28
3.3.2	Hidrólise de Materiais Lignocelulósicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	CONSTRUÇÃO DO BIODIGESTOR	31
4.2	PREPARO DA PALHA DA CEVADA.....	32
4.2.1	Determinação de Umidade da Palha da Cevada	33
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DA CEVADA	33
4.3.1	Determinação do Teor de Cinzas	33
4.3.2	Preparo Para Determinação de Extrativos, Lignina Insolúvel e Carboidratos	34
4.3.3	Determinação de Componentes Secundários	34
4.3.4	Quantificação De Lignina Insolúvel	35
4.3.5	Quantificação de Lignina Solúvel	36
4.3.6	Quantificação de Carboidratos	37
4.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO PRÉ-TRATAMENTO.....	38
4.5	PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO	39
4.6	CURVA PADRÃO DE GLICOSE	40

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE CEVADA	42
5.2	OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA PALHA DA CEVADA ..	45
5.2.1	Análise de Sólidos Solúveis	45
5.3	GLICOSE LIBERADA NO O PRÉ-TRATAMENTO.....	49
5.4	VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NO PONTO CENTRAL.....	55
5.5	TESTE DE HIDRÓLISE EM BIORREATOR.....	57
6	CONCLUSÃO.....	58
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE A – Curva para Quantificação de Glicose	65
	APÊNDICE B – Desenhos Técnicos do Reator	67

1 INTRODUÇÃO

A monocultura de cevada tem demonstrado expressivo crescimento, sendo uma excelente fonte de materiais lignocelulósicos, os principais componentes orgânicos estruturais da fibra são, a celulose, a hemiceluloses e a lignina. Após a utilização do malte pelas indústrias cervejeiras, realiza-se o descarte da palha da cevada que, muitas vezes, destina-se para alimentação de animais ou, como serapilheira para o solo. Representando potencial desperdício de fonte de açúcares fermentescíveis e produtos secundários, como resinas, álcoois e óleos essenciais, que podem ser extraídos (MUSSATO *et al.*, 2010).

Para a caracterização química de lignocelulósicos geralmente é utilizada uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico. Assim, ocorre uma despolimerização do polissacarídeo, formando oligômeros e seus açúcares constituintes, isto é, suas unidades diminutas repetitivas. No caso das hemiceluloses, as maiores frações são de xilose, ácido acético e furfural. Já para a celulose, são formados glicose e hidroximetilfurfural (HMF) que, por sua vez, pode ser convertido a ácido fórmico (PALMQVIST, 2000).

O presente trabalho se justifica com uma proposta transdisciplinar, unindo os cursos de engenharia química, engenharia de controle e automação e o curso técnico em química, formando uma parceria entre as instituições, a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) – Câmpus Poços de Caldas – MG e o Instituto Federal de educação, ciência e tecnologia do estado de São Paulo (IFSP) – Câmpus São João da Boa Vista – SP. Apresentando como motivação característica, um projeto “pedagógico-industrial”, que visa edificar a ponte entre a academia e a sociedade, através da aplicabilidade da pesquisa no setor rural e industrial, promovendo a consciência da utilização de resíduos agroindustriais. Contribuindo assim para amenizar o impacto ambiental e agregar valor aos materiais descartados.

O presente trabalho pode ser fracionado em duas etapas que culminam no mesmo objetivo de degradação da palha da cevada e liberação de açúcares redutores totais (ART). A primeira etapa é a confecção de um biodigestor para a despolimerização da fibra vegetal, e a segunda etapa é o estudo e otimização da hidrólise ácida em material lignocelulósico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Projetar e construir um biorreator para hidrolise ácida de material lignocelulósico e estudar o processo de liberação de açúcares fermentescíveis de palha de cevada.

2.1.1 Objetivos Específicos

- a) Elaborar projeto técnico para a construção do biorreator;
- b) Caracterizar físico-quimicamente a biomassa utilizada, definindo sua umidade residual após sua secagem, teores iniciais de lignina, celulose, hemiceluloses e cinzas;
- c) Estudo das condições de pré-tratamento ácido através do planejamento experimental;
- d) Aplicar a metodologia de hidrolise ácida para a obtenção de açúcares fermentescível a partir da palha da cevada em escala laboratorial;
- e) Aplicar as condições ótimas estudadas no biorreator e efetuar um comparativo entre as escalas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existe uma tendência mundial para o desenvolvimento científico e tecnológico de combustíveis “ambientalmente corretos”, entre eles destacam-se àqueles advindos de reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Há um considerável e crescente interesse de vários países que exploram monoculturas como, por exemplo, Brasil, Estados Unidos e Canadá no desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol a partir do aproveitamento dos materiais lignocelulósicos e reaproveitamento de resíduos agroindustriais, uma vez que não há a necessidade de aumento de área de plantio (ROCHA *et al.*, 2019).

3.1 MATÉRIAS-PRIMAS RICAS EM AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS.

A natureza disponibiliza diversas espécies vegetais como matérias-primas que apresentam açúcares para potenciais processos fermentativos. Tais espécies são classificadas de acordo com sua estrutura biológica e taxonômica, composição bioquímica e complexidade, sendo divididas em (ROCHA *et al.*, 2019):

a) Matérias-primas açucaradas: disponibilizam sacarose, glicose, frutose, galactose e lactose, são hidrossolúveis e facilmente extraídos por pressão e difusão, presentes na cana-de-açúcar, beterraba, sorgo sacar:ino, frutas e no soro do leite (BNDES; CGEE, 2008);

b) Matérias-primas amiláceas: disponibilizam polissacarídeos que necessitam de pré-tratamento físico, trituração, e hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis. Estão presentes nos grãos de milho, mandioca, trigo, cevada e batata (BNDES; CGEE, 2008);

c) Matérias-primas lignocelulósicas: são resíduos agroindustriais e florestais, necessitam de pré-tratamentos físicos, químicos e enzimáticos para hidrolise converter a lignina em monossacarídeos (BNDES; CGEE, 2008).

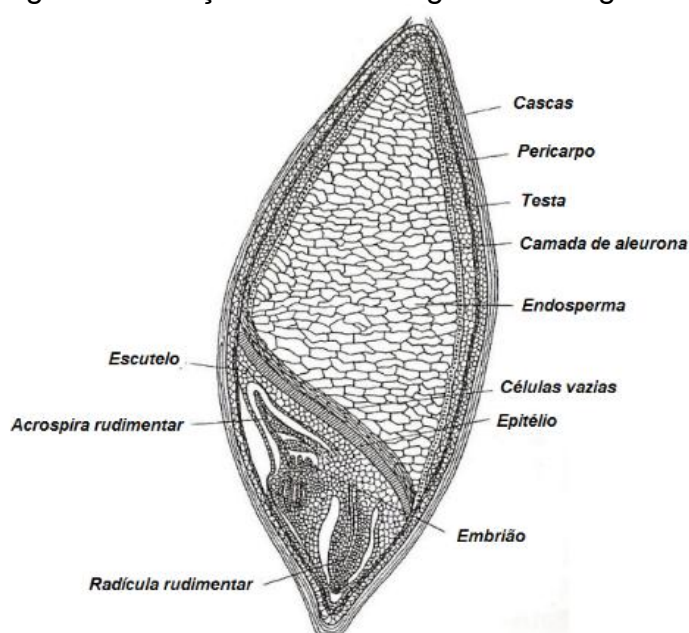
Para o emprego de matérias-primas como substrato na produção industrial de etanol, levam-se em conta diversos aspectos técnicos, econômicos e energéticos do processo fermentativo. Sendo a origem e natureza da matéria-prima uns dos componentes de maior relevância nos custos de produção e procedimento operacionais, chegando até 75% dos custos totais. (ROCHA *et al.*, 2019)

3.2 CEVADA

A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma gramínea cerealífera de pequeno porte, originária do Oriente Médio, e que ocupa o quinto lugar na colheita mundial de grãos, após arroz, milho, trigo e soja. Sendo caracterizada por se desenvolver melhor em culturas de clima frio, chamada popularmente de “cultura de inverno”. Com flores dispostas nas extremidades das espigas do colmo, os aquênios são amarelados de aspecto ovoides (Figura 1). Trata-se de uma cultura de clima seco, que não tolera o alagamento, sendo bem resistente às estiagens se comparada ao trigo, mas com mais exigências nutricionais em relação à fertilidade do solo. O produto resultante da germinação artificial dos grãos, o malte, é utilizado principalmente na fabricação da cerveja. Os grãos torrados e moídos são usados na fabricação de uma bebida sem cafeína de aspecto semelhante ao do café. A cevada é ainda empregada na alimentação animal como forragem verde e na fabricação de ração (DE MORI; MINELLA, 2012).

Com quantidade anual média de aproximadamente 140 milhões de toneladas, a produção do cereal está concentrada nas regiões temperadas da Europa, Ásia e América do Norte. Sendo assim uma das principais fontes de alimento para pessoas e animais desde a antiguidade (STEFFENSON *et al.*, 2017).

Figura 1 - Secção cruzada longitudinal do grão de cevada



Fonte: Adaptado de Kunze (2004).

De acordo com Quinde (2004), os grãos de cevada consistem em cerca de 65 % a 68 % de amido, 10 % a 17 % de proteína, 4 % a 9 % em β -glucano, 2 % a 3 % de lipídios, e 1,5 % a 2,5 % de minerais.

Os compostos β -glucanos e os arabinoxilanos são os principais constituintes da estrutura celular e dos tecidos que compõem o grão de cevada. No grão maduro de cevada, na parte do endosperma, os arabinoxilanos e β -glucanos podem representar até 85 % dos polissacarídeos totais que compõem a parede celular da biomassa. A parede celular do endosperma é formada principalmente por β -glucanos e uma menor quantidade de arabinoxilanos, enquanto a parede celular da aleurona (proteína encontrada no endosperma vegetal externo) é composta por arabinoxilanos (67 a 71%) e menores quantidades de β -glucanos (26%).

Os componentes β -glucanos e arabinoxilanos no grão de cevada e sua interação com outros componentes são relevantes para a indústria do ponto de vista tecnológico. Devido à sua influência na obtenção de frações enriquecidas desses polissacarídeos não amiláceos, vão impactar positivamente na utilização da cevada nas nutrições humana e animal, quanto na agroindústria. (FINCHER & STONE, 1986)

Na parede estrutural celular das fibras, encontram-se a celulose, a hemicelulose e a lignina, compostos hidrolisáveis para a obtenção de açúcares redutores totais (ART). A celulose e hemicelulose são os compostos que, após serem pré-tratados, são utilizados na obtenção dos carboidratos para a fermentação. Os açúcares redutores são aqueles que possuem grupos carbonílicos e cetônicos livres e disponíveis para ataques, capazes de serem oxidados na presença de agentes oxidantes em soluções ácidas ou alcalinas (SOUSA, 2014).

3.2.1 Palha da Cevada

A crescente onda de produção de cevada no Brasil para atender as demandas das maltarias, resulta em um crescimento na quantidade de palha de cevada que é considerado um resíduo agroindustrial, a qual pode ser utilizada desde ração animal até para forragem de pasto (MAPA, 2017).

Semelhante a outros materiais lignocelulosicos, a palha de cevada também é constituída de três principais componentes, que se fazem presentes em maior quantidade: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Observando-se que as

porcentagens de hemiceluloses nesta matéria-prima são elevadas (Tabela 1), estima-se que é possível a obtenção de um hidrolisado com teor significativo de xilose em condições de hidrólise menos drástica quando comparado à hidrólise do cavaco de eucalipto, uma fibra mais rica em lignina. O produto de hidrólise da palha da cevada apresenta valores reduzidos dos teores de inibidores, principalmente do furfural (STRYGINA, 2017).

A D-xilose ($C_5H_{10}O_5$) é o principal açúcar presente na fração hemicelulósica da parede celular da palha da cevada, pode ser facilmente obtida pelo processo de hidrólise ácida e com rendimentos consideráveis. Sendo assim, a hidrólise em via ácida da palha de cevada apresenta rendimento de um produto hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, como observado na Tabela 1, com destaque para glicose e a xilose (NÁPOLES *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Composição química de diferentes tipos de palha

Biomassa Lignocelulósica	% Celulose	% Hemiceluloses	% Lignina
Palha de cana	40 – 44	30 – 32	22 – 25
Bagaço de cana	32 – 48	19 – 24	23 – 32
Madeira dura	43 – 47	25 – 35	16 – 24
Madeira mole	40 – 44	25 – 29	25 – 31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38 – 40	28	7 – 21
Fibra de coco	36 – 43	0,15 - 0,25	41 – 45
Fibra de bananeira	60 – 65	6 – 8	5 – 10
Palha de cevada	31 – 45	27 – 38	14 – 19

Fonte: Adaptado Santos *et al.* (2012).

Diferentes matérias-primas lignocelulósicas podem ser empregadas para a obtenção da xilose. A escolha da biomassa é de suma importância, uma vez que esta deve estar disponível em abundância e possuir um teor elevado de xilana. A xilana é uma pentosana que quando hidrolisada dá origem a uma pentose conhecida

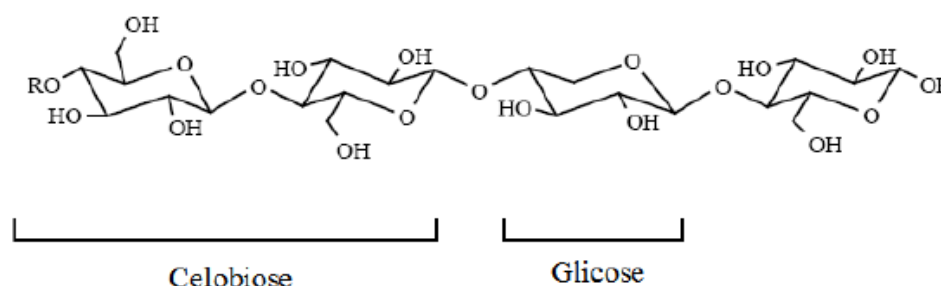
como xilose. As xilanas são polissacarídeos formados por unidades de D-xilose ligadas por pontes glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) na cadeia principal e diferentes carboidratos, tais como ácidos urônicos e seus derivados, L-arabinose e oligossacarídeos em cadeias laterais. As xilanas são frequentemente encontradas como principais constituintes das hemiceluloses em diversas espécies vegetais (PARK, 2013).

3.2.2 Celulose

Segundo Suhas (2016), a produção de celulose compreende aproximadamente 50 % da produção de biomassa de todo o material orgânico mundial, o que equivale a cerca de 100 bilhões de toneladas por ano.

A celulose (Figura 2) é considerada o principal item constituinte dos materiais lignocelulósicos sendo um polissacarídeo de cadeia extensa e de maior abundância na natureza. Isoladamente, a celulose corresponde a cerca de 40 % de toda a reserva de carbono disponível na biosfera (RABELO, 2007). Foi descoberta e caracterizada no ano de 1838 na França por Aلسelme Payen.

Figura 2 - Estrutura da celulose



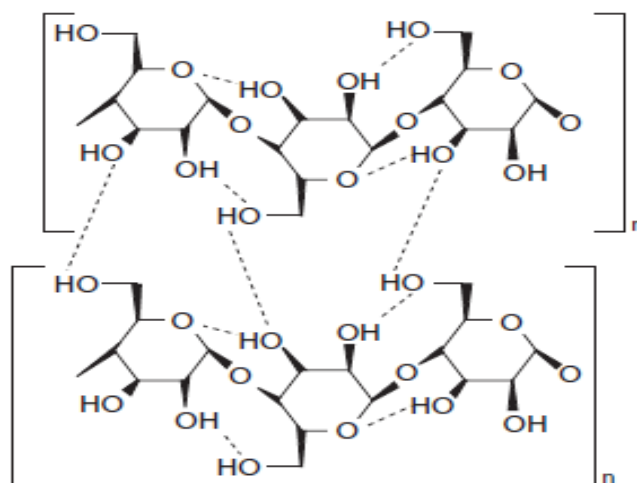
Fonte: Rabelo (2010, p.19).

Do ponto de vista químico, a celulose é considerada um monopolímero linear de alto, massa molar e de cadeia longa, apresentando como principal constituinte o monômero D-glicose (C₆ H₁₁O₅)_n. Trata-se de um composto formado por até 15000 unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β - (1,4). A molécula da celulose composta por anéis de β -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas, cuja unidade repetitiva é a celobiose (dímeros de glicose) (RABELO, 2010).

As interações entre as cadeias ocorrem por meio do tipo de “ligação hidrogênio” (Figura 3), formando uma espécie de micro fibra ou fibrilas, que se unem em unidades maiores e formam as fibras de celulose já conhecidas.

Devido às fibrilas serem formadas a partir de interações de ligação de hidrogênio, que tem alto nível de estabilidade, isso faz com que um possível ataque à estrutura, uma hidrólise, por exemplo, seja desfavorecida necessitando de condições mais extremas e severas, como a presença de um ácido forte e altas temperaturas (ZHANG; LYND, 2004).

Figura 3 - Estrutura química da celulose com as interações das ligações de hidrogênio entre as moléculas.



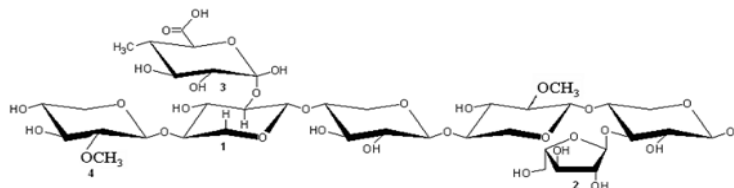
Fonte: Nelson; Cox (2011, p.17).

A celulose tende a ser insolúvel em água, mas devido à presença de grupos hidroxílicos em cada resíduo de glicose, e às inúmeras interações de ligações hidrogeniônicas, possui alto teor de hidratação. Soluções fortes ácidas ou alcalinas conseguem romper as interações e dissolver a celulose. A transformação dos polímeros amido e celulose em glicose é uma etapa fundamental na produção de alimentos, de energia e até de produtos químicos e farmacêuticos. A intenção de se utilizar a celulose para a produção de alimentos, seja por fermentação direta seja por prévia hidrólise ácida, é relativamente antiga.

3.2.3 Hemiceluloses

A hemiceluloses (Figura 4) é um polímero ramificado composto de polissacarídeos de baixa massa molar, com moléculas associadas às paredes celulares das plantas, como a celulose e a lignina (PULS *et al.*, 1993).

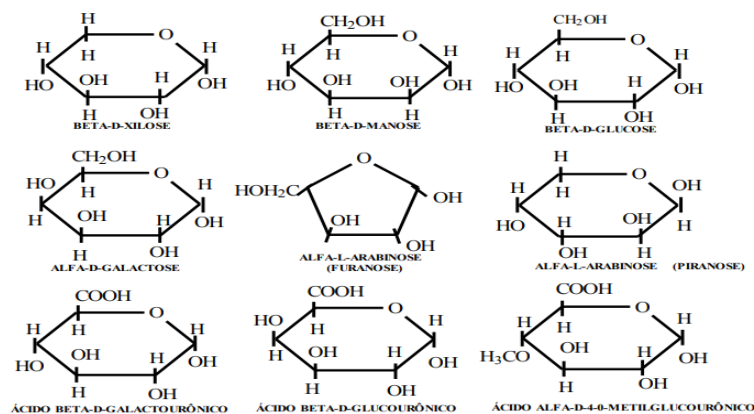
Figura 4 - Estrutura molecular da hemiceluloses



Fonte: Adaptado de Carvalho (2011).

De acordo com Canettiere (2004) o grau de polimerização nas moléculas de hemiceluloses é de aproximadamente 200 unidades de monômeros. Dessa forma, um polímero bem menor que a celulose que pode chegar aproximadamente 15000 unidades. É classificado como heteropolissacarídeos complexo, constituídos por unidades de açúcares (Figura 5) que podem ser subdivididos em grupos, como pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (RABELO, 2010).

Figura 5 - Monossacarídeos que formam as hemiceluloses

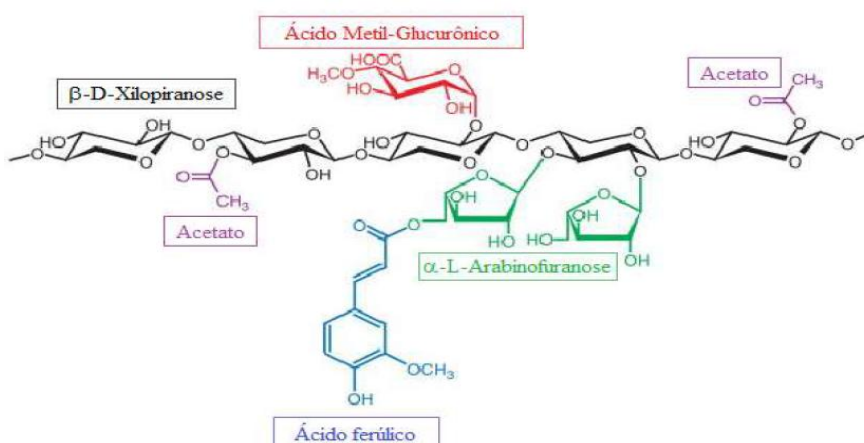


Fonte: Adaptado de Rabelo (2007).

O teor quantificado de hemiceluloses na palha da cevada, por exemplo, encontra-se numa proporção entre 27 % a 38 % (Tabela 1). O componente mais significativo dentre as frações hemicelulósicas de resíduos agro-industriais é a xilana (Figura 6), é um polímero constituído por unidades de xilose que podem ser hidrolisadas por vias ácidas (COWLING, 1975; KHUAD; SINGH, 1993). A xilana

possui uma estrutura linear constituída de xilopiranosil unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ que são encontradas em todas as plantas terrestres e compreendem a 30 % do material da parede celular dos vegetais em questão. A xilana em madeiras duras se encontra com o radical O-acetil-4-O-metil glucuronoxilana, no qual a cadeia de xilana aparece em intervalos regulares unida com unidades de ácido acético e ácido 4-O-metil glucurônico (BIANCHI, 1995).

Figura 6 - Estrutura molecular da xilana



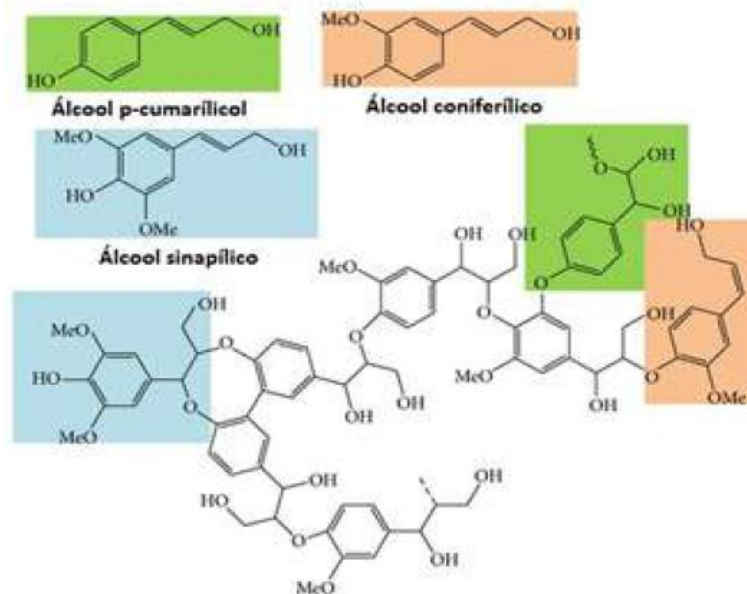
Fonte: Pratto (2014, p. 28).

Contudo as hemiceluloses são estruturalmente mais semelhantes à celulose do que com a lignina.

3.2.4 Lignina

A lignina (Figura 7) atua como uma espécie de “cimento molecular”, um material ligante na parede estrutural celular, unido de forma eficiente às microfibras de celulose e hemicelulose. Atribuindo considerável rigidez e resistência ao impacto mecânico, compressão e dobra da biomassa vegetal, conferindo sustentação, impermeabilidade seletiva ligada ao fluxo interno de água dos vegetais (RABELO, 2007). Atua ainda em escala microscópica, dificulta a degradação microbiana da celulose e da hemicelulose, promovê resistência aos ataques microbiológicos, constituindo assim um empecilho as hidrólises ácidas, básicas e enzimáticas (KHUAD; SINGH, 1993).

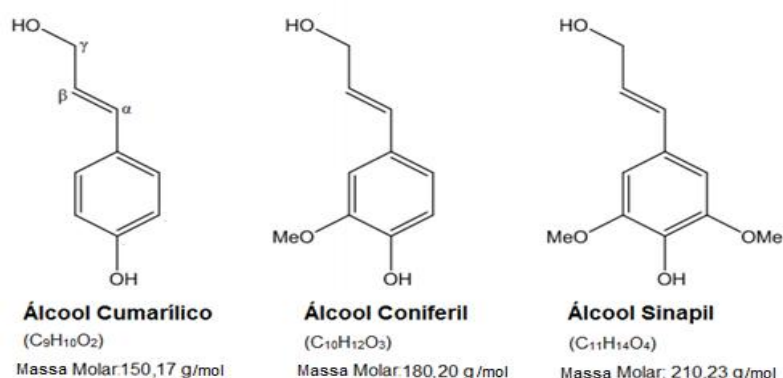
Figura 7 - Estrutura química da lignina (álcool coniferílico, e álcool sinapílico e álcool p-cumarílico em destaque).



Fonte: Lee *et al.* (2014, p.15).

A lignina é segundo polímero natural mais abundante na natureza, a lignina apresenta uma estrutura tridimensional não uniforme e é um composto polímero composto por fenilpropano com diferentes ligações entre os monômeros (Figura 8), álcool coniferil (3-metoxi 4-hidroximetil álcool), álcool sinapil (3, 5 dimetoxi 4-hidroxinamil álcool) e álcool cumarílico (álcool 4- hidroxicumarílico) (GOLDSTEIN, 1978).

Figura 8 - Precursores primários da lignina



Fonte: Adaptado de Bon (2008).

Durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, podem ser formados produtos secundários indesejados (compostos fenólicos), provenientes da degradação da lignina, como: álcoois aromáticos (catecol, hidroquinona, coniferil,

guaiacol, 4-metilcatecol e álcool vanílico, entre outros) e aldeídos (p-hidroxibenzaldeído e seringaldeído, entre outros) (NISHIKAWA; SUTCLIFFE; SADDLER, 1988; ZALDIVAR *et al.*, 2000). Segundo Nishikawa (1988) estes compostos são potentes inibidores do metabolismo microbiano em processos fermentativos a partir de materiais hidrolisados.

3.2.5 Componentes Secundários

Os componentes secundários, também conhecidos como extrativos consistem em gorduras, gomas, amidos, alcalóides, resinas e óleos essenciais entre outros e os não extrativos incluem compostos como sílica, carbonatos e oxalatos, sendo frequentemente responsáveis por características como cor, sabor, resistência ao apodrecimento e até mesmo propriedades abrasivas (KHUAD; SINGH, 1993).

Os compostos inorgânicos presentes na composição das biomassas lignocelulósicas, são aproximadamente 2 % constituídos por cinzas, contendo carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos. Ainda existem extrativos presentes na estrutura da biomassa, tais como terpenos, óleos essenciais, ácidos graxos, álcoois, resinas ácidas e taninos entre outros, que representam cerca de 4 % a 10 % do peso seco da biomassa. Contudo, a proporção de tais componentes estruturais em resíduos agrícolas depende do tipo de biomassa, da sua idade, das condições de crescimento, entre outros (RABELO, 2010).

3.2.6 Planejamento Experimental

De acordo com Rodrigues e lemma (2009), o planejamento experimental é uma ferramenta muito poderosa, baseada em fundamentos estatísticos, capaz de indicar as condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das especificações desejadas e também avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas. Os fatores são variáveis independentes a serem estudados ou avaliados em um processo, podendo ser controladas e mensuradas. As respostas são variáveis dependentes e podem ser determinadas de forma empírica experimentalmente.

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece

informações seguras sobre o processo com o propósito de minimizar o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro, barateando os custos do projeto (IEMMA; RODRIGUES, 2009).

Em geral, a estatística é usada quando a quantidade de informações é numerosa, porém a atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos e quando isso é feito de forma apropriada, muitas conclusões podem ser extraídas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1996). Com o planejamento experimental há uma redução significativa no número de ensaios necessários devido à análise multivariável que permite verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre as variáveis estudadas. Além disso, é possível otimizar mais de uma variável ao mesmo tempo.

Para a otimização de um processo, Rodrigues e Lemma (2009) sugerem uma sequência de passos que inicia a análise do processo definindo os fatores (variáveis de entrada) e as respostas (variáveis de saída). Posteriormente, define-se o tipo de planejamento experimental mais adequado, observando-se a quantidade de fatores e respostas do processo. As análises estatísticas devem ser realizadas fazendo-se uso do “bom senso”, através da qual será determinada a modelagem matemática bem como as superfícies de respostas. Após a otimização do processo é necessário à realização da validação experimental dos resultados nas condições ótimas de operação.

O planejamento experimental mais comum é o composto central, também chamado de planejamento em estrela, no qual se calcula quais serão os novos valores ou pontos axiais determinados, representado pela Equação 1 (RABELO, 2007).

$$\alpha = (2^n)^{\frac{1}{4}} \quad (1)$$

Em que: α é a distância dos pontos axiais e n é o número de variáveis.

3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

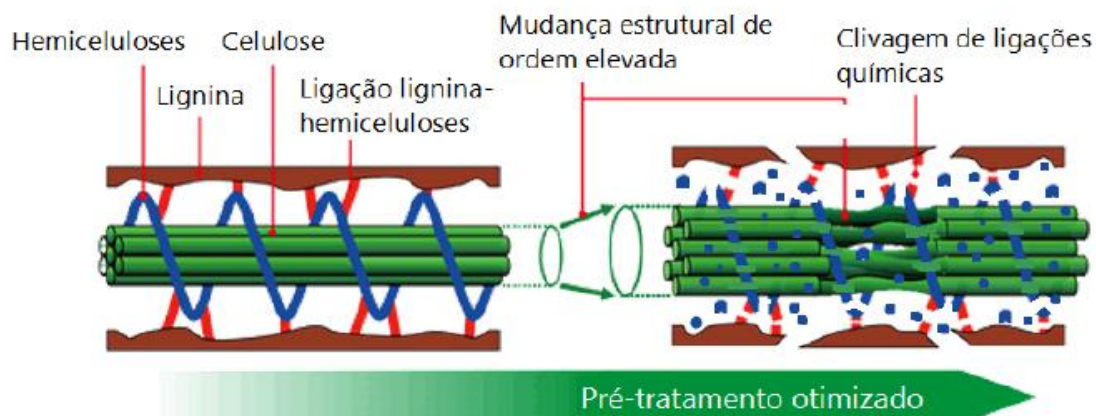
Há diversos processos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos, que envolvem processos físicos, químicos, biológicos ou um somatório de etapas. A seleção do tipo de pré-tratamento esta relacionada aos os custos envolvidos no processo, a biomassa de extração e ao produto de interesse. Entre os métodos mais usuais e conhecidos reportados na literatura estão, a hidrólise alcalina, a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática, a explosão a vapor, a água quente, fluído supercrítico, amônia líquida e hidróxido de sódio. Todos estes métodos objetivam quebrar a estrutura da lignocelulose (figura 9) permitindo o acesso dos microrganismos aos açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol (etanol de segunda geração – 2G) ou outros produtos secundários provenientes da biomassa (CARVALHO, 2011).

De forma geral, o pré-tratamento é um processo que tem como objetivo principal quebrar as interações e ligações químicas entre as moléculas de lignina, hemicelulose e celulose, destituindo a unidade da fibra. Por meio da quebra da lignina, que protege e envolve o substrato, tem-se uma maior área superficial reacional para ataque químico, separando assim os três componentes principais dos materiais lignocelulósicos (CARVALHO,2011).

A eficiência de um pré-tratamento pode ser medido, pela redução da extensão das partículas da fibra, apresentando baixa taxa de degradação dos açúcares fermentativos liberados, com um processo de baixo custo e consumo de energia (CARVALHO, 2011).

Portanto para a obtenção de açúcares fermentescíveis, originários de biomassa celulósica, é preciso que haja uma clivagem nos polímeros naturais em seus monômeros. Assim podem vir a ser hidrolisados e convertidos em etanol e gás carbônico pela ação de microrganismos pertinentes. Entretanto, as fibras de celulose e de hemiceluloses, encontram-se de certa forma “blindadas” na matriz lignínica estrutural da palha em questão, tornando as fibras pouco expostas para a ação de enzimas hidrolíticas ou reagentes químicos. Deste modo, o pré-tratamento expõem as fibras de celulose e hemiceluloses (Figura 9), promovendo a eficiência do ataque dos agentes hidrolíticos (RABELO, 2010).

Figura 9 - Efeito do pré-tratamento na estrutura da biomassa



Fonte: Nakasu (2015,p. 21).

O pré-tratamento é a segunda etapa de custos mais elevados na conversão lignocelulósica somando ao fato que deve ser seguido da hidrólise enzimática, devido às especificidades, fazendo-se necessário empregar tecnologias adequadas de pré-tratamentos, pois diferentes materiais lignocelulósicos possuem diferentes propriedades físico-químicas. Não existe uma metodologia de pré-tratamento geral, que atenda a todos os quesitos, devido à complexidade do processo e a variedade e disponibilidade de materiais lignocelulósicos (MACHADO, 2013). De acordo com Mussato (2010) as características que um pré-tratamento eficaz e adequado deve possuir, são principalmente: eficiência em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade, simplicidade operacional, segurança, higiene industrial, atributos ambientais, menor necessidade de consumo de insumos químicos, energia e utilidades.

Como dito anteriormente, os pré-tratamentos podem vir a ser classificados em diversos tipos, como em físicos, químicos ou biológicos. Entretanto, também podem ser combinados com outros métodos, sejam eles de uma mesma categoria, ou de categorias diferentes (MACHADO, 2013). Na Tabela 2 está representado um comparativo entre os diversos tipos de pré-tratamentos existentes, bem como suas peculiaridades, vantagens e desvantagens.

Tabela 2 - Diferentes tipos de pré-tratamentos.

Pré-tratamento		Características Composicionais			Geração de Compostos Tóxicos	Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemiceluloses	Lignina			
Física	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Não há	Redução da Cristalinidade	Alto consumo de energia
	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80 - 99,9% de remoção	Pouca remoção com mudança de estrutura	Alta Formação	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da Xilana como produto inibitório
	Hidrotérmico	Diminuição do Grau de Cristalinidade e aumento dos poros da celulose	Alta solubilização	Pouca remoção com moderada transformação na estrutura	Baixa Formação	Não requer catalisador e reatores são de baixo custo	Alto consumo de energia e água
Química	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80 - 99,9% de remoção	Pouca remoção com mudança de estrutura	Baixa Formação	Condições médias, altas produções de Xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de Sódio	Inchaço significativo	Considerável solubilidade	Solubilização, > 50%	Baixa Formação	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	Organosolve	Considerável inchaço	Solubilização, >90%	Solubilização, >90%	Média/Baixa Formação	Altas produções de xilose,	Recuperação de solvente, técnica de alto custo
Biológico	Enzimático	20 - 30% de despolimerização	Solubilização, >80%	≈ 40% de deslignificação	Sem Formação a Baixa Formação	Baixo gasto de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise

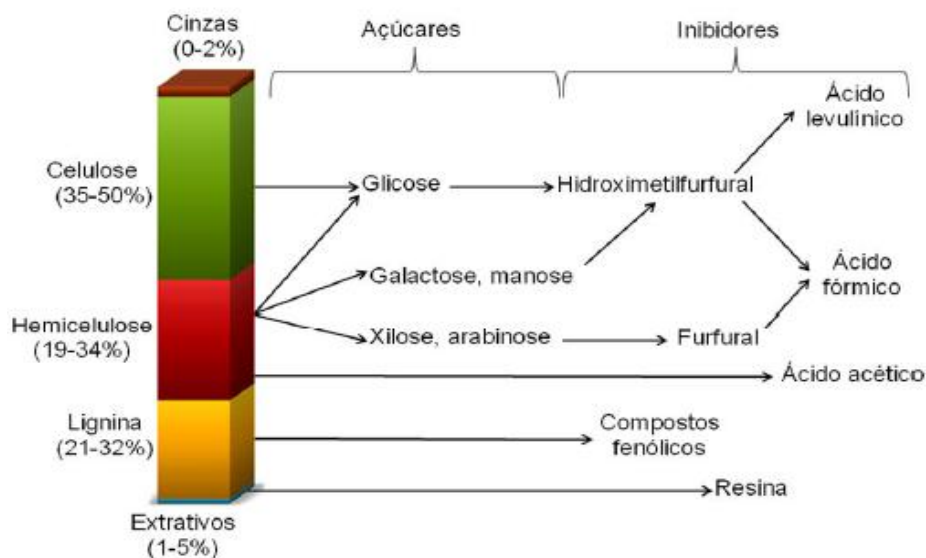
Fonte: Adaptado de Machado (2013).

Para este trabalho, foi escolhido um pré-tratamento químico, adotando ácido sulfúrico com várias diluições, pois devido ao seu baixo potencial de degradação dos açúcares fermentescíveis, alto grau de penetrabilidade na fibra lignocelulósica, com posterior recuperação significativa na fração sólida para futura hidrólise e remoção de hemiceluloses na fração líquida.

É durante a etapa do pré-tratamento que também ocorre a formação de compostos secundários indesejados que dificultam e atrapalham os processos biológicos. Estes compostos atenuam ou matam os microrganismos por serem tóxicos, e podem levar a inibição de enzimas. Estes compostos inibidores tem origem na degradação dos açúcares fermentescíveis por condições drásticas, como elevadas temperaturas e altas concentrações de ácidos (RABELO, 2010).

A Figura 10 ilustra a procedência de cada agente inibidor de diferentes constituintes de biomassa.

Figura 10 - Formação de componentes inibitórios



Fonte: Rabelo (2010, p. 17).

3.3.1 Pré – Tratamento Ácido

As hidrólises ácidas podem ocorrer com ácidos concentrados ou diluídos. Quando realizada hidrólise com ácido concentrado, o processo ocorre em tempo reduzido; contudo, tem-se um alto nível de degradação dos açúcares fermentescíveis formados, de forma exotérmica, e a corrosão das partes metálicas dos equipamentos. Já o método aplicando ácidos diluídos pode ser considerado mais viável, pois efetua a mesma quebra com eficiência e promove uma menor corrosão dos equipamentos; contudo, a utilização de ácido diluído demanda mais tempo de reação, mas apresenta uma série de vantagens, como o teor de degradação dos açúcares formados gerando produtos inibidores da fermentação ser expressivamente menor, havendo ainda uma diluição parcial destes açúcares em solução, e a alta penetrabilidade na fibra. (RODRIGUES, 2007).

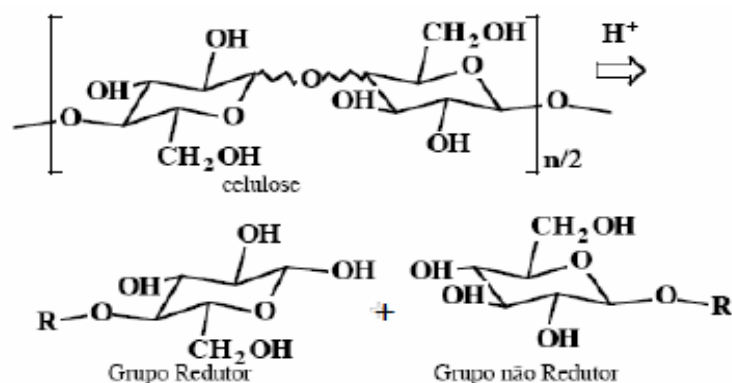
Com relação aos processos de pré-tratamento, a utilização de ácidos diluídos sejam hidrácidos como ácido clorídrico ou oxiácidos, como o sulfúrico, e o fosfórico ou mesmo ácidos orgânicos como ácido acético, constituem os pré-tratamentos mais abordados na literatura atualmente. (RODRIGUES, 2007) Durante o processo, a hemicelulose é solubilizada, separando-se da biomassa numa fração líquida contendo, predominantemente, pentoses e uma fração sólida composta em sua

maioria por celulose e lignina, que são insolúveis em meio aquoso. (SANTOS *et al.*, 2012)

Conforme os procedimentos operacionais adotados, a fração líquida será composta de açúcares redutores como a xilose, glicose e arabinose, além de produtos da decomposição das hemiceluloses como os oligômeros dos polímeros naturais estruturais e o ácido acético gerado pela hidrólise de grupos acetil ligados aos açúcares, e/ou produtos da decomposição de monossacarídeos como o furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF). (SANTOS *et al.*, 2012; SCHELL *et al.*, 2003).

De acordo com Rabelo (2007), com a hidrólise ácida da celulose obtem-se como produtos: polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras. Logo após a hidrólise de cadeias mais extensas, a decomposição dá origem à celobiose (dissacarídeo redutor) e à glicose, como ilustrado a na Figura 11.

Figura 11 - Reações de hidrólise da celulose



Fonte: Rabelo (2007, p. 18).

3.3.2 Hidrólise de Materiais Lignocelulósicos

A hidrólise é a etapa em que os polímeros fibrosos naturais de hemiceluloses e celulosas são fragmentados em formas monoméricas. Este processo de fragmentação pode ocorrer por vias enzimáticas ou químicas, e estas sendo ácidas ou básicas. Na Tabela 3 estão elucidados os parâmetros de diferentes tipos hidrólise, onde se pode notar que com a hidrólise enzimática é possível conseguir melhores rendimentos de glicose em faixas de tempo mais extensas e temperatura mais brandas.

Tabela 3 - Comparação das condições e desempenhos dos tipos de hidrólise

	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de Glicose
Ácido Diluído	<1 % H ₂ SO ₄	215	3 min	50 – 70 %
Ácido Concentrado	30 – 70 % H ₂ SO ₄	40	2 – 6 h	90 %
Enzima	Celulase	50	12 h	75 – 95 %

Fonte: Adaptado de Nakasu (2015); adaptado de Hamelinck *et al.* (2005).

Contudo, na Tabela 4, elencam-se as vantagens e desvantagens das hidrólises químicas. Após a análise dos tipos de hidrólise, aplica-se a este trabalho a hidrólise ácida diluída.

Tabela 4 - Comparação entre os métodos químicos de hidrólise

Método de hidrólise	Vantagens	Desvantagens
Ácido Concentrado	Operação a baixas temperaturas. Altos rendimentos de açúcares.	Alto consumo de reagente. Alta corrosão de equipamentos. Alto consumo energético para recuperação do ácido. Tempos reacionais longos. Degradação de açúcares
Ácido Diluído	Baixo consumo de reagente. Tempos reacionais curtos. Baixo teor de corrosão de equipamentos. Penetrabilidade na fibra.	Operação em altas temperaturas. Formação de subprodutos indesejados.

Fonte: Nakasu (2015, p. 37).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSTRUÇÃO DO BIODIGESTOR

O modelo de biodigestor adotado para a hidrólise química foi um reator do tipo batelada, devido ao seu baixo custo e versatilidade (FOGLER, 2002), atrelados a custos reduzidos. Os materiais utilizados para a sua confecção são provenientes de reaproveitamento e reciclagem e doação. Este equipamento tem como finalidade servir como reator realizando a hidrólise da palha da cevada.

O dimensionamento da peça se dá em, um vaso reacional é cilíndrico, possui 34,5 cm de altura e 25 cm de diâmetro, e espessura da chapa em 1,27cm, base cônica de 12 cm de altura, e foi instalado em sua base do vaso para a descarga de compostos e higienização, uma válvula olhal. Em seu corpo de vaso reacional foi instalado uma resistência elétrica do tipo coleira de cerâmica de 250 mm de diâmetro, 200 mm altura, 1 cm de espessura e 9400W de potência da marca RR (resistências industriais®).

Em sua face superior o biodigestor, possui uma tampa e um agitador mecânico com motor que gera uma velocidade de agitação em vórtice de 120 a 5000 Rpm, modelo 713 da marca Fisatom. A tampa possui dimensões de 33 cm de diâmetro, contendo um orifício concêntrico de entrada de 7 cm de diâmetro e 4 orifícios para a fixação de parafusos. Na mesma tampa estão afixados 4 parafusos com suporte em flanges para acoplar uma torre de aço inox 407 de 103 cm de altura, preenchida com pérolas de sílica, além disso há um suporte para acople do motor de agitação do composto, como demonstrado na Figura 12 ilustra o equipamento.

Figura 12 - Biodigestor com resistência do tipo coleira



Fonte: Do autor.

4.2 PREPARO DA PALHA DA CEVADA

Segundo Rabelo (2010), que avaliou a influência do tamanho da partícula da palha em diferentes materiais lignocelulósicos durante o pré-tratamento químico, postulou, com ressalvas, que não há a necessidade de redução do tamanho das partículas para garantir a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à biomassa pré-tratada, contudo, quanto menor a extensão da fibra, maior a penetrabilidade para efeitos da hidrólise ácida (ALBINI; FREIRE; FREIRE, 2015).

Coletou-se 5,3 kg de palha de cevada, proveniente de uma micro cervejaria da região de São João da Boa Vista – São Paulo, Brasil. Sanitizou-se a biomassa em solução de hipoclorito de sódio 100 ppm por 20 minutos, a fim de garantir que todos os experimentos fossem realizados com o mesmo tipo de amostra.

Após a sanitização com hipoclorito de sódio por 15 min, secou-se e fragmentou-se então a palha da cevada em um moinho de facas inox, da marca Poli®, metalúrgica Siemens Ltda, com capacidade pra 6 L, frequência de 60 Hz, durante 15 minutos, para diminuir a granulometria da fibra vegetal ao máximo possível, pois segundo Rabelo (2010), há significativa influência do tamanho da partícula da biomassa durante o pré-tratamento químico.

4.2.1 Determinação de Úmidade da Palha da Cevada

A palha da cevada foi previamente seca em estufa de esterilização e secagem – Odontobras Mod. El. 1.3 – com recirculação para a renovação de ar a 60 °C durante 24 horas; em seguida a palha foi totalmente seca com o auxílio da mesma a 105 °C até que a unidade de medida estabilizou-se. Após a secagem total foi calculado o teor de umidade por meio da Equação 2:

$$Umidade(\%) = \left(1 - \frac{m3 - m1 (biomassa\ seca)}{m2 - m1 (biomassa\ úmida)}\right) \times 100 \quad (2)$$

Em que:

m1: massa do cadinho vazio, em gramas;

m2: massa do cadinho + massa da biomassa úmida, em gramas;

m3: massa do cadinho + massa da biomassa seca, em gramas.

Armazenou-se a palha da cevada moída e seca em fracos com rosca que foram alocados em um dessecador fechado, onde ficaram acondicionados até o momento de sua utilização.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DA CEVADA

4.3.1 Determinação do Teor de Cinzas

O Método para a determinação do teor de cinzas foi baseado no procedimento padrão do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory) (SLUITER *et al.*, 2005a) com o objetivo de obter as quantidades de metais, estrutural ou extraível, da biomassa.

O método consiste na tomada de 1,00 ± 0,001 g da biomassa (palha de cevada) triturada em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. A análise foi realizada com a biomassa previamente seca (até atingir a massa constante).

As amostras contendo a palha de cevada seca foram carbonizadas em forno mufla da marca QUIMIS, modelo Q.318.21, à 800 °C por 20 minutos. Após este

período os cadinhos foram resfriados no interior de um dessecador contendo sílica gel por cerca de 1 h. Em seguida, com o auxílio de uma balança tomou-se a massa das cinzas e por meio da Equação 3, calculou-se o teor de cinzas;

$$\text{Teor de Cinzas}(\%) = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \times 100 \quad (3)$$

Em que:

m1: massa em gramas, do cadinho vazio previamente calcinado;

m2: massa do cadinho + massa da biomassa seca em estufa a 105 °C;

m3: massa em gramas do cadinho com as cinzas.

4.3.2 Preparo Para Determinação de Extrativos, Lignina Insolúvel e Carboidratos

A caracterização da palha da cevada foi feita com uma hidrólise em duas etapas. Primeiramente foram pesados 0,300 g de palha em base seca em tubos de ensaio, depois adicionados à esta matéria-prima 3 mL de ácido sulfúrico com concentração de 72 %. Os tubos vedados com Parafilm® foram então incubados em banho termostático a 30 °C por 1 hora e com auxílio de um bastão de vidro as amostras foram homogeneizadas em intervalos de 10 minutos. Ao término da hidrólise, todo conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para um frasco reagente de 250 mL com tampa e anel de vedação e foram adicionados 84 mL de água destilada para obter a concentração final de 4 %. Posteriormente, o sistema reacional foi fechado e levado à autoclave a 121 °C durante 1 hora. Depois desta hidrólise o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro qualitativo previamente tarado; uma alíquota do filtrado foi retirada para análises de compostos secundários, lignina insolúvel e carboidratos. (SLUITER *et al.*, 2008c, 2008d)

4.3.3 Determinação de Componentes Secundários

Determinaram-se os componentes secundários (extrativos) segundo o procedimento publicado pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – National Renewable Energy Laboratory) (SLUITER *et al.*, 2005b). O principal

objetivo foi quantificar os extrativos para a caracterização química da biomassa de cevada e remover o material não estrutural antes das quantificações da lignina e dos carboidratos para que não houvesse interferências. Adicionou-se, aproximadamente, 4,0 g de palha de cevada seca ao cartucho de extração que foi introduzido no tubo de extração do sistema Soxhlet. Adicionou-se 200 mL de água destilada no balão do extrator (da marca) que foram submetidos ao aquecimento até a ebulição. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor. Após a extração em água, as amostras foram submetidas à extração por etanol P.A. e submetidas ao aquecimento. Sendo mantida até desaparecimento total da coloração. Ao término da extração, os sólidos foram transferidos e lavados com 100 mL de etanol, filtrados a vácuo e secos em estufa a 105 °C até massa constante, determinada em balança analítica. Para o cálculo do teor de extrativos utilizou-se a Equação 4:

$$\text{Teor de Extrativos (\%)} = \left(\frac{m1 - m2}{m1} \right) \times 100 \quad (4)$$

Em que:

m1: massa em gramas da amostra descontando o teor de umidade;

m2: massa em gramas da amostra livre de extrativos.

4.3.4 Quantificação De Lignina Insolúvel

O corpo sólido retido no filtro foi submetido a lavagens sucessivas usando-se cerca de 1,5 L de água destilada e deionizada; em seguida o filtro foi seco em estufa a 105 °C, até atingir massa constante. A quantidade de lignina insolúvel foi calculada pela diferença entre a massa do resíduo insolúvel que permaneceu no papel filtro e o conteúdo de cinzas da biomassa. Posteriormente, os materiais (sólidos retidos em papel de filtro) foram calcinados em um forno mufla da marca QUIMIS, modelo Q.318.21, a 500 °C durante 1 hora e a 800 °C por mais 2 horas. (National Renewable Energy Laboratory - NREL). (SLUITER *et al.*, 2005b). A massa obtida após cada processo foi mensurada a partir de uma balança analítica. A fração de lignina insolúvel presente nos resíduos foi calculada a partir da Equação 5:

$$\text{Lignina Insolúvel (\%)} = \left(\frac{m1 - mpf}{m0} \times 100 \right) - \text{Cinzas (\%)} \quad (5)$$

Em que:

m1: massa em gramas do papel de filtro mais a lignina insolúvel após a secagem em estufa;

mpf: massa em gramas do papel de filtro seco;

m0: massa em gramas inicial da amostra de biomassa;

Cinzas : percentual de cinzas obtida na calcinação dos sólidos retidos + papel de filtro.

4.3.5 Quantificação de Lignina Solúvel

Para a quantificação de lignina solúvel, utilizou-se o método de Goldschimid (1971), já consolidado na literatura e amplamente aplicado, no qual se realiza uma varredura da absorbância de 280 nm a 210 nm. Gouveia *et al.* (2009) aplicou esta metodologia para caracterização de lignina solúvel, recolhendo-se uma amostra de 50,0 µL do licor hidrolisado e adicionand a um balão volumétrico de 50,0 mL completando o volume com água destilada e deionizada; realizou-se a medida de absorbância com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível da marca SHIMADZU, modelo UV. 1601PC, no comprimento de onda – λ – de 210 nm, garantindo a Lei de Lambert-Beer. A quantidade de lignina foi calculada por meio das Equações 6 e 7:

$$[C] \text{ lignina} = 4,187 \times 10^{-2} (AT - ApD) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (6)$$

Em que:

[C] lignina: concentração de lignina solúvel, em g/L;

AT: absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 210 - 280 nm;

ApD: $c1\epsilon1 + C2\epsilon2$ – absorbância, em um comprimento de onda de 210 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-HMF), cujas concentrações c1 e c2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia

líquida de alta eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 $\text{Lg}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

$$\text{Teor Lig. Solúvel (\%)} = \frac{CxLigxVfiltradoxFD}{Mbiomassa \text{ para caracterização}} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

V: filtrado: volume do hidrolisado filtrado, 0,087L;

FD: Fator de diluição para leitura da absorbância

M: Biomassa para caracterização: Massa utilizada para a caracterização (aproximadamente 0,3000 g).

4.3.6 Quantificação de Carboidratos

A quantificação de carboidratos foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) – na faculdade de engenharia química da Universidade de Campinas (FEQ – Unicamp) em um cromatográfico líquido de alta eficiência (HPLC), da marca Thermo Scientific, Modelo: Dionex Ultimate 3000, módulo de bomba: LPG -3400SD. Uma alíquota de 20,0 μL da amostra foi injetada pelo módulo de Injetor: WPS – 3000TSL. Detector de índice de Refração: RI-101 (Shodex) e software: Chromeleon 6.80. A coluna cromatográfica: Marca: Bio-Rad, do modelo: Aminex HPX-87H, dimensões: 7,8 x 300mm. Banho ultrassônico: Marca Ecos-sonic, modelo: Q13/40kHz e centrífuga de bancada: Marca: Centurion, Modelo: K241R Series.

As concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose foram determinadas por meio de comparação as curvas analíticas obtidas por padrões. (GOUVEIA; NASCIMENTO; SOUTO-MAIOR,2009) A curva foi construída utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas obtidas após a injeção no cromatógrafo. Com os resultados apresentados viabilizaram-se os cálculos das concentrações de açúcares por meio da área obtida no cromatograma.

Para o cálculo das concentrações de açúcares, utilizou-se a equação 8:

$$\text{Açúcares (\%)} = \left(\frac{\text{CCLAExCAxVfiltrado}}{\text{M1}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Em que:

CCLAE: concentração do açúcar quantificador por CLAE, em g/L;

CA: concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a glicose, xilose tem-se: 0,90 e 0,88 respectivamente;

V filtrado: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L;

M1: massa da biomassa utilizada na hidrólise descontando o teor de umidade, em gramas.

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DO PRÉ-TRATAMENTO

Para este trabalho, utilizou-se o software STATISTICA® versão 5.0, para o planejamento experimental do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) para duas variáveis, sendo um planejamento fatorial 2^2 , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando assim 11 experimentos. Tal planejamento foi selecionado mediante a definição de dois fatores experimentais (concentração da solução de ácido sulfúrico e massa de palha de cevada), tendo como variável resposta a concentração de glicose liberados em solução e a concentração de sólidos solúveis liberados e solução ($^{\circ}\text{Bx}$). De forma similar, o mesmo planejamento experimental foi feito por Schultz *et al.* (2014) com o objetivo de otimizar o pré-tratamento ácido, mas dessa vez com bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentescíveis, onde havia como fatores a concentração de ácido sulfúrico (%) e o tempo de pré-tratamento em minutos; a variável resposta era a concentração de glicose (g/L) liberados em solução. Segundo Rodrigues e lemma (2009) um DCCR com 2 fatores, 3 repetições no ponto central e 4 pontos axiais é capaz de fornecer informações adequadas.

A matriz de interação entre os fatores codificados e os valores reais são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Matriz de planejamento contendo valores codificados e reais

Experimentos	Valores Codificados		Valores Reais	
	[H ₂ SO ₄]	Massa Cevada	[H ₂ SO ₄] (%)	Massa Cevada (m/v)
1	-1,00	-1,00	0,86	7,18
2	Extremidades	-1,00	1,00	0,86
3		1,00	-1,00	2,63
4		1,00	1,00	2,63
5		-1,41	0,00	0,50
6	Fatoriais	1,41	0,00	3,00
7		0,00	-1,41	1,75
8		0,00	1,41	1,75
9		0,00	0,00	1,75
10	Centrais	0,00	0,00	1,75
11		0,00	0,00	1,75

Fonte: Do autor.

A tabela 5 apresenta os valores codificados e reais das variáveis utilizadas nesse trabalho. Variou-se a concentração de ácido sulfúrico de 0,5 % a 3,0 % em massa com uma carga de sólidos de palha de cevada, variou-se a massa de 5 a 20 gramas em 100 ml de solução, mantendo-se a temperatura fixa em 121 °C, a pressão em 1 Kgf/cm² e tempo de permanência na autoclave de 40 minutos.

4.5 PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO

Inicialmente, tomaram-se as respectivas massas 5,00 g, 10,00 g, 15,00 g, 20,00 g das amostras de palha de cevada previamente trituradas. Em seguida transferiram-se as amostras para frascos do tipo *Scott Duran* de 250 mL, no qual se adicionou 100 mL de solução de ácido sulfúrico nas concentrações: 0,5 %, 0,8 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 % e 2,5 % (m/v). Alocaram-se as amostras em uma autoclave vertical da marca BIOENG, modelo A50, a 120 °C com pressão de 1,0 Kgf/cm² pelo tempo de 40 min. Ao término do pré-tratamento, inseriram-se os frascos em banho refrigerado contendo água e gelo para cessar a reação. Filtrou-se a mistura à vácuo, lavando-se a palha com 60 mL de água destilada para a remoção dos ARTs

remanescentes no sólido. Realizou-se análise de glicose no licor em triplicata a partir da curva padrão de glicose fundamenta pelo método colorimétrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) proposto por Miller (1959).

4.6 CURVA PADRÃO DE GLICOSE

Preparou-se a solução padrão de D-glicose a partir de 0,1000 g de sólido em um béquer, em seguida dissolveu-se a D-glicose em 20,0 ml de água destilada e deionizada em constante agitação. Transferiu-se o conteúdo do béquer para um balão volumétrico de 100,0 ml completou-se o volume com água destilada até o menisco e homogeneizou-se a mistura.

O preparo do agente redutor DNS foi efetuado pela diluição de 10,7 g de ácido dinitrosalicílico e 19,9 g de NaOH em 1420 ml de água destilada. Em seguida adicionou-se 7,4 ml de fenol fundido a 50 °C e 8,5 g de metabissulfito de sódio. Homogeneizou-se e armazenou-se a solução em frasco âmbar envolvido em papel alumínio para proteger da foto decomposição em um freezer vertical com temperatura de aproximadamente 4 °C.

A solução de tartarato duplo de sódio e potássio foi preparada com 15,1 g do sal, transferiu-se para um balão volumétrico de 1,00 L e avolumou-se a solução com água destilada.

A partir da solução padrão de glicose 1,0 g/L foram preparadas as seguintes diluições: 0,10 g/L, 0,20 g/L, 0,40 g/L, 0,60 g/L, 0,70 g/L, 0,80 g/L e 0,90 g/L.

- a) Separaram-se tubos de ensaio, numerando-os de acordo com as diluições;
- b) Pipetou-se uma alíquota de 1,0 ml de cada padrão de glicose e transferiu-se para cada tubo previamente identificado;
- c) Adicionou-se com o auxílio de pipetas volumétricas 1,0 ml de reagente DNS;
- d) Agitaram-se os tubos e aqueceu-se em banho-maria durante 5 minutos a temperatura de 100 °C;
- e) Após o tempo os tubos foram resfriados num banho de água fria;
- f) Adicionou-se 16,0 ml da solução de tartarato duplo sódio e potássio;

g) Com o auxílio de uma cubeta de plástico realizaram-se as leituras de cada solução em espectrofotômetro previamente zerado com um branco, no comprimento de onda de 540 nm em absorbância.

O mesmo procedimento foi utilizado para o branco, utilizou-se 1,0 ml de água destilada como amostra no lugar da solução padrão de glicose.

As amostras hidrolisadas foram diluídas em um balão volumétrico de 50,0 ml, transferiu-se 1,0 ml da amostra e completou-se o volume com água destilada.

Em seguida foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a construção da curva padrão. O resultado obtido após a substituição da absorbância na equação da reta foi multiplicado pelo fator de diluição 50 obtendo-se a concentração de açúcares redutores totais.

Para a quantificação dos ART, utilizou-se o método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS) descrito por MILLER (1959). Para isso, foi necessário construir uma curva-padrão de glicose (Apêndice A) com concentrações variando de 0,1 a 1,00 g.L⁻¹. Quando necessário, foram efetuadas diluições das amostras de modo que a absorbância obtida estivesse contida no intervalo da curva-padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE CEVADA

Para a caracterização do tamanho da fibra fragmentada, utilizou-se o método de distribuição granulométrica. (CREMASCO, 2012) Peneirou-se em um agitador eletromagnético de peneiras, da marca A BRONZINOX modelo ABME 0800, com a massa de 102,48 gramas de palha fragmentada, durante 20 minutos na frequência de 5 Hz. Na Tabela 6 constam os dados de distribuição granulométrica da fibra.

Tabela 6 - Distribuição granulométrica da palha de cevada fragmentada

	DA (μm)	mi (g)	Mi(g)	Xi(%)	Ci(%)
1	1000	9,850	9,850	9,612	9,612
2	600	14,780	24,630	14,422	24,034
3	355	15,490	40,120	15,115	39,149
4	212	31,820	71,940	31,050	70,199
5	125	23,570	95,510	23,000	93,199
6	75	6,400	101,910	6,245	99,444
7	45	0,570	102,480	0,556	100,000
8	25	0,000	102,480	0,000	100,000
9	< 25 (fundo)	0,000	102,480	0,000	100,000

Fonte: Do autor.

Em que:

DA: É o diâmetro de abertura de cada peneira;

mi: É a massa de cada material retido;

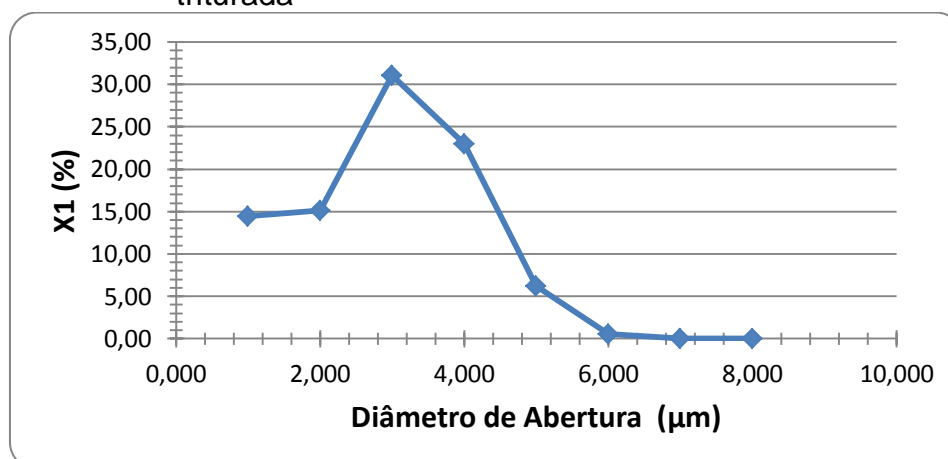
Mi: É massa cumulativa de material retido;

Xi: É a porcentagem de material retido em cada peneira;

Ci: É massa cumulativa percentual de cada material retido.

Constatou-se com a análise granulométrica uma maior concentração percentual do material particulado nas faixas de 600 a 125 μm de diâmetro, conforme representado na Figura 13.

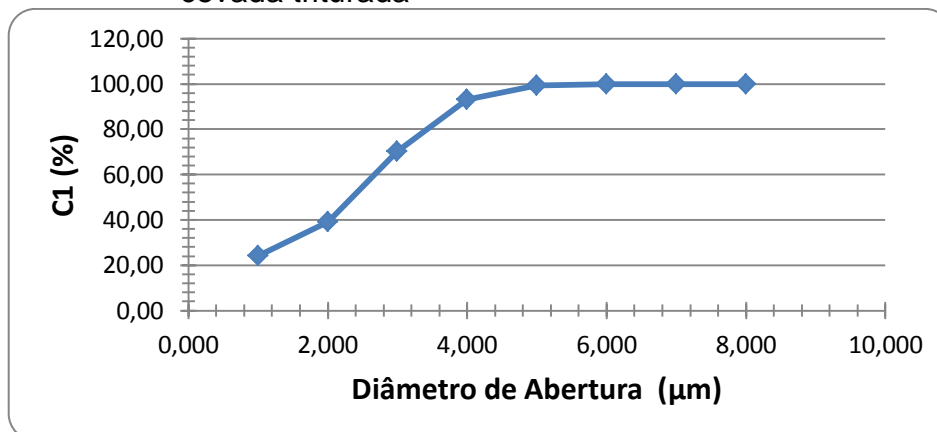
Figura 13 - Gráfico da distribuição granulométrica da palha da cevada triturada



Fonte: Do autor.

Através da Figura 14, é possível observar uma faixa de distribuição crescente de acumulo de material, bem como a quantidade mínima de partículas retidas no diâmetro de 1,000 μm.

Figura 14 - Gráfico da distribuição granulométrica cumulativa da palha da cevada triturada



Fonte: Do autor.

Observou-se através da análise granulométrica que, cerca de 70% das partículas lignocelulósicas estão retidas entre 355-125 μm, demonstrando assim, partículas diminutas, com grande superfície de contato e de fácil penetrabilidade, endossando assim a utilização de ácido diluído. (CREMASCO, 2012)

Em seguida secou-se em estufa a matéria-prima a ser utilizada nos experimentos do presente trabalho, de modo que sua umidade final que se fazia presente não fosse suficiente para o desenvolvimento de fungos e bolores,

garantindo assim melhor conservação e estoque por um maior período de tempo. A umidade residual final média da palha utilizada foi de 8,19 %, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Umidade residual da palha da cevada após secagem.

Amostras n°	Umidade (%)
1	8,24
2	7,94
3	8,39
Média ±SD	8,19 % ± 0,18
Coefficiente de Variação (%)	2,17

Fonte: Do autor.

Com o coeficiente de variação (%) 2,17 de umidade, das amostras, demonstrando proximidade e confiabilidade nos resultados obtidos.

A palha de cevada utilizada no presente trabalho apresentou uma composição de celulose, hemiceluloses, lignina e cinzas iguais a 37,45 %; 20,31 %; 18,85 % e 8,45 % respectivamente. Esta composição se aproximou dos valores apresentados pelos diversos autores na Tabela 9. Quanto ao teor de celulose, hemiceluloses (polímero de principal interesse em processos de bioconversão de xilose à xilitol), lignina e cinzas. A Tabela 8 demonstra que os teores de celulose, hemiceluloses e lignina da palha de cevada se diferem dos teores das demais matérias-primas.

Tabela 8 - Caracterização química da palha da cevada.

Componente	(m/m (%) ± SD)
Celulose	37,45 ± 3,18
Hemiceluloses	20,31 ± 2,61
Lignina	18,85 ± 1,78
Cinzas	8,45 ± 1,57

Fonte: Do autor.

Observou-se na Tabela 8 que os polímeros naturais que liberaram açúcares fermentescíveis após as hidrólises, compõem cerca de 60% da massa bruta da matéria-prima. Na Tabela 9 efetuou-se um comparativo entre a composição da palha da cevada *in natura* utilizado nesse trabalho, com outras matérias primas. A concentração dos componentes químicos estruturais de vegetais sofrem variações de acordo com a região de plantio, clima, umidade, limitação de água e nutrientes pelo solo, idade do vegetal, entre outros (LYND; ELANDER; WYWAN, 1996).

Tabela 9 - Composição química de diferentes matérias-primas.

Matéria-Prima	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referências
Palha de Arroz	43,50	22,01	17,20	11,40	MUSSATTO (2002)
Palha de Cana	35,42	25,02	22,57	5,83	RUBIO MATTOS <i>et al.</i> (2002)
Resíduo de Eucalipto	40,20	15,67	26,90	1,41	CANETTIERI <i>et al.</i> (2002)
Casca de Café	39,91	14,40	28,06	6,80	CARVALHO <i>et al.</i> (2004)
Palha de Trigo	33,81	31,83	20,12	8,02	CÂNDIDO <i>et al.</i> (2003)
Palha de Cevada	37,45	20,31	18,85	8,45	Presente trabalho

Fonte: Do autor.

Observou-se na Tabela 9 que devido a composição química da palha de cevada *in natura*, em comparação aos demais resíduos encontrados como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e casca de aveia, estes que vêm sendo amplamente empregados como matéria-prima para a produção biotecnológica de diversos produtos orgânicos, como o xilitol. Porém, a palha de cevada possui teor de hemiceluloses superior aos resíduos de eucalipto e casca de café, então é possível a obtenção de um hidrolisado desta matéria-prima com maior teor de xilose em condições de hidrólise menos drástica tendo assim um produto com menor teor de inibidores, como o furfural. (SCHULTZ, 2014)

5.2 OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DA PALHA DA CEVADA

5.2.1 Análise de Sólidos Solúveis

Avaliou-se em cada condição do planejamento experimental, as concentrações de sólidos solúveis liberados durante o pré-tratamento. Os resultados obtidos (Tabela 10) demonstram que na concentração de 2,63 % de ácido sulfúrico e massa de cevada de 7,18 gramas de palha de cevada, em um tempo de 40 minutos

em autoclave, foram liberados 3,58 °Bx de sólidos solúveis em solução. No pré-tratamento com ácido diluído é obtido uma fração líquida rica em hemiceluloses removidas da matriz celulósica fibrosa da biomassa, e uma fração sólida constituída por lignina, além da celulose que será quebrada em glicose na etapa de hidrólise. A menor concentração de sólidos solúveis foi obtida na condição de 0,5 % de ácido sulfúrico e em massa de 12,5 gramas de palha, o que revela a necessidade no aumento da concentração do ácido para promover a solubilização das hemiceluloses, abrindo as fibras e garantir o tratamento adequado da palha da cevada para a etapa de hidrólise, como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Análise de sólidos Solúveis

Experimento	[H ₂ SO ₄] (%)	Massa de Cevada (g)	Sólidos Solúveis (°Bx)
1	0,86	7,18	1,38
2	2,63	7,18	3,58
3	0,86	17,82	1,58
4	2,63	17,82	3,18
5	0,5	12,50	0,28
6	3,00	12,50	2,58
7	1,75	5,00	2,48
8	1,75	20,00	2,48
9	1,75	12,50	2,58
10	1,75	12,50	2,68
11	1,75	12,50	2,58

Fonte: Do autor.

Embasado no teste de Shapiro Wilk ratificou-se a normalidade dos dados (concentrações em °Bx), onde foi obtido um W calculado de 0,88771 e $p = 0,13018$, sendo maior que o W tabelado de 0,85 para um conjunto de dados de onze amostras, realizados no Software Statistica® 5,0.

Realizando-se as análises estatísticas observa-se que apenas as concentrações linear e quadrática de ácido sulfúrico foram estatisticamente significativas para o intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) para a variável reposta sólidos solúveis (°Bx) (Tabela 11).

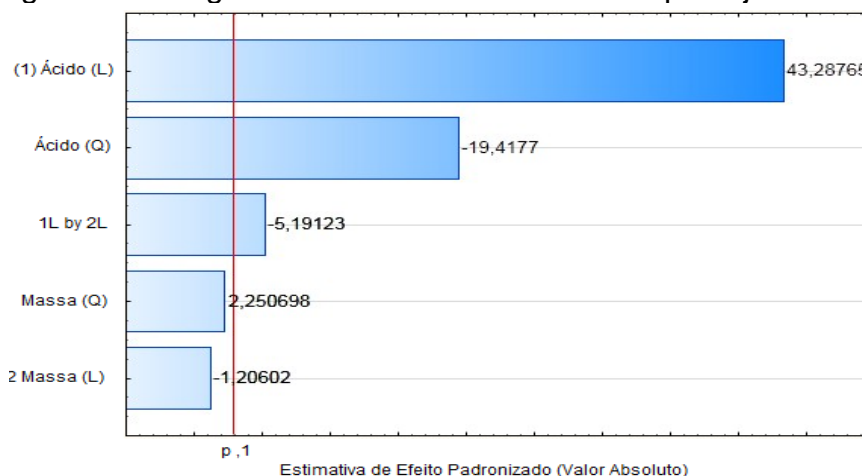
Tabela 11 - Coeficientes da variável sólidos solúveis.

	Coeficiente Regressão	Erro Padrão	t(5)	p - Valor	(-95%) coef.limt	(95%) coef.Limt.
Média	-1,30573	0,217006	-6,0170	0,026527	-1,93938	-0,672074
Acido (%) L	3,50204	0,134861	25,9678	0,001480	3,10825	3,895828
Acido (%) Q	-0,60318	0,031064	-19,4177	0,002642	-0,69389	-0,512478
Massa (g)L	0,00239	0,024378	0,0979	0,930948	-0,06880	0,073571
Massa (g)Q	0,00194	0,000862	2,2507	0,153277	-0,00058	0,004459
1L by 2L	-0,03183	0,006131	-5,1912	0,035162	-0,04973	-0,013926

Fonte: Do autor.

A partir do diagrama de Pareto foi possível avaliar as variáveis que apresentaram o maior efeito na concentração de sólidos solúveis figura 15.

Figura 15 - Diagrama de Pareto dos fatores do planejamento experimental



Fonte: Do Autor.

Observa-se que os termos linear e quadrático de concentração do ácido sulfúrico é a variável com maior efeito nas respostas do planejamento experimental, seguido da concentração quadrática de ácido sulfúrico. Nota-se também que as concentrações de massa no pré-tratamento linear e quadrático, não apresentaram efeitos significativos na variável resposta. Desta forma para a construção da tabela de análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, obtenção de um modelo matemático, as concentrações de massas lineares e quadráticas e a interação linear entre concentração de ácido sulfúrico e massa de pré-tratamento (1L by 2L), foram

excluídos da regressão e adicionados aos resíduos, pelo fato de não serem significantivos pela análise do p-valor.

Foi construída a Tabela 12 (ANOVA) que permite o cálculo dos efeitos com as variáveis significativas; e os resíduos com as variáveis não significativas. Observou-se que o coeficiente de determinação (R^2), obtido foi de 99,65 % e o F calculado (R,r) é 48,43 vezes maior que o F tabelado, sendo o modelo proposto significativo como visto na Tabela 12. Assim, é possível a construção da superfície de resposta e uma curva de contorno para análise.

Tabela 12 - ANOVA °Bx.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F- Calculado	p-Valor
Regressão (R)	8,273418	6,0	1,378903	194,208951	0,000143
Resíduos (r)	0,028400	4,0	0,007100		
Falta de Ajuste	0,501552	3,0	0,167184		
Erro Puro	0,006667	2,0	0,003333		
Total	8,301818	10,0	0,830182		
R^2	99,657901				
F tab. (R,r)	4,01				
Relação (R,r)	48,431160				

Fonte: Do autor.

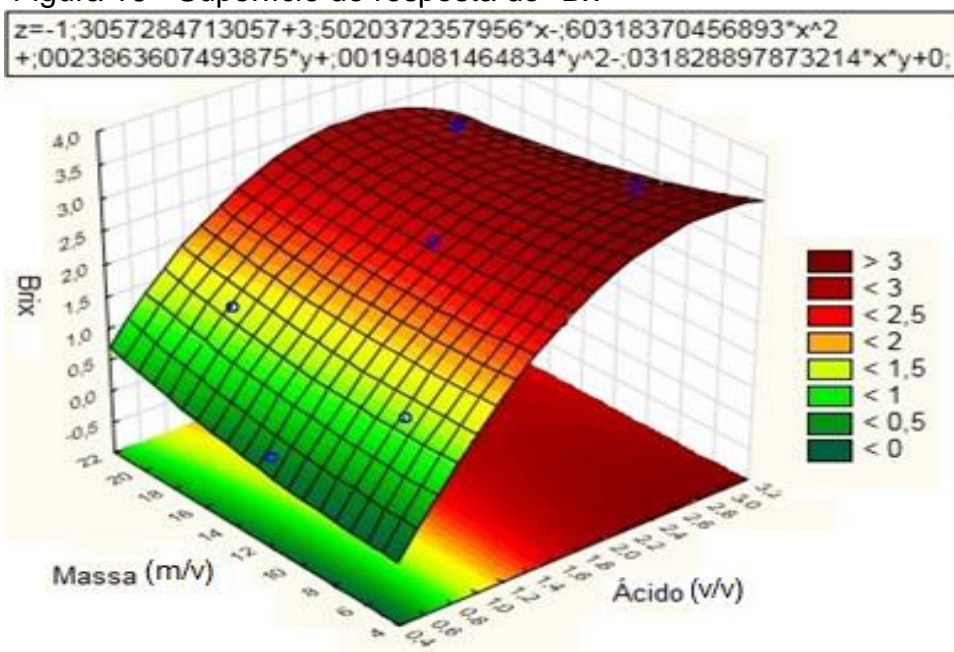
Assim pode-se obter a superfície de resposta e a curva de contorno com a otimização do processo, em que é possível verificar que a condição experimental de ácido sulfúrico a 2% e massa de 15 gramas no pré-tratamento também está dentro da faixa de rendimento otimizada, assim como verificado com a variável resposta glicose grau Brix, como mostrado na Figura 16 e Figura 17. A Equação 9 descreve a variável resposta obtida pelo modelo.

$$^{\circ}Bx = 1,305 + 3,502 * C - 0,603 * C^2 + 0,0238 * M + 0,0194 * M^2 \quad (9)$$

Em que:

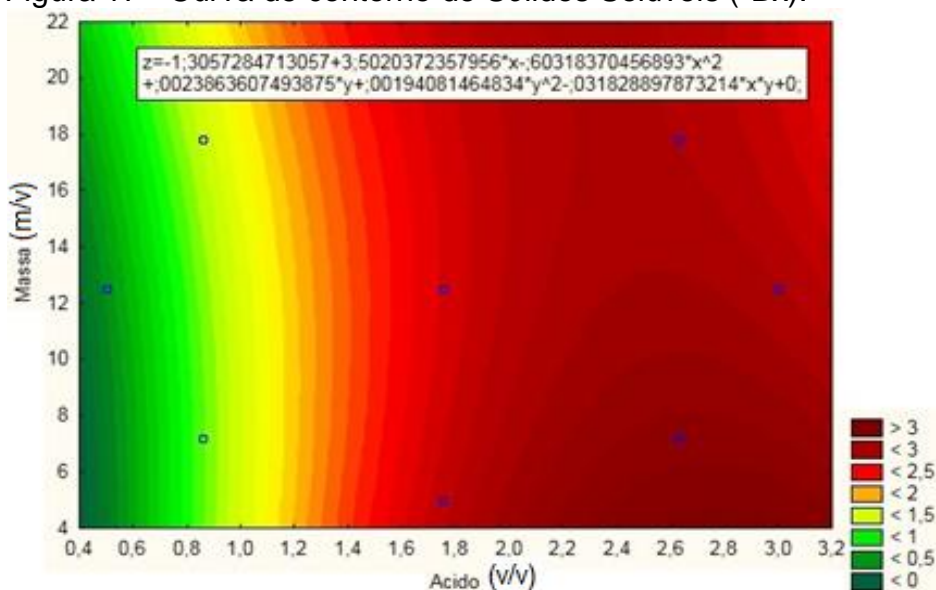
C: concentração de ácido sulfúrico, em % em massa.

Figura 16 - Superfície de resposta do °Bx



Fonte: Do autor.

Figura 17 - Curva de contorno de Sólidos Solúveis (°Bx).



Fonte: Do autor.

5.3 GLICOSE LIBERADA NO O PRÉ-TRATAMENTO

O planejamento experimental foi executado para a otimização do pré-tratamento, as análises de glicose liberada em cada condição foram realizadas em triplicatas, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise de glicose liberada no pré-tratamento ácido.

Experimento	Absorbância (540 nm)			Média ± SD	Coefficiente de Variação (%)
1	0,017	0,015	0,016	0,016 ± 0,0008	5,17
2	0,049	0,048	0,049	0,048 ± 0,0047	0,97
3	0,029	0,028	0,031	0,029 ± 0,0012	4,28
4	0,053	0,048	0,053	0,051 ± 0,0023	4,61
5	0,001	0,001	0,001	0,001 ± 0,0000	0,00
6	0,048	0,055	0,053	0,052 ± 0,0029	5,68
7	0,026	0,024	0,025	0,025 ± 0,0008	3,29
8	0,046	0,048	0,049	0,047 ± 0,0012	2,63
9	0,051	0,050	0,053	0,051 ± 0,0012	2,44
10	0,056	0,047	0,048	0,050 ± 0,0040	8,03
11	0,050	0,048	0,055	0,051 ± 0,0029	5,80

Fonte: Do Autor

Analisando-se os resultados da Tabela 13, nota-se que a dispersão entre as repetições nas análises de glicose foram baixas, inferiores a um coeficiente de variação de 10%.

O desvio padrão amostral (S) foi calculado pela Equação 10:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (10)$$

Em que:

X_i cada amostra, \bar{X} a média aritmética simples e n o número de amostras avaliadas.

O coeficiente de variação (CV %) foi calculado pela Equação 11:

$$CV\% = \left(\frac{S}{\bar{X}}\right) 100 \quad (11)$$

Em que:

S o desvio padrão amostral e \bar{X} a média aritmética simples das amostras avaliadas.

Dados os valores experimentais de absorbância média de cada condição do planejamento experimental, calculou-se a concentração de glicose utilizando-se a equação obtida anteriormente ($[Glicose] \text{ (g/L)} = 2,2545 \times Abs + 0,0441$) multiplicando pelo fator de diluição (x50). A concentração de glicose em g/L foi multiplicada pelo

volume em L de licor recuperado após a filtração em filtro de tecido de algodão da separação da fração sólida. A Tabela 14 demonstra os valores de concentração da glicose liberada no pré-tratamento ácido.

Tabela 14 - Análise de glicose liberada no pré-tratamento ácido

Experimentos	[H ₂ SO ₄] (%)	Massa de Cevada (g)	Concentração de glicose liberada (g/L)	Glicose (g)
1	0,86	7,18	4,01	0,373
2	2,63	7,18	7,62	0,746
3	0,86	17,82	5,47	0,509
4	2,63	17,82	7,95	0,827
5	0,5	12,50	2,32	0,243
6	3,00	12,50	8,07	0,774
7	1,75	5,00	5,02	0,492
8	1,75	20,00	7,50	0,713
9	1,75	12,50	7,95	0,819
10	1,75	12,50	7,84	0,808
11	1,75	12,50	7,95	0,819

Fonte: Do autor.

A massa de glicose obtida foi dividida pela massa inicial de palha de cevada. Assim, obteve-se uma relação entre a massa de glicose liberada no licor por massa de palha de cevada alimentada. Os resultados são apresentados na Tabela 15. Observou-se que a maior concentração de glicose foi obtida na condição de pré-tratamento na qual se combinou uma concentração de ácido sulfúrico de 2,63 % com massa de palha de cevada de 7,18 g (ensaio 2). Porém, devido à maior recuperação de licor nos experimentos com as condições centrais do planejamento experimental, a maior relação de massa de glicose por massa de palha de cevada foi obtida na condição de ácido sulfúrico a 1,75 % com massa de 12,5 g (ensaios 9, 10 e 11).

Tabela 15 - Variável resposta massa Glicose (g) / Palha de cevada (g)

Experimento	Média da Absorbância (nm)	Glicose (g/L)	Volume Licor (L)	Glicose (g)	Massa da Palha (g)	Glicose (g) / Palha (g)
1	0,016	4,01	0,093	0,373	7,18	0,0519
2	0,048	7,62	0,098	0,746	7,18	0,1039
3	0,029	5,47	0,093	0,509	17,82	0,0286
4	0,083	7,95	0,104	0,827	17,82	0,0675
5	0,001	2,32	0,105	0,243	12,50	0,0195
6	0,052	8,07	0,096	0,774	12,50	0,0620
7	0,025	5,02	0,098	0,492	5,00	0,0985
8	0,047	7,50	0,095	0,713	20,00	0,0356
9 (C)*	0,063	7,95	0,103	0,819	12,50	0,0767
10 (C)	0,062	7,84	0,103	0,808	12,50	0,0758
11 (C)	0,063	7,95	0,103	0,819	12,50	0,0767

Fonte: Do Autor.

Os resultados obtidos foram avaliados através do teste de Shapiro Wilk afim de confirmar a distribuição normal dos dados, para que posteriormente fossem feitas as análises estatísticas para a otimização do pré-tratamento. Com o teste de Shapiro Wilk, a normalidade dos dados foi ratificada, pois, obteve-se um W calculado de 0,95404 sendo maior que o W tabelado de 0,85 para um conjunto de dados de onze amostras.

Realizando-se as análises estatísticas observa-se que a concentração de ácido sulfúrico, linear e quadrática, o tempo de pré-tratamento em autoclave, linear e quadrático, foram significativos para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para a variável reposta g glicose/g palha (Tabela 16).

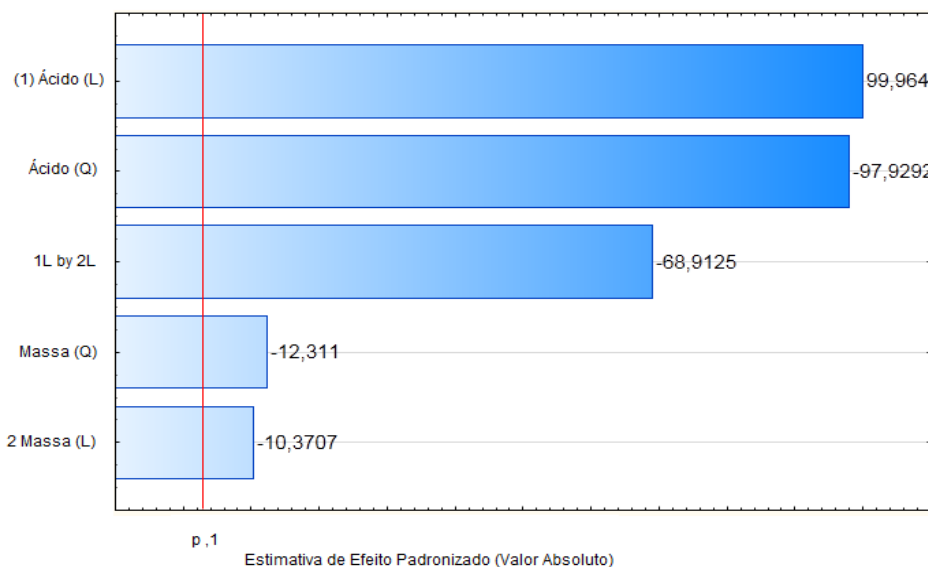
Tabela 16 - Coeficientes da variável Glicose (g) / Palha de cevada (g).

Fatores	Coeficiente Regressão	Erro Padrão	t(5)	p – Valor	(-95%) coef.limt	(95%) coef.Limt.
Média	0,076272	0,000310	246,3444	0,000016	0,075368	0,077176
Acido (%) L	0,037931	0,000379	99,9642	0,000100	0,036823	0,039039
Acido (%) Q	-0,031147	0,000452	-68,9125	0,000211	-0,032467	-0,029827
Massa (g)L	-0,037194	0,000380	-97,9292	0,000104	-0,038303	-0,036085
Massa (g)Q	-0,004702	0,000453	-10,3707	0,009170	-0,006026	-0,003378
1L by 2L	-0,006602	0,000536	-12,3110	0,006533	-0,008168	-0,005036

Fonte: Do autor.

A partir do diagrama de Pareto foi possível avaliar as variáveis que apresentaram o maior efeito na variável g glicose/ g palha de cevada, como ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Diagrama de Pareto da variável glicose (g)/ palha de cevada (g)



Fonte: Do autor.

Observou-se que a concentração linear (L) de ácido sulfúrico é a variável com maior efeito nas respostas do planejamento experimental. Observou-se também que a concentração de ácido sulfúrico quadrático, além da Massa de cevada linear (L), também apresentaram efeitos significativos na variável resposta. Deste modo, para a construção da ANOVA e posteriormente obtenção de um modelo matemático, a interação linear entre concentração de ácido sulfúrico e a massa de cevada (1Lby2L) e a Massa (Q) foram excluídas da regressão e adicionadas aos resíduos, pelo fato de não ser significativa pela análise do p-valor.

Construiu-se a tabela da ANOVA que permite o cálculo dos efeitos com as variáveis significativas; e os resíduos com as variáveis não significativas. Observou-se que o R^2 obtido foi de 99,99 % e o F calculado (R,r) é 345,22 vezes maior que o F tabelado, vide Tabela 17. Assim, é possível a construção da superfície para análise estatística.

Tabela 17 - ANOVA da variável Glicose (g) / Palha de cevada (g)

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F- Calculado	p-Valor
Regressão (R)	0,00744233	8,0	0,00093029	3234,78427507	0,00034
Resíduos (r)	0,00000058	2,0	0,00000029		
Falta de ajuste (fa)	0,00039068	3,0	0,00013023		
Erro Puro (ep)	0,00000058	2,0	0,00000029		
Total	0,00744291	10,0	0,00074429		
R ²	99,992272				
F tab. (R,r)	9,370000				
Relação (R,r)	345,227777				

Fonte: Do autor.

Assim, pode-se obter-se a superfície de resposta com a otimização do processo, onde é possível verificar que a melhor condição experimental é de ácido sulfúrico a 2,63% e a massa de palha de cevada de 7g, como demonstrado na Figura 19 e 20. A Equação 12 descreve a variável repostada obtida pelo modelo.

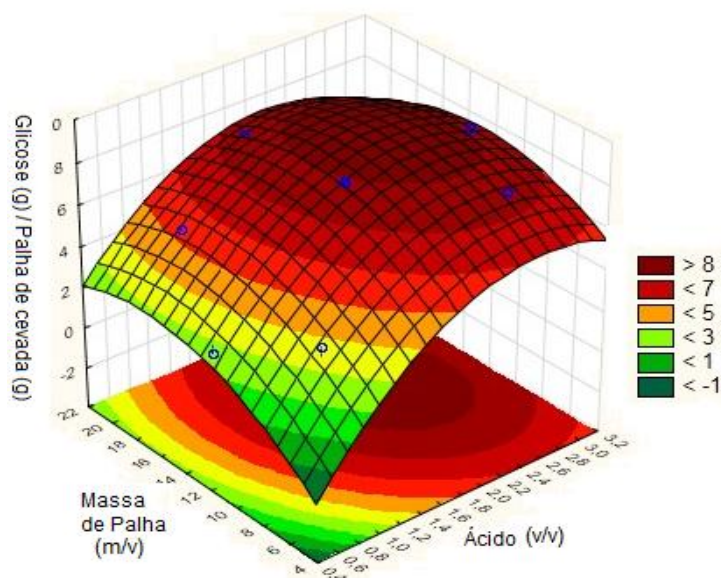
$$\text{Glicose (g/L)} = -0,0408 + 0,1203 \cdot C + (-0,2581 \cdot C^2 + 0,0392 \cdot M + (-0,000247 \cdot M^2)) \quad (12)$$

Em que:

C: concentração de ácido sulfúrico, em % em massa;

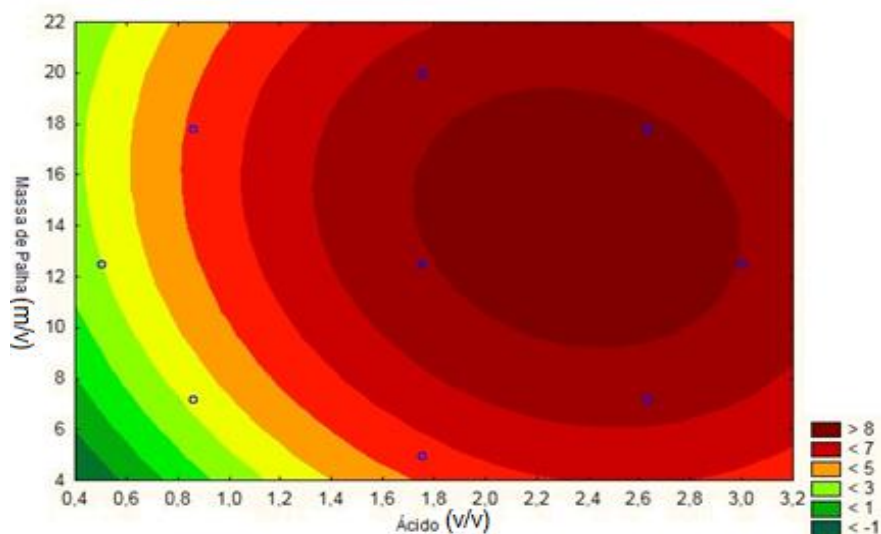
M: massa, em gramas.

Figura 19 - Superfície de resposta da variável glicose (g) / palha de cevada(g)



Fonte: Do autor.

Figura 20 - Curva de contorno da variável glicose (g) / palha de cevada(g)



Fonte: Do autor.

Em 2014, Schultz *et al.* realizou um planejamento experimental semelhante ao deste trabalho, porém com o diferencial de biomassa para a otimização do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com uma carga de sólidos de 1:10. Realizando a hidrólise enzimática em todos os sólidos pré-tratados, fixando uma carga enzimática de Cellic® CTec3 (Novozymes) em 15 FPU/g de biomassa, a 50 °C durante 48h, foi verificado que a condição ótima de pré-tratamento para o bagaço da cana-de-açúcar foi a condição onde utilizou-se ácido sulfúrico a 1,5 % com um tempo de autoclave de 56 min. Tais condições otimizadas são semelhantes às obtidas neste trabalho, com diferencial do material de palha de cevada, sendo uma concentração de ácido sulfúrico a 2,6 % e massa de 7g com tempo de pré-tratamento de 40 min em autoclave. Tal fato pode ser atribuído a semelhança quantitativa entre os componentes estruturais de ambas as biomassas.

5.4 VALIDAÇÃO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NO PONTO CENTRAL

A validação da eficácia do modelo proposto pelo planejamento experimental realizado, partiu-se assim para um pré-tratamento na condição ótima fornecida pela superfície de resposta: ácido sulfúrico a 2,6 % e massa de 7 g de palha de cevada. Os resultados obtidos nas análises de glicose do licor do pré-tratamento da condição central como visto na tabela 18 revelaram uma absorbância média de $0,063 \pm \text{SD } 0,0005$ com um coeficiente de variação de 0,75 %.

Tabela 18 - Análise de glicose no ponto central medido em $\lambda = 540$ nm

Experimento	Média Absorbância (nm)			Média \pm SD	Coefficiente de variação (%)
Ponto central	0,063	0,062	0,063	0,063 \pm 0,0005	0,75

Fonte: Do autor.

*Ponto central: [H₂SO₄] de 2,6% e Massa de 7g.

Utilizando a absorbância média obtida do licor da condição central fornecida pela superfície de resposta, foi calculado o rendimento de glicose (g) / palha de cevada (g) de acordo com a metodologia descrita no item 8.2 (glicose liberada no pré-tratamento). Observou-se a liberação de 0,137 glicose(g) / palha(g), sendo uma concentração aproximadamente de 90% do esperado (\approx 0,14 glicose(g) / palha(g)) de acordo com a superfície de resposta gerada pelo modelo como demonstrado na Tabela 19.

Tabela 19 - Rendimento de glicose no ponto central

Experimento	Média da Absorbância	Glicose (g/L)	Vol. De Licor (L)	Glicose (g)	Glicos e (g) / Palha (g)
Ponto central	0,063	9,31	0,103	0,959	0,137

Fonte: Do autor.

*Ponto central: [H₂SO₄] 2,6% e massa de 7g.

Com relação à segunda variável resposta: concentração de sólidos solúveis, grau Brix ($^{\circ}$ Bx) do licor do pré-tratamento, foi obtido, uma concentração de 2,61 $^{\circ}$ Bx na condição ótima de ácido sulfúrico a 2,3 % com massa palha de cevada de 7g e tempo de 40 min, sendo também um resultado satisfatório, pois a concentração estimada pelo modelo era 3 $^{\circ}$ Bx.

Com o objetivo de ratificar a qualidade e validade das informações fornecidas por ambos os planejamentos experimentais, avaliou-se isoladamente a influência da massa no pré-tratamento nas duas variáveis respostas deste trabalho: massa de glicose por grama de palha de cevada e liberação de sólidos solúveis em $^{\circ}$ Bx. Para a realização deste teste, fixou-se a concentração da solução de ácido sulfúrico em 2,3 % (m/V), que é a concentração ótima verificada nos dois planejamentos experimentais, e variou-se a massa de pré-tratamento no intervalo de -1 até +1 do planejamento experimental, ou seja, testou-se as massas: 7,18; 12,5 e 17,82 gramas de cevada.

5.5 TESTE DE HIDRÓLISE EM BIORREATOR

Para a realização dos experimentos de hidrólise ácida no biorreator, foram utilizados como base os resultados em escala de laboratorial. Utilizaram-se concentrações de ácido sulfúrico na ordem de 2,6 % (v/v) e massa de 7g / 100 ml. Sendo o volume total do vaso reacional de 13,5 L e o volume útil de trabalho é de 10,8 L, os testes e leituras foram realizados em triplicata. Na Tabela 20 são apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados em biorreator.

Tabela 20 - Testes em biorreator laboratorial – Glicose (g) / Palha (g)

Massa cevada (g)	[H₂SO₄] (%)	Média da Abs. (nm)	Glicose (g/l)	Glicose (g)	Glicose(g) / Palha (g)
756,6	2,6	0,053	8,179	81,794	0,108

Fonte: Do autor.

Obtiveram-se resultados de relação Glicose (g) / Palha (g) de 0,108, no reator similares aos experimentos em escala de bancada, com valor de 0,137, comprovando que a agitação mecânica em vaso reacional aumenta a eficiência da hidrólise por promover maior contato das fibras com ácido.

Comparando-se os dados obtidos sobre as concentrações de açúcares através das duas metodologias diferentes, construiu-se a Tabela 21, que demonstra as concentrações de açúcares analisadas em HPLC – LRAC.

Tabela 21 - Concentrações de açúcares nas diferentes metodologias.

Métodos	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)
Reator	29,2727	10,7407	3,8306
Bancada	20,8541	8,5699	3,0131

Fonte: Do autor.

Através destes dados na Tabela 21, pode ser observar a proximidade das concentrações dos açúcares liberados que foram analisados, comprovando no processo de digestibilidade do biorreator para o processo de bancada.

6 CONCLUSÃO

Projetou-se e construiu-se um biorreator para hidrólise ácida de material lignocelulósico, assim como o estudou-se e o processou-se a liberação de açúcares fermentescíveis.

Caracterizou-se físico-quimicamente a biomassa utilizada de palha de cevada, definindo sua umidade residual após sua secagem em 8,19% (m/m), teores iniciais de lignina 18,85%, celulose 37,45%, hemiceluloses 20,31% e cinzas 8,45%.

Estudaram-se as condições de pré-tratamento ácido através do planejamento experimental estatístico, que demonstraram que as concentrações de ácido sulfúrico (linear e quadrático) e massa (linear), foram estatisticamente significativas (pela análise do p-valor) em um intervalo de confiança de 95% para a variável resposta massa de glicose por massa de palha de cevada; enquanto que para a variável concentração de sólidos solúveis, apenas a concentração de ácido sulfúrico (linear e quadrático) foram estatisticamente significativos.

Aplicou-se a metodologia de hidrólise ácida e obteve-se na etapa do pré-tratamento na condição otimizada, ácido sulfúrico a 2,3 % m/v e massa de 7g de palha no tempo de 40 minutos em autoclave a 121 °C, onde se obteve uma concentração de 0,137 g glicose(g) / palha(g) e 2,61 °Bx.

Aplicou-se as condições ótimas estudadas no biorreator, efetuando um comparativo entre as escalas, quantificando-se a porcentagem de glicose em 29,27 g/L, xilose em 10,74 g/L e arabinose em 3,83 g/L. Nota-se a proximidade entre as concentrações de açúcares quantificados, comprova-se o processo de digestibilidade do biorreator. Por tanto, os valores das concentrações de açúcares demonstrados pela palha da cevada, comprovam ser uma biomassa com potencial para a produção de produtos fermentescíveis, como etanol de segunda geração, extração de xilose e a produção de furfural.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, seguem algumas atividades que podem ser realizadas após esse trabalho de dissertação de mestrado complementando assim os dados estudados:

- a) Realizar ensaios de hidrólise enzimática nos hidrolisados obtidos;
- b) Realizar ensaios de fermentação nos hidrolisados obtidos e avaliar o rendimento em produção de etanol;
- d) Buscar uma otimização multivariável que contemple simultaneamente a obtenção de açúcares fermentescíveis da celulose e hemiceluloses;
- e) Adicionar a variável tempo do planejamento experimental e adicionar buscando maiores concentrações de açúcares fermentescíveis.

REFERÊNCIAS

- ALBINI, G.; PERAZZINI, H.; FREIRE, F. B.; FREIRE, J. T.; Secagem de Grãos de Cevada em Camada Fina: Cinética de Secagem. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS*, 37., 2015, São Carlos. **Anais [...]** São Carlos: UFSCar, 2015. p.1893-1902.
- BARROS NETO B., SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, 2. ed. Campinas: UNICAMP - SP, 1996.
- BIANCHI, M. L. **Polpação de Palha de Milho utilizando-se diferentes processos organosolv**. 1995. Dissertação (mestrado em química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.1995.
- BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES. 2008. 316 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **A Cerveja no Brasil**, Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/a-cerveja-no-brasil>. Acesso em: 12 de fev. 2019.
- BON, E.P; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.
- CÂNDIDO, E. J.; CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Determinação da Composição Química da Palha de trigo. *In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS*. 7, 2002, Maringá. **Anais [...]**. Maringá: UEM, 2002. p.108.
- CANETTIERI, E.V. *et al.* Composition of Eucalyptus Grandis Wood Residues. *In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE AZUCAR Y DERIVADOS DE LA CANA*, 7, 2002, Habana. **Anais [...]**. Universidad de la Habana, 2002. p.134.
- CANETTIERI, E.V. **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. 2004. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, SP, 2004.
- CARVALHO, G. B. M; *et al.* Chemical characterization of coffee rind: a plentiful residue that can be used in biotechnological bioprocesses. *In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS*. 26, 2004, Tennessee. **Anais [...]** Knoxville: University of Tennessee. 2004. p. 198-201.
- CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.

CREMASCO, M. A. **Operações Unitárias em Sistemas Particulados e Fluidodinâmicos**. São Paulo: Editora Blucher, 2012.

COWLING, E.B. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *In: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING SYMPOSIUM*. 5., 1975, Oxonia. **Anais** [...] Oxonia: University of Oxford, UK. p. 163.

DE MORI, C; MINELLA, E. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 28p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 139). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/91355/1/2012-documentosonline-139.pdf> . Acesso em: 2 jun. 2018.

EMBRAPA. **Área plantada de sementes de cevada (ha)**. 2012. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139_2.htm Acesso em: 12 ago. 2018.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A. Cell walls and their components in cereal grain technology. *In: POMERANZ, Y. (Ed.). Advances in cereal science and technology*.. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1986. v. 8, p. 207–295

FOGLER, S. C. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora, LTC, 2002.

GOLDSTEIN, C.H. *et al.* Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**. v 25. p. 85-102, 1978.

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

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and longterm. **Biomass and Bioenergy**. v. 28. 2005. p. 384-410.

KHUAD, R. C., SINGH, A. Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. Berlin: Versuchs und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB). 2004.

LEE, H.V; HAMID, S.B.A; ZAIN, S.K. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. **The Scientific World Journal**. 2014, p. 1-20, 2014.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n.58. p.741– 761. 1996.

MACHADO, D. L. **Estudo da adsorção de enzimas do complexo celulítico em bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos e avicel.** 2013. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) Universidade de Campinas, Campinas – SP, 2013.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MUSSATO, S. I. **Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*.** 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de engenharia Química de Lorena, Lorena, SP, 2002.

MUSSATTO, S. I *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 6, p. 817-830. 2010.

NAKASU, P.Y. **Cinética da hidrólise ácida do licor obtido após pré-tratamento hidrotérmico.** 2015. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2015.

NÁPOLES, A. I. *et al.* Obtención de xilitol a partir de de bagazo de la caña de azúcar. *In: REVISTA DEL 1 CONGRESO IBEROAMERICANO DE APROCECHAMIENTO DE DESCHOS Y TECNOLOGIAS LIMPIAS*,1. 1997, Costa Rica, **Anais [...]** Costa rica: Universidad de Costa Rica. 1997. p. 35-36.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 2014.

NISHIKAWA, N. K., SUTCLIFFE, R., SADDLER, J. N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 549-552, 1988.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. 2. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 25-33, 2000.

PARK, K.H., LEE, K.Y., LEE, H.G Chemical composition and physicochemical properties of barley dietary fiber by chemical modification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 360-365, set. 2013.

PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística.** 2015. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São carlos, São Carlos, SP, 2015.

PULS, J. *et al.* Hemicellulose and Hemicellulases. **Portland Press**, Cambridge, v.13, p. 1-27, 1993.

QUINDE, Z.; ULLRICH, S.E.; BAIK, B. K. Genotypic variation in colour and discolouration potential of barley-based food products. **Cereal Chemistry**, v. 81, p. 752–758, 2004.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2007.

ROCHA, M.; BERGAMO, L.; KIKAS, T. Potential of cereal-based agricultural residues available for bioenergy production. **Elsevier**. v. 23. n. 83, p. 142-149, 2019.

RODRIGUES, F.A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana.** 2007. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos, uma estratégia sequencial de planejamento.** Campinas: ed. Casa do Pão, 2009.

RUBIO MATOS, Z. *et al.* Evaluación del efecto de las condiciones de hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar en la recuperación de xilosa usando planeamiento estadístico. *In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA*, 7., 2002, Habana, **Anais** [...] Habana: Universidad de Cuba, 2002. v.13, p. 170-188.

SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SCHELL, D. J. *et al.* Dilute-Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover in Pilot-Scale Reactor. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 108, n. 55, p. 69-85, 2003.

SCHULTZ, E. L. *et al.* Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de açúcares fermentescíveis. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, 20., 2014, Florianópolis. **Anais**[...] Florianópolis: Blucher, 2014, p. 18-22.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Ash in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, v.1, n. 4, p. 1-8, 2005.

SLUITER, A. *et al.* Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, v.1 n. 2, p.1-12, 2005.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, v. 1, n. 3, p.1-16. 2008.

SLUITER, A. *et al.* Determination of Extractives in Biomass. **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, v. 1, n. 4, p. 1-12, 2005

SOUSA, V. M. Z. **Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico.** 2014.

Monografia (graduação em Engenharia de Energia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

STEFFENSON, B. J. *et al.* Vulnerability of Barley to African Pathotypes of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and Sources of Resistance. **APS Publications**. Published Online: 24 May 2017, Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0400-R> . Acesso em: 15 out. 2018.

STRYGINA, K.V.; BÖRNER, A.; KHLESTKINA, E. K. Identification and characterization of regulatory network components for anthocyanin synthesis in barley aleurone. *In*: INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE “PLANT GENETICS, GENOMICS, BIOINFORMATICS AN BIOTECHNOLOGY”, 7., 2017, Almaty, Kazakhstan. **Anais** [...]. Amalty, 2017. v. 7, p. 240-246.

SUHAS, V.K. *et al.* Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 216, n. 11, p.1066-1076, set. 2016.

ZALDIVAR, J., MARTÍNEZ, A., INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 15, p.797-824. 2004.

APÊNDICE A – Curva para Quantificação de Glicose

Para efetuar as leituras de concentração dos açúcares redutores totais liberados durante o pré-tratamento da palha da cevada, foi construída uma curva analítica de calibração seguindo-se o método do DNS proposto por Miller (1959). Os resultados obtidos nas análises que foram realizadas em triplicatas encontram-se na Tabela 20. Observa-se que o coeficiente de variação máximo obtido entre as repetições amostrais foram de 8,64%, sendo uma baixa a dispersão entre as análises demonstrando o rigor analítico dos resultados.

Tabela 22 - Curva de glicose, método DNS (1959).

[glicose](g/L)	Amostras 1 (Abs.)	Amostras 2 (Abs.)	Amostras 3 (Abs.)	Média ±SD	Coefficiente de variação (%)
0,10	0,018	0,023	0,019	0,020 ± 0,0017	8,64
0,20	0,074	0,075	0,072	0,074 ± 0,0012	1,69
0,40	0,157	0,160	0,154	0,157 ± 0,0024	1,56
0,60	0,268	0,266	0,269	0,268 ± 0,0012	0,47
0,70	0,273	0,277	0,275	0,275 ± 0,0016	0,59
0,80	0,334	0,339	0,332	0,335 ± 0,0029	0,88
0,90	0,383	0,376	0,370	0,376 ± 0,0053	1,41

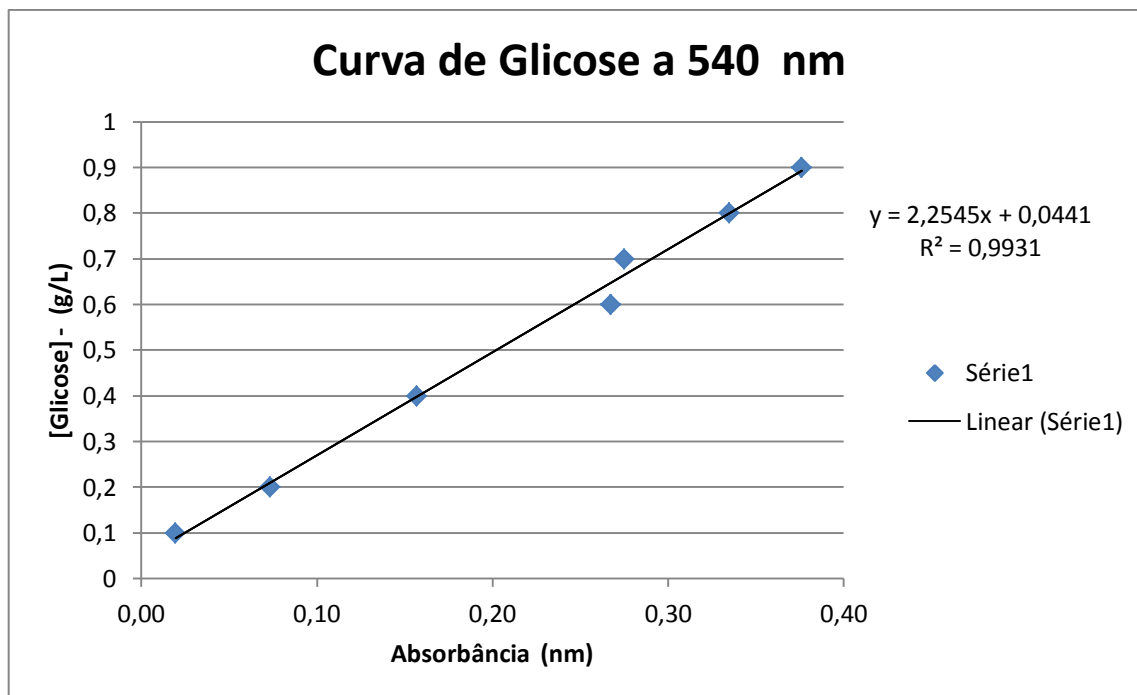
Fonte: Do autor.

Assim sendo, construindo-se um gráfico de dispersão da concentração média de glicose em função da absorbância, representado pela Figura 12, que de acordo com a Lei de Lamber-Beer é uma função linear. Observa-se que o coeficiente de regressão linear R^2 foi satisfatório de 99,3%. Portanto, para a quantificação de glicose durante a execução do planejamento experimental utilizou-se a equação 12:

$$[\text{Glicose}] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 2,254 \cdot \text{Abs} + 0,0441 \quad (12)$$

Em que: [Glicose] é a concentração de glicose em g/L e Abs é a absorbância medida em uma faixa de comprimento de onda de 540 nm.

Figura 21 - Curva de determinação de glicose



Fonte: Do autor.

Sabe-se que o teste do DNS (ácido dinitrosalicílico) baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelada), que é reduzido a um composto de coloração avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor.

APÊNDICE B – Desenhos Técnicos do Reator

