



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS CELULÓSICOS DA**  
**AGROINDÚSTRIA DO ARROZ**

**VALCENIR JÚNIOR MENDES FURLAN**  
Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA  
Orientador

RIO GRANDE, RS  
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS CELULÓSICOS DA  
AGROINDÚSTRIA DO ARROZ**

**VALCENIR JÚNIOR MENDES FURLAN**  
Engenheiro de Alimentos

Dissertação apresentada para a obtenção  
do título de Mestre em Engenharia e  
Ciência de Alimentos.

**Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA**  
Orientador

RIO GRANDE, RS  
2009

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e muita força de vontade para alcançar os meus objetivos;

Aos meus queridos pais Valcenir e Setembrina, por todos os esforços, dedicação incondicional e ensinamentos, que me ajudaram a vencer mais esta etapa da minha caminhada;

As minhas irmãs Fernanda e Andréia, cunhado Alex e sobrinha Micaela pelo incentivo e compreensão da minha ausência e, por sempre estarem na torcida;

A minha querida namorada Graciela Centenaro, pelo apoio, palavras de incentivo nas horas mais difíceis, companheirismo e amor dedicado. Obrigado a você e a sua família;

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, pela orientação, aprendizado científico e profissional, busca por estrutura e recursos graças ao seu trabalho e, especialmente pelas oportunidades e confiança. Muito Obrigado!

As futuras Engenheiras Juliana Moreira e Vanessa Schmidt e a colega Ana Cláudia Margarites, pela amizade e auxílio no desenvolvimento experimental desse trabalho, sempre com muita dedicação;

A toda equipe do LEB, especialmente as colegas Michele Andrade pelas valiosas sugestões e agradável convivência e bom humor e, a Christiane Ogradowski pela prestatividade e palavras de incentivo;

Ao imprescindível suporte técnico, à generosidade e, principalmente confiança dos funcionários Roque Zílio e Jesus Lamego;

Ao amigo Ricardo Monteiro pelo auxílio durante os experimentos de fermentação;

A Universidade Federal do Rio Grande por proporcionar um Programa de Pós-Graduação de qualidade e gratuito;

A Capes, que concedeu a bolsa de estudos;

Ao Gilson Teixeira, pelo fornecimento das matérias-primas;

A Novozymes Latin America LTDA pela doação das enzimas;

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Furlong e a Jaqueline Buffon pelas contribuições valiosas e por toda atenção dispensada. A todos os colaboradores, por disponibilizar equipamentos, reagentes e laboratórios;

Aos colaboradores dos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos, Operações Unitárias, Microbiologia e Bioprocessos por potencializar sua estrutura, jamais negando qualquer tipo de auxílio;

As funcionárias da secretaria de Pós-Graduação Islanda Passos e Daniele Borges pela amizade e disponibilidade;

Ao funcionário da Biblioteca Iradilson, pela gentileza e colaboração;

A comissão examinadora pelas correções da dissertação e valiosas sugestões;

A todos os colegas de Pós-Graduação;

Aos amigos, pois sempre me auxiliaram em momentos difíceis desta etapa da minha vida;

Por último, mas não por isso menos importante, a todas as pessoas que de alguma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho fosse desenvolvido e que representa mais uma grande etapa vencida em minha vida. MUITO OBRIGADO!

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	i
2 OBJETIVO GERAL.....	4
2.1 Objetivos específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 Crise energética e meio ambiente.....	5
3.1.1 Protocolo de Kyoto .....	6
3.2 Etanol.....	7
3.2.1 Histórico do etanol.....	7
3.2.2 Produção de etanol .....	8
3.3 Materiais lignocelulósicos.....	9
3.3.1 Resíduos agroindustriais .....	10
3.4 Arroz.....	11
3.4.1 Palha e casca de arroz.....	12
3.5 Celulose.....	14
3.6 Hemiceluloses.....	16
3.7 Lignina.....	17
3.8 Pré-tratamento das matérias-primas.....	18
3.9 Sacarificação.....	20
3.9.1 Hidrólise ácida.....	21
3.9.2 Hidrólise enzimática .....	22
3.10 Fermentação alcoólica.....	24
3.10.1 Leveduras.....	27
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....	30
4.1 SACARIFICAÇÃO ÁCIDA DE PALHA E CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	31
4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA E CASCA DE ARROZ.....	46
4.3 SACARIFICAÇÃO DE REJEITOS DA AGROINDÚSTRIA DO ARROZ E OBTENÇÃO DE BIOETANOL.....	68
5 CONCLUSÃO GERAL.....	82
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Composição química da palha e da casca de arroz.....	13
Tabela 2: Atividades relativas de celulasas de <i>Trichoderma koningi</i> sobre a hidrólise completa de celulose de algodão.....	23

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Produção de arroz em casca nas regiões do Brasil (safra 2007/2008).....	12
Figura 2: Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose.....	14
Figura 3: Representação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose.....	15
Figura 4: (1) Cadeia linear da celulose, com indicação de sua unidade estrutural; (2) Arranjo das cadeias na fibrila elementar; (3) Cristalito; (4) Seção transversal da microfibrila.....	16
Figura 5: Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.....	17
Figura 6: Estrutura dos álcoois precursores da lignina.....	18
Figura 7: Estrutura lignina de <i>Fagus sp.</i> .....	18
Figura 8: Esquema simplificado da hidrólise por celulasas.....	22

## PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS CELULÓSICOS DA AGROINDÚSTRIA DO ARROZ

### RESUMO

As atuais políticas ambientais buscam redução no consumo energético e no despejo de resíduos ao meio ambiente, através do desenvolvimento de alternativas ligadas a fontes renováveis. O aproveitamento de resíduos agroindustriais como a palha e a casca de arroz para geração de energia, apresentam elevado potencial, visto que são constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, os quais podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de bioetanol, já que na forma macromolecular não são assimiláveis nos processos fermentativos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de bioetanol utilizando palha e casca de arroz através de hidrólise ácida e enzimática seguida de fermentação. Na sacarificação ácida das matérias-primas foram avaliados o efeito da temperatura de reação (72 a 128°C) e concentração de substrato (0,2 a 5,8%, p/v) na conversão de açúcares indiretamente para diretamente fermentescíveis utilizando como agente catalisador  $H_2SO_4$  (72%, p/p), empregando um planejamento composto central ortogonal, sendo os maiores valores de açúcares redutores (AR) registrados no primeiro minuto de reação. Quando houve aumento da temperatura, verificou-se um efeito significativo ( $p=0,05$ ) e negativo sobre a concentração de AR, tanto para a palha como para a casca de arroz. O máximo rendimento em AR (55,12%) foi obtido através da sacarificação da palha de arroz na concentração 3% (p/v) a 72°C. Na hidrólise enzimática estudou-se o efeito da temperatura, concentração de enzima e substrato na conversão de açúcares, após pré-tratamento para deslignificação da palha e casca de arroz. Os hidrolisados foram obtidos utilizando as enzimas comerciais celulase NS 50013 e  $\beta$ -glucosidase NS 50010 (10:1), com agitação  $150 \text{ min}^{-1}$ , pH 4,8 durante 48 h. Através da análise estatística observou-se que a concentração de enzima foi a variável que apresentou maior influência na formação de AR para ambas as matérias-primas. A máxima sacarificação alcançada foi através da hidrólise enzimática (79,90% de AR) da palha de arroz após 48 h de reação a 41,6°C. A fermentação do hidrolisado enzimático contendo 130 g/L de açúcares foi realizada em condições anaeróbias produzindo 23,3 g/L de etanol correspondendo a 0,41 g/g de conversão. Estes resultados indicam a potencialidade da palha de arroz para a utilização em processos biotecnológicos como para produção de bioetanol.

Palavras-chave: Bioetanol; Enzima; Fermentação; Resíduos Agroindustriais



## BIOETHANOL PRODUCTION FROM CELLULOSIC WASTES AGROINDUSTRY RICE

### ABSTRACT

Current environmental politics look for energy consumption reduction and residues discard in environment, through development of renewable alternatives sources. The use of agroindustrial wastes as hulls and straw rice for energy generation show high potential because they are constituted mainly of polymerized carbohydrates, which can be used as raw material for the bioethanol production, since previously hydrolysates, because in the macromolecular form aren't assimilable in fermentation processes. The present work had as objective to study the ethanol production from hulls and straw rice through acid and enzymatic hydrolysis followed by fermentation. In the acid saccharification of the raw materials were evaluated the effect of reaction temperature (72 and 128°C) and substrate concentration (0.2 to 5.8%, w/v) on conversion of sugars indirectly for directly fermentable with catalytic agent H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%, w/w) using central composite rotatable design and the largest AR values recorded in the first minute reaction. When the temperature increased, a significant ( $p=0.05$ ) and negative effect was verified on AR concentration, so much hulls as straw rice. The maximum AR (55.12%) was obtained from the saccharification straw rice on the concentration 3% (w/v) at 72°C. In the enzymatic saccharification was studied the effect of temperature, enzyme concentration and substrate concentration on conversion sugars, after pretreatment for delignification of hulls and straw rice. The hydrolysates were obtained using commercial enzymes Cellulase NS 50013 and  $\beta$ -glucosidase NS 50010 (10:1), with stirring 150 min<sup>-1</sup>, pH 4.8 for 48 h. Through the statistical analysis was observed that enzyme concentration was the variable that showed larger influence in the AR production in both raw materials. The maximum saccharification achieved was by straw rice through enzymatic hydrolysis (79.90% AR) of straw rice after 48 h reaction at 41.6°C. The fermentation of enzymatic hydrolysates containing 130 g/L sugars was accomplished in anaerobic conditions producing 23.3 ethanol g/L corresponding conversion of 0.41 g/g. These results indicate the potentiality of straw rice for use in processes biotechnological as bioethanol production.

Keywords: Agroindustrial Wastes; Bioethanol; Enzyme; Fermentation

## 1 INTRODUÇÃO

A crise de energia juntamente com a carência de alimentos e as ameaças ao meio ambiente, estreitamente relacionadas, constitui os principais problemas que afligem a humanidade, devido ao desenvolvimento sócio-econômico e o aumento populacional que determinam acréscimos à demanda de alimentos e de bens de consumo que, por sua vez, exigem aumento na quantidade de energia para sua produção e do despejo de grandes volumes de resíduos no ambiente (MENEZES, 1980). A partir disto, é possível prever, para curto ou médio prazo, a falta de elementos essenciais para a subsistência humana, especialmente alimentos e combustíveis. Neste sentido, a biomassa será num futuro próximo, uma das principais fontes de recursos para a obtenção de alimentos, produtos químicos e combustíveis (REYES et al., 1998).

Um dos principais motivos pelos quais tem sido incentivada a utilização da energia fotossintética é a sua renovabilidade, uma vez que os compostos orgânicos obtidos pela fotossíntese são decompostos pela natureza e resintetizados com repetições periódicas desse ciclo. Ao contrário, os combustíveis de origem fósseis são esgotáveis e não se renovam, sendo que o período para a sua formação não se mede em anos, mas avalia-se em períodos geológicos (MENEZES, 1980).

Dentro deste contexto, os materiais lignocelulósicos ocupam lugar de destaque, principalmente em função da sua abundância e do seu caráter renovável, fatores que tem propiciado um grande interesse por estes tipos de materiais. Em virtude da preocupação em preservar o meio ambiente, passou-se a motivar o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, dos quais a celulose é o mais abundante, compreendendo cerca de dois terços de toda matéria orgânica existente no planeta. Estima-se que a produção anual de celulose é 100 bilhões de toneladas (ZHAO et al., 2007).

A palha de arroz, considerada resíduo da agricultura, é um dos materiais lignocelulósicos mais abundantes e desperdiçados no planeta, com produção de 731 milhões de toneladas anualmente, sendo distribuídas entre Ásia (667,6 milhões de toneladas), América (37,2 milhões de toneladas), África (20,9 milhões de toneladas), Europa (3,9 milhões de toneladas) e Oceania (1,7 milhões de toneladas). Esta quantidade de palha de arroz apresenta potencial para a produção de 205 bilhões de litros de bioetanol por ano, sendo a maior quantidade de uma única biomassa agrícola (KARIMI et al., 2006).

Além disso, do processo de beneficiamento do arroz, tem-se como resíduo a casca, com geração anual de 123 milhões de toneladas em todo o planeta (SAHA e COTTA, 2008). Normalmente, é incinerada para gerar energia na própria indústria, resultando em cinzas que provocam poluição no meio ambiente e problemas de saúde ao homem. Outro destino comum da casca é o descarte em lavouras e fundos de rios, liberando gás metano, contribuindo para o aquecimento global (DELLA et al., 2006; FOLETTO et al., 2005).

Segundo a Agência Internacional de Energia (IEA) estima-se que as fontes renováveis respondem por 13% da oferta total de energia primária. Aproximadamente 80% desses recursos renováveis estão na forma de biomassa combustível, principalmente madeiras, carvão vegetal e resíduos agroindustriais, como a casca e a palha de arroz que, juntas, são responsáveis por 854 milhões de toneladas, com elevado potencial para geração de energia. Investimentos estão sendo efetuados para viabilizar a produção de bioetanol a partir de celulose, sendo estimado que, em 2020, cerca de 30 bilhões de litros poderiam ser obtidos desta fonte, apenas nos EUA (BRASIL, 2006).

Devido ao seu elevado valor energético, o bioetanol é o biocombustível que apresenta expectativas mais promissoras para o futuro, pois para cada tonelada de álcool combustível utilizado, cerca de 2,3 toneladas de CO<sub>2</sub> fóssil deixam de ser emitidos. A produção mundial de etanol aproxima-se dos 62 bilhões de litros, dos quais os EUA (32 bilhões de litros) é o maior produtor, seguido pelo Brasil com produção anual de 23 bilhões de litros. O álcool é utilizado em mistura com a gasolina no Brasil, EUA, União Européia, México, Índia, Argentina, Colômbia e, mais recentemente, no Japão. Calcula-se que o Brasil chegará a 2030, com uma produção de aproximadamente 66,5 bilhões de litros de etanol, um volume 300% superior ao atual, podendo exportar 12 bilhões de litros, contra os atuais 5,1 bilhões. A projeção está no Plano Nacional de Energia, divulgado pela Empresa de Pesquisa Energética (RFA, 2009; BRASIL, 2006).

O bioetanol vem despertando, de modo crescente, a atenção de pesquisadores, empresas e governos em função dos aumentos dos preços do barril de petróleo, aliado as perspectivas de esgotamento das reservas e os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo estrangeiro de países politicamente instáveis, assim como as preocupações de natureza ambiental, relacionadas às emissões de substâncias que comprometem o meio ambiente. O bioetanol produzido com base na biomassa celulósica vem sendo referido como a segunda geração de biocombustíveis,

cujo processamento apresenta uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento, emergindo como fundamental para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol, que hoje esbarra em limitações para expansão da área plantada, por competir com a produção de alimentos (SUKUMARAN et al., 2009; BASTOS, 2007).

Não é muito antiga a idéia de se utilizar celulose para a produção de alimentos, seja por fermentação direta ou por hidrólise prévia. Todavia, tanto o processo de hidrólise prévia como o de fermentação direta era de baixa eficiência, tornando-os economicamente inviáveis (MENEZES, 1980). Progressos tecnológicos alcançados na hidrólise ácida e enzimática da celulose para a transformação em açúcares fermentescíveis, permitirão a exploração econômica de subprodutos celulósicos agroindustriais para a produção de alimentos e bioetanol.

Em função do que foi exposto, este estudo busca oferecer uma alternativa em relação ao aproveitamento de biomassa de resíduos agroindustriais, através da produção de bioetanol como biocombustível, contribuindo assim para a proteção ambiental, redução das emissões de carbono fóssil e minimização das crises energéticas e de alimentos.

## 2 OBJETIVO GERAL

O trabalho que foi desenvolvido teve como objetivo estudar a produção de bioetanol a partir da utilização de resíduos agroindustriais como palha e casca de arroz.

### 2.1 Objetivos específicos

- Estudar a conversão de açúcares indiretamente para diretamente fermentescíveis da palha e casca de arroz através de hidrólise ácida e enzimática;
- Comparar as matérias-primas palha e casca de arroz em relação a sua susceptibilidade a sacarificação;
- Produzir bioetanol empregando processo fermentativo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Crise energética e meio ambiente

As fontes de energia estão divididas em três grupos: combustíveis fósseis, fontes renováveis e fontes nucleares. O consumo mundial de energia aumentou 22,6%, boa parte dessa energia consumida proveio de fontes fósseis como petróleo, carvão e gás natural (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007).

Atualmente as reservas de petróleo estão estimadas em um trilhão de barris, logo a perspectiva para o esgotamento é, no máximo, 70 anos (SHREEVE, 2006). No caso específico de fontes não renováveis, pode-se afirmar que em um único século a humanidade consumiu o que a natureza acumulou em milhões de anos (AMATO, 2002). Os EUA é o país que mais consome petróleo, respondendo por 25%, no entanto mantêm apenas 3% das reservas conhecidas, sendo que 60% estão localizadas no Oriente Médio (DOE, 2005). O crescente aumento no consumo do petróleo em nível internacional associado à redução de suas reservas e aos conflitos internacionais no Oriente Médio implicará no aumento gradativo do preço do barril nos próximos anos; com isso países muito dependentes terão que ajustar drasticamente suas balanças comerciais, com implicações de emprego e renda (STRAPASSON, 2005).

A partir da década de 1980 as questões relativas a mudanças climáticas, aquecimento global e efeito estufa passaram a ocupar lugar de destaque no rol das ameaças ambientais que mais colocam em risco a integridade do planeta. Vários gases que existem naturalmente na atmosfera quando emitidos em excesso intensificam o efeito estufa como metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), hidrofluorcarbonos (HFCs) e o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que atualmente são os que mais contribuiram para incremento do problema (NISHI et al., 2005).

Em 2002, 24 bilhões de toneladas de dióxido de carbono foram lançados no meio ambiente pela queima de combustíveis fósseis e, em 2015, essas quantidades deverão alcançar 33 bilhões (SHREEVE, 2006). Devido ao aumento da concentração desses gases, o efeito estufa vem se agravando e trazendo consigo a elevação da temperatura média global. Consequências drásticas são esperadas com esse aquecimento, como derretimento das calotas polares de gelo, aumento do nível médio dos oceanos, propagação de doenças tropicais, migração e extinção da biodiversidade entre outros. Algumas dessas consequências, como o derretimento das calotas

polares e o aumento do nível médio dos oceanos, já podem ser observadas (NISHI et al., 2005).

A partir disso, as políticas ecológicas tem como objetivo principal à redução no consumo de energia e o desenvolvimento de energias que provêm de fontes renováveis como biomassa, vento, geotérmica, água e energia solar, uma vez que as fontes de energias renováveis proporcionam desenvolvimento sustentável e proteção ambiental. De acordo com os estudos do Comitê do Conselho Mundial de Energia, até 2070 a contribuição de energia renovável para o equilíbrio da energia mundial será aproximadamente 60% (KAMINSKI et al., 2007).

### 3.1.1 Protocolo de Kyoto

Sob a conclusão de que as mudanças climáticas representariam de fato uma ameaça para a humanidade, foi criada a Convenção da Organização das Nações Unidas (ONU) sobre Mudança no Clima, cujo objetivo era frear as emissões e, conseqüentemente, as concentrações de gases do efeito estufa na atmosfera a um nível, o qual impediria, que a interferência antrópica modificasse o sistema climático. Outro objetivo era garantir que a produção de alimentos não fosse ameaçada, a fim de permitir que o crescimento econômico prosseguisse de maneira sustentável. Como resultado, ficou acordado, que os países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e da antiga URSS adotariam políticas de mitigação capazes de fazer com que os níveis de emissão antrópica dos referidos gases retomassem, até o ano 2000 (primeiro prazo), aos níveis de 1990. Assim, em 1997 em Kyoto, no Japão, foi aprovado o documento que veio a ser chamado de “Protocolo de Kyoto”, quantificando as metas de redução de emissões (NOVO, 2005).

De acordo com o Protocolo de Kyoto, os países mais industrializados ficariam obrigados a reduzir as emissões de gases geradores de efeito estufa em volumes de 5,2% inferiores a seus níveis de emissões em 1990, sendo que essa redução deverá ser feita entre 2008 e 2012, intervalo estabelecido como o primeiro período de cumprimento do Protocolo. Além disso, o planeta terá que reduzir em 25% as emissões de gás carbônico oriundas da combustão da gasolina. Uma das alternativas a essa redução é a utilização do bioetanol, visto que substitui totalmente o uso de combustíveis fósseis, é renovável e economicamente viável (NOVO, 2005).

### 3.2 Etanol

O álcool etílico ou etanol ( $C_2H_5OH$ ) é produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais (cereais, beterraba e cana). Ainda hoje, boa parte do etanol industrial é produzida por meio da fermentação, embora também seja feita sinteticamente de fontes como eteno, derivado do petróleo (BASTOS, 2007).

O combustível etanol pode ser classificado como sendo de dois tipos: álcool anidro, que é praticamente puro, com um teor alcoólico entre 99,3 e 99,8 (v/v), utilizado atualmente como aditivo na gasolina até um percentual de 25 (v/v); e o álcool hidratado que contém um teor alcoólico entre 92,6 e 93,8 (v/v), utilizado como combustível puro nos motores (SCANDIFFIO, 2005).

O bioetanol é o biocombustível que apresenta expectativas mais promissoras para o futuro, por apresentar as seguintes vantagens: não apresenta dependências de reservas petrolíferas (diminuí a dependência do petróleo estrangeiro); é obtido de fontes renováveis; gera dez vezes mais energia do que consome em sua produção; apresenta baixos níveis de emissões de gases relacionados ao efeito estufa como o monóxido de carbono (redução de 4% para o E10 e 37% para o E85), óxidos de enxofre e compostos orgânicos tóxicos como o benzeno e chumbo. Isto é importante, pois cerca de 50% dos gases na terra provêm da utilização dos automóveis, já que um terço da energia gerada no planeta é usada para o transporte. Portanto temos motores de combustão mais ecológicos e com menos depósitos, ajuda no desenvolvimento econômico-rural; substitui compostos perigosos da gasolina, como por exemplo, o benzeno, uma vez que a gasolina contamina o solo e a água, ao contrário o bioetanol é biodegradável, tornando-o mais seguro ao ambiente. Portanto, diminui a poluição do ar, a emissão de gás carbônico e conseqüentemente as mudanças climáticas (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; BRASIL, 2006; SHREEVE, 2006; SARAIVA, 2003).

#### 3.2.1 Histórico do etanol

No Brasil, as indústrias de açúcar e de álcool estiveram sempre intimamente ligadas, desde o tempo do descobrimento. Deduz-se que a produção de álcool iniciou na Capitania de São Vicente, porque nela foi montado o primeiro engenho de açúcar do país, após a vinda das primeiras mudas de cana-de-açúcar



trazidas da ilha da Madeira em 1532. Certamente, transformava-se o melaço residual da fabricação do açúcar em cachaça e, da garapa fermentada produzia-se aguardente. Por séculos, as bebidas destiladas foram o único álcool produzido. A indústria de álcool industrial desenvolveu-se na Europa em meados do século XIX e, no último quarto desse século iniciou-se a produção de etanol no Brasil com as sobras de melaço da indústria de açúcar, que ampliava sua capacidade produtiva (LIMA et al., 2001).

A produção de etanol no Brasil começou a ter grande destaque na década de 70, mais exatamente após a primeira grande crise do petróleo em 1973, quando o preço do barril de petróleo foi elevado abruptamente. Neste contexto, em 1975 foi criado o PROÁLCOOL, um programa federal administrado pelo Ministério da Indústria e Comércio, que tinha como objetivos deslocar o consumo da gasolina para o álcool combustível e dar maior estabilidade à indústria açucareira. De acordo com Araújo e Ghirardi citado por Novo (2005), o PROÁLCOOL foi criado em resposta as mudanças ocorridas no mercado petrolífero, pois 90% da gasolina consumida era importada, sendo usado também como instrumento de suporte à indústria açucareira, num período em que esta se deparava com o declínio brusco do valor de seus produtos.

A indústria do álcool substituiu desde 1976, mais de 1,44 bilhões de barris de petróleo e a economia de divisas com a substituição do petróleo foi cerca de US\$ 120 bilhões, entre 1979 e 2004 (MARTINES-FILHO, 2006).

### 3.2.2 Produção de etanol

A produção mundial de etanol é mais de 62 bilhões de litros, dos quais os EUA é o maior produtor. O Brasil apresenta uma capacidade de produção de aproximadamente 23 bilhões, juntos esses países são responsáveis por 89% da produção mundial seguidos pela China e União Européia (RFA, 2009). O etanol é utilizado em mistura com a gasolina no Brasil, EUA, União Européia, México, Índia, Argentina, Colômbia e mais recentemente no Japão. Em 2008 o Brasil exportou 5,1 bilhões de litros de álcool, volume 45% superior ao ano de 2007 (BRASIL, 2009), e é um dos poucos países que geram excedentes exportáveis, além do pequeno comércio intra-União Européia (BASTOS, 2007).

O Brasil possui o menor custo de produção de bioetanol do mundo, visto que o mesmo pode ser obtido a partir de diversas formas de biomassa, sendo a cana-de-açúcar a realidade econômica atual. Porém, o país enfrenta alguns problemas

relacionados à obtenção de álcool a partir da cultura da cana-de-açúcar, pois essa prática gera exploração de mão-de-obra, sem contar que o país terá que aumentar em pelo menos 50% sua área atual com cana-de-açúcar até 2013, se quiser atender ao crescimento da demanda interna de álcool e às demandas interna e externa de açúcar, sem considerar o mercado internacional do bioetanol (STRAPASSON, 2005).

Essa atividade gera também problemas ambientais como: o assoreamento dos rios causado pela erosão e pela ocupação agrícola de áreas geograficamente não adequadas; a compactação dos solos ocasionada pela intensificação da mecanização nas lavouras; a destruição de reservas de matas nativas e ciliares para ampliação das lavouras; o aumento das emissões de CO<sub>2</sub>; a eliminação de micronutrientes e da mesofauna a partir das queimadas; contaminação de cursos d'água na lixiviação de pesticidas e fertilizantes; o aumento da produção de subprodutos agroindustriais como a vinhaça, a torta de filtro e o bagaço. A vinhaça é o principal resíduo da agroindústria canavieira, destacando-se como o principal efluente com elevado potencial poluente devido à alta DBO (> 20.000 mg/L) e apresenta-se em grande volume, dificultando seu transporte e eliminação. A produção de vinhaça varia em função dos diferentes processos empregados na fabricação do álcool, de maneira geral, para cada litro de álcool produzido em uma destilaria gera-se entre 10 a 15 litros de vinhaça (PIACENTE e PIACENTE, 2007).

### 3.3 Materiais lignocelulósicos

Muitos materiais lignocelulósicos são subprodutos de atividades agrícolas, resíduos industriais ou resíduos domésticos e, enormes são as possibilidades a partir destes para a produção e consumo global como combustível renovável (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007). São compostos principalmente de celulose (constituído de glicose, polímero que contém açúcar de 6 carbonos), hemicelulose (polímero ramificado composto de xilose e outros açúcares de 5 carbonos) e lignina que consiste de unidades de polifenil-propano, podendo então ser utilizados como substratos para processos fermentativos, uma vez que 70% desses resíduos são constituídos de carboidratos (SAHA, 2003).

Devido à necessidade de ampliação da oferta de matérias-primas para produção de etanol, sem pressionar a área plantada para produção de alimentos, e a busca na prevenção do despejo de resíduos poluidores, empresas e países têm investido em pesquisas de maior aproveitamento dos materiais lignocelulósicos. Em

torno de 50% da biomassa terrestre é constituída desses compostos orgânicos (LEE, 1997), incluindo os resíduos agroindustriais constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, dos quais a celulose é o mais abundante, compreendendo cerca de dois terços de toda matéria orgânica existente sobre o planeta (ZHAO et al., 2007).

A abundância dos materiais lignocelulósicos e seu caráter renovável decorre do fato de que metade do  $\text{CO}_2$  atmosférico é fixado através da fotossíntese dos vegetais, assumindo a forma de celulose e seus associados. A energia acumulada pelas plantas na forma de carboidratos é o resultado da fotossíntese, que compreende a síntese dos compostos orgânicos a partir da água e do dióxido de carbono, usando a energia fornecida pela luz que é absorvida pela clorofila, fenômeno inverso da respiração e faz parte do ciclo do carbono. Esse evento é de fundamental importância na natureza, pois os produtos da fotossíntese geram as matérias-primas das quais dependem direta ou indiretamente para fornecimento de energia às reações metabólicas de quase todas as plantas e animais (MENEZES, 1980).

A formação dos carboidratos na fotossíntese pode ser representada por uma equação endergônica de oxido-redução. O agente redutor é a  $\text{H}_2\text{O}$ , que é oxidada a  $\text{O}_2$ ; o agente oxidante,  $\text{CO}_2$ , é reduzido ao nível de carboidrato representado por  $\text{C}(\text{H}_2\text{O})$ . A fixação do  $\text{CO}_2$  nas plantas pela fotossíntese é a forma pela qual a energia se armazena formando o carboidrato, a partir do qual, e juntamente com os outros nutrientes do solo formam-se todos os compostos orgânicos da planta, como proteínas, gorduras, pigmentos, entre outros, por sequência de reações bioquímicas catalisadas por enzimas (REGULY, 1996).

A produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica é referida como a segunda geração de biocombustíveis, cujo processamento é uma das mais promissoras tecnologias em fase de desenvolvimento (BASTOS, 2007).

### 3.3.1 Resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais são gerados durante o processamento de alimentos, fibras, couro, madeira entre outros. A população humana produz milhões de toneladas de resíduos agroindustriais. A América Latina, por exemplo, produz 500 milhões de toneladas por ano de subprodutos agroindustriais, sendo que o Brasil é responsável por quase a metade deste montante (ALVES et al., 2007). Na maioria das

vezes, esses rejeitos são despejados no meio ambiente, provocando sérios problemas de poluição no solo, em águas superficiais e subterrâneas.

Como os resíduos de atividades agroindustriais (incluindo atividades agropecuárias) apresentam em geral, grande concentração de material orgânico, o seu lançamento em corpos hídricos proporciona o decréscimo na concentração de oxigênio dissolvido nesse meio, provocando a morte de peixes e outros animais aquáticos aeróbios por asfixia (MATOS, 2005).

O aproveitamento dos resíduos agroindustriais como substrato em processos biotecnológicos para a produção de bioetanol apresenta as seguintes vantagens:

- São abundantes, renováveis e de baixo custo;
- Não liberam gás carbônico e possuem pequeno conteúdo de enxofre;
- O bioetanol celulósico apresenta potencial para produzir pelo menos duas vezes mais combustível da mesma área de terra plantada e disponibilidade da biomassa;
- Potencial econômico, devido ao aumento dos preços dos combustíveis fósseis; (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; SHREEVE, 2006).

### 3.4 Arroz

A produção mundial de arroz na última safra atingiu 625.103,5 milhões de toneladas, onde o Brasil ocupou o nono lugar com 12.059,6 milhões de toneladas. A Região Sul do país é a maior produtora, contribuindo com 71%, sendo o Rio Grande do Sul o principal estado, detendo aproximadamente 61% do total produzido (CONAB, 2009; IRGA, 2008).

Na Figura 1, estão representadas as regiões do Brasil com suas respectivas produções de arroz em casca, destacando-se a Região Sul como a maior produtora.



**Figura 1:** Produção de arroz em casca nas regiões do Brasil (safra 2007/2008) (CONAB, 2009).

### 3.4.1 Palha e casca de arroz

A palha de arroz é um dos resíduos do cultivo da agricultura mais abundantes e desperdiçados, os quais são produzidos anualmente 731 milhões de toneladas. De acordo com Karimi et al. (2006), a produção média anual de palha de arroz, em milhões de toneladas na Ásia foi 667,6; seguida da América 37,2; África 20,9; Europa 3,9 e Oceania 1,7. Segundo pesquisas da Fundação ZERI (Iniciativas de Pesquisa em Emissão Zero), no município de Santa Vitória do Palmar-RS, onde são plantados cerca de 90 mil hectares de arroz, para cada 12 hectares do grão, é gerada em média uma tonelada de palha (BOURSCHEIT, 2007). Este material lignocelulósico é normalmente descartado na própria lavoura, onde grandes acúmulos causam mudanças no ecossistema (SUN et al., 2000) ou, então, efetuam-se queimadas como forma de eliminação provocando danos a saúde e ao meio ambiente (JACOBS et al., 1997).

Do processo de beneficiamento do arroz tem-se como resíduo a casca, que corresponde em média a 23% do peso total do grão, com geração anual de 123,69 milhões de toneladas em todo o planeta. Este resíduo apresenta alta dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, levando a obtenção de produtos de baixa propriedade nutritiva, boa resistência ao desgaste e muitas cinzas (SAHA e COTTA, 2008; DELLA et al., 2001). Normalmente, é incinerada para gerar energia na própria indústria,

resultando em cinzas que são descartadas nas lavouras como fertilizantes. Porém, as cinzas carregam carbono residual da combustão, provocando poluição no meio ambiente e problemas de saúde ao homem, já que são tóxicas. A cinza equivale aproximadamente a 18% do peso da casca e contém 92% de sílica, e só tem valor econômico se apresentar alta qualidade. Outro destino comum da casca é o descarte em lavouras e fundos de rios, liberando gás metano, contribuindo para o aquecimento global (DELLA et al., 2006; FOLETTO et al., 2005).

Tanto a casca como a palha de arroz são disponibilizadas durante todo o ano, estando, portanto, nas condições desejáveis de fornecimento constante. A variação na composição (Tabela 1) depende de vários fatores, começando pela variedade de arroz e indo até as condições do solo e clima durante o cultivo da planta (DELLA et al., 2006).

**Tabela 1:** Composição química da palha e da casca de arroz.

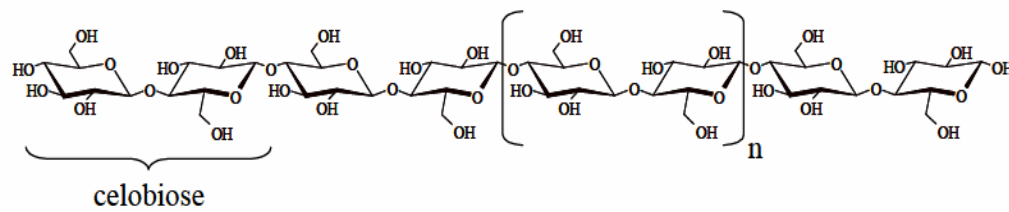
Componentes (%)	Palha de arroz (Mussato e Roberto, 2002)	Casca de arroz (Reyes et al., 1998)
Celulose	43,5	38,4
Hemicelulose	22,0	-
Lignina	17,2	29,4
Cinzas	11,4	8,5
Outros	5,9	23,7

A disponibilidade de resíduos celulósicos, representadas por palhas, cascas, folhas, resíduos de exploração madeireira e outros, despertam o interesse para seu uso como matéria-prima para produção de álcool (LIMA et al., 2001), porque os resíduos agrícolas e da industrialização de vegetais são constituídos fundamentalmente por material celulósico, biologicamente sempre associado a hemiceluloses. No entanto, para que esses resíduos sejam aproveitados para a obtenção de bioetanol ou em outros processos biotecnológicos, inicialmente eles devem ser hidrolisados, visto que na forma macromolecular não são assimiláveis (TAMANINI e HAULY, 2004). Se não após: a) hidrólise enzimática onde as respectivas enzimas que têm essas moléculas como substrato, promovem a sua cisão hidrolítica; b) hidrólise através de processos químicos e físico-químicos, mais drásticos, em que a cisão pela água é catalisada por agentes químicos em geral ácidos minerais. A despolimerização total desses polissacarídios origina a glicose no caso da celulose; e

outros monossacarídeos, em especial pentoses, no caso das hemiceluloses (REGULY, 1996).

### 3.5 Celulose

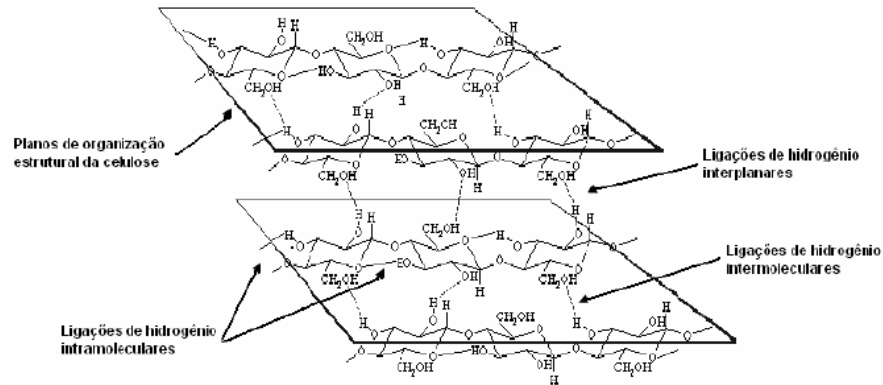
A celulose constitui a parede celular dos vegetais encontrada em toda planta na combinação com lignina e qualquer hemicelulose, é um homopolissacarídeo linear (parte amorfo e parte cristalino), constituída por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1-4), duas unidades adjacentes formam a celobiose, que se repete, apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial (Figura 2) (GALDEANO, 2001; LIMA et al., 2001; KHUAD e SINGH, 1993).



**Figura 2:** Representação da cadeia linear da celulose, formada por várias unidades consecutivas de celobiose (TÍMAR-BALÁZSY e EASTOP, 1998).

A celulose apresenta peso molecular variável, com fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , com valor mínimo de  $n=200$ , suas cadeias agregam-se formando fibrilas e apresentam pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, resultando na cristalinidade da celulose (Figura 3). Essas regiões cristalinas, nas quais as cadeias estão ordenadas paralelamente, são separadas por regiões menos ordenadas, conhecidas como amorfas.

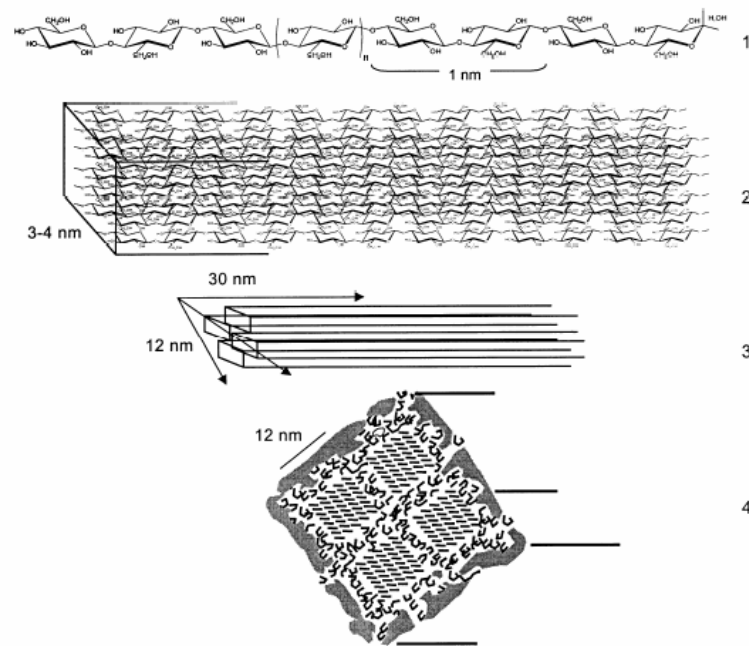
A cristalinidade e a capacidade de formar fibras compactas tornam a celulose impenetrável à água, quanto maior for a proporção na forma cristalina, maior a resistência ao ataque enzimático (GALDEANO, 2001; REYES et al., 1998).



**Figura 3:** Representação das ligações de hidrogênio na estrutura supramolecular da celulose (PITARELO, 2007).

Devido à linearidade do esqueleto celulósico, cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados insolúveis em água denominados fibrilas. Diversas fibrilas se associam uma com as outras formando cristalitos de celulose. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos se unem através de uma monocamada de hemicelulose envolvidas por uma matriz amorfa de hemicelulose e protolignina. O composto natural que resulta dessa associação é chamado de microfibrila de celulose (PITARELO, 2007) (Figura 4).





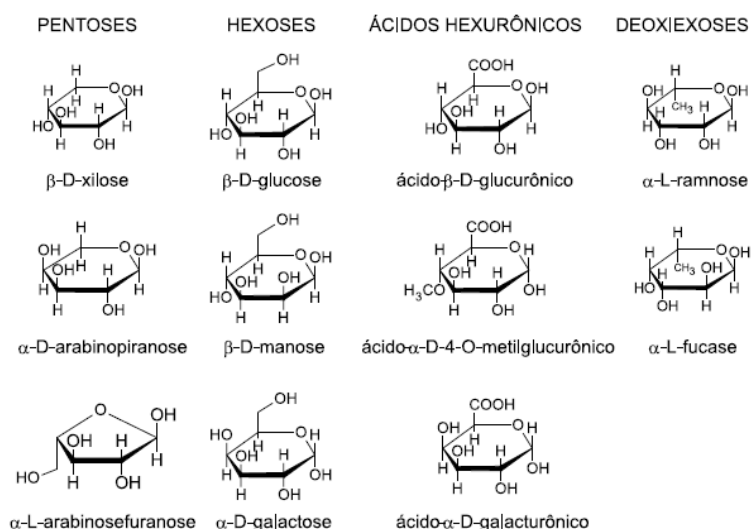
**Figura 4:** (1) Cadeia linear da celulose, com indicação de sua unidade estrutural; (2) Arranjo das cadeias na fibrila elementar; (3) Cristalito; (4) Seção transversal da microfibrila (RAMOS, 2003).

### 3.6 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polímeros ramificados compostos de polissacarídeos de baixa massa molecular, depositada na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado. Apresenta maior susceptibilidade à hidrólise ácida, devido ao caráter relativamente amorfo, com grande polidispersidade e grau de polimerização inferior a celulose. São compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses. Esses açúcares podem ser homopolímeros (exemplo: xilana, formado por xilose) ou heteropolímeros (exemplo: glicomanana, formado por glicose e manose) (FERRAZ, 2001; LIMA et al., 2001).

Enquanto a celulose, como substância química, contém como unidade fundamental exclusivamente a  $\beta$ -D-glucose, as hemiceluloses são polímeros em cuja composição podem aparecer, condensadas em proporções variadas, diversas

unidades de açúcar como apresentado na Figura 5 (MORAIS et al., 2005). Portanto, o termo hemiceluloses não designa um composto químico, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo cada componente propriedades peculiares.

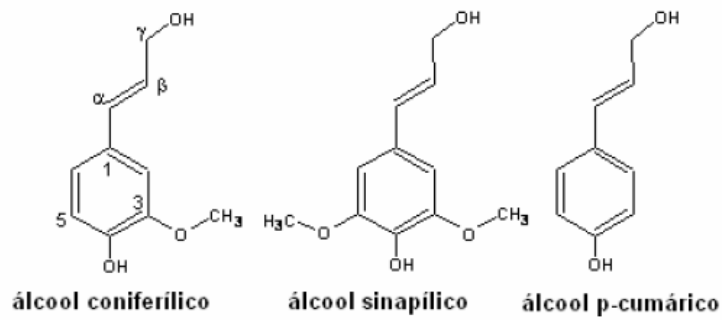


**Figura 5:** Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses (MORAIS et al., 2005).

### 3.7 Lignina

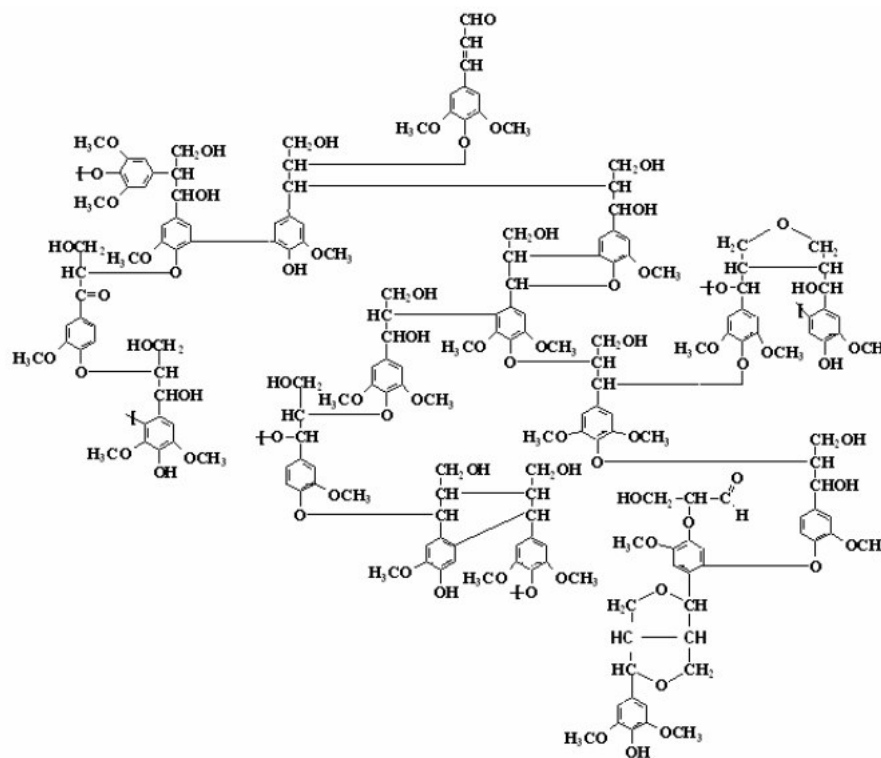
Depois da celulose, a lignina é um dos polímeros orgânicos mais abundantes e importantes na natureza, é depositada juntamente com os carboidratos, formando ligações covalentes com unidades monossacarídicas das hemiceluloses, age no enrijecimento e como barreira contra a degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular.

Pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico (Figura 6). Sua estrutura é bastante complexa e possui vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes as  $\beta$ -O-4 e  $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1, 5-5,  $\beta$ - $\beta$  e  $\beta$ -O-5.



**Figura 6:** Estrutura dos álcoois precursores da lignina (SJÖSTRÖM, 1992).

Um modelo proposto para lignina da árvore faia (*Fagus sp*) é mostrado na Figura 7.



**Figura 7:** Estrutura lignina de *Fagus sp* (FENGEL e WEGENER, 1989).

### 3.8 Pré-tratamento das matérias-primas

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos celulósicos está representada pela barreira física formada pela lignina, impedindo a utilização da

celulose nativa. Vários tipos de pré-tratamentos podem ser aplicados com o objetivo de diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulases (MARTÍN et al., 2002; REYES et al., 1998). Tais técnicas são baseadas em processos mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou a combinação destes. Estes processos dependerão do grau de separação requerido e do fim a que se destina. Pré-tratamentos que combinam métodos físicos e químicos têm sido apontados na literatura como os mais eficientes e, entre esses métodos, o com hidróxido de sódio destaca-se por ser um dos mais antigos e utilizados nas indústrias de celulose e papel para deslignificação de matérias-primas vegetais, principalmente madeiras, palhas de cereais e plantas fibrosas. Os processos alcalinos utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão), em comparação com sistemas ácidos. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra (PITARELO, 2007; RAMOS, 2000).

A natureza e o tipo de deslignificação realizado no substrato também têm efeito na taxa e extensão da hidrólise (PITARELO, 2007). A solubilização e fracionamento da lignina associada a elevadas severidades de processo, são potencialmente prejudiciais às etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação, em virtude da deposição de lignina sobre a superfície da polpa celulósica, bem como da geração de compostos inibidores da fermentação tais como derivados fenólicos e ácidos orgânicos. Os processos de pré-tratamento devem ser conduzidos sob condições moderadas, de modo a promover elevada reatividade das fibras celulósicas, com menor perda de glicose no hidrolisado, além da mínima geração de compostos inibidores das etapas subsequentes de hidrólise e fermentação.

A lavagem da polpa pré-tratada é fundamental, principalmente quando se opera com carga de sólidos superior a 8%, em virtude do efeito inibitório sobre a atividade enzimática exercido por carboidratos (xilose e glicose), compostos de degradação e derivados de lignina depositados sobre a polpa celulósica (BASTOS, 2007).

Saha e Cotta (2008) estudaram o tempo de reação necessário para pré-tratar alcalinamente a casca de arroz em autoclave a 121°C por 6, 30 min e 1 h; e constataram que o rendimento em açúcares redutores aumentou em 36% quando a matéria-prima foi pré-tratada por 6 min e passou para 1 h de reação. Eles também verificaram que a sacarificação enzimática, empregando pré-tratamento alcalino foi duas vezes maior de quando não se utilizou a base.

### 3.9 Sacarificação

Uma das principais etapas para a produção de bioetanol a partir dos processos fermentativos envolvendo carboidratos é a escolha do tipo de substrato, se este é diretamente fermentescível como o melaço, caldo de cana e sorgo sacarino ou indiretamente fermentescível como matérias-primas amiláceas ou celulósicas. Os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura muito complexa, pois 70% da celulose está na forma cristalina e a lignina juntamente com a hemicelulose forma um complexo difícil de isolar a celulose. Para que esta seja utilizada pelos microrganismos nos processos fermentativos, inicialmente é necessário converter estes carboidratos indiretamente para diretamente fermentescíveis. Esta conversão é chamada de sacarificação e pode ser realizada através da hidrólise química ou enzimática. A condução técnica de qualquer um destes processos, envolve reações que podem levar concomitantemente a derivados oxidados da celulose, a oligossacarídios, à celobiose e, por fim, a própria glicose monomérica (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; REGULY, 1996).

Segundo Mc Ginnis e Shafizadeh (1980) citado por Reguly (1996), a eliminação das hemiceluloses não apresenta maior dificuldade, pois são facilmente hidrolisadas por ácidos diluídos, sendo os produtos da hidrólise predominantemente pentoses (D-xilose, L-arabinose, L-ramnose) e hexoses (D-glicose, D-manose, D- e L-galactose), além dos ácidos urônicos da glicose e da galactose; são também solúveis em meio alcalino. Deve-se destacar que apenas o tratamento do material celulósico com vapor já promove a hidrólise das ligações glicosídicas da hemicelulose.

Já a remoção da lignina ou a alteração de sua associação com a celulose, contudo, exige a ruptura do complexo lignocelulósico, ou seja, de grande parte das ligações covalentes. O que não é fácil, pois não há simetria ou regularidade na lignina como resultado de sua biossíntese (REGULY, 1996).

O processo de hidrólise destina-se a quebrar as macromoléculas de celulose ou hemicelulose, por meio da adição de ácido sulfúrico aos resíduos, no caso da hidrólise ácida, ou pela ação de enzimas, no caso da hidrólise enzimática. Essa última reproduz o processo existente na natureza, em que a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares é feita por enzimas (chamadas celulasas, secretadas por fungos ou bactérias, microrganismos que se alimentam da matéria orgânica, alterando-a e formando substâncias químicas) (BASTOS, 2007; DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007).

### 3.9.1 Hidrólise ácida

Os ácidos utilizados como catalisadores liberam prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas. O rompimento destas ligações liberam uma série de compostos, principalmente açúcares como glicose, xilose e arabinose. A cinética de clivagem das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 por ácidos, depende basicamente da concentração e do tipo de ácido utilizado, assim como da temperatura do processo (AGUILAR et al., 2002).

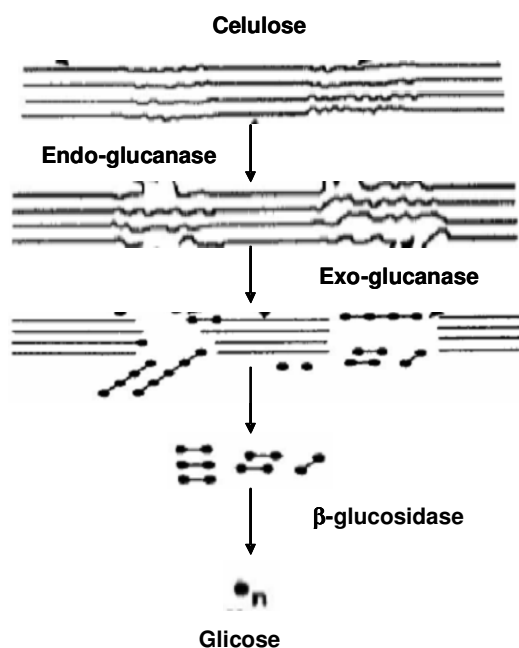
A hidrólise dos carboidratos com ácidos diluídos ocorre através de um processo heterogêneo, decorrente cineticamente de duas reações monomoleculares de 1<sup>o</sup> ordem, onde o rendimento em açúcar depende da relação entre a velocidade de sua formação ( $K_1$ ) e a velocidade de sua degradação ( $K_2$ ), relação  $K_1/K_2$ , não sendo possível chegar a um estado de equilíbrio entre o açúcar formado e o açúcar decomposto. Outra desvantagem de se empregar o processo com ácido diluído é o custo, devido a necessidade de reatores especiais, por causa das altas temperaturas e pressões utilizadas para ocorrer a reação (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; REGULY, 1996).

No entanto, a sacarificação dos carboidratos catalisada por ácidos concentrados se desenvolve como um processo homogêneo, à velocidade uniforme, conduzindo até formação de glicose. Os ácidos fortes como HCl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> causam antes, uma hidrólise das ligações glicosídicas do que o rompimento do complexo lignocelulósico, quase não influenciando na separação da lignina, devido às ligações éster e covalentes existentes. Por isso a lignina por si só, não é um grande empecilho à sacarificação ácida da celulose, com vistas à obtenção de glicose. Mas, a sacarificação tem contudo suas limitações, devido formação de produtos de decomposição do carboidrato formado (REGULY, 1996).

A hidrólise com ácidos concentrados como o sulfúrico é um processo relativamente antigo, empregando temperaturas moderadas e tempos de reações curtos. As temperaturas e pressões utilizadas permitem o uso de materiais com custo relativamente baixo. Este método geralmente é seguido por uma diluição com água para dissolver o hidrolisado ou converter o substrato em açúcar (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007).

### 3.9.2 Hidrólise enzimática

A degradação do polímero é feita pela ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente. Esses grupos de enzimas compreendem as endo-1,4- $\beta$ -glucanases, as exo-1,4- $\beta$ -glucanases e as 1,4- $\beta$ -glucosidases. A Figura 8 apresenta um esquema simplificado da hidrólise utilizando celulases. Os diferentes grupos de enzimas atuam de forma cooperativa, causando a hidrólise completa da celulose até glicose.



**Figura 8:** Esquema simplificado da hidrólise por celulases (DA SILVA et al., 1997).

As endo-glucanases rompem a molécula de celulose ao acaso e liberam fragmentos menores, possibilitando a formação de cadeias menores de celotriose, celobiose, que servem de substrato para as exo-glucanases. As exo-glucanases hidrolisam, pelas pontas, os fragmentos de menor massa molecular separando as moléculas de celobiose. As  $\beta$ -glucosidases, hidrolisam a celobiose até glicose (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; LIMA et al., 2001; ORTEGA et al., 2001; REYES et al., 1998).

O grau de sinergismo das celulases é grande e pode ser ilustrado com os dados apresentados na Tabela 2. Observa-se que a atividade relativa de cada grupo

de enzimas atuando de maneira isolada é bastante baixa, enquanto que, os três grupos em conjunto, permitem a hidrólise total da celulose.

**Tabela 2:** Atividades relativas de celulasas de *Trichoderma koningi* sobre a hidrólise completa de celulose de algodão.

Enzima	Atividade relativa das celulasas
Endo-glucanase	<1%
Exo-glucanase	<1%
$\beta$ -glucosidase	Nenhuma
Endo-glucanase + $\beta$ -glucosidase	5%
Exo-glucanase + $\beta$ -glucosidase	4%
Endo-glucanase + Exo-glucanase + $\beta$ -glucosidase	100%
Caldo de cultura original	100%

Fonte: LIMA et al., 2001

O processo enzimático envolvendo celulasas é bastante complexo, podendo ser inibido por vários produtos solúveis originados na própria reação enzimática. Celobiose e glicose, por exemplo, têm sido identificadas como inibidores do complexo celulase, enquanto que  $\beta$ -glucosidase pode também ser inibida pelo seu substrato, celobiose (LADISCH et al., 1983).

Sabe-se que a celobiose acumulada atua como repressora das glucanases, a adição de  $\beta$ -glucosidase (celobiase) resulta em maior produção de glicose. Todavia, a glicose inibe a ação da  $\beta$ -glucosidase, o que foi sugerido para ser diminuído este efeito é o uso de celobiase de outra espécie fúngica, não tão sensível à repressão catabólica (REGULY, 1996). Sukumaran et al. (2009) conseguiram as maiores sacarificações empregando a proporção de celulase suplementada com  $\beta$ -glucosidase (10:1), quando comparada (8:1) na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Ortega et al. (2001) observaram que a liberação de açúcares redutores dobrou quando a concentração de celulasas foi quadruplicada, e a presença de exógenos de  $\beta$ -glucosidase nas reações causou um aumento na produção de glicose. Também notaram que os maiores conteúdos de açúcares fermentescíveis foram obtidos após 24 h de reação e pH ácido em torno de 5 para sacarificação da celulose.

Um dos organismos mais extensivamente estudados para a produção de complexos celulolíticos é o fungo *Trichoderma reesei*, por ser considerado o melhor microrganismo produtor de celulasas, as quais podem quebrar as ligações glicosídicas



$\beta$ -1,4 presentes na celulose ou derivados de celulose. Além disso, essas enzimas são mais atuantes sobre a celulose cristalina, mais resistente aos inibidores químicos e estáveis em reatores enzimáticos agitados, a pH (4,8) e temperatura de 50°C por 48 h (SOUZA e DILLON, 2007; ORTEGA et al., 2001; REGULY, 1996).

A taxa e extensão de hidrólise da celulose por enzimas celulásicas são influenciadas pelos substratos e enzimas, incluindo a heterogeneidade da reação, onde tem a ação de uma enzima líquida agindo em um substrato sólido. Então, uma agitação adequada é exigida para assegurar o contato suficiente entre o substrato e enzimas e promover transferências de calor e de massa dentro do recipiente da reação. Estudos mostraram que a alta velocidade de agitação (150 min<sup>-1</sup>) produz um maior rendimento final em açúcares durante a hidrólise enzimática do polímero de celulose (INGESSON et al., 2001).

A alta concentração de substrato impede a transferência da celulase, de forma que a enzima não entra em contato suficientemente com o substrato, no qual acaba afetando a hidrólise da celulose (CAO e TAN, 2002). Ingesson et al. (2001) verificaram que o aumento da concentração de substrato para 7,5% (p/v) ocasionou uma redução na taxa inicial de hidrólise, devido a formação de produtos inibitórios e limitações de transferência de massa dentro da mistura da reação em consequência da alta viscosidade do meio.

A hidrólise enzimática apresenta grande potencial em virtude das características como especificidade da reação; não gera compostos tóxicos; ausência da formação de produtos secundários como inibidores da fermentação alcoólica; a reação ocorre em condições suaves e não requer altas pressões, temperaturas e equipamentos anticorrosivos (BASTOS, 2007). Além disso, as enzimas são catalisadores biológicos, constituídas de moléculas de proteínas, produzidas por células vivas. A utilização de enzimas nas indústrias tem viabilizado economicamente diferentes processos tecnológicos sob condições amenas de temperatura e pressão, além de diminuir a poluição ambiental.

### 3.10 Fermentação alcoólica

Bioquimicamente, a fermentação é uma manifestação fisiológica da célula viva, podendo ser definida como desassimilação (catabolismo de matéria orgânica - carboidratos, gorduras, proteínas) através de reações acopladas, catalisadas por enzimas intra e extracelulares, acarretando formação de substâncias intermediárias

dos produtos finais da oxidação biológica total; ou, então, derivados dessas substâncias. No sentido tecnológico, fermentação significa todo processo em que microrganismos atuam sobre substratos orgânicos, através de suas enzimas, produzindo determinadas substâncias ou substratos modificados, de utilidade para o homem (REGULY, 1996).

A via fermentativa é a maneira mais importante para a obtenção do álcool etílico no Brasil. Um dos fatores é sua economia de obtenção, pois existe um grande número de matérias-primas naturais em todo o país, devido suas distribuições geográficas incluindo diversos tipos de climas e solos. Na obtenção do álcool por via fermentativa, distinguem-se três fases: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação (LIMA et al., 2001).

O preparo do substrato, as operações dessa fase diferem conforme as fontes de carboidratos direta ou indiretamente fermentescíveis. A primeira apenas requer um ajuste da concentração do açúcar e da reação do meio, enquanto as demais necessitam de uma prévia conversão do substrato antes da fermentação (MENEZES, 1980).

A fermentação é um processo comum a todos os substratos açucarados, cujo princípio é a transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono com algumas variações entre os processos.

Na destilação, separa-se o etanol do substrato fermentado, sob a forma de mistura hidroalcoólica, impurificada com aldeídos, ésteres, álcoois superiores e ácidos orgânicos e após separara-se as impurezas do etanol (LIMA et al., 2001).

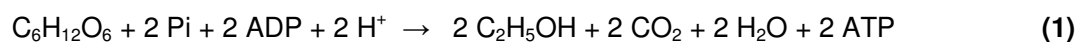
A transformação do açúcar (glicose) em etanol e  $\text{CO}_2$ , envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns estimulam e outros reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (LIMA et al., 2001).

A regulação da produção de etanol em nível metabólico é complexa e dependem da concentração instantânea de substrato, produto, oxigênio e temperatura, que afetam o crescimento, viabilidade e produtividade (PEREIRA JR., 1991). As reações incluem transferência de fosfato, oxidação-redução, descarboxilação e isomerização, além de outras; sendo um processo de oxidação-redução

intramolecular, anaeróbico e exotérmico. Esquemáticamente, a reação se desenvolve como segue:

Em aerobiose, há oxidação total da glicose:  $C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$ , que, na prática, diminui o rendimento em álcool, ao mesmo tempo em que, pelo maior aproveitamento da energia proveniente da oxidação da glicose, há maior produção de células de leveduras (LIMA et al., 2001).

Em condições anaeróbicas, as reações enzimáticas, desde a glicose até ácido pirúvico, ocorrem no citoplasma celular. Este é o meio utilizado pelas células de *Saccharomyces cerevisiae* para a obtenção de energia, sequência denominada Emden-Meyerhof-Parnas (EMP). Entre o ácido pirúvico e o etanol duas reações ocorrem: na primeira, o ácido pirúvico sofre descarboxilação (através da enzima piruvato-descarboxilase), com formação de acetaldeído e gás carbônico, reação essencialmente irreversível. Em seguida, o acetaldeído é reduzido a etanol, através da enzima álcool-desidrogenase cujo poder é fornecido pela coenzima  $NADH + H^+$  (LEHNINGER et al., 1993; PEREIRA JR., 1982; AMORIM, 1977). A reação global da fermentação alcoólica está representada pela Equação 1:



Ressalta-se que  $NAD^+$  e  $NADH$  não aparecem nesta equação, mesmo sendo cruciais para a reação global.  $NAD^+$  gerada na redução de acetaldeído a etanol é consumida na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato. Assim, não há um resultado líquido de oxidação-redução na conversão da glicose a etanol (STRYER, 1995). Nesta equação verifica-se que há um ganho líquido de 2 moles de ATP por mol de glicose metabolizada. Pela estequiometria da reação, para 1 g de glicose metabolizada, são produzidos 0,51 g de etanol e 0,48 g de gás carbônico.

Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar produtos secundários da fermentação, resultando num rendimento de 95% em etanol, conforme já observado por Pasteur em condições adequadas de fermentação (com mostos sintéticos). Entretanto, em condições industriais, nas quais fatores químicos, físicos e microbiológicos afetam a levedura, rendimentos de 90% normalmente são obtidos, os que implicam em desvios de 10% do açúcar processado para a formação de outros produtos que não o etanol (LIMA et al., 2001).

### 3.10.1 Leveduras

As leveduras são agentes biológicos ativos responsáveis pela fermentação alcoólica e, por isso, a escolha da linhagem apropriada é de importância fundamental para o êxito da fermentação. As leveduras podem ser definidas como fungos especializados, monocelulares, aclorofilados, heterotróficos, unicelulares e eucarióticos. Do aspecto das exigências nutricionais esse grupo situa-se entre aqueles que se desenvolvem em substratos mais simples, constituídos por fontes de carbonos e sais minerais, e aqueles que exigem meios mais complexos (SCHMIDELL et al., 2001).

Convém ressaltar que a levedura *Saccharomyces* é um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de ajustar-se metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformado em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> em anaerobiose, processo denominado de fermentação alcoólica. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica da glicose obtida da hidrólise dos carboidratos é um processo completamente estabelecido e, a levedura *Sacharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais apropriado, visto que seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um processo de seleção natural, apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica (ZHU et al., 2005). Desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados a fermentação acontece sem maiores problemas. Quanto à fermentação das pentoses poucos microrganismos possuem a capacidade de transformá-las em etanol. Três espécies de leveduras foram identificadas como as de maior potencial para a fermentação alcoólica das pentoses: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, com desempenho muito limitado. O metabolismo das pentoses exige a presença de um nível mínimo de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado. Estas cepas apresentam baixa tolerância ao etanol e aos ácidos alifáticos e, por isso, alternativas para a seleção de mutantes mais resistentes e a fusão de protoplastos vêm sendo desenvolvidas (ROSSELL, 2007).

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundário (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa.

As leveduras são mesófilas, com temperaturas ótimas para a produção de etanol na faixa de 26 a 35°C (MORAES, 2001). Temperaturas inferiores ao limite retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam aumento na velocidade da fermentação (a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol), na evaporação do álcool e favorecimento do aparecimento de contaminações. Para uma temperatura adequada, esta deve ser mantida por meio de dispositivos de resfriamento (REGULY, 1996).

Aumentando a concentração de açúcares, eleva-se a velocidade de fermentação, produtividade e dentro de certos limites, acarreta-se menores crescimento da levedura e menor formação de glicerol por unidade de substrato processado. Entretanto, elevados teores de açúcares aumentam o estresse osmótico à levedura (LIMA et al., 2001).

A *Saccharomyces cerevisiae* deve apresentar como características altas velocidades de fermentação, tolerância ao etanol, resistência à acidez, temperatura e elevado rendimento (ARAUJO, 1978).

As fermentações desenvolvem-se em pH entre 4 e 5, iniciando com valores baixos e finalizando entre 3,5 e 4. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de restringir o crescimento da levedura, com a conseqüente redução da produção de glicerol, ao mesmo tempo em que reduz a contaminação bacteriana. Entretanto, fermentações alcoólicas desenvolvem-se bem em níveis mais elevados, em substratos de alto poder tampão (MENEZES, 1980).

A quantidade e a necessidade de se adicionar ou não elementos nutricionais, outros elementos corretivos depende do tipo do mosto. Na fermentação alcoólica a fonte de carbono é proporcionada pelo carboidrato. As fontes de nitrogênio e fósforo também são imprescindíveis à fermentação, e como os caldos de cana e de sorgo e a maioria dos hidrolisados amiláceos ou celulósicos são carentes desses elementos é necessário a adição de sais desses elementos, como sulfato de amônio e

superfosfato (MENEZES, 1980).

O processo fermentativo pode ser inibido não só pelos seus próprios produtos como etanol, como por diferentes substâncias que podem ou deliberadamente estarem presentes nos mostos. Assim, alguns minerais como potássio e cálcio podem se apresentarem em quantidades excessivas que acarretam efeitos negativos à fermentação (REGULY, 1996).

As maiores concentrações de levedura permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e com maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do microrganismo (LIMA et al., 2001).

Algumas leveduras são selecionadas com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação. O preparo do inóculo é uma etapa complexa, onde o mesmo pode ser definido como uma quantia de células suficiente para dar início a um processo fermentativo de forma rápida e econômica.

Partindo-se de tubos de culturas selecionadas, faz-se a inoculação subsequente de volumes de meio em quantidades e concentrações crescentes, na proporção de 1:5 ou 1:10, até atingir o volume útil da fermentação (LIMA et al., 2001).

#### 4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi dividido em três artigos para melhor compreensão. No primeiro artigo estudou-se a sacarificação ácida de palha e casca de arroz para produção de bioetanol.

Para comparar a sacarificação química com a biológica realizou-se um estudo de hidrólise enzimática de palha e casca de arroz, empregando a enzima celulase suplementada com  $\beta$ -glucosidase, o qual deu origem ao segundo artigo.

Após avaliação dos melhores resultados de sacarificação das matérias-primas, o hidrolisado foi fermentado empregando o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de produzir bioetanol resultando no terceiro artigo desta dissertação.

#### 4.1 SACARIFICAÇÃO ÁCIDA DE PALHA E CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

##### RESUMO

Resíduos agroindustriais como a palha e a casca de arroz são renováveis e abundantes, constituídos principalmente de carboidratos que podem ser utilizados em diversos processos biotecnológicos, desde que sejam previamente hidrolisados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura e concentração de substrato na conversão de açúcares indiretamente para diretamente fermentescíveis através da hidrólise ácida de palha e casca de arroz. O planejamento composto central rotacional foi empregado e as variáveis independentes estudadas foram a concentração de substrato, que variou de 0,2 a 5,8% (p/v), temperatura da reação entre 72 e 128°C e a resposta foi a concentração de açúcares redutores (AR) formados, utilizando como agente catalisador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%, p/p). Os maiores valores de AR foram registrados no primeiro minuto de reação. Quando houve aumento da temperatura, verificou-se um efeito negativo sobre a concentração de AR, tanto para a casca como para a palha de arroz. O máximo rendimento em AR (55,12%) foi obtido através da sacarificação da palha de arroz, sob as condições ótimas de 72°C e concentração de substrato 3% (p/v).

Palavras-chave: Arroz; Casca; Hidrólise Ácida; Palha; Planejamento Experimental

##### ABSTRACT

Agroindustrial and agricultural wastes as straw and hulls rice are renewable and abundant, constituted mainly of carbohydrates that can be used in several biotechnological processes, since it previously hydrolyses. In this work, the main objective was to study the effect of enzyme and substrate concentration in the indirectly for directly fermentable conversion sugars by acid hydrolysis of straw and hulls rice. A central composite rotatable design was used and independent variables studied were substrate concentrations (0.2 to 5.8%, w/v) and temperature reaction (72 and 128°C), on the response concentration sugars reducing obtained (AR) using as catalytic agent H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%, p/p). The largest AR values were registered in the first minute reaction. When the temperature increased a negative effect was verified on AR concentration, so hulls as straw rice. The maximum AR yield (55.12%) was achieved from saccharification of straw rice under optimum conditions of 72°C and substrate concentration 3% (w/v).

Keywords: Acid Hydrolysis; Experimental Design; Hulls; Rice; Straw



## 1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos grãos de maior relevância em termos de valor econômico, e também é o cultivo alimentar de grande importância em muitos países em desenvolvimento. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050 haverá uma necessidade para atender o dobro desta população (EMBRAPA, 2005).

A produção mundial de arroz na última safra atingiu 625.103,5 milhões de toneladas, onde o Brasil ocupou o nono lugar com 12.059,6 milhões de toneladas. A Região Sul do país é a maior produtora, contribuindo com 71%, sendo o Rio Grande do Sul o principal estado, detendo aproximadamente 61% do total produzido (CONAB, 2009; IRGA, 2008).

Durante o processo de beneficiamento do arroz tem-se como resíduo a casca, que corresponde, em média, a 23% do peso total do grão, com geração anual de 123,69 milhões de toneladas em todo o planeta. Este resíduo apresenta alta dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, levando a obtenção de produtos de baixa propriedade nutritiva, boa resistência ao desgaste e muitas cinzas (SAHA e COTTA, 2008; DELLA et al., 2001). Normalmente, é incinerada para gerar energia na própria indústria, resultando em cinzas que são descartadas nas lavouras como fertilizantes. Porém, as cinzas carregam carbono residual da combustão, provocando poluição no meio ambiente e problemas de saúde ao homem, já que são tóxicas. Outro destino comum da casca é o descarte em lavouras e fundos de rios, liberando gás metano, contribuindo para o aquecimento global (DELLA et al., 2006; FOLETTO et al., 2005).

A palha de arroz é um dos resíduos agrícolas mais abundantes e desperdiçados, os quais são produzidos anualmente 731 milhões de toneladas (KARIMI et al., 2006). Este material lignocelulósico é geralmente descartado na própria lavoura, onde grandes acúmulos causam mudanças no ecossistema (SUN et al., 2000) ou, então, efetuam-se queimadas como forma de eliminação provocando danos à saúde e a natureza (JACOBS et al., 1997).

Dentro deste contexto e em virtude da preocupação em preservar o meio ambiente contra o despejo de resíduos poluidores e a necessidade de ampliação da oferta de matérias-primas para produção de bioetanol, sem pressionar a área plantada para produção de alimentos, torna-se interessante motivar o aproveitamento desses resíduos agroindustriais, uma vez que são constituídos principalmente de carboidratos polimerizados, dos quais a celulose é o mais abundante, compreendendo cerca de

dois terços de toda matéria orgânica existente no planeta (ZHAO et al., 2007).

No entanto, para que esses resíduos sejam aproveitados para a obtenção de bioetanol ou em outros processos biotecnológicos, inicialmente eles devem ser hidrolisados, visto que na forma macromolecular não são assimiláveis (TAMANINI e HAULY, 2004), pois 70% da celulose apresenta-se na forma cristalina e a lignina juntamente com a hemicelulose formam um complexo, do qual é difícil isolar a celulose. Para que esta seja utilizada pelos microrganismos nos processos fermentativos, inicialmente é necessário converter estes carboidratos indiretamente para diretamente fermentescíveis. Esta conversão é chamada de sacarificação e pode ser feita através da hidrólise química.

A despolimerização total desses polissacarídios origina a glicose e outros monossacarídios, em especial pentoses da hemicelulose. A sacarificação dos carboidratos com ácidos mais concentrados, sob aquecimento ou pressão, é um processo homogêneo e se desenvolve à velocidade uniforme, porém a hidrólise pode ser muito lenta em temperaturas baixas, enquanto que as altas temperaturas podem favorecê-la. Além disso, a proporção de substrato (material lignocelulósico) e agente catalisador pode influenciar na conversão dos polissacarídeos à açúcares menores (REGULY, 1996).

O objetivo deste trabalho foi estudar a conversão de açúcares indiretamente para diretamente fermentescíveis da palha e casca de arroz através de hidrólise ácida empregando a metodologia de superfície de resposta.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

As matérias-primas utilizadas foram palha e casca de arroz (BR IRGA 410), originadas do município de Santa Vitória do Palmar-RS.

### **2.2 Preparo das amostras**

As matérias-primas foram moídas em moinho de facas (Wiley Mill USA-Arthur H.Thomas CO), para possibilitar redução da cristalinidade da celulose. As amostras foram peneiradas em granulometria de 0,850 mm (Tyler 20) (SUN et al., 2000).

### 2.3 Caracterização química da matéria-prima

As determinações de umidade e cinzas foram realizadas segundo metodologia oficial da AOAC (2000). Cinzas foram determinadas por método gravimétrico em mufla (modelo Q318M24, Quimis) 550-600°C e umidade por método gravimétrico em estufa (modelo MCS314, DeLeo) 105°C.

O conteúdo de lignina total foi obtido a partir da soma dos valores da concentração de lignina insolúvel e solúvel, de acordo com ASTM Methods (1956) e o teor de holocelulose como descrito por Browning (1963).

### 2.4 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores (AR) foram quantificados nas matérias-primas e nos hidrolisados pelo método espectrofotométrico (modelo 700 plus, Femto) do 3,5 dinitrossalicílico proposto por Miller (1959).

### 2.5 Sacarificação

A sacarificação foi realizada em um reator de vidro, do tipo tribular nas seguintes condições: solução de ácido sulfúrico concentrado 72% (p/p) como agente catalisador, agitação 150 min<sup>-1</sup>, pressão atmosférica, período de reação total 120 min, temperatura (T) constante e concentração de substrato (S) em % (p/v).

Em cada ensaio, retirou-se alíquota do hidrolisado no primeiro minuto de reação e, em seguida, a cada 15 min até completar 2 h. Na alíquota retirada adicionou-se água destilada a 50°C (1:5), e após a amostra foi homogeneizada com agitação (modelo 753A, Fisatom) de 150 min<sup>-1</sup> por 5 min. A seguir, o hidrolisado foi neutralizado com NaOH 3,5 M, para cessar a reação, centrifugado (modelo DCS-16 RV, Presvac) a 3080g e determinou-se AR.

Para o estudo da hidrólise ácida empregou-se um planejamento composto central rotacional com dois fatores de estudo segundo Barros Neto et al. (1996), constituído por quatro ensaios lineares nos níveis -1 e +1, quatro ensaios axiais ( $\alpha = \pm 1,41$ ) e três ensaios no ponto central, totalizando 11 experimentos. As variáveis independentes estudadas foram concentrações de substrato (S), que variou de 0,2 a 5,8% (p/v) e temperatura (T) da reação variando, entre 72 e 128°C, conforme a Tabela 1. A resposta do planejamento foi a concentração de açúcares redutores formados

(%).

**Tabela 1:** Variáveis do delineamento composto central rotacional com seus respectivos níveis codificados e reais.

Variáveis	Níveis				
	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
S (% p/v)	0,2	1	3	5	5,8
T (°C)	72	80	100	120	128

S = concentração de substrato; T = temperatura da reação

Os resultados foram avaliados através dos coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA), verificação dos efeitos significativos ao nível de 5% de confiança e da utilização da metodologia de superfície de resposta para otimização das condições operacionais.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização química da matéria-prima

A Tabela 2 apresenta os resultados experimentais da composição centesimal e do conteúdo de açúcares redutores da palha e casca de arroz.

**Tabela 2:** Composição centesimal e açúcares redutores (AR) das matérias-primas palha e casca de arroz, em base úmida.

Componentes (g/100g)	Palha*	Casca*
Umidade	8,60 ± 0,16	9,81 ± 0,10
Cinzas	15,32 ± 0,02	12,42 ± 0,19
Lignina total	22,80 ± 0,10	27,20 ± 0,17
Holocelulose	53,17 ± 0,16	48,60 ± 0,30
AR	0,31 ± 0,43	0,24 ± 0,38

\*Valores médios ± desvio padrão (3 repetições)

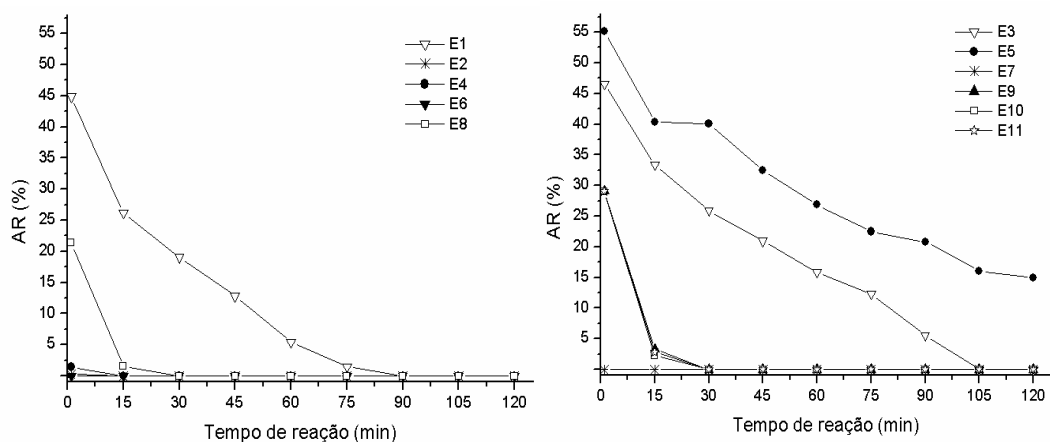
A composição química das matérias-primas diferiu ligeiramente da literatura. Mussato e Roberto (2002) encontraram valores de umidade, cinzas, lignina total e holocelulose para a palha de 5,9; 11,4; 17,2 e 65,5%, respectivamente; e Zhu et

al. (2005) obtiveram 12,8; 15,4; 13,6 e 58,2% respectivamente. Reyes et al. (1998), encontraram para casca 8,5% de cinzas; 29,4% de lignina total e 62,1% de holocelulose e no estudo de Saha e Cotta (2008) a casca de arroz apresentou 6,3% de umidade, 18,8% de cinzas, 15,5% de lignina total e 47,7% de holocelulose.

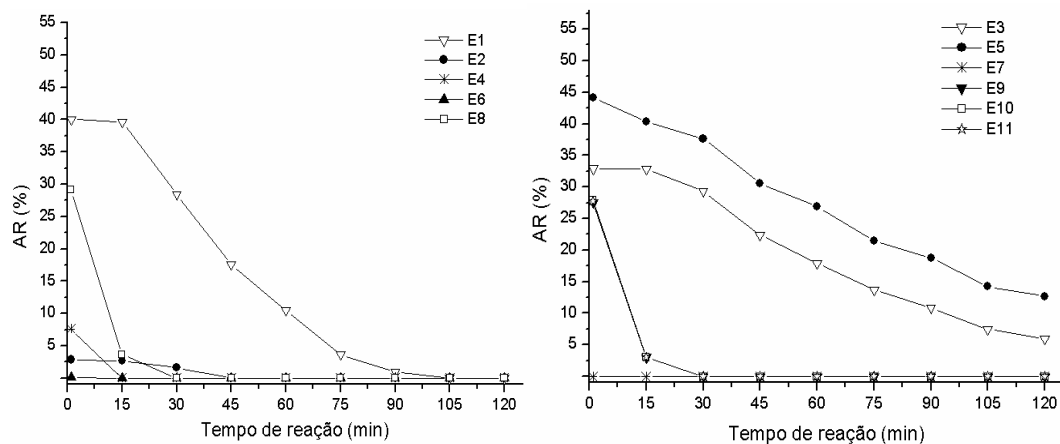
As diferenças dos resultados estão relacionadas com a variedade do arroz, o solo em que foi plantado, o clima e também dos tipos e teores de fertilizantes utilizados, entre outros (DELLA et al., 2006).

### 3.2 Sacarificação

As maiores concentrações de AR corresponderam ao primeiro minuto de reação tanto para a palha como para a casca de arroz (Figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Concentração de açúcares redutores (AR) durante o tempo de reação na hidrólise ácida da palha de arroz.



**Figura 2:** Concentração de açúcares redutores (AR) durante o tempo de reação na

hidrólise ácida da casca de arroz.

Os valores de AR nos tempos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 min apresentaram valores decrescentes e nulos ao final da reação. Isso pode ser explicado pelo fato de que a hidrólise dos carboidratos catalisada por ácidos concentrados se desenvolve como um processo homogêneo, à velocidade uniforme, conduzindo à sacarificação, isto é, até formação de glicose. Porém, a hidrólise dos carboidratos com ácidos diluídos ocorre por um processo heterogêneo, decorrente cineticamente de duas reações monomoleculares de 1º ordem, onde o rendimento em açúcar depende da relação entre a velocidade de sua formação ( $K_1$ ) e a velocidade de sua degradação ( $K_2$ ), relação  $K_1/K_2$ . Portanto, na sacarificação com ácidos diluídos não é possível chegar a um estado de equilíbrio entre o açúcar formado e o açúcar decomposto. Logo, para obter um alto rendimento em açúcar a partir dos materiais celulósicos é necessário favorecer  $K_1$  e diminuir  $K_2$ , através do aumento da temperatura e da acidez, atingindo um rendimento quantitativo da transformação da celulose em glicose.

Como a reação com ácido é espontânea, com o passar do tempo verifica-se um processo heterogêneo em que a velocidade de degradação desses açúcares aumenta e com isso surgem produtos da decomposição desses carboidratos, como por exemplo, hidroximetilfurfural oriundo da desidratação intramolecular da glicose. Por este motivo ocorre a diminuição progressiva dos AR ao longo do tempo da reação. Portanto, a eficiência da reação irá depender da ação combinada da concentração do ácido e temperatura, por um curto período (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; AGUILAR et al., 2002; REGULY, 1996).

A Tabela 3 representa o planejamento fatorial com 11 ensaios realizados para cada matéria-prima, com valores codificados, originais e AR obtidos no primeiro minuto de reação, correspondentes as maiores concentrações de açúcares redutores formados.

**Tabela 3:** Valores de açúcares redutores (AR) com 1 min de reação para palha e casca de arroz de acordo com o delimitamento composto central com pontos axiais.

Ensaio <sup>a</sup>	Valores codificados		Valores reais		AR (%) <sub>1 min de reação</sub>	
	T	S	T (°C)	S (% p/v)	Palha	Casca
E1	-1	-1	80	1	44,84	40,05
E2	+1	-1	120	1	0,26	2,90
E3	-1	+1	80	5	46,61	32,90
E4	+1	+1	120	5	1,45	7,63
E5	- $\alpha$	0	72	3	55,12	44,15
E6	+ $\alpha$	0	128	3	0	0,10
E7	0	- $\alpha$	100	0,2	0	0
E8	0	+ $\alpha$	100	5,8	21,38	29,20
E9	0	0	100	3	29,06	27,55
E10	0	0	100	3	29,04	27,97
E11	0	0	100	3	29,17	27,76

<sup>a</sup> Experimentos realizados em ordem aleatória; T = temperatura da reação; S = concentração de substrato; p= 0,05

O planejamento experimental foi analisado com os valores codificados, pois a soma dos desvios em relação a média é igual a zero. Além disso, utilizou-se o erro puro, visto que é possível avaliar a repetibilidade em um ponto, quando apresenta pequeno número de repetições (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

### 3.2.1 Análise estatística da sacarificação da palha de arroz

A partir dos coeficientes de regressão analisados (p= 0,05), o fator de interação linear entre T e S não apresentou significância estatística dentro do intervalo de confiança (95%). Então esta variável foi excluída e incorporada no resíduo total para cálculo da ANOVA e a análise foi realizada novamente, conforme a Tabela 4.

**Tabela 4:** Coeficientes de regressão e significância estatística de cada fator para os açúcares redutores da palha de arroz.

Fatores	Coeficiente de regressão	Significância estatística (p)*
Média	29,07	< 0,0001
T (L)	-20,99	< 0,0001
T (Q)	0,30	0,0095
S (L)	4,15	< 0,0001
S (Q)	-8,18	< 0,0001

\*Nível de significância de 5%; T = temperatura da reação; S = concentração de substrato; L = linear; Q = quadrático

Através da ANOVA foi verificada a significância da regressão em nível de 95% de confiança, utilizando o teste F (Tabela 5).

**Tabela 5:** ANOVA para a concentração de açúcares redutores da palha de arroz.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub> (p ≤ 0,05)	R <sup>2</sup>
Regressão	4072,56	4	1018,14	41,97	4,53	0,97
Resíduo	145,55	6	24,26			
Falta de ajuste	145,54	4				
Erro puro	0,01	2				
Total	4218,12	10				

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste de Fisher; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação

De acordo com Box e Wetz citado por Barros Neto et al. (1996), a regressão é considerada como útil para fins preditivos caso o valor  $MQ_{regressão}/MQ_{resíduo}$  seja, pelo menos, quatro a cinco vezes maior que o  $F_{tabelado}$ . O modelo apresentou regressão significativa em nível de 95% de confiança ( $F_{calculado}$  superior ao  $F_{tabelado}$ ) com R<sup>2</sup> igual a 0,97 (Tabela 5), evidenciando que o modelo explicou 97% da variação dos dados experimentais. O valor de  $F_{calculado}$  da regressão foi 9,2 vezes superior que o  $F_{tabelado}$ , indicando que o modelo é preditivo. Além disso, a média quadrática do erro puro apresentou um valor baixo (0,0049), logo o experimento foi bem controlado, isto é, os desvios padrões das respostas são pequenos.

O modelo com as variáveis que representam a concentração de AR da palha de arroz, em função da temperatura e concentração de substrato na faixa

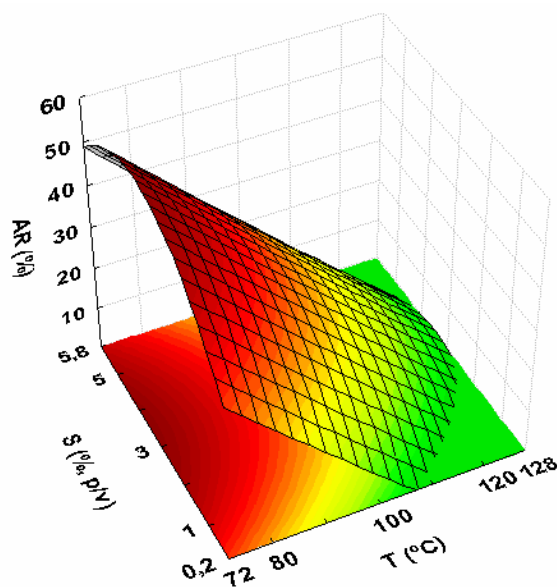


estudada, está representado pela Equação 1:

$$AR = 29,07 - 20,99*T + 0,30*T^2 + 4,15*S - 8,18*S^2 \quad (1)$$

Onde: AR = açúcares redutores (%); T = temperatura da reação (°C); S = concentração de substrato (% p/v)

Assim, o modelo foi utilizado na construção da superfície de resposta permitindo a visualização do comportamento dos hidrolisados ácidos de palha de arroz, em função das variáveis que apresentaram influência significativa sobre a variável resposta AR, mostrado na Figura 3. A 72°C e 3% de substrato foi obtida a máxima concentração de açúcares redutores (55,12%) para a palha de arroz, empregando ácido sulfúrico 72% (p/p) e 1 min de reação.

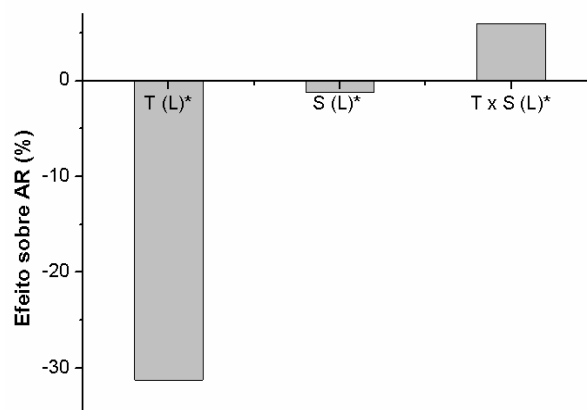


**Figura 3:** Superfície de resposta representando AR dos hidrolisados ácidos da palha de arroz. AR = açúcares redutores; T = temperatura da reação; S = concentração de substrato

O tratamento estatístico dos resultados permitiu a análise dos efeitos principais da concentração de substrato e da temperatura, sobre a concentração de açúcares redutores. Efeito negativo foi observado quando houve aumento na temperatura de 80°C para 120°C, com a concentração de açúcares redutores diminuindo 44,9%. No entanto, quando a concentração do meio aumentou de 1 para 5% (p/v), ocorreu aumento em AR da ordem de 1,5%.

### 3.2.2 Análise estatística da sacarificação da casca de arroz

Os resultados da análise estatística da concentração de açúcares redutores para a casca de arroz, apresentaram coeficientes de regressão significativos ( $p \leq 0,05$ ), porém não foi obtido modelo matemático significativo e preditivo, visto que o  $F_{\text{calculado}}$  não foi suficientemente maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ . No entanto, a análise dos efeitos foi significativa ( $p \leq 0,05$ ) para T, S e interação. Isso mostra que essas variáveis independentes, dentro das condições estudadas, apresentam também uma resposta importante à avaliação da sacarificação ácida da casca de arroz, como pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4:** Efeito da concentração de substrato e da temperatura no conteúdo de açúcares redutores (AR) dos hidrolisados ácidos da casca de arroz. \*Significativos ( $p \leq 0,05$ ); T = temperatura da reação; S = concentração de substrato; L = linear

O efeito estimado indica o quanto cada fator influi na resposta estudada, pois quanto maior o seu valor em módulo, maior é a sua influência (LOPES et al., 2007). A variável com maior efeito foi à temperatura, que apresentou efeito negativo. Quando a mesma aumentou de 80°C para 120°C ocorreu uma diminuição da resposta em 31,2%, favorecendo  $K_2$  que é a fase de despolimerização conforme visto anteriormente, ocasionando uma rápida reação de degradação dos açúcares redutores devido ao aumento da temperatura de reação.

Quando a concentração de substrato passou de 1% (p/v) para 5% (p/v), ocorreu efeito negativo, com diminuição no valor da resposta em 1,2%, indicando que incremento desta variável induziria a redução da conversão de açúcares indiretamente

para diretamente fermentescíveis. A interação entre as variáveis T e S, influenciou positivamente a quantidade de AR formados a partir dos hidrolisados, verificando-se um aumento de 5,9%.

#### 4 CONCLUSÃO

Os maiores conteúdos de açúcares redutores obtidos foram registrados no primeiro minuto de reação, demonstrando que a eficiência do processo depende da ação combinada da concentração do ácido, temperatura e do tempo de reação.

O aumento da temperatura apresentou efeito negativo na concentração de AR, causando diminuição de 44,9% e 31,2%, respectivamente, para os hidrolisados ácidos de palha e casca de arroz.

Através da sacarificação ácida da palha de arroz, verificou-se que a 72°C e concentração de substrato 3% (p/v) são obtidos os maiores valores de AR (55,12%). Portanto, esse resíduo celulósico foi o que apresentou maior conversão de açúcares indiretamente para diretamente fermentescíveis. Assim essa matéria-prima torna-se potencial para utilização em processos biotecnológicos, considerando que a partir de uma tonelada de palha podem ser produzidos 320 litros de bioetanol, uma vez que é abundante, renovável e de baixo custo.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 4, p. 309-318, 2002.

**AOAC - Association of Official Analytical Chemists**. 13<sup>a</sup> ed., Arlington: A.O.A.C. 1141 p., 2000.

**ASTM Methods**. Standard test methods for lignin in wood. D271-48, 1956.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed., Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 299 p., 1996.

BROWNING, B. L. **The chemistry of wood**. New York: Interscience, 689 p., 1963.

**CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (safra 2008/2009). Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em 28 de janeiro de 2009.

DELLA, V. P.; HOTZA, D.; JUNKES, J. A.; OLIVEIRA, A. P. N. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DELLA, V. P.; KUHN, I.; HOTZA, D. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 778-782, 2001.

DEMIRBAS, A. H.; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing countries. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2386-2398, 2007.

**EMBRAPA** - Clima Temperado. Cultivo do arroz irrigado no Brasil: importância econômica agrícola e alimentar do arroz. novembro, 2005. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em 8 de janeiro de 2009. ISSN 1806-9207.

FOLETTTO, E. L.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL JR., U. L.; JAHN, S. L. Aplicabilidade das Cinzas da Casca de Arroz. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

**IRGA** - Instituto Rio Grandense do Arroz. Produção mundial de arroz deve atingir 625 milhões de toneladas, 2008. Disponível em: <[www.irga.rs.gov.br](http://www.irga.rs.gov.br)>. Acesso em 28 de janeiro de 2009.

JACOBS, J.; KREUTZER, R.; SMITH, D. Rice burning and asthma hospitalizations, butte country, California, 1983-1992. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 980-985, 1997.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid

pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 138-144, 2006.

LOPES, A. S.; ORMENESE, R. C. S. C.; MONTENEGRO, F. M.; FERREIRA JÚNIOR, P. G. Influência do uso simultâneo de ácido ascórbico e azodicarbonamida na qualidade do pão francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 307-312, abril-junho, 2007.

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.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p. 34-39, setembro-outubro, 2002.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos - Fundamentos, matérias-primas agrícolas, processos e produtos**. v. 1, ed. Universitária – UFPEL, Pelotas – RS, 1996.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1º ed. Casa do Pão Editora, Campinas, SP, 2005.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 111-122, 2000.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção

biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, outubro-dezembro, 2004.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 235-241, 2007.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S.; ZHAO, Y.; TU, S.; XUE, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. **Biosystems Engineering**, v. 92, n. 2, p. 229-235, 2005.

## 4.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PALHA E CASCA DE ARROZ

### RESUMO

A hidrólise enzimática dos materiais celulósicos como a palha e casca de arroz é essencial para produção de açúcares como glicose, tornando esses resíduos, matérias-primas potenciais para o desenvolvimento de produtos de interesses comerciais. No entanto, alguns fatores influenciam a sacarificação enzimática, estando associados às características dos substratos e ao comportamento das enzimas durante a reação. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da temperatura e das concentrações de enzima e substrato durante a hidrólise enzimática de palha e casca de arroz. Um pré-tratamento nas matérias-primas foi realizado, a fim de romper o complexo lignocelulósico e obter um substrato deslignificado. Os hidrolisados enzimáticos foram produzidos utilizando as enzimas comerciais celulase NS 50013 e  $\beta$ -glucosidase NS 50010 (10:1), pH 4,8, agitação a  $150 \text{ min}^{-1}$  por 48 h. Para o estudo da sacarificação enzimática empregou-se um delineamento composto central rotacional com três fatores de estudo, onde as variáveis estudadas foram a temperatura da reação, a concentração de substrato e a concentração de enzima e a resposta do planejamento foi o conteúdo de açúcares redutores (AR). Os resultados mostraram que a concentração de enzima foi a variável que apresentou maior influência na formação de AR para ambas as matérias-primas. O maior rendimento em AR foi alcançado com a palha de arroz (66,90%).

Palavras-chave: Deslignificação; Hidrólise Enzimática; Resíduos Agroindustriais

### ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of the cellulosic materials as straw and hulls rice is essential for sugars production as glucose, becoming those residues, potential raw materials for the development products of interests commercial. However, some factors influence the enzymatic saccharification, associated to the substrates characteristics and behavior of enzymes during the reaction. The objective this work was to study the effect of the temperature and enzyme and of substrate concentrations in the enzymatic hydrolysis of hulls and straw rice. A pretreatment in the raw materials was used in order to break the lignocellulosic compound and obtain a substrate the lignified. The enzymatic hydrolysates were produced using the commercial enzymes cellulase NS 50013 and  $\beta$ -glucosidase NS 50010 (10:1), pH 4.8, stirring  $150 \text{ min}^{-1}$  for 48 h. For to study the enzymatic hydrolysis a factorial design was used, and independent variables studied were temperature reaction (T) substrate concentration and enzyme concentration, and the plan response was reducing sugars (AR). The results showed that enzyme concentration was the variable that presented larger influence on AR obtaining of the hydrolysates to both raw materials. However, the largest yield in AR (66.90%) was obtained with rice straw.

Keywords: Agroindustrial and Agricultural Wastes; Enzymatic Hydrolysis; Delignification

## 1 INTRODUÇÃO

Diante da pressão política e social para a redução das cargas poluentes das atividades industriais e ao mesmo tempo a busca por energias que provêm de fontes renováveis, os materiais lignocelulósicos apresentam-se como matéria-prima alternativa para a produção de alimentos, energia e produtos químicos, substituindo total ou parcialmente as fontes fósseis de combustíveis.

Os materiais celulósicos representam a maior fonte de carbono e energia renovável do planeta, pois 50% da biomassa terrestre é constituída desses compostos orgânicos (LEE, 1997). A cada ano são acumuladas na natureza 854 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos como a palha e casca de arroz, gerados através da agricultura e outras práticas. Essas biomassas apresentam elevado potencial para geração de energia e produtos de interesse comercial, pois são constituídas principalmente de carboidratos polimerizados, dos quais a celulose é o mais abundante (SAHA e COTTA, 2008; KARIMI et al., 2006).

Anualmente são fotossintetizadas 150 bilhões de toneladas desse biopolímero natural, que hidrolisado libera açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados para a produção de combustíveis e insumos químicos, uma vez que esse carboidrato é um homopolissacarídeo linear formado por monômeros de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 (ZHAO et al., 2007; HECK et al., 2002). A sacarificação da celulose pode ser realizada através da ação de três grupos de enzimas que atuam sinergicamente, onde sua conversão processa-se em condições moderadas e não gera produtos de degradação de açúcares. Este complexo enzimático é constituído por endo-1,4- $\beta$ -glucanases, as quais têm a propriedade de romper a molécula de celulose ao acaso, liberando fragmentos menores, possibilitando a formação de cadeias de celotriose e celobiose; as exo-1,4- $\beta$ -glucanases hidrolisam pelas extremidades os fragmentos de menor massa molecular separando as moléculas de celobiose; e as 1,4- $\beta$ -glucosidases que hidrolisam a celobiose até glicose como produto final (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007; REYES et al., 1998).

No entanto, a bioconversão da celulose em glicose é um processo complexo, porque suas cadeias estão agregadas na forma de fibrilas que juntamente com as pontes de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intra e intercadeias, resultam na cristalinidade da mesma, tornando-a impenetrável à água (TAMANINI e HAULY, 2004; ORTEGA et al., 2001). Além disso, a hidrólise enzimática da celulose é



dificultada por ela se apresentar como polissacarídeo de sustentação dos vegetais em combinação com hemicelulose e a lignina (HECK et al., 2002). As hemiceluloses são compostas por pentoses e hexoses, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos, grupos acetila e desoxihexoses, açúcares esses que podem estar na forma de homopolímeros ou heteropolímeros. A lignina é um polímero vegetal derivado dos álcoois hidroxicinâmicos p-coumarílico, coniferílico e sinapílico, também chamados de monolignóis, que atua como ligante das fibras de celulose, contribuindo para a resistência e rigidez dos tecidos dos vegetais (TAMANINI e HAULY, 2004; FERRAZ, 2001). Assim, a hemicelulose forma a partir da fotossíntese uma matriz estruturada com as fibrilas da celulose, sendo a lignina a substância de cementação (REGULY, 1996).

A maior dificuldade para o aproveitamento desses resíduos está representada pela barreira física formada pela lignina-hemicelulose-celulose, impedindo o aproveitamento da celulose nativa (ZHU et al., 2005). Entretanto, existem pré-tratamentos (deslignificação) para ruptura do complexo lignocelulósico, com o objetivo de diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulasas (MARTÍN et al., 2002; REYES et al., 1998). A utilização dessas biomassas em processos biotecnológicos, além de exigir a etapa de deslignificação para liberação da fração celulósica para posterior sacarificação, depende de fatores importantes como a concentração de substrato, enzimas, pH, temperatura, tempo de reação e agitação durante a hidrólise (SAHA e COTTA, 2008; REGULY, 1996).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da temperatura e das concentrações de enzima e substrato durante a sacarificação enzimática de palha e de casca de arroz.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima**

As matérias-primas palha e casca de arroz (BR IRGA 410) foram originadas do município de Santa Vitória do Palmar-RS, moídas em moinho de facas (Wiley Mill USA-Arthur H.Thomas CO) e peneiradas até uma granulometria de 0,850 mm (Tyler 20) (SUN et al., 2000).

## 2.2 Pré-tratamento

Realizou-se um estudo de deslignificação como descrito por Sukumaran et al. (2009), empregando pressão de 1,1 atm manométrica a 121°C durante 60 min em autoclave (modelo AV-137, Phoenix), onde a concentração de palha ou de casca de arroz variou em 5, 10 e 20% (p/v); as concentrações da solução de NaOH foram 0,1 e 0,25 M; e o tempo de repouso da matéria-prima em contato com o reagente variou em 24 e 48 h.

Após o término da reação, a fração sólida foi lavada com água destilada até atingir a neutralidade, filtrada e seca em estufa (modelo MCS314, DeLeo) a 80°C por 30 h. Nas soluções de lavagem foram determinados o conteúdo de açúcares redutores e de lignina extraída, a partir da precipitação com HCl 2 M, até valores de pH 2,0 conforme indicado por Reguly (1996). Esses resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido por teste de comparação entre médias ao nível de 5% de significância. Antes de realizar ANOVA foi verificado se os dados eram normais (teste Kolmogorov-Smirnov) e se suas variâncias apresentavam-se iguais (homocedasticidade) analisada pelo teste Levene (TRIOLA, 1999).

## 2.3 Caracterização química da matéria-prima e do substrato pré-tratado

As determinações de umidade e cinzas foram realizadas segundo metodologia oficial da AOAC (2000), cinzas foram determinadas por método gravimétrico em mufla (modelo Q318M24, Quimis) 550-600°C e a umidade por método gravimétrico em estufa (modelo MCS314, DeLeo) 105°C.

O conteúdo de lignina total foi obtido a partir da soma dos valores da concentração de lignina insolúvel e solúvel, de acordo com ASTM Methods (1956) e o teor de holocelulose como descrito por Browning (1963).

## 2.4 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores (AR) foram quantificados nas soluções de lavagem e nos hidrolisados, respectivamente, pelo método espectrofotométrico (modelo 700 plus, Femto) do 3,5 dinitrossalicílico proposto por Miller (1959).

## 2.5 Enzimas

Foram utilizadas as enzimas comerciais celulase (NS 50013) produzida pelo *Trichoderma reesei* e  $\beta$ -glucosidase (NS 50010) do *Aspergillus niger*, suplementadas na proporção (10:1), doadas pela Novozymes Latin America LTDA. A atividade das enzimas foram 47 FPU/mL para a celulase e 168 CBU/mL para a  $\beta$ -glucosidase, determinadas de acordo com os procedimentos padrões recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987).

## 2.6 Hidrólise enzimática

A sacarificação do substrato pré-tratado foi realizada em solução tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,8), sob agitação constante a  $150 \text{ min}^{-1}$  em shaker orbital (modelo Certomat BS-1, B. Braun Biotech International), por um período de reação total de 48 h, temperatura (T) constante, concentração de substrato (S) em % (p/v), e enzima (E) em % (p/p).

Em cada ensaio, retirou-se alíquota do hidrolisado nos tempos 0,5; 4; 8; 12; 24; 36 e 48 h de reação e adicionou-se NaOH 0,05 M (1:1), para cessar a reação. A seguir o hidrolisado foi centrifugado (modelo DCS-16 RV, Presvac) a 3080g, durante 10 min para posterior determinação de açúcares redutores no sobrenadante.

Para o estudo da hidrólise enzimática empregou-se um planejamento fatorial completo com três fatores de estudo, segundo Barros Neto et al. (1996), constituído por oito ensaios lineares nos níveis -1 e +1, seis ensaios axiais ( $\alpha = \pm 1,68$ ) e três ensaios no ponto central, totalizando 17 experimentos. As variáveis independentes estudadas foram a temperatura (T) da reação variando entre 41,6 e 58,4°C, a concentração de substrato (S) que variou de 0,8 a 9,2% (p/v) e a concentração de enzima (E) entre 0,35 e 4,05% (p/p), conforme a Tabela 1. A resposta do planejamento foi a concentração de açúcares redutores.

**Tabela 1:** Valores das variáveis do delineamento composto central rotacional com seus respectivos níveis codificados e reais.

Variáveis	Níveis				
	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
S (% p/v)	0,8	2,5	5	7,5	9,2
E (% p/p)	0,35	1,1	2,2	3,3	4,05
T (°C)	41,6	45	50	55	58,4

S = concentração de substrato; E = concentração de enzima; T = temperatura da reação

Os resultados foram avaliados através dos coeficientes de regressão, análise de variância (ANOVA), verificação dos efeitos significativos ao nível de 5% de confiança e da utilização da metodologia de superfície de resposta para otimização das condições operacionais.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Preparo e pré-tratamento da matéria-prima

O pré-tratamento nas matérias-primas foi empregado com o objetivo de romper o complexo lignocelulósico e obter um substrato deslignificado, o qual foi posteriormente utilizado para os ensaios de hidrólise enzimática.

A Tabela 2 apresenta o tratamento empregado para o estudo de deslignificação da palha de arroz. A análise estatística mostrou que os resultados foram normais segundo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedásticos de acordo com teste de Levene.

Através da ANOVA verificou-se que não existe diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre utilizar a concentração de NaOH de 0,1 e 0,25 M e, entre os tempos de repouso de 24 e 48 h e, entre as concentrações de palha de arroz.

**Tabela 2:** Concentrações de lignina e açúcares redutores (AR) nas soluções de lavagem da palha de arroz.

Concentração de NaOH (M)	Tempo de repouso (h)	Concentração de palha (% p/v)	Lignina extraída (%)	AR extraídos (%)
0,1	24	20	30,20	0,25
		10	49,50	0,39
		5	44,40	0,44
	48	20	25,14	0,23
		10	30,20	0,31
		5	48,91	0,53
0,25	24	20	46,40	0,33
		10	49,72	0,78
		5	48,97	0,44
	48	20	31,55	0,23
		10	50,53	1,0
		5	49,84	0,96

Os dados foram normais segundo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedásticos de acordo com Levene para a casca de arroz. Com isso foi possível realizar a ANOVA, onde se constatou que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre utilizar a concentração de NaOH 0,1 e 0,25 M, e entre os tempos de repouso de 24 e 48 h, porém existe diferença significativa entre as concentrações de cascas 5 e 20% (p/v) empregadas, analisados através do teste de contraste de médias, verificado por Tukey (Tabela 3).

**Tabela 3:** Concentrações de lignina e açúcares redutores (AR) quantificados nas soluções de lavagem da casca de arroz.

Concentração de NaOH (M)	Tempo de repouso (h)	Concentração de casca (% p/v)	Lignina extraída (%)	AR extraídos (%)
0,1	24	20	2,89	0,03
		10	22,30	0,18
		5	16,97	0,26
	48	20	3,33	0,03
		10	10,75	0,16
		5	16,42	0,29
0,25	24	20	2,84	0,06
		10	20,03	0,32
		5	24,94	0,41
	48	20	7,38	0,03
		10	15,47	0,26
		5	25,04	0,44

A partir da análise estatística, o processo escolhido para o pré-tratamento das matérias-primas foi o que empregou menor tempo (24 h) e quantidade de NaOH (0,1 M) afim de evitar aumento nos custos do processo. Foi verificada uma redução de aproximadamente 45% e 20% na quantidade de lignina removida para a palha e casca de arroz, respectivamente, conforme a Tabela 4.

**Tabela 4:** Composição centesimal da palha e casca de arroz antes e após a deslignificação.

Componentes (g/100g)	Palha		Casca	
	sem tratamento*	pré-tratada*	sem tratamento*	pré-tratada*
Umidade	8,60 ± 0,16	8,94 ± 0,08	9,81 ± 0,10	9,99 ± 0,12
Cinzas	15,32 ± 0,02	4,97 ± 0,21	12,42 ± 0,19	2,89 ± 0,30
Holocelulose	53,17 ± 0,16	73,20 ± 0,31	48,60 ± 0,30	64,10 ± 0,24
Lignina	22,80 ± 0,10	12,54 ± 0,23	27,20 ± 0,17	21,75 ± 0,35

\*Valores médios ± desvio padrão (3 repetições)

Sun e Cheng (2002) estudando o tratamento de madeiras com NaOH também conseguiram diminuir de 55% para 20% o conteúdo de lignina presente no

material pré-tratado. Resultados semelhantes foram observados por Aguiar e Menezes (2000), os quais extraíram aproximadamente 56% da fração de lignina do bagaço de cana-de-açúcar, através do pré-tratamento com NaOH 1 M, concentração de biomassa 5% (p/v), a 121°C por 30 min em autoclave, seguida de lavagem com água corrente até neutralidade, com posterior filtração e secagem a 65°C. Eles concluíram que os pré-tratamentos alcalinos são mais eficientes e apresentam menor custo quando comparado a outras técnicas como radiação ou explosão a vapor.

Segundo Reguly (1996) a reação de celuloses nativas com álcali, em determinadas condições de concentração e temperatura seguida de lavagem, resulta em uma celulose hidratada, a qual possui orientação cristalina modificada em relação à da celulose nativa, pois a supressão de pontes de hidrogênio, pela entrada de água, afasta as cadeias deixando as hidroxilas livres para reagir.

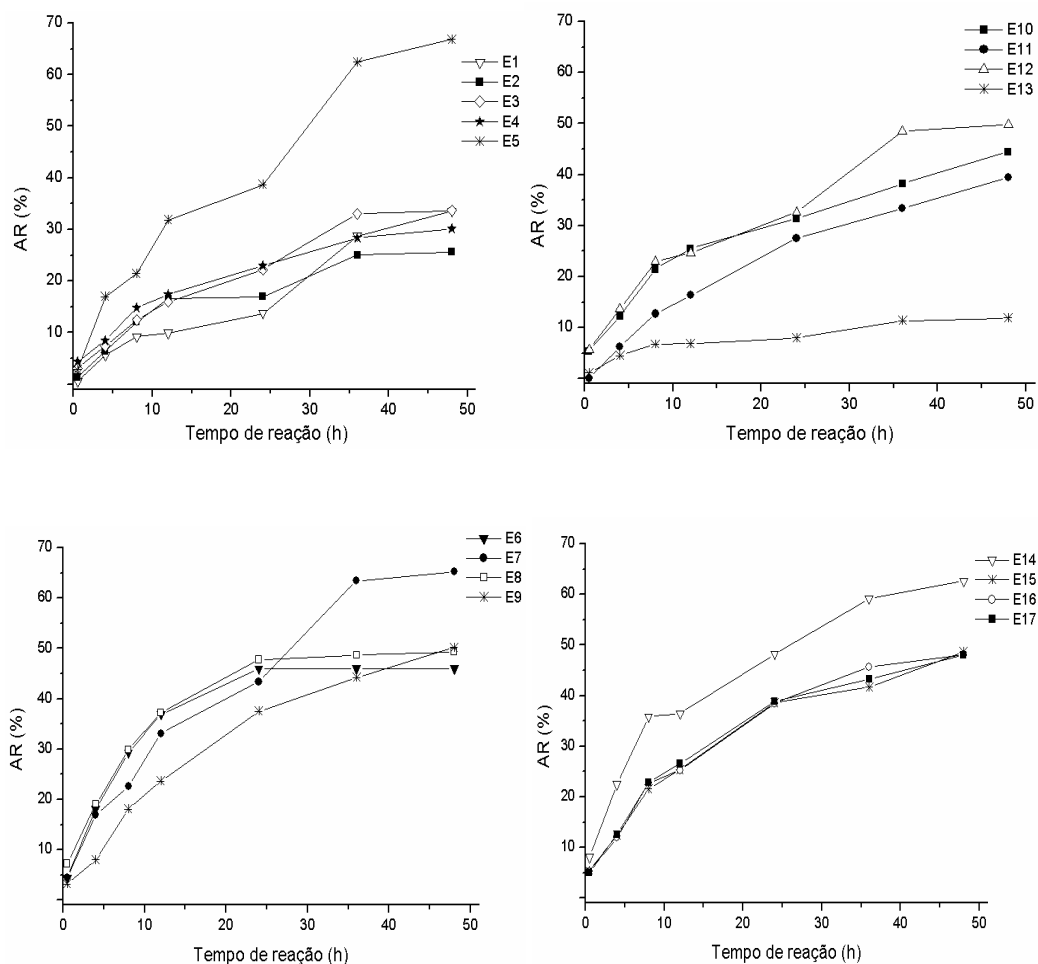
Sukumaran et al. (2009) estudaram o pré-tratamento ácido ou básico para hidrólise enzimática da palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, empregando HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M como solução reagente com posterior reação a 121°C por 1 h em autoclave, seguida da neutralização das amostras utilizando água para a lavagem e seca em estufa. Os autores verificaram que a deslignificação com álcali apresentou o maior rendimento em açúcares fermentescíveis quando comparada com o tratamento ácido e a matéria-prima com maior rendimento em açúcares redutores foi a palha de arroz.

Neste estudo a palha apresentou uma deslignificação maior que a casca de arroz, 45 e 20%, respectivamente. De acordo com Reyes et al. (1998) devido a casca possuir camadas com células reforçadas por sílica, há uma dificuldade da ação do álcali, impedindo a diminuição da cristalinidade e conseqüentemente da superfície específica de contato. Além disso, a casca é constituída de maior conteúdo de lignina do que a palha, interferindo assim na deslignificação, pois conforme Mcmillan (1994) o efeito do pré-tratamento alcalino em materiais lignocelulósicos, depende da quantidade de lignina presente.

### **3.2 Hidrólise enzimática**

As maiores concentrações de AR corresponderam a 48 h de reação em todos os ensaios, tanto para a palha como para a casca de arroz (Figuras 1 e 2). A partir desses valores foi possível construir a Tabela 5 que representa o planejamento fatorial com 17 experimentos realizados para cada matéria-prima, com valores reais e

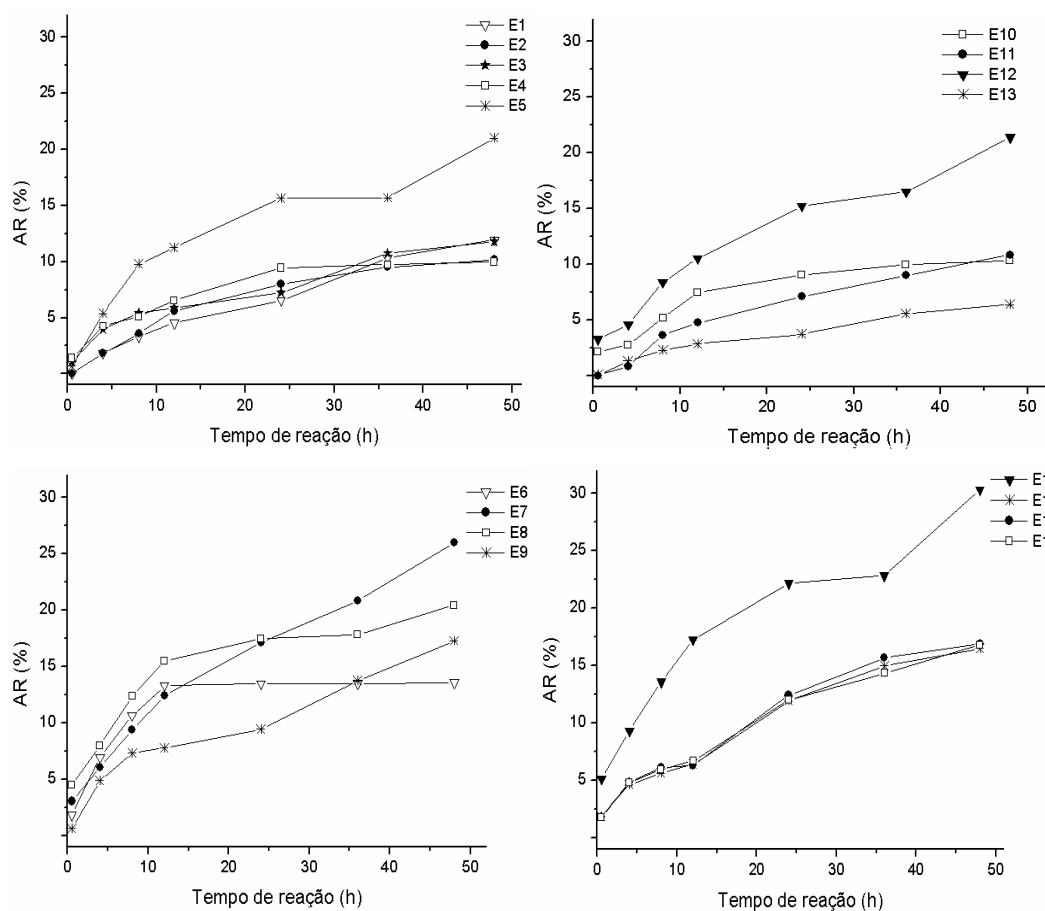
os resultados de AR no maior tempo.



**Figura 1:** Conteúdo de açúcares redutores (AR) durante o tempo de reação da hidrólise enzimática da palha de arroz.

Os maiores valores de AR no tempo de 48 h foram obtidos nos ensaios 5 (66,90%), 7 (65,21%) e 14 (62,62%) para a palha de arroz e nos ensaios 7 (26,0%) e 14 (30,30%) para a casca de arroz, para os hidrolisados, em que foram utilizados as maiores concentrações de enzimas.





**Figura 2:** Conteúdo de açúcares redutores (AR) durante o tempo de reação da hidrólise enzimática da casca de arroz.

Sukumaran et al. (2009) estudaram o tempo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase e  $\beta$ -glucosidase e verificaram que em 48 h de reação alcançaram a maior concentração de AR quando comparada com o tempo de 24 h, assim como observado neste trabalho. Segundo os autores, as celulase apresentam como característica a lenta degradação dos polissacarídeos celulósicos e precisam penetrar no polímero para hidrolisá-lo, a fim de atingir o sítio-ativo.

**Tabela 5:** Matriz do delineamento composto central rotacional ( $\alpha = \pm 1,68$ ) para a hidrólise enzimática da palha e da casca de arroz.

Ensaio <sup>a</sup>	Valores reais			AR (%) 48 h de reação	
	T (°C)	S (% p/v)	E (% p/p)	Palha	Casca
E1	45	2,5	1,1	33,60	11,94
E2	55	2,5	1,1	25,65	10,16
E3	45	7,5	1,1	33,67	11,77
E4	55	7,5	1,1	30,13	9,73
E5	45	2,5	3,3	66,90	20,99
E6	55	2,5	3,3	46,03	16,37
E7	45	7,5	3,3	65,21	26,0
E8	55	7,5	3,3	49,33	20,46
E9	41,6	5	2,2	50,16	17,28
E10	58,4	5	2,2	44,43	10,30
E11	50	0,8	2,2	39,37	10,83
E12	50	9,2	2,2	49,82	21,39
E13	50	5	0,35	11,92	6,37
E14	50	5	4,05	62,62	30,30
E15	50	5	2,2	48,66	19,59
E16	50	5	2,2	48,10	19,88
E17	50	5	2,2	47,75	19,95

<sup>a</sup> Experimentos realizados em ordem aleatória; AR = açúcares redutores; T = temperatura da reação; S = concentração de substrato; E = concentração de enzima;  $p = 0,05$

O planejamento experimental foi analisado com os valores codificados, pois a soma dos desvios em relação a média é igual a zero. Além disso, utilizou-se o erro puro, visto que é possível avaliar a repetibilidade em um ponto, quando apresenta pequeno número de repetições (RODRIGUES e IEMMA, 2005). De acordo com Box e Wetz citado por Barros Neto et al. (1996), considera-se a regressão como útil para fins preditivos caso o valor de  $MQ_{regressão}/MQ_{resíduo}$  seja, pelo menos, quatro a cinco vezes maior que o  $F_{tabelado}$ .

### 3.2.1 Sacarificação da palha de arroz

Os coeficientes de regressão obtidos pela análise estatística e utilizados na construção do modelo quadrático são apresentados na Tabela 6. Os termos não estatisticamente significativos a um nível de significância 5% (T quadrático e interação entre S e E linear) foram incorporados à falta de ajuste para cálculo da ANOVA.

**Tabela 6:** Coeficientes de regressão e significância estatística para açúcares redutores da palha de arroz.

Fatores	Coeficiente de regressão	Significância estatística (p)*
Média	48,01	< 0,0001
T (L)	-4,24	0,0008
S (L)	1,73	0,0050
S (Q)	-1,00	0,0165
E (L)	13,89	< 0,0001
E (Q)	-3,60	0,0013
T x S (L)	1,17	0,0185
T x E (L)	-3,16	0,0026

\*Nível de significância de 5%; S = concentração de substrato; E = concentração de enzima; T = temperatura da reação; L = linear; Q = quadrático

A análise de variância (Tabela 7) mostrou que o modelo quadrático se ajustou bem aos dados experimentais visto que o  $F_{\text{calculado}}$  foi doze vezes superior ao  $F_{\text{tabelado}}$ , indicando que o modelo de 2ª ordem obtido é estatisticamente significativo e preditivo, com coeficiente de determinação  $R^2$  igual a 0,97, evidenciando que o modelo explicou 97% da variação dos dados experimentais.

**Tabela 7:** ANOVA para as concentrações de açúcares redutores da palha de arroz.

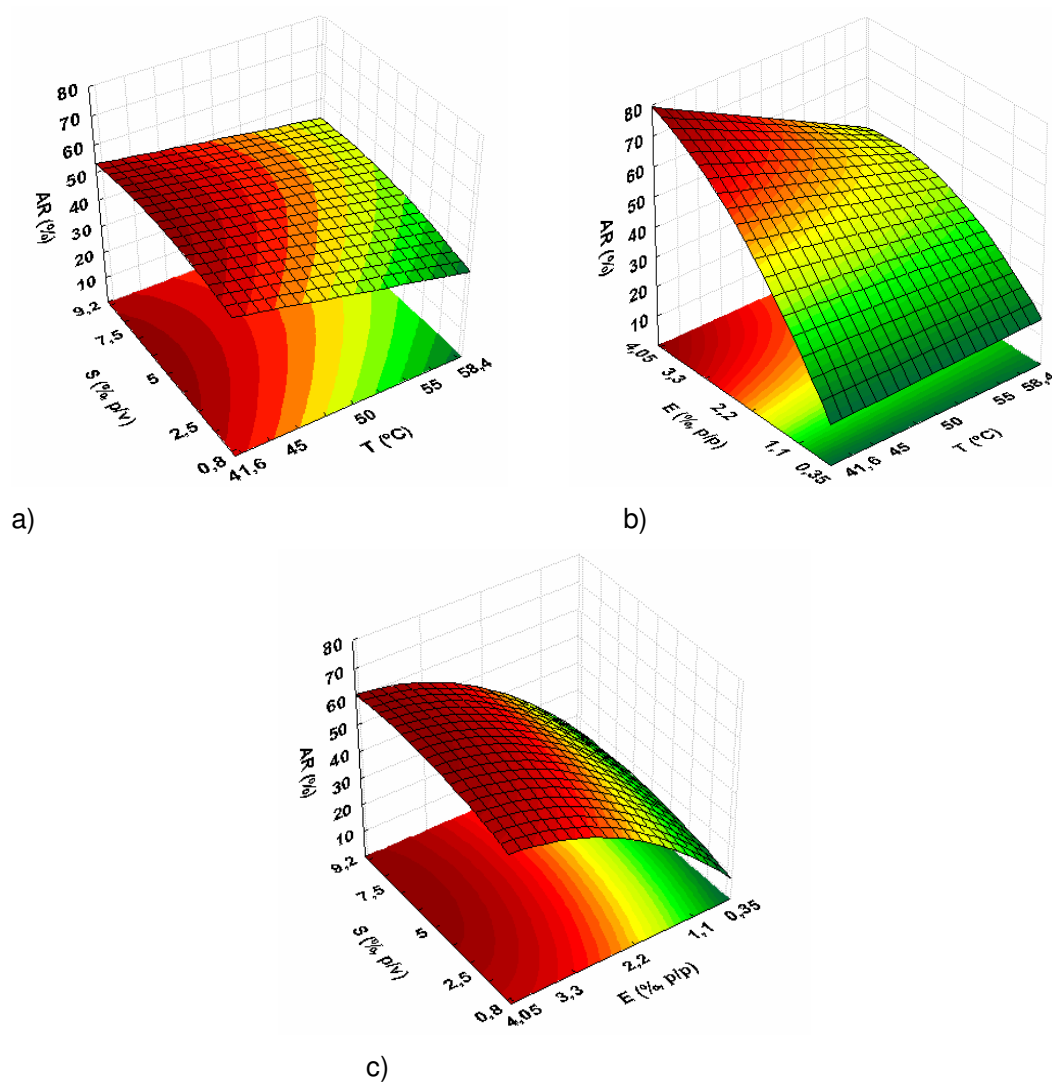
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}} (p \leq 0,05)$	$R^2$
Regressão	3171,87	7	453,12	41,16	3,29	0,97
Resíduo	99,07	9	11			
Falta de ajuste	98,65	7				
Erro puro	0,42	2				
Total	3270,94	16				

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste de Fisher;  $R^2$  = coeficiente de determinação

A partir do modelo (Equação 1) foi possível construir as superfícies de resposta apresentadas na Figura 3, onde verificou-se que utilizando uma temperatura de 41,6°C, 5% de substrato e 4,05% de enzima, pode-se obter um valor máximo de AR nas condições de reação pH 4,8 por um período de 48 h.

$$AR = 48 - 4,24 \cdot T + 1,73 \cdot S - 1 \cdot S^2 + 13,89 \cdot E - 3,60 \cdot E^2 + 1,17 \cdot T \cdot S - 3,16 \cdot T \cdot E \quad (1)$$

Onde: AR = açúcares redutores (%); S = concentração de substrato (% p/v); E = concentração de enzima (% p/p); T = temperatura da reação (°C)



**Figura 3:** Superfícies de resposta para açúcares redutores (AR) dos hidrolisados enzimáticos da palha de arroz em função do (a) substrato versus temperatura, (b)

enzima versus temperatura e (c) substrato versus enzima. S = concentração de substrato; T = temperatura da reação; E = concentração de enzima

A Figura 3a mostra que diminuindo a temperatura e mantendo a concentração de substrato na faixa entre 5 e 7,5% (p/v) implica num ganho na conversão de açúcares redutores, porém se este valor ficar acima dessa faixa, ocorrerá uma diminuição dos açúcares fermentescíveis formados. As Figuras 3b e 3c, indicam que o aumento da carga de enzima e a diminuição da temperatura da reação (dentro das faixas estudadas) são favoráveis para obtenção de altas concentrações de AR.

A análise dos efeitos mostrou que, quando a temperatura passou de 45°C para 55°C, foi observado um efeito negativo, visto que houve uma diminuição de 12,05% no conteúdo de açúcares redutores. No entanto, quando as concentrações de substrato e enzima passaram do nível -1 para +1, um efeito positivo para o conteúdo de AR foi verificado, aumentando 1,5 e 26,1%, respectivamente. A interação entre as variáveis apresentou efeito positivo somente entre a temperatura da reação e a concentração de substrato.

Ma et al. (2009) realizaram sacarificação da palha de arroz, após pré-tratamento com irradiação por microondas a 680 W, por 24 min e concentração de matéria-prima 7,5% (p/v). Os mesmos obtiveram 17,55% de AR, após hidrólise enzimática a temperatura de 40°C, pH (4,8) sob agitação de 110 min<sup>-1</sup>, durante 100 h de reação, concentrações de substrato 5% (p/v) e celulase 12% (v/p).

No entanto no presente trabalho hidrolisando a palha de arroz pré-tratada com NaOH, a uma temperatura de 45°C, pH (4,8), agitação 150 min<sup>-1</sup>, durante 48 h de reação, concentrações de substrato 2,5% (p/v) e enzima 2,75% (v/p), o maior valor de açúcares redutores encontrado foi 66,90%.

### **3.2.2 Sacarificação da casca de arroz**

Os coeficientes de regressão utilizados na construção do modelo quadrático estão apresentados na Tabela 8. Das variáveis independentes estudadas, a interação entre T e S (linear) foi o fator não estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), sendo este incorporado no resíduo total durante a análise estatística.

**Tabela 8:** Coeficientes de regressão e significância estatística para açúcares redutores da casca de arroz.

Fatores	Coeficiente de regressão	Significância estatística (p)*
Média	19,80	< 0,0001
T (L)	-1,88	0,0007
T (Q)	-2,11	0,0007
S (L)	1,92	0,0007
S (Q)	-1,29	0,0019
E (L)	5,89	< 0,0001
E (Q)	-0,50	0,0125
T x E (L)	-0,79	0,0071
S x E (L)	1,21	0,0030

\*Nível de significância de 5%; T = temperatura da reação; S = concentração de substrato; E = concentração de enzima; L = linear; Q = quadrático

Através da ANOVA (Tabela 9), verificou-se que o  $F_{\text{calculado}}$  foi 6,4 vezes superior ao  $F_{\text{tabelado}}$ , indicando que o modelo foi significativo e preditivo, o qual descreve as respostas em função das variáveis analisadas.

**Tabela 9:** ANOVA para as concentrações de AR da casca de arroz.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}} (p \leq 0,05)$	$R^2$
Regressão	646,35	8	80,80	21,89	3,44	0,96
Resíduo	29,52	8	3,69			
Falta de ajuste	29,45	6				
Erro puro	0,07	2				
Total	675,88	16				

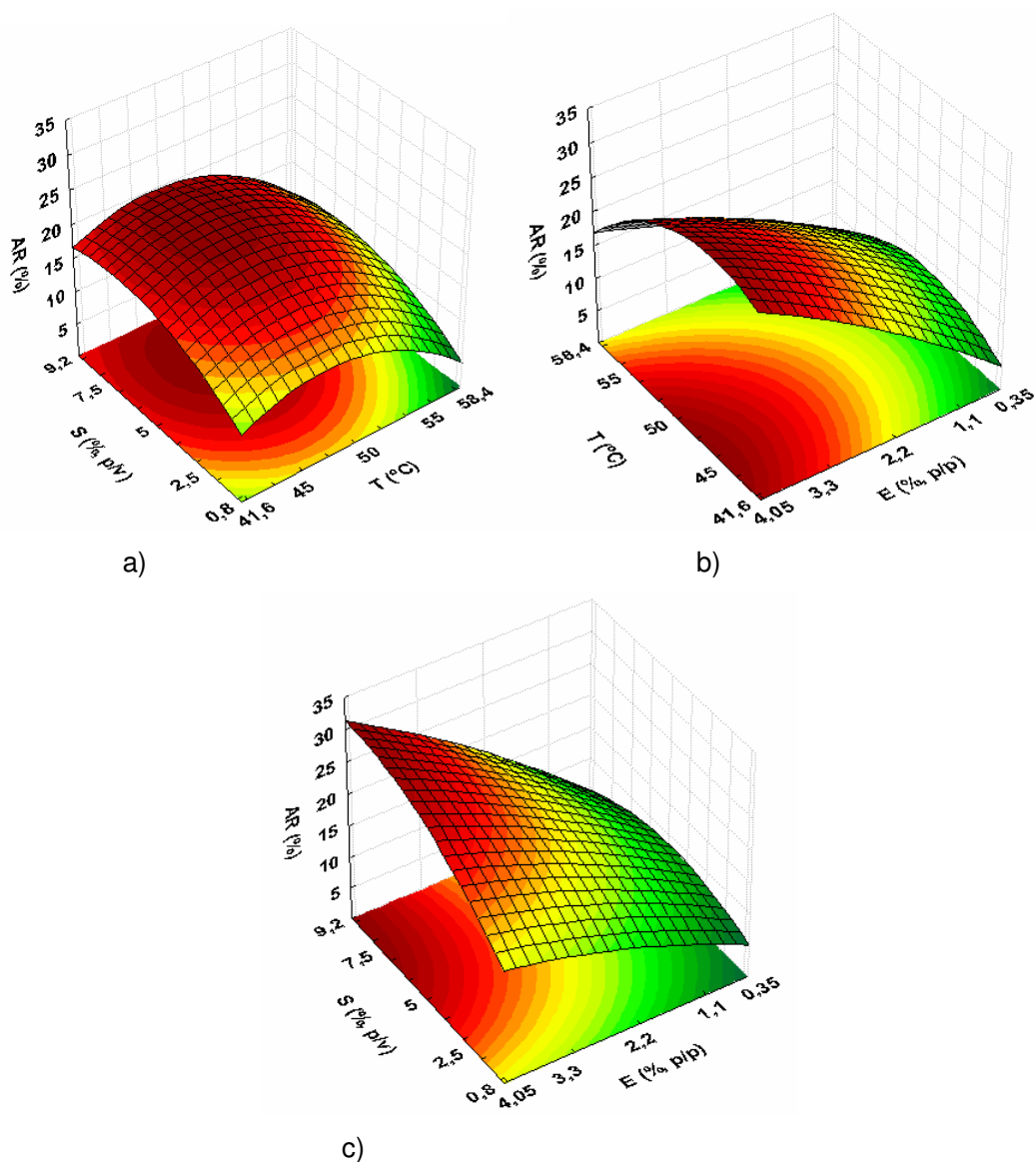
SQ = soma quadrática; GL = graus liberdade; MQ = média quadrática; F = teste Fisher;  $R^2$  = coeficiente determinação; AR = açúcares redutores

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,96, mostrou ajuste do modelo aos dados experimentais para resposta concentração de AR, frente à equação empírica proposta (Equação 2), com 96% da variabilidade dos dados explicados.

A partir dos resultados obteve-se o modelo quadrático (Equação 2) que representa o comportamento da hidrólise enzimática e descreve as superfícies de resposta (Figura 4) para o conteúdo de açúcares fermentescíveis.

$$AR = 19,80 - 1,88*T - 2,11*T^2 + 1,92*S - 1,29*S^2 + 5,89*E - 0,50*E^2 - 0,79*T*E + 1,21*S*E \quad (2)$$

Onde: AR = açúcares redutores (%); T = temperatura da reação (°C); S = concentração de substrato (% p/v); E = concentração de enzima (% p/p)



**Figura 4:** Superfícies de resposta para açúcares redutores (AR) da hidrólise de casca de arroz em função das variáveis (a) substrato versus temperatura, (b) temperatura versus enzima e (c) substrato versus enzima. S = concentração de substrato; T = temperatura da reação; E = concentração de enzima

Houve efeito negativo no conteúdo de açúcares redutores quando a temperatura passou de 45 °C para 55 °C, com diminuição de 3,5%. No entanto, quando aumentaram as concentrações de substrato (2,5 para 7,5% p/v) e de enzima (1,1 para 3,3% p/p) do meio, um efeito positivo foi verificado, o qual aumentou as concentrações de açúcares fermentescíveis em aproximadamente 2,2 e 10,05% para S e E, respectivamente. A interação entre as variáveis apresentou efeito positivo somente entre as concentrações de substrato e enzima.

Saha e Cotta (2008) estudaram a sacarificação da casca de arroz empregando concentração de substrato 15% (p/v), agitação 100 min<sup>-1</sup> durante 72 h de reação, com uma concentração de enzima 15% (v/p), e concluíram que o ótimo da reação foi com pH 5,0 a 45°C. Também observaram que aumentando a concentração de enzima para 45% (v/p), o máximo de AR alcançado foi 15,4% nessas mesmas condições ótimas.

Reyes et al. (1998) verificaram o efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos na hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando celulasas, e notaram que o pré-tratamento com ozônio na matéria-prima com posterior sacarificação empregando concentração de substrato 5% (p/v), enzima 1,5% (p/p), temperatura da reação 50°C durante 1 h, atingiram 32,5% de AR.

Este trabalho contempla o que foi relatado pelos autores anteriormente, uma vez que a casca de arroz apresentou temperatura ótima na faixa entre 45 e 50°C, e o pH (4,8) utilizado foi próximo a 5.

Ingesson et al. (2001) verificaram que aumentando a concentração de substrato acima de 7,5% (p/v), ocorreu uma redução na taxa inicial de hidrólise podendo ser atribuído à formação de produtos inibitórios e limitações de transferência de massa dentro da mistura da reação, devido à alta viscosidade do meio.

Segundo Reguly (1996) enquanto há substrato com centros ativos disponíveis, a elevação da concentração de enzima aumenta o produto linearmente. Após, a concentração do produto não aumenta mais, mesmo incrementando a concentração de enzima, indicando menor atividade desta ou limitação de substrato disponível.

Entre as matérias-primas analisadas, o maior rendimento em açúcares redutores foi obtido com palha de arroz (66,90%), possivelmente devido ao maior conteúdo de celulose presente nessa matéria-prima que favoreceu a ação das enzimas. Observou-se, ainda, que o processo de deslignificação na casca (20% de



remoção de lignina) não foi tão eficiente quanto da palha de arroz (45% de remoção), visto que a sílica presente na casca impede o acesso da enzima ao seu sítio ativo.

#### 4 CONCLUSÃO

A aplicação de concentração de enzima acima de 3,3% e concentração de substrato em torno de 5%, empregando temperaturas abaixo de 45 °C permitiram obter os maiores conteúdos de AR (> 60% e > 20%), tanto para os hidrolisado da palha como da casca de arroz, respectivamente.

O maior rendimento de AR foi alcançado com a palha de arroz (acima de 60%). Portanto, essa biomassa lignocelulósica pode ser utilizada para obtenção de bioprodutos para a produção de alimentos e energia, em especial o bioetanol, onde para cada tonelada de palha é possível produzir 389 litros, reduzindo assim a geração de resíduos dos processos industriais e agrícolas.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus Niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70, janeiro-junho, 2000.

**AOAC - Association of Official Analytical Chemists**. 13<sup>a</sup> ed., Arlington: A.O.A.C. 1141 p., 2000.

**ASTM Methods**. Standard test methods for lignin in wood. D271-48, 1956.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed., Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 299 p., 1996.

BROWNING, B. L. **The chemistry of wood**. New York: Interscience, 689 p., 1963.

DEMIRBAS, A. H.; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing countries. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2386-2398, 2007.

FERRAZ, A. **Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose**. In: LIMA, U. A. (Coord.). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgar Blücher, v. 3, p. 465-484, 2001.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 213-218, 2002.

INGESSON, H.; ZACCHI, G.; YANG, B.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 177-182, 2001.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 138-144, 2006.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

MA, H.; LIU, W. W.; CHEN, X.; WU, Y. J.; YU, Z. L. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1279-1284, 2009.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Eds.), **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324, 1994.

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

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 7-14, 2001.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos - Fundamentos, matérias-primas agrícolas, processos e produtos**. v. 1, ed. Universitária – UFPEL, Pelotas – RS, 1996.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1° ed. Casa do Pão Editora, Campinas, SP, 2005.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 111-122, 2000.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, outubro-dezembro, 2004.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 7<sup>o</sup> ed. LTC, Rio de Janeiro, 1999.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 235-241, 2007.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S.; ZHAO, Y.; TU, S.; XUE, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. **Biosystems Engineering**, v. 92, n. 2, p. 229-235, 2005.

### 4.3 SACARIFICAÇÃO DE REJEITOS DA AGROINDÚSTRIA DO ARROZ E OBTENÇÃO DE BIOETANOL

#### RESUMO

A produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais vem emergindo como uma das tecnologias mais importantes para produção sustentável de combustíveis alternativos, devido ao caráter renovável e abundante desses materiais lignocelulósicos. A obtenção de etanol dessas biomassas envolvem processos que vão desde a hidrólise dos carboidratos presentes para geração de açúcares fermentescíveis até a conversão dos mesmos em etanol por ação microbiana. O objetivo deste trabalho foi estudar os processos de hidrólise (ácida ou enzimática) de palha e casca de arroz para obtenção de bioetanol. Utilizou-se uma concentração de material lignocelulósico 3% (p/v) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%, p/p) a 72°C por 1 min de reação para sacarificação ácida. As enzimas comerciais celulase (NS 50013), suplementada com β-glucosidase (NS 50010) na proporção (10:1) com concentração 4,05% (p/p) a pH 4,8, foram empregadas para conversão enzimática. A máxima hidrólise foi alcançada através da sacarificação enzimática (79,90% de açúcares redutores) da palha de arroz após 48 h de reação a 41,6°C. A fermentação do hidrolisado enzimático contendo 130 g/L de açúcares foi realizada por *Saccharomyces cerevisiae* produzindo 23,3 g/L de etanol correspondendo a uma conversão de 0,41 g/g.

Palavras chave: Bioetanol; Materiais Lignocelulósicos; Sacarificação

#### ABSTRACT

The bioethanol production from agroindustrial and agricultural wastes is coming up as one of the most important technologies for sustainable production of alternative fuels, due to the renewable and abundant character of those materials lignocellulosic. The obtaining of ethanol of those biomasses involves processes since hydrolysis of carbohydrates for sugars fermentable generation to its conversion in ethanol for microbial action. The objective of this work was to study the more effective hydrolysis process (acid or enzymatic) of straw and hulls rice for bioethanol production. Was used a material lignocellulosic concentration 3% (w/v) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (72%, w/w) at 72°C for 1 min reaction. The enzymes commercial cellulase (NS 50013) supplemented with β-glucosidase (NS 50010) in the proportion (10:1) with concentration 4.05% (w/w) at pH 4.8, were used to enzymatic conversion. The maximum saccharification achieved was by straw rice enzymatic hydrolysis after 48 h reaction at 41.6°C. The fermentation of the enzymatic hydrolysates containing 130 g/L sugar was accomplished with *Saccharomyces cerevisiae* producing 23.3 g/L of ethanol with corresponding conversion of 0.41 g/g.

Keywords: Bioethanol; Lignocellulosic Materials; Saccharification

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo mundial de energia aumentou 22,6%, boa parte provinda de fontes fósseis como petróleo, carvão e gás natural (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007). No entanto, estudos relatam que a perspectiva para o esgotamento do petróleo é, no máximo, de 70 anos. Em 2002, 24 bilhões de toneladas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) foram lançados no meio ambiente e, em 2015, essa quantidade deverá alcançar 33 bilhões, sendo o setor de transporte o principal responsável pela emissão, pois cerca de 50% dos gases no planeta provêm da utilização dos automóveis. Devido ao aumento da concentração desses gases, o efeito estufa vem se agravando e trazendo consigo a elevação da temperatura média global (SHREEVE, 2006; NISHI et al., 2005).

Por motivos econômicos, geopolíticos e ambientais, as atenções se voltam para fontes alternativas de energia, em especial os biocombustíveis. O bioetanol é o biocombustível com perspectivas mais promissoras para o futuro, pois não é dependente de reservas petrolíferas, é obtido de fontes renováveis e apresenta baixos níveis de emissões de gases relacionados ao efeito estufa como o monóxido de carbono. Além disso, para cada tonelada de álcool combustível utilizado, cerca de 2,3 toneladas de CO<sub>2</sub> fóssil deixam de ser emitidos (BRASIL, 2006).

A partir disso, vários países estabeleceram metas ambiciosas para elevar o consumo de bioetanol nos próximos anos, e como consequência, um aumento substancial na sua produção, que hoje esbarra em limitações para expansão da área plantada, por competir com a produção de alimentos (SUKUMARAN et al., 2009). Nesse sentido, surge como alternativa o bioetanol, produzido a partir da biomassa lignocelulósica, que são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, destacando-se os resíduos celulósicos em especial os agroindustriais, como a palha e a casca de arroz que juntas são responsáveis pela geração anual de 854 milhões de toneladas (SAHA e COTTA, 2008; KARIMI et al., 2006). Esses resíduos lignocelulósicos são considerados matérias-primas potenciais para a produção de álcool por serem constituídos principalmente de celulose, um polímero renovável, abundante e disponível a baixo custo, na natureza é produzido anualmente cerca de 10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> toneladas (ZHAO et al., 2007).

No entanto, a hidrólise dessas biomassas é essencial para geração de açúcares fermentescíveis, para posterior conversão a bioetanol por ação microbiana. A quebra do polímero celulósico em açúcares solúveis como glicose, pode ser

catalisada por ação ácida ou enzimática. Os dois métodos empregados apresentam eficiência variada, a qual depende das condições do tratamento, tipo de biomassa e das propriedades dos agentes de hidrolíticos (SUKUMARAN et al., 2009).

A hidrólise com ácidos concentrados como o sulfúrico é um processo relativamente antigo, em que ocorre a quebra das macromoléculas de celulose por meio da adição de ácidos aos resíduos, empregando temperaturas relativamente moderadas e tempos de reação curtos. As temperaturas e pressões empregadas permitem o uso de materiais com custo relativamente baixo (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2007).

A hidrólise enzimática reproduz o processo existente na natureza, em que a quebra das longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares é feita por enzimas (geralmente celulasas, secretadas por fungos ou bactérias), ou seja, por uma molécula biológica, que promove reações em meio específico com máxima eficiência, processando-se em condições moderadas e não havendo formação de produtos da degradação dos açúcares (BASTOS, 2007).

Uma vez que a hidrólise é completada, o hidrolisado celulósico resultante pode ser fermentado e convertido a bioetanol. Este processo de hidrólise e fermentação separadas (SHF) já foi extensivamente testado por pesquisadores, e sua vantagem é que ambas as etapas podem ser realizadas em condições ótimas. No caso de catálise ácida ou enzimática a hidrólise se realiza a temperatura ótima da reação, enquanto que a fermentação se realiza a temperatura ótima do microrganismo produtor de etanol (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007; KARIMI et al., 2006).

Este trabalho teve como objetivo comparar o processo de hidrólise ácida e enzimática de palha e casca de arroz na conversão de açúcares fermentescíveis e, produzir bioetanol dessas matérias-primas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima e enzimas**

A palha e casca de arroz (BR IRGA 410) foram originadas do município de Santa Vitória do Palmar-RS, moídas em moinho de facas (Wiley Mill USA-Arthur H.Thomas CO) e peneiradas em granulometria de 0,850 mm (Tyler 20) conforme indicado por Sun et al. (2000). A celulase comercial (NS 50013) produzida pelo

*Trichoderma reesei* e  $\beta$ -glucosidase (NS 50010) do *Aspergillus niger* foram doadas pela Novozymes Latin America LTDA.

As matérias-primas apresentavam uma composição centesimal em termos de umidade, cinzas, lignina total e holocelulose de 8,60; 15,32; 22,80 e 53,17% para a palha e 9,81; 12,42; 27,20 e 48,60% para casca de arroz, respectivamente.

## 2.2 Hidrólise ácida

As sacarificações ácidas da palha e casca de arroz realizaram-se nas seguintes condições: solução de ácido sulfúrico 72% (p/p) como agente catalisador, sob agitação de  $150 \text{ min}^{-1}$ , à pressão atmosférica, período de reação total 1 min a  $72^\circ\text{C}$  e concentração de matéria-prima 3% (p/v).

Para a quantificação do conteúdo de açúcares redutores (AR), retirou-se uma alíquota no final da reação, adicionou-se água destilada a  $50^\circ\text{C}$  (1:5) e em seguida a amostra foi homogeneizada com agitação (modelo 753A, Fisatom) de  $150 \text{ min}^{-1}$  por 5 min. Após, o hidrolisado foi neutralizado com NaOH 3,5 M e centrifugado (modelo DCS-16 RV, Presvac) a 3080g durante 10 min e o sobrenadante analisado.

## 2.3 Hidrólise enzimática

Para conseguir maiores concentrações de AR foi necessário primeiro um pré-tratamento nas matérias-primas, com o objetivo de permitir o contato do substrato (celulose) com o agente catalisador (enzimas). Uma solução de NaOH 0,1 M e palha ou casca 10% (p/v) permaneceu por 1 h em autoclave (modelo AV-137, Phoenix) a  $121^\circ\text{C}$  seguidas de 24 h de repouso. A fração sólida foi lavada com água destilada, até atingir a neutralidade, filtrada e seca em estufa (modelo MCS314, DeLeo) a  $80^\circ\text{C}$  por 30 h.

A partir da biomassa deslignificada com uma solução de NaOH 0,1 M, tempo de repouso 24 h e concentração de matéria-prima 10% (p/v), realizou-se a hidrólise enzimática, nas seguintes condições: foram utilizadas as enzimas comerciais celulase suplementada com  $\beta$ -glucosidase na proporção (10:1), empregando-se uma solução tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,8), sob agitação constante a  $150 \text{ min}^{-1}$  em shaker orbital (modelo Certomat BS-1, B. Braun Biotech International), período de reação total 48 h, temperatura  $41,6^\circ\text{C}$ , concentração de substrato 5% (p/v), e enzima



4,05% (p/p) para a palha; e 45°C, 7,5% (p/v) de substrato e 4,05% (p/p) de enzima para a casca de arroz.

Para a determinação da concentração de AR no hidrolisado, retirou-se uma alíquota após 48 h e adicionou-se NaOH 0,05 M (1:1), para cessar a reação. A seguir a amostra foi centrifugada (modelo DCS-16 RV, Presvac) a 3080g por 10 min, para posterior análise no sobrenadante.

## 2.4 Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo empregado para a produção de bioetanol foi à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fornecida pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) de Piracicaba-SP, a qual foi mantida em tubos de ensaio contendo meio YPDA (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de agar) e conservada a 4°C.

Para sua reativação foi transferida uma alçada da cultura de manutenção para um meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), com posterior incubação a 25°C e agitação 200 min<sup>-1</sup> por 48 h em shaker orbital (modelo Certomat BS-1, B. Braun Biotech International). Após a reativação, as culturas foram estriadas em placas com o meio YPDA e transferidas para incubadora (modelo 347F, Fanem) a 30°C durante 24 h. Passado esse período, as placas foram mantidas sob refrigeração a 4°C, para posterior preparo do inóculo.

O inóculo foi preparado, transferindo-se uma alçada de células proveniente do meio de manutenção para frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio composto por (g/100 mL): AR do hidrolisado (3); glicose (2); extrato de levedura (1); peptona (2). Os frascos inoculados foram incubados a 30°C em shaker orbital (modelo Certomat BS-1, B. Braun Biotech International) a 150 min<sup>-1</sup> por 16 h. O crescimento celular foi acompanhado mediante uma curva de calibração que correlacionou a densidade ótica a 650 nm com a massa celular seca.

## 2.5 Fermentação

Foi realizada em condições anaeróbias em Biorreator de bancada (modelo Biostat B, B. Braun Biotech International), em meio de fermentação que possuía (g/L): extrato de levedura (5); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7,5); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,5); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,75); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1) e volume de trabalho de 1 L, composto por 900 mL de hidrolisado (ácido ou enzimático) filtrado e concentrado cinco vezes em evaporador rotativo

(modelo Q-344B2, Quimis) sob vácuo (bomba modelo Q-355B, Quimis) a 70°C, a fim de obter 130 g/L de AR. O pH (5,0) foi ajustado com NaOH (2 M) e HCl (2 M). O meio de fermentação e o reator foram esterilizados a 121°C durante 40 min em autoclave (modelo AV-137, Phoenix). O volume de inóculo utilizado para a fermentação alcoólica foi 10% (v/v) acrescentado asépticamente. O experimento foi conduzido a 30°C durante 14 h, com agitação de 50 min<sup>-1</sup>.

## **2.6 Acompanhamento analítico dos experimentos**

Durante a fermentação foram retiradas amostras em intervalos de 2 h para análise da concentração celular, etanol produzido e açúcares fermentescíveis.

Os açúcares redutores nos hidrolisados e no meio de fermentação foram quantificados pelo método espectrofotométrico (modelo 700 plus, Femto) do 3,5-dinitrossalicílico proposto por Miller (1959) e a concentração de etanol foi determinada segundo Kaye e Haag (1954).

## **2.7 Análise estatística dos dados**

As hidrólises foram realizadas em quadruplicatas e os seus teores de AR submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparação entre médias ao nível de 5% de significância. Antes de realizar ANOVA foi necessário verificar se os dados eram normais (teste Kolmogorov-Smirnov) e se suas variâncias apresentavam-se iguais (homocedasticidade) analisadas pelo teste Levene (TRIOLA, 1999).

Os parâmetros da fermentação (concentração celular, etanol e AR) foram analisados em triplicata.

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Hidrólise**

A Tabela 1 apresenta a concentração média de açúcares redutores, das sacarificações (ácida ou enzimática) da palha e da casca de arroz. Através da análise estatística observa-se que os resultados foram normais pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedásticos pelo teste de Levene. Assim foi possível realizar a ANOVA

com dois níveis no primeiro tratamento (palha e casca de arroz) e dois níveis no segundo tratamento (hidrólise ácida e enzimática).

**Tabela 1:** Valores de açúcares redutores (AR) para a hidrólise da palha e da casca de arroz.

Matéria-prima	Hidrólise	AR (%)*
Palha	Ácida	53,85 ± 0,92 <sup>a</sup>
Palha	Enzimática	79,90 ± 0,24 <sup>b</sup>
Casca	Ácida	43,92 ± 0,75 <sup>c</sup>
Casca	Enzimática	31,60 ± 0,43 <sup>d</sup>

\*Valores médios ± desvio padrão (4 repetições); letras diferentes na mesma coluna: existe diferença significativa

Os resultados da Tabela 1 mostram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as matérias-primas e os tratamentos de hidrólise utilizados para a sacarificação de resíduos lignocelulósicos.

A palha de arroz foi à matéria-prima que apresentou maior sacarificação em ambos os processos ácido e enzimático, devido este resíduo possuir conteúdo de carboidratos e celulose amorfa mais elevado do que a casca.

A casca de arroz apresentou a maior concentração de AR (43,92%) utilizando o processo de hidrólise ácida, quando comparada à sacarificação enzimática (31,60%). Isto se deve ao fato de que o pré-tratamento empregado em estudo prévio removeu apenas 20% do conteúdo de lignina, pois, conforme Zhu et al. (2005) este componente atua como ligante das fibras de celulose, contribuindo para a resistência e rigidez do tecido vegetal, formando uma barreira física que dificulta ação dos catalisadores.

De acordo com Cardona e Sánchez (2007), o efeito negativo do conteúdo de lignina impede a sacarificação, limitando a acessibilidade da enzima ao seu substrato. Além disso, a solubilização e fracionamento da lignina associada a elevadas severidades de processo, podem ser potencialmente prejudiciais às etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação, em virtude da deposição de lignina sobre a superfície da polpa celulósica, pois a lignina solubilizada, redeposita-se sobre a matriz celulósica formando um filme, restringindo a acessibilidade dos agentes hidrolíticos à polpa (IPT, 2006). Em razão disto, o rendimento glicosídico do processo de hidrólise enzimática ficou prejudicado, como observado neste trabalho.

Segundo Martín et al. (2002) e Reguly (1996), durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos catalisada por ácidos, devido às altas temperaturas e condições ácidas, não se obtém apenas açúcares provenientes da celulose e hemicelulose, mas também uma série de compostos que podem atuar como potenciais inibidores da fermentação, como por exemplo, furfural, proveniente da degradação de pentoses e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) oriundo da desidratação de hexoses, havendo ainda formação de ácido fórmico pela degradação de compostos derivados do furano (furfural ou 5-HMF) e ácido levulínico produzido a partir da degradação de 5-HMF. Logo, há a necessidade de adicionar uma etapa de destoxicação desses hidrolisados para melhorar a fermentação. Além do mais, apresenta a desvantagem de se utilizar um ácido “forte”, com dificuldades técnicas de controle e de recuperação do açúcar (SUKUMARAN et al., 2009).

A hidrólise enzimática ao contrário da ácida apresenta um grande potencial em virtude das características como especificidade da reação; ausência da formação de produtos secundários como inibidores da fermentação alcoólica; a reação ocorre em condições suaves e não requer altas pressões, temperaturas e equipamentos anticorrosivos (BASTOS, 2007). Além disso, como subproduto do pré-tratamento, resta a lignina, que pode ser usada para produzir energia, pois apresenta um poder calorífico ao redor 7000 kcal/kg, comparável ao dos melhores carvões; sendo maior do que madeiras secas (4000 kcal/kg) (REGULY, 1996).

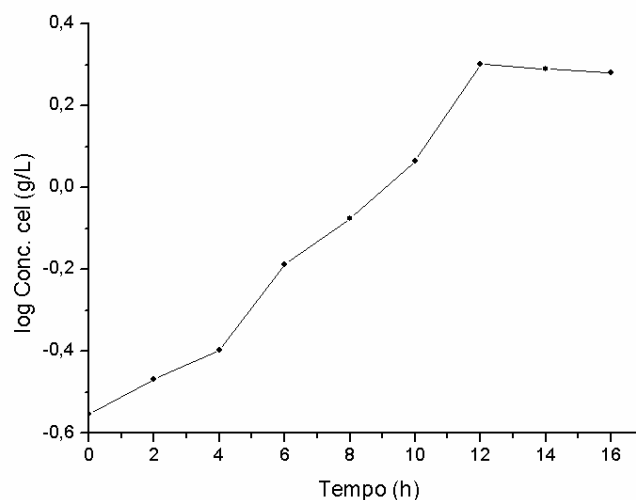
Verificou-se que o maior conteúdo de AR (79,90%) foi alcançado com a palha de arroz, empregando hidrólise enzimática a 41,6°C, com concentrações de substrato 5% e de enzima 4,05%, condição esta utilizada para obtenção dos hidrolisados para a posterior fermentação.

### **3.2 Fermentação**

Sukumaran et al. (2009) constataram que utilizando 12% de açúcares redutores de hidrolisado de palha de arroz para a fermentação alcoólica, obteve-se maior concentração de etanol (25,56 g/L) do que a 6% de AR (12,34 g/L). Neste estudo, o hidrolisado foi concentrado cinco vezes para atingir concentração de AR de aproximadamente 13% para posterior fermentação. Mussatto e Roberto (2004) concentraram seu hidrolisado 9 vezes e observaram que após esta etapa os açúcares aumentaram proporcionalmente ao fator de concentração, não havendo degradação dos mesmos no hidrolisado.

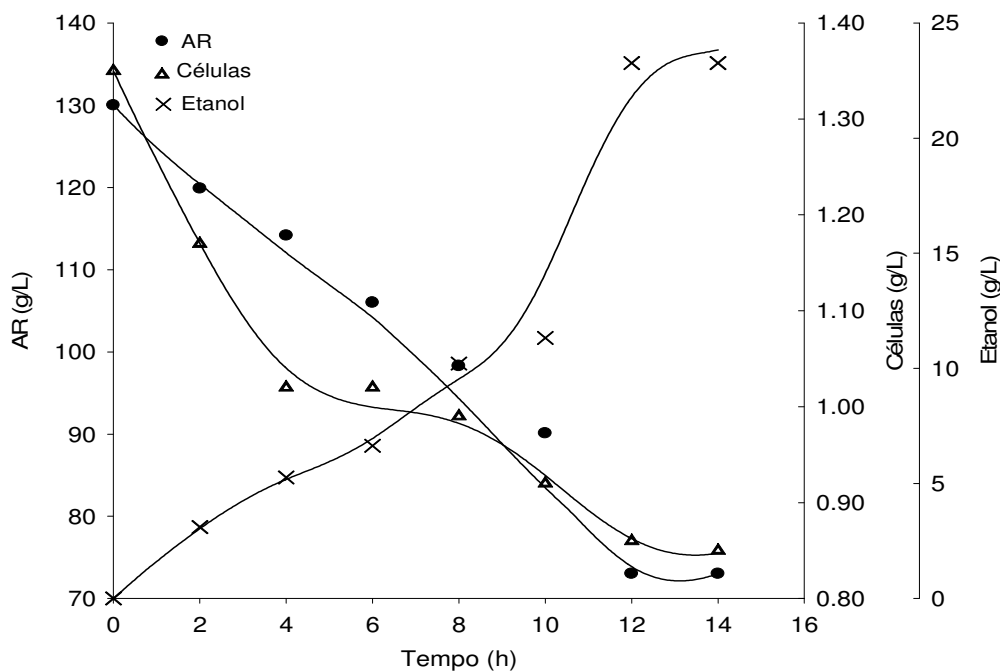
A Figura 1 mostra a curva de crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* construída para auxiliar no posterior processo de fermentação alcoólica. Verifica-se que a fase de latência ocorreu nas primeiras 4 h do crescimento celular, a qual se caracterizou pela reduzida multiplicação celular devido à adaptação das células, que estão sintetizando as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. A partir da quarta hora observa-se a fase de transição, a qual é caracterizada pelo início da reprodução celular propriamente dita, onde há um aumento gradual na velocidade específica de crescimento.

A fase logarítmica foi observada no período de 4-12 h, em que a curva apresentou uma inclinação acentuada, atribuída a fatores e condições favoráveis ao metabolismo, obtendo-se o máximo crescimento celular no tempo de 12 h, sendo este período utilizado para o preparo do inóculo.



**Figura 1:** Curva de crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Observa-se na Figura 2 que existem duas fases distintas da variação de AR com o tempo de fermentação. Nas primeiras 12 h, há o consumo do açúcar, ou seja, alta atividade dos microorganismos, na segunda fase, menos tumultuosa, nota-se a menor atividade da levedura, ainda que no final da fermentação, os açúcares permaneceram constantes. Durante a fermentação do hidrolisado da palha de arroz foi observado que o etanol foi produzido ao longo de todo o tempo de 12 h.



**Figura 2:** Perfis de consumo de substrato (AR), produção celular e de etanol empregando *Saccharomyces cerevisiae* a partir do hidrolisado da palha de arroz.

A eficiência desse processo de bioconversão pode ser melhor observada através dos valores dos parâmetros fermentativos mostrados na Tabela 2. O microrganismo foi capaz de produzir etanol a partir dos açúcares presentes do hidrolisado de palha de arroz, confirmando que essa matéria-prima pode ser empregada em processos biotecnológicos.

**Tabela 2:** Parâmetros fermentativos da produção de etanol do hidrolisado da palha de arroz.

Concentração AR	130 g/L
Tempo de fermentação	12 h
Concentração etanol máx.	23,3 g/L
Y P/S	0,41 g/g
P máx.	1,94 g/L.h
Concentração etanol máx. teórica	66,3 g/L
$\eta$	35,14 %

AR = açúcares redutores; Y P/S = fator de conversão de substrato em produto; P = produtividade;  $\eta$  = eficiência

Sukumaran et al. (2009) conseguiram a maior concentração de etanol (25,56 g/L) após 24 h de fermentação e sua eficiência máxima foi 41,76%, empregando *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica de um hidrolisado, obtido a partir da palha de arroz pré-tratada com álcali, e sacarificado enzimaticamente através das enzimas celulase suplementada com  $\beta$ -glucosidase.

Saha e Cotta (2008) também verificaram que a casca de arroz pré-tratada alcalinamente e submetida à sacarificação enzimática por celulase,  $\beta$ -glucosidase e hemicelulase com posterior fermentação empregando *Escherichia coli* conseguiram 9,87 g/L em 19 h de fermentação.

A máxima produção de etanol (23,3 g/L) neste trabalho foi alcançada após 12 h (Figura 2) com uma eficiência de 35,14%. Este valor pode aumentar para 40%, uma vez que durante a fermentação alcoólica cada grama de glicose convertida gera 0,51 g de etanol, considerando um rendimento de 100%. No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo que consegue alcançar rendimento máximo de aproximadamente 90% deste valor estequiométrico, pois ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, essa levedura gera energia (ATP, adenosina trifosfato) que é empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros) e biossínteses, necessários à manutenção da espécie (LIMA et al., 2001; SCHMIDELL et al., 2001).

A eficiência da fermentação alcoólica foi 40% neste estudo, pois, conforme Palmqvist e Hahn-häger-dal (2000) durante o pré-tratamento do material lignocelulósico devido a exposição a elevadas temperaturas e reagentes, poderá ocorrer a formação de compostos da degradação da glicose, xilose (hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente) ou da lignina (aromáticos, fenólicos e aldeídos), e também a liberação de substâncias provenientes da própria estrutura lignocelulósica (extrativos e ácido acético), esses compostos podem ter atuado como inibidores da ação microbiana, interferindo negativamente no rendimento do processo fermentativo.

No tempo 12 h de fermentação foram obtidos os melhores resultados de conversão de substrato em produto (0,41 g/g) e produtividade de etanol (1,94 g/L.h).

#### **4 CONCLUSÃO**

Os sacarificados de palha de arroz apresentaram maior concentração de AR (79,90% e 53,85%) do que os de casca (31,60% e 43,92%) para hidrólise

enzimática e ácida, respectivamente. A hidrólise enzimática da palha mostrou-se mais eficiente na conversão de açúcares fermentescíveis (79,90%).

Após 12 h de fermentação do hidrolisado enzimático da palha de arroz obteve-se concentração de etanol 23,3 g/L, correspondendo à eficiência de 40%. Considerando que anualmente são gerados em todo planeta 731 milhões de toneladas de palha de arroz, é possível obter 150 bilhões de litros de bioetanol. Portanto, a palha pode ser considerada matéria-prima para a produção de biocombustíveis, emergindo como importante tecnologia para produção sustentável de energias renováveis.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, março, 2007. ISSN 1414-9230.

**BRASIL** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011, 2ª ed., Brasília, DF., 110 p., 2006. ISBN 85-7383-357-2.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

DEMIRBAS, A. H.; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing countries. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2386-2398, 2007.

**IPT** – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. III Workshop tecnológico sobre Hidrólise, 2006.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 138-144, 2006.

KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of alcohol content. **Journal Forensic Medical**, v.1, p. 373, 1954.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia**



**industrial - Processos fermentativos e enzimáticos.** v. 3, ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

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.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 94-100, janeiro-março, 2004.

NISHI, M. H.; JACOVINE, L. A. G.; SILVA, M. L.; VALVERDE, S. R.; NOGUEIRA, H. P.; ALVARENGA, A. P. Influência dos créditos de carbono na viabilidade financeira de três projetos florestais. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, p. 263-270, 2005.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos - Fundamentos, matérias-primas agrícolas, processos e produtos.** v. 1, ed. Universitária – UFPEL, Pelotas – RS, 1996.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial – Engenharia bioquímica.** v. 2, ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

SHREEVE, J. Redesigning life to make ethanol. **Technology Review**, v. july-august, 2006.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 111-122, 2000.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 7<sup>o</sup> ed. LTC, Rio de Janeiro, 1999.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 235-241, 2007.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S.; ZHAO, Y.; TU, S.; XUE, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. **Biosystems Engineering**, v. 92, n. 2, p. 229-235, 2005.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Houve a conversão de açúcares indiretamente para diretamente fermentescíveis da palha e casca de arroz, através da hidrólise ácida e enzimática. O aumento na temperatura apresentou efeito negativo na concentração de AR, causando diminuição de 44,9% e 31,2%, respectivamente, para os hidrolisados ácidos de palha e casca de arroz.

Os maiores conteúdos de AR foram no primeiro minuto de reação, demonstrando que a eficiência do processo depende da ação combinada da concentração do ácido, temperatura e tempo de reação para a sacarificação ácida das biomassas celulósicas.

Na hidrólise enzimática da palha e casca de arroz foi possível obter modelos matemáticos que relacionaram a temperatura, concentração de enzima e a concentração de substrato em relação ao conteúdo de AR. O emprego de concentração de enzima acima de 3,3% (p/p) e concentração de substrato em torno de 5% (p/v), em temperaturas abaixo de 45°C, permitiram alcançar as maiores conversões em açúcares fermentescíveis para ambos os resíduos.

Entre as matérias-primas, os hidrolisados de palha de arroz apresentaram maior conteúdo de AR (79,90% e 53,85%) do que os de casca (31,60%, 43,92%) para hidrólise enzimática e ácida respectivamente. A sacarificação enzimática da palha mostrou-se mais eficiente na conversão de açúcares fermentescíveis (79,90%).

Hidrolisados enzimáticos de palha de arroz foram submetidos a 12 h de fermentação utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a partir do qual foi possível obter concentração de etanol 23,3 g/L, correspondendo a 40% de eficiência. Considerando que anualmente são gerados em todo planeta 731 milhões de toneladas de palha de arroz, é possível obter 150 bilhões de litros de bioetanol.

Portanto, obteve-se bioetanol de resíduo celulósico, como a palha de arroz, servindo como alternativa para minimizar as crises energéticas e de alimentos. Sendo assim, a produção de bioetanol a partir da palha de arroz, emerge como importante tecnologia para produção sustentável de combustíveis alternativos, devido seu caráter abundante, renovável e de baixo custo, diminuindo também a geração de resíduos dos processos industriais e agrícolas.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção de bioetanol de palha de arroz através dos processos de hidrólise seguida de fermentação, bem como sacarificação e fermentação simultânea;

- Avaliar o pré-tratamento para deslignificação e separação de hemicelulose e celulose;

- Hidrolisar enzimaticamente a hemicelulose e celulose;

- Identificar e quantificar os açúcares presentes nos hidrolisados;

- Fermentar separadamente as frações de pentoses e hexoses;

- Sacarificar e fermentar simultaneamente a fração hemicelulósica;

- Sacarificar e fermentar simultaneamente a fração celulósica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus Niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70, janeiro-junho, 2000.

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 4, p. 309-318, 2002.

ALVES, A. C. N.; MATTOS, W. R. S.; SANTOS, F. A. P.; LIMA, M. L. P.; PAZ, C. C. P.; PEDROSO, A. M. Substituição parcial de silagem de milho por farelo de glúten de milho desidratado na alimentação de vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1590-1596, 2007.

AMATO, G. W. **Casca agregando valor ao arroz**. World association industrial and technological research organizations, 2002. Disponível em: <[www.irga.rs.gov.br](http://www.irga.rs.gov.br)>. Acesso em 02 de junho de 2007.

AMORIM, H. V. **Introdução a bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras, IAA-PLANALSUCAR (COSUL), 90 p., 1977.

**AOAC - Association of Official Analytical Chemists**. 13<sup>a</sup> ed., Arlington: A.O.A.C. 1141 p., 2000.

ARAUJO, N. A. **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol**. S. L., 11 p., 1978.

**ASTM Methods**. Standard test methods for lignin in wood. D271-48, 1956.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed., Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 299 p., 1996.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, março, 2007. ISSN 1414-9230.

BOURSCHEIT, A. **EcoAgência de Notícias**. Disponível em: <[www.ecoagencia.com.br](http://www.ecoagencia.com.br)>. Acesso em 08 de maio de 2007.

**BRASIL** - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Álcool Combustível. Disponível em: < [www.mdic.gov.br](http://www.mdic.gov.br) >. Acesso em 24 de março de 2009.

**BRASIL** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011, 2ª ed., Brasília, DF., 110 p., 2006. ISBN 85-7383-357-2.

BROWNING, B. L. **The chemistry of wood**. New York: Interscience, 689 p., 1963.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.

**CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos (safra 2008/2009). Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em 28 de janeiro de 2009.

DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Boletim do SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DELLA, V. P.; HOTZA, D.; JUNKES, J. A.; OLIVEIRA, A. P. N. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida da casca de arroz e sílica obtida por tratamento térmico da cinza de casca de arroz. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DELLA, V. P.; KUHN, I.; HOTZA, D. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 778-782, 2001.

DEMIRBAS, A. H.; DEMIRBAS, I. Importance of rural bioenergy for developing countries. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2386-2398, 2007.

DOE. **Multi Year program plan 2007-2012**, Office of the biomass program, Energy efficiency and renewable energy, US department of energy, 31 de agosto de 2005.

**EMBRAPA** - Clima Temperado. Cultivo do arroz irrigado no Brasil: importância econômica agrícola e alimentar do arroz. novembro, 2005. Disponível em: <[www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br](http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br)>. Acesso em 8 de janeiro de 2009. ISSN 1806-9207.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A. **Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose**. In: LIMA, U. A. (Coord.). Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgar Blücher, v. 3, p. 465-484, 2001.

FOLETTTO, E. L.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL JR., U. L.; JAHN, S. L. Aplicabilidade das Cinzas da Casca de Arroz. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

GALDEANO, M. C. Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão. **Dissertação de Mestrado**, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2001.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 213-218, 2002.

INGESSON, H.; ZACCHI, G.; YANG, B.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 177-182, 2001.

**IPT** – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. III Workshop tecnológico sobre Hidrólise, 2006.

**IRGA** - Instituto Rio Grandense do Arroz. Produção mundial de arroz deve atingir 625 milhões de toneladas, 2008. Disponível em: <[www.irga.rs.gov.br](http://www.irga.rs.gov.br)>. Acesso em 28 de janeiro de 2009.

JACOBS, J.; KREUTZER, R.; SMITH, D. Rice burning and asthma hospitalizations, butte country, California, 1983-1992. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 980-985, 1997.

KAMINSKI, W.; MARSZALEK, J.; AGNIESZKA, C. Renewable energy source-dehydrated ethanol. **Chemical Engineering Journal**, 2007.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 138-144, 2006.

KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of alcohol content. **Journal Forensic Medical**, v.1, p. 373, 1954.

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

LADISCH, M. R.; LIN, K. W.; VOLOCH, M.; TSAO, G. T. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 5, p. 82, 1983.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.



LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, 2<sup>nd</sup> ed., Worth Publishers, New York, 1013 p., 1993.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial - Processos fermentativos e enzimáticos**. v. 3, ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

LOPES, A. S.; ORMENESE, R. C. S. C.; MONTENEGRO, F. M.; FERREIRA JÚNIOR, P. G. Influência do uso simultâneo de ácido ascórbico e azodicarbonamida na qualidade do pão francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 307-312, abril-junho, 2007.

MA, H.; LIU, W. W.; CHEN, X.; WU, Y. J.; YU, Z. L. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1279-1284, 2009.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MARTINES-FILHO, J.; BURNQUIST, B. L.; VIAN, C. E. F. Bioenergy and the rise of sugarcane-based ethanol in Brazil. **American Agricultural Economic Association**, 2006. Disponível em: <[www.choices-magazine.org](http://www.choices-magazine.org)>. Acesso em 10 de setembro de 2007.

MATOS, A. T. **Curso sobre tratamento de resíduos agroindustriais**. Fundação Estadual do Meio Ambiente, Universidade Federal de Viçosa - MG, maio de 2005.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Eds.), **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324, 1994.

MENEZES, T. J. B. **Etanol: o combustível do Brasil**. Ed. Agronômica Ceres, SP, 1980.

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

MORAES, O. I. **Produção de microrganismos. Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 1° ed., v. 3, Editora Edgar Blucher, São Paulo, cap. 9, p.199-217, 2001.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de pinus oocarpa parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis, **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 94-100, janeiro-março, 2004.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p. 34-39, setembro-outubro, 2002.

NISHI, M. H.; JACOVINE, L. A. G.; SILVA, M. L.; VALVERDE, S. R.; NOGUEIRA, H. P.; ALVARENGA, A. P. Influência dos créditos de carbono na viabilidade financeira de três projetos florestais. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, p. 263-270, 2005.

NOVO, A. M. Uso intensivo do etanol como combustível do futuro: efeitos de um choque de tecnologia no Brasil utilizando o equilíbrio geral computável. **Dissertação de Mestrado**, Curso de Ciências Econômicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 7-14, 2001.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

PEREIRA JR., N. Seleção de Leveduras para a Fermentação Alcoólica, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 111 p.,1982.

PEREIRA JR., N. Intensification of the D-xylose fermentation process. **Ph. D. Thesis**, The University of Manchester, UK, 1991.

PIACENTE, F. J.; PIACENTE, E. A. **Desenvolvimento sustentável na agroindústria canavieira: uma discussão sobre os Resíduos**. Disponível em: <www.cori.unicamp.br>. Acesso em 28 de outubro de 2007.

PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. **Dissertação de Mestrado**, Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 144 p., 2007.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. **Seminário Nacional sobre Reuso/Reciclage de Resíduos Sólidos Industriais**, 2000.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos - Fundamentos, matérias-primas agrícolas, processos e produtos**. v. 1, ed. Universitária – UFPEL, Pelotas – RS, 1996.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

**RFA-Renewable Fuels Association**. Disponível em: <www.ethanolrfa.org/industry/statistics. 2009 >. Acesso em 25 de março de 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 1ª ed. Casa do Pão Editora, Campinas, SP, 2005.

ROSSELL, C. E. V. **III Workshop tecnológico sobre hidrólise para produção de etanol**. UNICAMP, 2007.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 971-977, 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 271-291, 2003.

SARAIVA, I. J. **Custos e impactes ambientais no projecto de processos químicos**. Relatório de seminário, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, junho, 2003. Disponível em: <[www.eq.uc.pt/ines/seminario](http://www.eq.uc.pt/ines/seminario)>. Acesso em 7 de junho de 2007.

SCANDIFFIO, M. I. G. Análise prospectiva do álcool combustível no Brasil - cenários 2004-2024. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica**. v. 2, ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

SHREEVE, J. Redesigning life to make ethanol. **Technology Review**, v. july-august, 2006.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. 2<sup>a</sup> Ed. California, USA: Academic Press, 1992.

SOUZA, B. L. P.; DILLON, A. J. P. Avaliação da produção de celulases em produtos de fusão de protoplastos entre *Penicillium echinulatum* e *trichoderma harzianum* em cultivo semi-sólido. **XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR, 2007.

STRAPASSON, A. B. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional da Agroenergia 2005**. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em 20 de maio de 2007.

STRYER, L. **Biochemistry**, 4<sup>th</sup> ed. W. H. Freeman and Company, New York, 497 p., 1995.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 111-122, 2000.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, outubro-dezembro, 2004.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation**. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 7<sup>ª</sup> ed. LTC, Rio de Janeiro, 1999.

ZHAO, H.; KWAK, J. H.; ZHANG, Z. C.; BROWN, H. M.; AREY, B. W.; HOLLADAY, J. E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 235-241, 2007.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S.; ZHAO, Y.; TU, S.; XUE, Y. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to ethanol. **Biosystems Engineering**, v. 92, n. 2, p. 229-235, 2005.