



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

DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E RENDIMENTO DE
ETANOL DA FRAÇÃO AMILÁCEA DE CULTIVARES DE ARROZ

SABRINA PERES FARIAS

PROFESSOR DR. WALTER AUGUSTO RUIZ
ORIENTADOR

RIO GRANDE, RS

2015



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

DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E RENDIMENTO DE
ETANOL DA FRAÇÃO AMILÁCEA DE CULTIVARES DE ARROZ

SABRINA PERES FARIAS

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do título
de mestre em Engenharia
Química.

PROFESSOR DR. WALTER AUGUSTO RUIZ
ORIENTADOR

RIO GRANDE, RS

2015

F224d Farias, Sabrina Peres.

Determinação das condições de hidrólise enzimática e rendimento de etanol fração amilácea de cultivares de arroz / Sabrina Peres Farias. – 2015.

76 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Rio Grande/RS, 2015.

Orientador: Dr. Walter Luiz Ruiz.

1. Bioetanol 2. Hidrólise enzimática 3. Fermentação 4. Amido
I. Ruiz, Walter Luiz II. Título.

CDU 662.754

FOLHA DE APROVAÇÃO

A dissertação defendida por Sabrina Peres Farias é aprovada em 25 de setembro de 2015, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Dr. Walter Augusto Ruiz (Orientador)
Universidade Federal do Rio Grande

Dra. Francine Antelo
Universidade Federal do Rio Grande

Dra. Cláudia Lemons e Silva
Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a minha
Mãe Sibeles e Meu Noivo Artur que
me apoiam incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que coloca na minha trajetória;

Aos meus pais por priorizarem e incentivarem meus estudos;

À minha Mãe Sibebe, a pessoa mais importante na minha vida, exemplo de perseverança e dedicação, fez sempre mais do que podia para proporcionar que eu estudasse e alcançasse meus objetivos. Viveu, e tentou sempre amenizar, minhas angústias e frustrações. O mais profundo sentimento de gratidão, obrigada pelo amor, amizade e confiança. Você é a Mãe que desejo ser.

Ao Artur, meu noivo e grande amigo, agradeço pelo companheirismo incondicional. Sempre paciente e compreensivo, deixando meus dias mais alegres e motivantes. Não teria chegado até o fim sem a tua força e companhia.

Aos meus irmãos, Cristiano e Pâmela, obrigada pelo apoio. O Cris, grande incentivador da minha graduação, contribuiu de diversas maneiras para que eu concretizasse esse sonho. A Pâ obrigada pela compreensão e mensagens nos momentos difíceis, tentando amenizar as angústias que me consumiam, e pelos tantos livros que carregasses para mim, contribuindo para a elaboração deste trabalho.

Aos meus familiares obrigada pelas palavras de incentivo e pela torcida, especialmente minha Vó Sirley que sempre vibrou com minhas pequenas conquistas, a minha Madrinha Suzete, que sempre se fez Dinda, e minha Tia Lizerte que sempre se fez presente.

Agradeço aos meus Sogros, Oldraci e Maiza, que sempre me acolheram, torceram, incentivaram e vibraram.

Ao Gilberto agradeço pela torcida, pela acolhida e também por contribuir com este trabalho fornecendo o material da cultivar Puitá Inta CL.

Obrigada a todos os amigos que torcem por mim. Obrigada aos de Sempre, Mity, Pablo, Dai e Rodrigo, pelo apoio, torcida, desabafos e momentos de descontração.

Obrigada a amiga Ana pela ajuda, equilíbrio e força espiritual.

Obrigada ao Professor Walter pela orientação, ajuda e paciência, importantes para finalizarmos este trabalho.

Ao Pesquisador Sérgio agradeço por ter me recebido na Equipe de Agroenergia e pela oportunidade, confiança e dedicação que fizeram com que eu realizasse e concluísse este trabalho.

A Professora Cláudia obrigada pelo carinho e pelas contribuições.

A Juliana sou muito grata por toda a ajuda e colaboração técnica, fundamentais para conclusão deste trabalho e também pela companhia nos dias de trabalho e pelas palavras de apoio e carinho que me ajudaram nos momentos de preocupações e agonias.

Muito Obrigada a toda Equipe Agroenergia pela colaboração e ajuda, em especial as estagiárias Milena, Edenara, Vitória, Karen, Kauana, Amanda e Patrícia, que foram muito importantes na execução desta pesquisa.

Aos alunos de Iniciação Científica, do laboratório de Tecnologia Enzimática, Larissa e Pedro Henrique obrigada pela contribuição.

Obrigada às colegas de turma Nathália, Mônica e Franciele, pela ajuda durante as disciplinas, desabafos e risadas.

Obrigada ao Pesquisador Ariano e ao Alcides por fornecerem o material da cultivar BRS AG.

Obrigada ao Pesquisador Rafael, Pesquisadora Patrícia, Professora Francine, Professora Marta, Professora Maria do Carmo, Técnica Ana Paula e as Analistas Cristina, Daiane e Núbia pelas contribuições.

Obrigada a Embrapa Clima Temperado pela Infraestrutura e respaldo para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à LFN Latino América pela doação das enzimas.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que acreditaram e torceram por mim durante essa jornada de estudo e a todos que contribuíram para que esse trabalho se concretizasse, pois eu não fiz nada sozinha!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1.	Objetivo geral.....	3
2.2.	Objetivos específicos	3
3.	JUSTIFICATIVA	4
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1.	Etanol no Brasil.....	6
4.2.	Produção de etanol.....	6
4.3.	Matérias-primas Amiláceas para Produção de Etanol	9
4.4.	Arroz	10
4.4.1.	Amido	11
4.4.1.1.	Hidrólise Enzimática do Amido.....	12
4.5.	Fermentação Alcoólica.....	14
4.6.	Otimização de Processos – Planejamento Experimental.....	15
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
5.1.	Matéria Prima e Enzimas	16
5.2.	Preparo e Caracterização dos Grãos de Arroz	16
5.2.1.	Determinação do Teor de Amido.....	17
5.2.2.	Determinação do Teor de Fibras.....	17
5.2.3.	Determinação do Teor de Lipídios.....	18
5.2.4.	Determinação do Teor de Proteína	19
5.2.5.	Determinação do Teor de Cinzas	19
5.2.6.	Matéria Seca	19
5.2.7.	Determinação do Teor de Amilose	20
5.2.8.	Análise Granulométrica	20
5.3.	Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz.....	21
5.3.1.	Planejamento Experimental.....	21

5.3.2.	Validação experimental da Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz	22
5.3.3.	Metodologia experimental da Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz	23
5.4.	Determinação do Teor de Açúcares Redutores	24
5.5.	Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado dos Grãos de Arroz	25
5.5.1.	Preparo dos Hidrolisados para Fermentação.....	25
5.5.2.	Preparo para Fermentação	26
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1.	Caracterização dos Grãos de Arroz.....	30
6.1.1.	Análise Granulométrica	31
6.2.	Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz.....	32
6.2.1.	Planejamento fatorial fracionado 2^{6-2}	32
6.2.2.	Planejamento fatorial completo 2^3	35
6.2.2.1.	Delineamento para a cultivar BRS AG	36
6.2.2.2.	Delineamento para a Cultivar Puitá Inta CL	44
6.3.	Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado	52
7.	CONCLUSÃO	57
8.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	58
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de matérias-primas amiláceas	9
Tabela 2 - Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{6-2}	21
Tabela 3 - Matriz do planejamento 2^{6-2}	22
Tabela 4 - Ensaios fermentativos das cultivares	26
Tabela 5 - Composição solução de sais	27
Tabela 6 - Composição química dos grãos integrais	30
Tabela 7 - Composição química dos grãos polidos	30
Tabela 8 - Açúcares Redutores delineamento fracionado 2^{6-4} para BRS AG.....	33
Tabela 9 - Açúcares Redutores delineamento fracionado 2^{6-4} para Puitá Inta CL	34
Tabela 10 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2^{6-2}	35
Tabela 11 - Valores utilizados no delineamento fatorial completo 2^3	36
Tabela 12 - Matriz do planejamento 2^3	36
Tabela 13 - Açúcares Redutores delineamento completo para BRS AG	37
Tabela 14 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2^3 para BRS AG	37
Tabela 15 - Coeficientes de regressão para cultivar BRS AG	38
Tabela 16 - Análise de variância para BRS AG.....	38
Tabela 17 - Valores de AR experimental, previstos no modelo, erro de ajuste e erros relativos para BRS AG	39
Tabela 18 - Condições experimentais utilizadas no ensaio para validação do modelo para BRS AG	43
Tabela 19 - Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo da hidrólise para BRS AG	44
Tabela 20 - Açúcares Redutores delineamento completo para a cultivar Puitá Inta CL	44
Tabela 21 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2^3 para a cultivar Puitá Inta CL	45
Tabela 22 - Coeficientes de regressão para a cultivar Puitá Inta CL.....	45
Tabela 23 - Análise de variância para a cultivar Puitá Inta CL.....	46
Tabela 24 - Valores de AR experimental, previstos no modelo, erro de ajuste e erros relativos para a cultivar Puitá Inta CL.....	46

Tabela 25 - Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação do modelo para a cultivar Puitá Inta CL.....	50
Tabela 26 - Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo da hidrólise para a cultivar Puitá Inta CL	51
Tabela 27 - Comparativo dos de Teores de AR (mg.mL^{-1}) entre amostras de ambas cultivares	51
Tabela 28 - Condições experimentais de hidrólise hidrólise	52
Tabela 29 - Estimativas produção de etanol	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de operações para produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas	7
Figura 2 - Esquema produção de etanol via HSF	8
Figura 3 - Esquema produção de etanol via SSF.....	9
Figura 4 - Estrutura amilose e amilopectina.....	11
Figura 5 - Estrutura helicoidal do amido	12
Figura 6 - Atividade da α -amilase e glicoamilase sobre a amilose e amilopectina.....	13
Figura 7 - Fluxograma das etapas realizadas.....	17
Figura 8 - Fluxograma Hidrólise Enzimática	24
Figura 9 - Esquema reações DNS	25
Figura 10 - Etapas de preparo dos hidrolisados para a fermentação	26
Figura 11 - Fermentação dos hidrolisados em incubadora.....	28
Figura 12 - Distribuição granulométrica das farinhas de arroz.....	32
Figura 13 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura para a cultivar BRS AG.....	40
Figura 14 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura α para a cultivar BRS AG.....	40
Figura 15 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG	41
Figura 16 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG	41
Figura 17 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG	42
Figura 18 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG	42
Figura 19 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura para a cultivar Puitá Inta CL.....	47
Figura 20 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura para a cultivar Puitá Inta CL	47
Figura 21 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL.....	48

Figura 22 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL	48
Figura 23 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL.....	49
Figura 24 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL	49
Figura 25 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar Puitá Inta CL, com sólidos	52
Figura 26 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar Puitá Inta CL, sem sólidos	53
Figura 27 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar BRS AG com sólidos	54
Figura 28 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar BRS AG sem sólidos	54

RESUMO

FARIAS, Sabrina Peres. **Determinação das condições de hidrólise enzimática e rendimento de etanol da fração amilácea de cultivares de arroz.** Dissertação de Mestrado. Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

O bioetanol é uma alternativa para a solução de problemas ambientais e a escassez de combustíveis. Esse pode ser obtido a partir de diversas biomassas amiláceas. Cultivares de arroz são matérias primas promissoras para produção de etanol amiláceo, pois seus grãos possuem alto teor de amido. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar condições de hidrólise enzimática e rendimento de etanol da biomassa amilácea das cultivares de arroz Puitá Inta CL e BRS AG. Puitá Inta CL é uma cultivar cultivada comercialmente e a BRS AG é uma cultivar com alta produtividade de grãos indicada para alimentação animal ou produção de combustível. Adotou-se a estratégia de planejamento sequencial com o objetivo de encontrar a condição de hidrólise enzimática que fornecesse maior concentração de açúcares redutores (AR). A fermentação foi realizada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Para ambas as cultivares estudadas foi possível obter as mesmas condições operacionais para hidrólise enzimática. As cultivares apresentaram comportamento similares quando fermentadas apresentando concentração final de etanol de 84,1 g.L⁻¹ e 84,9 g.L⁻¹ para Puitá Inta CL e BRS AG, respectivamente. Assim conclui-se que as mesmas apresentam mesmo desempenho quando submetidas ao processo de produção de etanol por via enzimática.

Palavras chaves: Bioetanol, hidrólise enzimática, fermentação, amido.

ABSTRACT

FARIAS, Sabrina Peres. Determination of the conditions for enzymatic hydrolysis and ethanol yield of starchy fraction cultivars and rice. Dissertação de Mestrado. Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

The bioethanol is an alternative to solving environmental problems and the shortage of fuel. This can be obtained from various biomasses starch. Rice cultivars are promising raw materials for ethanol production starchy because their grains have high starch content. Thus, the aim of this study was to optimize enzymatic hydrolysis conditions and yield of ethanol from starchy biomass of rice cultivars PUITA Inta CL and BRS AG. PUITA Inta CL is a cultivar grown commercially and BRS AG is a cultivar with high grain yield indicated for animal feed and fuel production. It adopted the sequential planning strategy with the goal of finding the enzymatic hydrolysis condition to provide a greater concentration of reducing sugars (RS). The fermentation was carried out using commercial *Saccharomyces cerevisiae*. For both cultivars it was possible to obtain the same operating conditions for enzymatic hydrolysis. The cultivars showed similar behavior when fermented presenting final concentration of 84.1 g.L⁻¹ ethanol and 84.9 g.L⁻¹ to PUITA Inta CL and BRS AG, respectively. Thus it follows that they have the same performance when subjected to the ethanol production process by enzymatic route.

Keywords: bioethanol, enzymatic hydrolysis, fermentation, starch

1. INTRODUÇÃO

O etanol vem sendo indicado como uma solução para uma diversidade de problemas complexos associado à energia e questões ambientais (BARCELOS et al., 2011). A produção de etanol combustível, por via biológica, como fonte suplementar de energia tem sido foco em muitos países (ZHANG et al., 2013). Isso ocorre devido ao interesse na redução do uso de combustíveis fósseis e da diminuição de dióxido de carbono (KHAWLA et al., 2014).

No Brasil, o processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar está consolidado e bem sucedido. Porém não é interessante energeticamente manter o foco em apenas uma cultura, sendo necessária a busca por matérias-primas alternativas (BARCELOS et al., 2011).

O etanol também pode ser produzido a partir de açúcares obtidos de biomassas amiláceas ou lignocelulósicas. Esta última mostra-se interessante devido a sua abundância e baixo custo, porém apresenta algumas limitações para produção de etanol (YAMADA et al., 2011). Tais limitações ocorrem, principalmente, por causa da sua resistência à sacarificação, devido à complexidade da estrutura da parede celular (PHITSUWAN et al., 2013). Assim, faz-se necessária uma etapa de pré-tratamento da biomassa para que a mesma fique mais suscetível à ação enzimática (ALVIRA et al., 2010; CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

A biomassa amilácea apresenta-se mais acessível à sacarificação do que a lignocelulósica, o que facilita a produção de etanol. Diversas matérias-primas amiláceas são utilizadas para produção de bioetanol, tais como mandioca, arroz, sorgo sacarino, batata doce e milho, sendo essa última a mais utilizada atualmente. Porém, além do desenvolvimento de processos de produção de etanol amiláceo proveniente de matérias-primas frequentemente empregadas, como o milho, faz-se necessário o aprimoramento de processos eficientes utilizando matérias-primas amiláceas alternativas, como o arroz de alto rendimento (YAMADA et al., 2011).

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de arroz do mundo, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro (MAPA, 2011). Dessa forma, observa-se a potencialidade nacional e regional para produção da cultura de arroz. Esse pode ser aproveitado em sua integralidade, grãos, casca e palha, fornecendo biomassa amilácea e lignocelulósica para obtenção de bioetanol.

A Embrapa Clima Temperado busca o desenvolvimento de genótipos de alta produtividade que possam ser utilizados tanto para alimentação animal quanto para a produção de etanol (EMBRAPA, 2013). Apesar dos diversos estudos nos processos de

produção de etanol é necessário o desenvolvimento de processos que sejam economicamente e ambientalmente sustentáveis. Dentro desse contexto, Monteiro et al. (2009) relataram que a busca por processos ambientalmente sustentáveis acarretará na substituição gradual dos processos químicos por processos enzimáticos. Isso se dá devido algumas vantagens que os processos de hidrólise enzimática apresentam sobre os processos químicos tais como a seletividade das enzimas, economia energética e a não geração de produtos indesejáveis (CURVELO-SANTANA et al., 2010).

Sendo assim, este trabalho objetiva definir as condições do processo de sacarificação enzimática da biomassa amilácea de arroz, visando a produção de etanol de primeira geração.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar as condições de hidrólise enzimática e determinar o rendimento de etanol da biomassa amilácea das cultivares de arroz Puitá Inta CL e BRS AG.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a composição química dos grãos integrais e polidos das duas cultivares de arroz quanto ao teor de lipídeos, umidade, cinzas, fibra bruta, proteína e amido;
- Determinar o teor de amilose nos grãos das cultivares de arroz;
- Estabelecer as condições ótimas de hidrólise enzimática da fração amilácea das cultivares de arroz;
- Fermentar o hidrolisado obtido com a condição otimizada de hidrólise enzimática com e sem a remoção da fração sólida residual;
- Determinar e comparar os rendimentos de etanol obtidos para as duas cultivares nas duas condições, com e sem a remoção da fração sólida residual.

3. JUSTIFICATIVA

A escassez de combustíveis fósseis e os problemas ambientais associados a sua extração e combustão tem promovido o interesse na busca de estratégias de produção e consumo de biocombustíveis (YAMADA et al., 2011, SANTOS et al., 2012). Neste contexto, o bioetanol é um importante biocombustível que pode ser obtido a partir de diversas biomassas renováveis. Biomassas lignocelulósicas ou amiláceas, tais como milho, mandioca, arroz, sorgo sacarino e batata-doce, podem ser promissoras matérias-primas para produção de etanol.

A cultura de arroz é uma matéria-prima promissora para produção de bioetanol, pois fornece biomassa amilácea e também lignocelulósica. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil está entre os maiores produtores mundiais de arroz (MAPA, 2011). Segundo Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil teve um estoque final de mais de 2 mil toneladas de arroz na safra de 2012/13 e o estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional (CONAB, 2013), apresentando uma média do rendimento de grãos de arroz irrigado de 7,5 t/ha, bem acima da média brasileira que é de 4,5 t/ha e isso demonstra a importância do estado na agricultura brasileira (EMBRAPA, 2013).

A Embrapa Clima Temperado possui uma intensa e histórica atuação na pesquisa e desenvolvimento com a cultura do arroz irrigado. Dentre os inúmeros projetos de pesquisa, busca por aplicações para tipos especiais de arroz, através da diversificação do seu uso, visando também o desenvolvimento de genótipos que possuam alta produtividade e que possam ser utilizados para alimentação animal e produção de etanol (EMBRAPA, 2013).

Segundo Yamada et al. (2011), além da otimização de processos de produção de etanol utilizando matérias-primas amiláceas comumente utilizadas, como o milho, é importante também desenvolver processos rentáveis e eficientes utilizando matérias-primas alternativas como o arroz. No entanto, são poucas as informações encontradas na literatura sobre as condições de sacarificação e fermentação de grãos de arroz para a produção de etanol.

De acordo com Monteiro et al. (2009), a preocupação em poluir menos acarretará na substituição gradual dos processos químicos por processos enzimáticos, visto que as enzimas são capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente mais viáveis. Sendo assim, é importante estabelecer condições de hidrólise enzimática que viabilizem o processo de produção de etanol tornando-o ambientalmente sustentável.

Portanto, estabelecer as condições do processo enzimático para a conversão de materiais amiláceos do arroz para sua utilização posterior na produção de etanol, é plenamente justificável à medida em que possibilitará o aproveitamento desta cultura que apresenta alto grau de tecnologia de produção e rendimento em grãos, com potencial de tornar-se energeticamente sustentável.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Etanol no Brasil

Há registros históricos que relatam o uso do etanol no Brasil como combustível desde a década de 20. Em 1975, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que dentre outros objetivos previa a produção de etanol anidro para misturar à gasolina (MACHADO, 2013). Assim, o etanol combustível foi de fato introduzido à matriz energética brasileira, reduzindo a dependência externa do petróleo e diversificando o uso da cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2013).

Atualmente, Brasil e Estados Unidos são responsáveis por cerca de 80% da oferta mundial de etanol. O Brasil produz etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar e mais de 20% dos carros no país podem utilizar somente esse combustível, estes com motores unicamente a etanol ou flex. Os veículos com motores flex podem utilizar etanol ou gasolina, ou quaisquer misturas de ambos. (BAEYENS et al., 2015).

Cerca de 1% da área total do Brasil é ocupada pela cultura de cana-de-açúcar. O setor industrial de cana-de-açúcar é uma das principais atividades econômicas do país e, neste segmento, são encontradas usinas de açúcar, destilarias de álcool e usinas integradas de açúcar e etanol (SILVEIRA et al. 2014). O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, tendo tecnologia consolidada no setor e na Safra 2010/2011, a produção de álcool foi de 25,7 bilhões de litros (SANTOS et al., 2013).

4.2. Produção de etanol

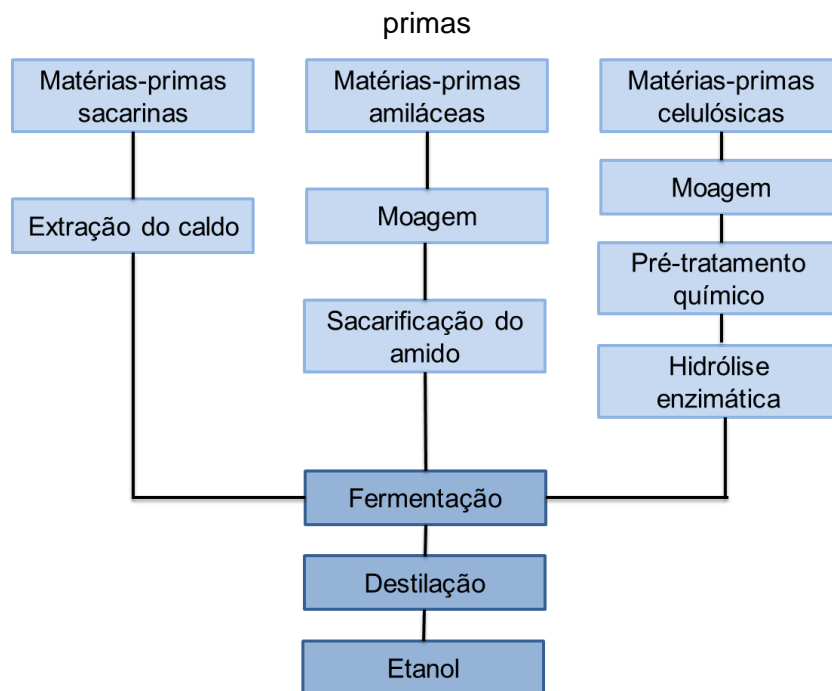
O processo de produção de etanol pode ser de primeira, segunda ou terceira geração dependendo da matéria prima do qual é obtido. O etanol produzido no Brasil, a partir do caldo da cana-de-açúcar e melaço, é um processo de primeira geração (MORAES et al., 2015). Após o caldo ser extraído e tratado, é misturado com o melaço dando origem ao mosto. A esta mistura são adicionadas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e ocorre a fermentação dos açúcares a etanol. O mosto fermentado com 7% a 10% de álcool é separado das leveduras, que são recuperadas para novo uso, e é levado para a etapa de destilação (SANTOS et al., 2013).

De acordo com Naik et al. (2010), etanol de primeira geração pode ser obtido de açúcares ou amido e o de segunda geração de materiais lignocelulósicos. O etanol de terceira geração é produzido a partir de algas e está em estágios iniciais de estudos (BAEYENS et al., 2015).

As etapas para o processo de produção de etanol dependem da biomassa que será empregada. As matérias-primas sacarinas que contém carboidratos simples, como

glicose, frutose e sacarose são diretamente fermentadas. Biomassas amiláceas, constituídas por amido, precisam ser hidrolisadas para obtenção de monossacarídeos. Os materiais lignocelulósicos, constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, necessitam de uma etapa de pré-tratamento indispensável para redução da resistência do material à hidrólise enzimática para produção de monossacarídeos (MACHADO, 2013). A Figura 1 ilustra as diferentes etapas necessárias para a produção de etanol a partir das matérias primas sacarinas, amiláceas e celulósicas.

Figura 1 - Diagrama de operações para produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas



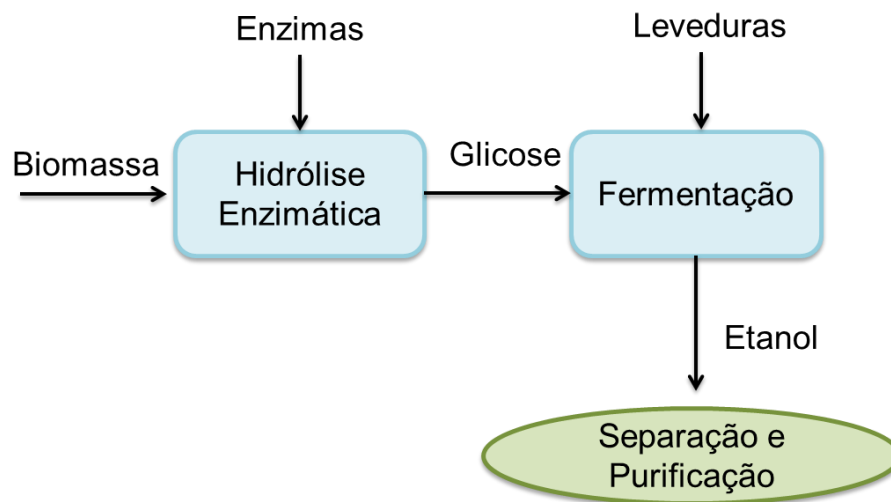
Fonte: Machado (2013).

A etapa de hidrólise é geralmente realizada por via enzimática, pois os processos enzimáticos são realizados em condições de reações menos severas do que os processos de hidrólise ácida e apresentam alta conversão da biomassa em glicose, devido à alta especificidade das reações enzimáticas (KHAWLA et al., 2014). O processo de produção de etanol pode ser realizado de forma sequencial, hidrólise separada da fermentação (HSF), ou simultânea, sacarificação simultânea à fermentação (SSF) (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

No processo HSF, na etapa de hidrólise ou sacarificação, normalmente realizada via hidrólise enzimática, ocorre a decomposição do material em açúcares fermentáveis. Posteriormente, estes açúcares liberados são fermentados em etanol, utilizando leveduras (LUQUE et al., 2008). Este processo apresenta como principais vantagens a possibilidade

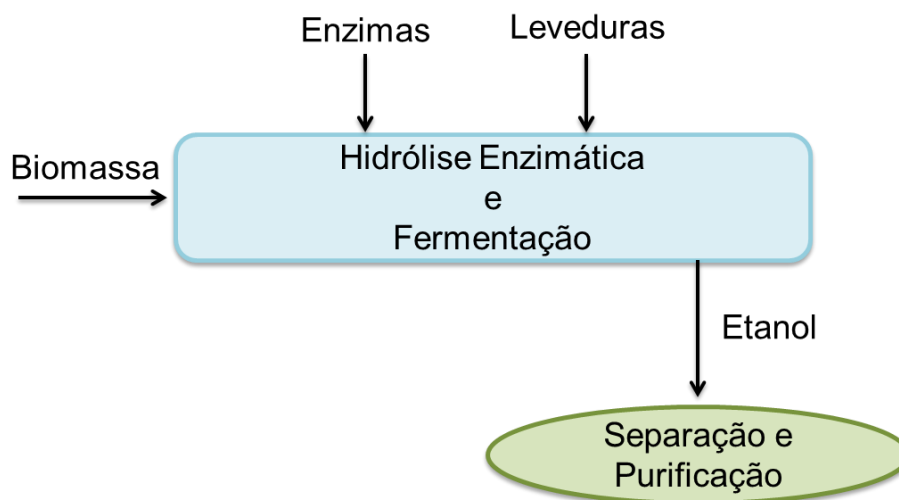
da hidrólise e da fermentação serem conduzidas em suas condições ótimas, já que essas condições podem não coincidirem para ambas as etapas. Já como desvantagem, ocorre o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, causando inibição às enzimas, e redução na conversão final de glicose, devido à adsorção de parte do açúcar no sólido residual da hidrólise (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). A Figura 2 apresenta um fluxograma esquemático da produção de etanol via processo HSF.

Figura 2 - Esquema produção de etanol via HSF



Fonte: Adaptado de Cordona e Sanchez (2007) e Castro e Pereira Junior (2010)

No processo SSF, a hidrólise enzimática e a fermentação ocorrem em um único reator. Esse processo apresenta alta eficiência na produção de etanol e redução de produtos inibidores e de custos de investimentos (CASTRO e PEREIRA JR., 2010; PHITSUWAN et al., 2013). Nesse processo, a glicose liberada é simultaneamente fermentada e a baixa concentração de glicose no meio também favorece a formação de produtos e reduz os riscos de contaminação no sistema (CASTRO e PEREIRA JR., 2010). A Figura 3 apresenta um fluxograma esquemático da produção de etanol via processo SSF.

Figura 3 - Esquema produção de etanol via SSF

Fonte: Adaptado de Cordona e Sanchez (2007) e Castro e Pereira Junior (2010)

4.3. Matérias-primas Amiláceas para Produção de Etanol

Segundo Yamada et al. (2011), há relatos da produção de etanol a partir de diversas matérias primas amiláceas como mandioca, arroz, sorgo sacarino e milho, destas o milho é a matéria prima mais utilizada para produção de bioetanol. O milho é a principal fonte de produção de álcool combustível nos EUA e, em 2012, 30,8 % da produção total de milho foi utilizada para produção de etanol (RAMCHANDRAN et al., 2015). A tabela 1 apresenta a composição química de algumas matérias-primas amiláceas.

Tabela 1 - Composição química de matérias-primas amiláceas

Componente	Sorgo ^a	Milho ^b	Mandioca ^c	Arroz Integral ^d
Amido	79,05	72	18 - 32	74,12
Umidade	14,03	-	65	-
Lipídeos	3,37	4	0,2	2,52
Cinzas	1,15	-	0,9-1	1,15
Fibra Bruta	1,4	9	1,1	11,76
Proteínas	10,06	9,5	1	10,46

Fonte: a - Barcelos (2012); b - Paes (2006); c - Okudoh et al. (2014) e d - Walter et al. (2008)

4.4. Arroz

O Arroz (*Oryza sativa*) é o principal cereal cultivado no mundo. O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de arroz, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro (MAPA, 2011). O estado do Rio Grande do Sul apresenta uma média do rendimento de grãos de arroz irrigado de 7,5 t/ha, bem acima da média brasileira que é de 4,5 t/ha, demonstrando a importância do estado na agricultura brasileira (EMBRAPA, 2013).

Diferenças nas condições climáticas, na composição genética e na preferência dos consumidores têm levado à evolução genética de milhares de cultivares de arroz. A diversidade entre as cultivares em grande parte atinge suas propriedades físicas, composição, propriedades de cozimento e composição de aromáticos (WANI et al., 2013). A composição do grão está sujeita a diferenças entre as variedades, variações ambientais, de manejo, processamento e de armazenamento (WALTER et al., 2008).

A cultura de arroz fornece matérias-primas promissoras para a produção de bioetanol, pois fornece biomassa amilacéa e também lignocelulósica. Aproximadamente 465.078 mil toneladas de arroz são produzidos no mundo e para cada quilograma de grão colhido cerca de 20% a 33% é casca de arroz. A casca de arroz contém cerca de 28% de celulose, 28% de hemicelulose e 24% de lignina. O alto rendimento e o baixo custo fazem da casca de arroz uma matéria-prima potencial para produção de etanol. Contudo, a complexa estrutura lignocelulósica da biomassa a torna resistente à degradação, o que limita sua utilização na produção de etanol (POTUMARTHI et al., 2013).

Além da casca, outro resíduo gerado na produção agrícola de grãos de arroz é a palha. A palha de arroz é o mais abundante resíduo agrícola em todo o mundo e estima-se que exista disponível cerca de 700 a 800 milhões de toneladas por ano (HSU et al., 2010). Assim como a casca, a palha de arroz é composta principalmente por celulose e hemicelulose, que podem ser hidrolisadas e fermentadas para a produção de etanol (ABEDINIFAR et al., 2009).

O amido, principal constituinte do grão, determina principalmente a aceitabilidade da cultivar de arroz em termos de propriedades físico-químicas. O amido de arroz apresenta vantagens tecnológicas em relação a outras fontes, por exemplo, a ampla variedade de proporções de amilose:amilopectina. A grande diversidade e características únicas fazem com que o arroz seja uma importante fonte de amido para indústria (WANI et al., 2013).

Diversas matérias-primas amiláceas são utilizadas para produção de bioetanol e atualmente o milho é a mais utilizada. Porém, além do desenvolvimento de processos de produção de etanol amiláceo proveniente de matérias-primas frequentemente empregadas, como o milho, faz-se necessário o aprimoramento de processos eficientes utilizando

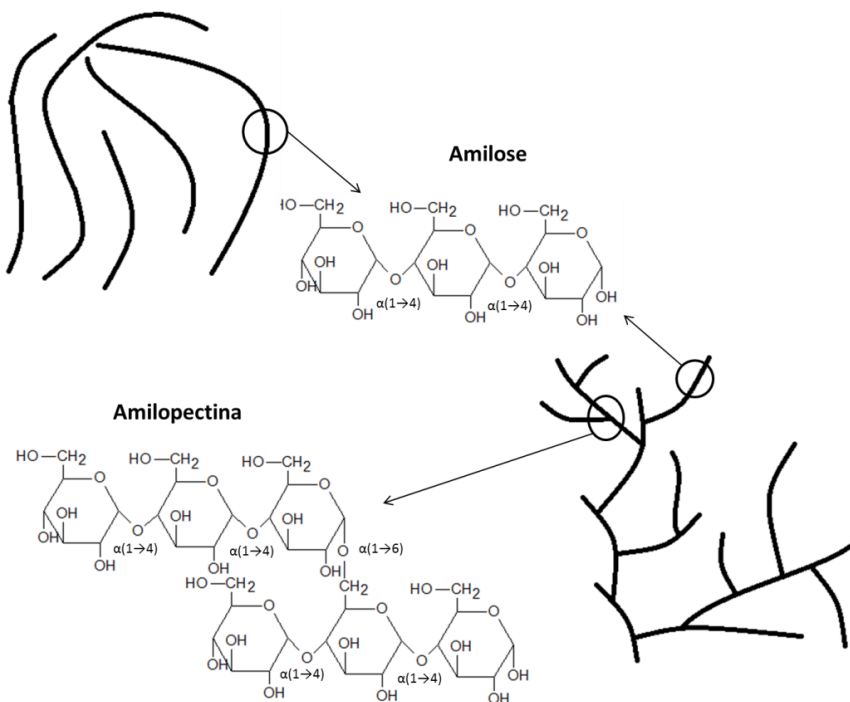
matérias-primas amiláceas alternativas, como o arroz de alto rendimento (YAMADA et al., 2011).

4.4.1. Amido

O amido é um polímero homogêneo, com alto peso molecular, composto por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas (NELSON e COX, 2011). É a principal fonte de reserva das plantas (sementes, tubérculos, raízes, bulbos e rizomas) e nos vegetais, encontra-se em pequenos grânulos, com características diferentes para cada espécie. As duas principais moléculas que constituem o amido são amilose e amilopectina, que em sua maioria apresenta de 15 a 30% de amilose e de 70 a 85% de amilopectina (KOBLOITZ, 2008).

A amilose é uma molécula linear, de resíduos de D-glicose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ com um pequeno número de ramificações. A amilopectina, ao contrário da amilose, é altamente ramificada, com ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, unindo os resíduos de D-glicose sucessivos, e com 5 a 6% de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ nos pontos de ramificações (Al, 2013; BARCELOS, 2012). A Figura 4 ilustra as estruturas e ligações das moléculas de amilose e amilopectina.

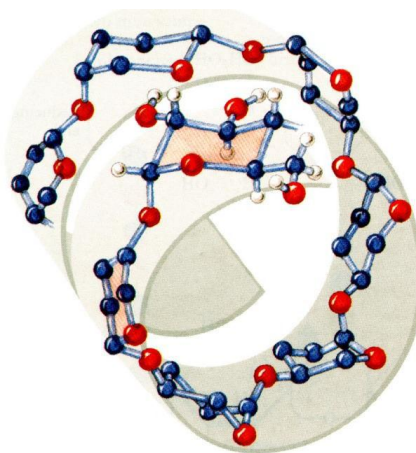
Figura 4 - Estrutura amilose e amilopectina



Fonte: Adaptado Lima et al. (2001)

Os arranjos moleculares das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ dão ao amido a estrutura helicoidal e as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ formam as ramificações, que dão origem as estruturas amorfas, facilmente hidrolisáveis (NELSON e COX, 2011). A Figura 5 representa a estrutura helicoidal do amido. O emprego de matérias-primas amiláceas para produção de etanol necessita da utilização de enzimas amilolíticas para liquefação e sacarificação do amido, transformando-o em açúcares fermentáveis. O processo de fermentação é semelhante ao empregado para cana-de-açúcar e melaço (BARCELOS, 2012).

Figura 5 - Estrutura helicoidal do amido



Fonte: Barcelos (2012)

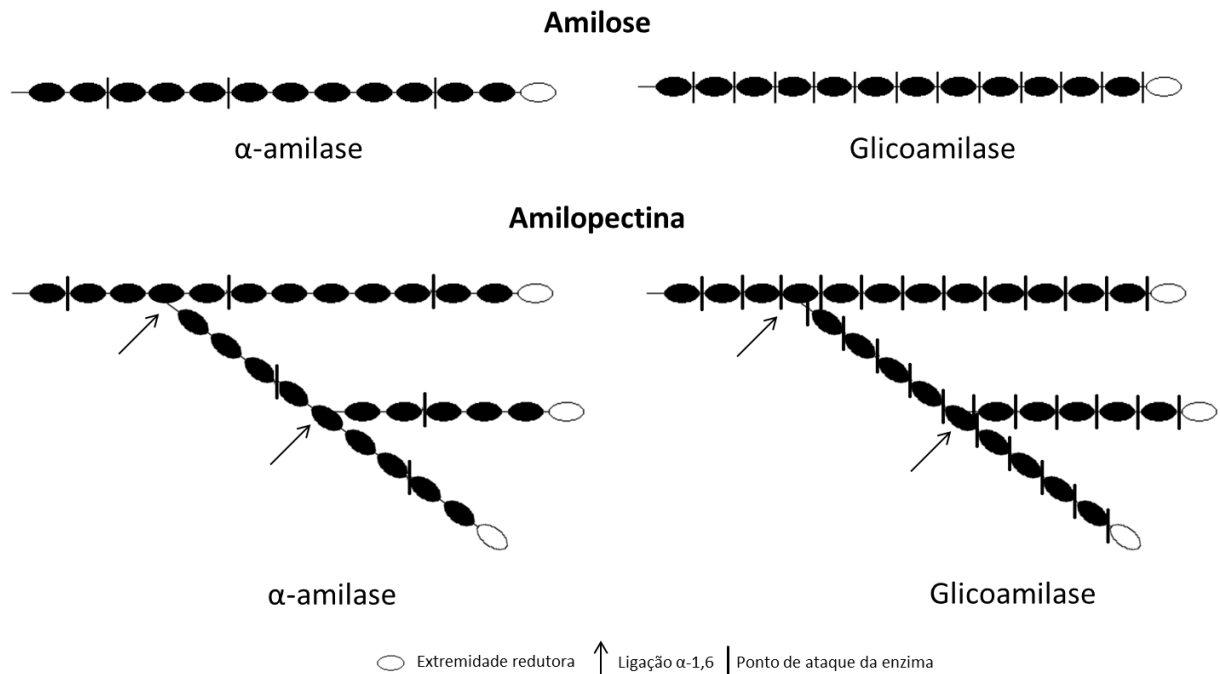
4.4.1.1. Hidrólise Enzimática do Amido

Segundo Koblitz (2008), em seu estado nativo, os grânulos de amido são resistentes ao ataque enzimático da maioria das enzimas amilolíticas. Porém, quando aquecidos em água os grânulos sofrem gelatinização, absorvendo grande quantidade desta e tornando-se suscetíveis ao ataque enzimático.

A hidrólise enzimática do amido ocorre devido à ação de dois grupos de enzimas, as α -amilases (EC 3.2.1.1) e as glicoamilases ou amiloglicosidase (EC 3.2.1.3). As primeiras são endo-carboidrases que hidrolisam de forma aleatória as ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, existentes na amilose e amilopectina, na região central das moléculas. As glicoamilases são exoenzimas capazes de remover glicoses a partir da extremidade não-redutora das cadeias de amilose e amilopectina. Estas são capazes de hidrolisar tanto as ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ quanto as $\alpha(1\rightarrow6)$. Teoricamente, as glicoamilases são capazes de converter totalmente o amido em glicose, porém, na prática, a conversão não é completa na ausência de α -amilases, motivo pelo qual as duas enzimas são utilizadas em conjunto (KOBBLITZ, 2008). A Figura 6

apresenta um esquema da atuação da α -amilase e glicoamilase sobre as cadeias da amilose e amilpectina.

Figura 6 - Atividade da α -amilase e glicoamilase sobre a amilose e amilpectina



Fonte: Adaptado de KOBELITZ (2008)

Sendo assim, o processo de hidrólise enzimática do amido inicia pela etapa de gelatinização que se dá pelo aquecimento de suspensões de amido, tornando a molécula mais acessível ao ataque enzimático, fato esse que viabiliza uma reação mais eficiente (BARCELOS, 2012). A etapa seguinte, denominada liquefação, ocorre devido à ação da α -amilase, promovendo a quebra limitada das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ produzindo açúcares de pequena massa molecular, chamados de dextrinas (BARCELOS, 2012; KHAWLA et al., 2014). A ação da α -amilase é rápida sobre o amido devido a essa enzima apresentar maior atividade sobre substratos de alto peso molecular (KOBELITZ, 2008).

A última etapa da hidrólise enzimática do amido é a sacarificação, em que ocorre a hidrólise das moléculas oriundas da liquefação em glicose (KHAWLA et al., 2014). Esta reação é catalisada pela glicoamilase, enzima que ataca as ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e também as $\alpha(1\rightarrow6)$, com menor intensidade (BARCELOS, 2012). A glicose obtida na sacarificação pode ser diretamente fermentada, pelas mesmas leveduras utilizadas em cervejarias e na fermentação do caldo de cana-de-açúcar, para obtenção do etanol (PHITSUWAN et al., 2013).

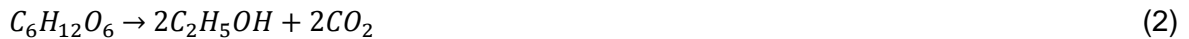
4.5. Fermentação Alcoólica

A fermentação é o processo que ocorre a transformação dos açúcares em álcool e gás carbônico pela ação de micro-organismos. Vários micro-organismos são capazes de produzir etanol a partir de açúcares. Porém as leveduras, principalmente a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, são as mais empregadas, pois aumentam a viabilidade técnica e econômica do processo (MACHADO, 2013).

As leveduras são unicelulares e se reproduzem por brotamento, fissão ou esporulação. Essas são microorganismos aeróbicos facultativos. Em sua reprodução produzem gás carbônico e água quando em aerobiose, ou respiração, conforme Equação 1 (MACHADO, 2013).



Em anaerobiose, ou fermentação, as leveduras produzem etanol, gás carbônico e apresentam um pequeno crescimento, de acordo com a Equação 2 (MACHADO, 2013).



O rendimento teórico para a produção de etanol é de 0,511 g etanol/g glicose. Na prática, este valor não é observado devido a utilização de parte da glicose para a produção de glicerol e álcoois superiores, substâncias necessárias para síntese de material celular e manutenção da levedura (BARRE et al., 2000).

Segundo Machado (2013) é indicado que as fermentações alcoólicas ocorram com pH do meio entre 4 e 5 e na faixa de temperaturas de 25 a 36°C. As leveduras indicadas para a fermentação alcóolica devem apresentar características como alta velocidade de fermentação, resistência a altas concentrações de etanol, baixa inibição pelo substrato e pelo produto. O meio de cultivo deve atender as suas necessidade nutricionais, fornecendo nitrogênio, hidrogênio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, zinco, vitaminas, dentre outros (BARCELOS, 2012 e MACHADO, 2013).

4.6. Otimização de Processos – Planejamento Experimental

A aplicação de técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos são utilizadas, dentre outros, com o objetivo da otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos. Associada à análise de superfícies de respostas, a metodologia do planejamento fatorial é uma ferramenta com fundamentos na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativas e erro (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Rodrigues e Iemma (2014) relataram como algumas das vantagens da utilização de planejamento experimental, a redução do número de experimentos e repetições e análise simultânea de fatores, o que permite avaliar efeitos sinérgicos e antagonísticos entre os fatores de interesse. Porém, segundo os autores, para que o uso dessa metodologia atinja os objetivos desejados, é necessário haver uma integração entre o processo, estatística e bom senso.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Matéria Prima e Enzimas

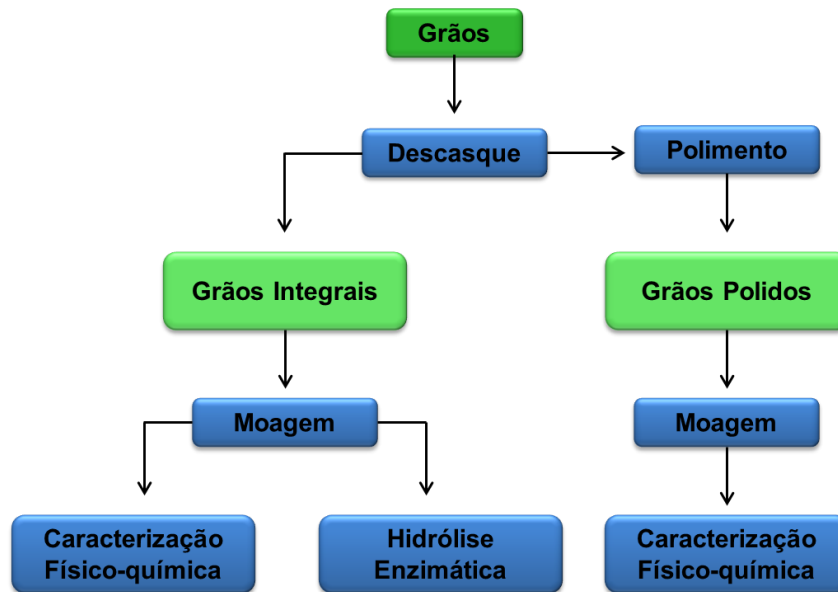
Foram utilizados grãos das seguintes cultivares de arroz: Puitá INTA CL, cultivar comercial, e BRS AG cultivar desenvolvida pela Embrapa Clima Temperado – Pelotas/RS. As enzimas comerciais utilizadas nos experimentos de hidrólise foram Liquozyme Supra 2.2X, com atividade declarada pelo fabricante igual a 300 KNU.g⁻¹ (KNU – quilo unidades Novo de α -amilase, quantidade de enzima que degrada 5,26 g de amido por hora, de acordo com o método padrão da Novozymes), e AMG 300 L com atividade declarada de 300 AGU.g⁻¹ (AGU quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de maltose por minuto, sob condições específicas, segundo método padrão da Novozymes) ambas doadas pela LFN Latino América (Bento Gonçalves – RS). Os dados experimentais foram analisados através do *Software Statistica*.

5.2. Preparo e Caracterização dos Grãos de Arroz

Os grãos foram descascados em engenho de prova e uma fração foi polida para realização da caracterização físico-química. As duas amostras de grãos (grãos apenas descascados e grãos descascados e polidos) foram moídas em moinho de facas, para obtenção da farinha e esta foi conservada sob refrigeração.

A caracterização físico-química dos grãos foi realizada utilizando a farinha obtida após a moagem. Esta farinha foi novamente moída em moinho de bancada a fim de reduzir o diâmetro das partículas e homogeneizar as amostras para a realização das análises químicas. O material foi seco em estufa a 60°C. Foram realizadas as análises de determinação do teor de amido, fibras, lipídeos, proteína, cinzas, matéria seca, amilose e análise granulométrica. A Figura 7 apresenta as etapas que foram realizadas com os grãos de arroz.

Figura 7 - Fluxograma das etapas realizadas



5.2.1. Determinação do Teor de Amido

O teor de amido foi determinado, utilizando a farinha de arroz, conforme o método do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), sendo quantidade de amido calculada em função da concentração de glicose determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SLUITER e SLUITER, 2008). A análise foi realizada pela Embrapa Agroenergia - Brasília.

5.2.2. Determinação do Teor de Fibras

O teor de fibra bruta foi determinado utilizando-se o determinador de fibras TE – 149 (Tecnal) segundo método sugerido pelo fabricante do equipamento. Aproximadamente 1 g de farinha foi pesada em saquinhos de TNT e selados com auxílio de seladora térmica M - 300 T (Barbi). As amostras contidas nos saquinhos foram hidratadas com 0,5 L de água antes da digestão.

As amostras hidratadas foram introduzidas no equipamento e realizou-se a digestão ácida com 2 L de ácido sulfúrico 1,25%, a 95°C durante 30 min. Transcorrido o tempo, o ácido foi retirado do equipamento e foram realizadas quatro lavagens com duração de 5 minutos cada, com água purificada por osmose reversa. Para cada lavagem foram necessários 2 L de água a 100°C. A digestão alcalina foi realizada com a adição de 2 L de hidróxido de sódio 1,25%, durante 30 minutos a 96°C. A solução foi escoada e o procedimento da lavagem com água, repetido.

Ao final da lavagem, as amostras foram removidas do equipamento e transferidas para um béquer onde realizou-se a lavagem com 0,5 L de álcool etílico seguida da lavagem com 0,5 L de acetona. Os saquinhos foram secos sobre papel absorvente e foram levados a estufa em cadinhos de porcelana a 105°C durante 6 h. O conjunto (saquinho-amostra-cadinho) foi pesado e, após frio, calcinado em mufla por 1 h a 550°C. Após esfriar, os cadinhos com as cinzas foram pesados e o teor de fibras calculado conforme a Equação 3.

$$\text{Fibra Bruta (\%)} = \frac{(C - A) - D}{B} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

A – Massa do saquinho vazio (g);

B – Massa da amostra (g);

C – Massa do conjunto cadinho + saquinho + amostra (g);

D – Massa do conjunto cadinho + cinzas (g).

5.2.3. Determinação do Teor de Lipídios

A análise de teor de lipídios foi realizada segundo Paquot (1979). Para determinação de lipídeos, pesou-se aproximadamente 5 g de farinha em cartucho de celulose, cobrindo-se posteriormente a amostra com algodão. A extração foi realizada durante 4 horas em extrator de soxhlet na presença hexano. A temperatura foi mantida constante no aparelho extrator, dentro da faixa de ebulição do solvente. Após a extração, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e a fração lipídica foi seca até peso constante em estufa a 60°C. O teor de lipídios foi calculado conforme a Equação 4.

$$\text{Teor de Lipídeos} = \frac{\text{massa}_{\text{óleo}}}{\text{massa}_{\text{farinha}}} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

massa_{óleo} – massa final de óleo extraída (g);

Massa_{farinha} – massa de farinha pesada no cartucho de celulose (g).

5.2.4. Determinação do Teor de Proteína

O conteúdo de nitrogênio foi determinado utilizando-se Analisador Elementar TruSpec CHN (LECO). Pesou-se aproximadamente 0,1 g de amostra em folha fina de estanho e levou-se ao equipamento para a queima a 850-900 °C. O teor de proteína bruta foi obtido multiplicando por 5,95 o teor de nitrogênio total, que segundo Instituto Adolfo Lutz (2008) é o fator de conversão de nitrogênio total em proteína para grãos de arroz.

5.2.5. Determinação do Teor de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado utilizando-se o método de Sluiter et. al (2005) com adaptações, pesou-se cerca de 2 g de amostra, pesada em cadinhos previamente secos e devidamente pesados. As amostras foram calcinadas em mufla a 550°C durante 6 h. O teor de cinzas foi calculado conforme a equação a 5.

$$\% c = \left(\frac{(\text{Cadinho}_{\text{cinzas}} - \text{Cadinho}_{\text{inicial}})}{\text{Massa}_{\text{amostra}}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde: %c – teor de cinzas (%);

Cadinho_{cinzas} – massa do cadinho contendo as cinzas (g);

Cadinho_{inicial} – massa do cadinho vazio (g);

Massa_{amostra} – massa de amostra (g).

5.2.6. Matéria Seca

Para determinação do teor de matéria seca pesou-se aproximadamente 2 g de farinha de arroz, em cadinhos previamente secos e pesados. A amostra foi seca em estufa a 105°C até massa constante. O teor de matéria seca foi calculado segunda a Equação 6.

$$\% MS = \left(\frac{(\text{Cadinho}_{\text{final}} - \text{Cadinho}_{\text{inicial}})}{\text{Massa}_{\text{amostra}}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

Onde:

% MS – teor de massa seca (%);

Cadinho_{final} – massa do cadinho contendo a amostra seca (g);

Cadinho_{inicial} – massa do cadinho vazio (g);

Massa_{amostra} – massa de amostra (g).

5.2.7. Determinação do Teor de Amilose

O conteúdo de amilose presente nas farinhas foi determinado utilizando o método de Martinez e Cuevas (1989), com adaptações. Aproximadamente 0,1 g de farinha dos grãos polidos, peneirada em peneira de 60 mesh, foi transferida para frascos erlenmeyeres de 250 mL, para a adição de 1 mL de álcool etílico 95% e 9 mL de solução de hidróxido de sódio 1N. Levou-se a mistura a banho-maria fervente durante 9 minutos. Após esfriar, o material foi transferido para balões volumétricos de 100 mL e o volume completado com água purificada em osmose reversa.

De cada amostra, transferiu-se uma alíquota de 5 mL para um balão volumétrico de 100 mL, em que adicionou-se 1 mL de ácido acético 1N e 2 mL de solução de iodo 2% (p/v). O volume dos balões foi completado com água purificada em osmose reversa. A leitura de absorvância foi realizada após 30 min de repouso a 590 nm. A curva padrão foi preparada previamente, utilizando-se amilose pura (Sigma) submetida ao mesmo procedimento utilizado para a farinha dos grãos de arroz.

5.2.8. Análise Granulométrica

A análise granulométrica da farinha de arroz utilizada nas reações de hidrólise, foi realizada utilizando o agitador de peneiras para análises granulométricas (Bertel) contendo diferentes peneiras com aberturas entre 0,5 e 0,045 mm (32 – 325 Mesh Tyler). O tamanho das partículas foi classificado pelo Diâmetro Médio de Sauter (smd), conforme Equação 7.

$$Smd = \frac{1}{\sum_{j=1}^N \frac{w_j}{d_{p,j}}} \quad (7)$$

Onde:

w_j - fração mássica retida na peneira j ;

$d_{p,j}$ - abertura da peneira j (mm);

N - número de peneiras.

5.3. Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz

5.3.1. Planejamento Experimental

A estratégia sequencial de planejamentos experimentais foi adotada para buscar a condição que fornecesse maior concentração de açúcares redutores (AR), ao final da etapa de hidrólise enzimática. Com o objetivo de avaliar o efeito das variáveis, temperatura de liquefação (temperatura ^{α -amilase}) (°C), dosagem de α -amilase (dosagem ^{α -amilase}) (μ L), tempo de liquefação (tempo de reação ^{α -amilase}) (min), temperatura de sacarificação (temperatura^{AMG}) (°C), dosagem de AMG (dosagem^{AMG}) (μ L), tempo de sacarificação (tempo de reação^{AMG}) (min), realizou-se um delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} com 3 repetições no ponto central, para cada cultivar em estudo. Os níveis utilizados no planejamento fatorial fracionado basearam-se no estudo de Barcelos (2012) que hidrolisou grãos de sorgo com enzimas comerciais. As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores usados em cada nível das variáveis e a matriz do planejamento 2^{6-2} , respectivamente.

Tabela 2 - Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{6-2}

Variáveis		Código	Níveis		
			-1	0	+1
α-Amilase	Dosagem ($\mu\text{L.g}^{-1}$ grão)	x_1	20	60	100
	Temperatura (°C)	x_2	70	80	90
	Tempo (min)	x_3	30	45	60
Glucoamilase	Dosagem ($\mu\text{L.g}^{-1}$ grão)	x_4	20	60	100
	Temperatura (°C)	x_5	50	55	60
	Tempo (min)	x_6	30	45	60

Tabela 3 - Matriz do planejamento 2^{6-2}

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	-1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	1	-1	1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	-1	1
16	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0

Após a avaliação dos efeitos e triagem das variáveis, realizou-se um planejamento fatorial completo 2^n com 3 repetições no ponto central, para cada uma das cultivares.

5.3.2. Validação experimental da Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz

Após analisar as superfícies de respostas obtidas a partir dos planejamentos fatoriais completos 2^n , realizados para cada uma das cultivares estudadas, foi possível determinar as condições de hidrólise que resultam na maior concentração de açúcares redutores no hidrolisado obtido. Para tais condições, foram realizados ensaios em triplicada os quais foram comparados com os valores preditos pelo modelo matemático obtido, para verificação desse modelo.

5.3.3. Metodologia experimental da Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz

As hidrólises enzimáticas foram realizadas sob agitação magnética em reator de vidro encamisado acoplado a um banho ultratermostático. Misturou-se 10 g de farinha de arroz integral com água purificada por osmose reversa (relação sólido:líquido de 1:3). A mistura foi tratada com as enzimas em duas etapas.

A primeira etapa, liquefação, foi realizada utilizando a enzima Liquozymes em pH 6,9. Transcorrido o tempo de liquefação, o pH foi corrigido para 5 com ácido acético 0,1 M e a temperatura reduzida para a realização da etapa seguinte. A etapa de sacarificação foi então realizada em pH 5,0 utilizando a enzima AMG 300 L. A temperatura, o tempo e a dosagem da enzima variaram conforme as faixas já apresentadas na tabela 3, para o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} . As enzimas foram solubilizadas em solução tampão fosfato pH 6,9 e tampão acetato pH 5,0, para a Liquozymes e AMG 300 L, respectivamente, antes de serem adicionadas ao meio reacional. O volume da enzima foi completado a 5 mL com solução tampão e ambientalizado na temperatura da reação.

A interrupção da reação foi realizada com a adição de 5 mL de NaOH 3M. Após o término da reação, o material reacional foi transferido para tubos falcon e centrifugados, a 2100 rpm durante 10 min, para separação da solução com os açúcares redutores, do material não hidrolisado, precipitado. A centrifugação foi realizada duas vezes. A eficiência de hidrólise enzimática (E.H.) dos grãos de arroz foi calculada segundo Bacelos (2012), como mostra a Equação 8.

$$E. H. (\%) = \frac{AR}{CS.TA.1,1} \cdot 100 \quad (8)$$

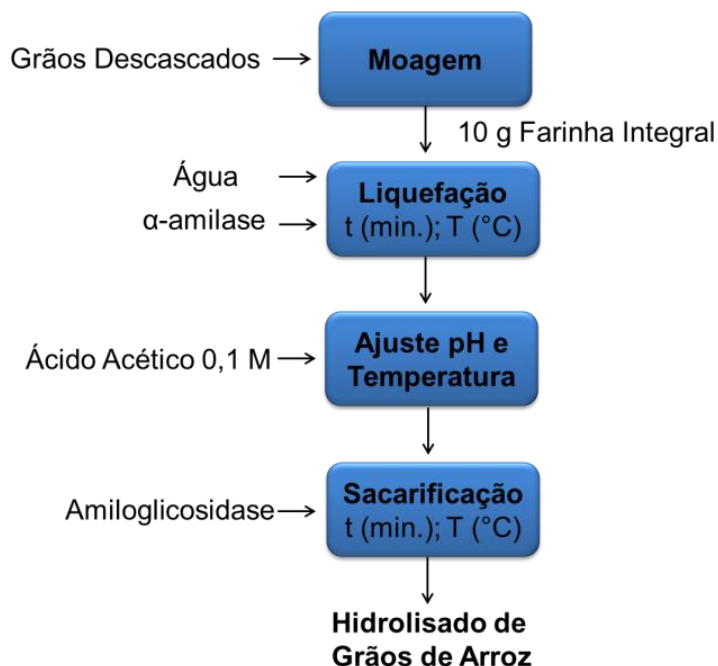
Onde:

AR - concentração de açúcares redutores após hidrólise enzimática dos grãos de arroz (g.L^{-1});

CS - concentração de sólidos final (g.L^{-1});

TA - teor de amido nos grãos de arroz (g.L^{-1}).

O fator de conversão 1,1, utilizado na Equação 8, está relacionado à adição de uma molécula da água (18 g.mol^{-1}) para a liberação de uma molécula de glicose (180 g.mol^{-1}), após o rompimento de cada ligação covalente durante a hidrólise do amido. A Figura 8 apresenta um fluxograma das etapas da hidrólise enzimática dos grãos de arroz.

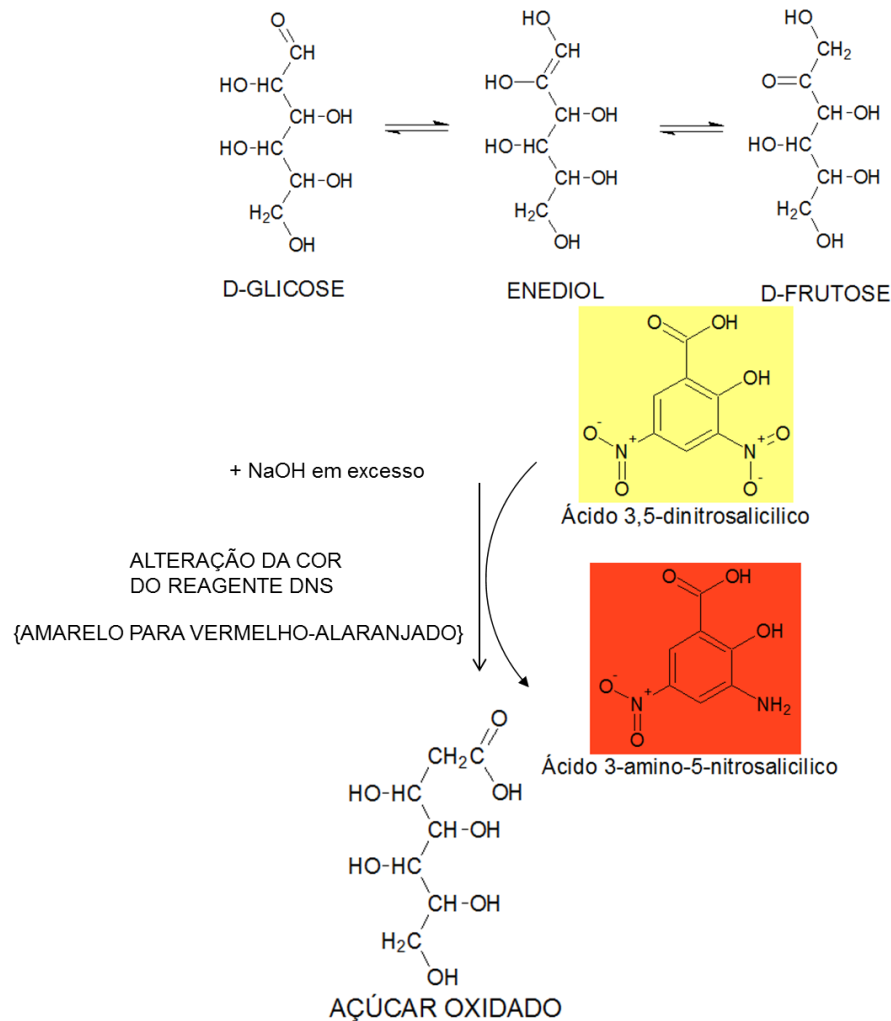
Figura 8 - Fluxograma Hidrólise Enzimática

5.4. Determinação do Teor de Açúcares Redutores

A quantificação dos açúcares redutores (AR) no produto da hidrólise dos grãos de arroz foi realizada pela adaptação do método descrito por Miller (1959). O método baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cor amarelo, que é reduzido a um composto avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor. Na Figura 9 visualiza-se esquematicamente as reações que ocorrem no método de DNS.

A solução de DNS foi preparada a partir da solubilização 4,4 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 440 mL de água purificada em osmose reversa. Sob agitação magnética, adicionou-se 150 mL de NaOH 4,5 % e 99,765 mL de tartarato duplo de sódio e potássio.

Em microtubos tipo eppendorf de 2 mL foram adicionados 100 µL de amostra previamente diluídas e 300 µL de solução de DNS. Os tubos foram agitados em agitador para tubos tipo vortex e colocados em banho-maria fervente durante 5 min. Transcorrido o tempo, os tubos foram transferidos para um banho com gelo, para serem resfriados. Adicionou-se então 1,5 mL de água purificada em osmose reversa e realizou-se a leitura em espectrômetro a 540 nm. A concentração de açúcar foi calculada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de uma solução de glicose com intervalos de 0 a 3 g.L⁻¹.

Figura 9 - Esquema reações DNS

Fonte: Maldonade *et al.* (2013)

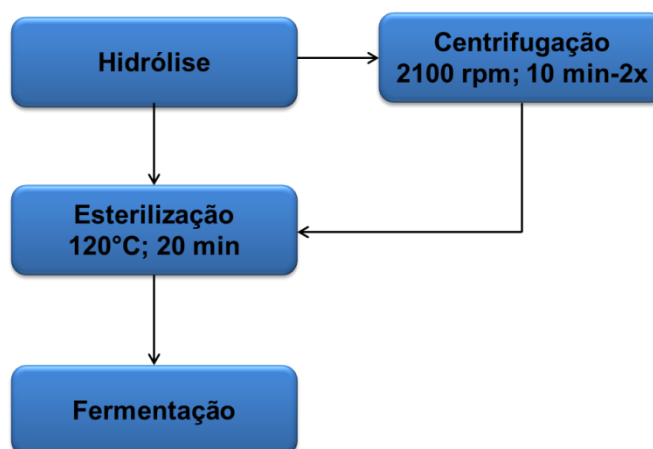
5.5. Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado dos Grãos de Arroz

5.5.1. Preparo dos Hidrolisados para Fermentação

Os hidrolisados foram preparados nas melhores condições de hidrólise obtidas no trabalho 2ⁿ. Foram fermentados os hidrolisados apenas com a sua fração líquida e também com o resíduo sólido a fim de comparar o desempenho na fermentação entre os materiais. Para a separação dos grãos, após transcorrido o tempo de hidrólise, o material foi centrifugado a 2100 rpm durante 10 min. O processo de centrifugação foi realizado duas vezes. Antes da fermentação os hidrolisados foram autoclavados a 120°C por 20 min, para

esterilização. A Figura 10 ilustra as etapas realizadas no preparo dos hidrolisados para a fermentação.

Figura 10 - Etapas de preparo dos hidrolisados para a fermentação



5.5.2. Preparo para Fermentação

Os hidrolisados foram ambientados a temperatura de 37°C e adicionou-se os nutrientes, a solução de sais e a levedura. Como fonte de nitrogênio e fósforo utilizou-se uréia e fosfato monopotássico, respectivamente. A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae*, comercial. Na Tabela 4 encontra-se as concentrações adicionadas bem como as características de cada hidrolisado. Na Tabela 5 tem-se a composição da solução de sais minerais.

Tabela 4 - Ensaios fermentativos das cultivares

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
Cultivar	Puitá Inta CL	Puitá Inta CL	BRS AG	BRS AG
Sólidos	Sim	Não	Sim	Não
Extrato de Levedura (g.L⁻¹)	8	8	8	8
Uréia (g.L⁻¹)	1,25	1,25	1,25	1,25
KH₂PO₄	1,1	1,1	1,1	1,1
Solução de sais minerais e ácido cítrico (mL.L⁻¹)	40	40	40	40

Tabela 5 - Composição solução de sais

Sal	Concentração (g.L⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,9
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035
H ₃ BO ₃	0,050
KI	0,009
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,0125
Ácido cítrico	12,5

5.5.3. Processo Fermentativo

A fermentação dos hidrolisados foi realizada em duplicata. Os ensaios fermentativos foram realizados simultaneamente em erlenmeyes de 250 mL na Incubadora Shaker SL 222, como pode ser visualizado na imagem (Figura 11), com agitação de 200 rpm, a 37°C, durante 36 horas. No decorrer desse tempo foram coletadas amostras e estas foram centrifugadas a 10000 rpm, para construção do perfil cinético de consumo de substrato e produção de etanol.

Figura 11 - Fermentação dos hidrolisados em incubadora



A produtividade volumétrica em etanol (Q_P), a eficiência de fermentação (E.F.), o fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$) e redução percentual de substratos (RPS), foram calculados segundo Barcelos (2012) conforme as Equações 9, 10, 11 e 12.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (9)$$

$$E.F. (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \cdot 100 \quad (10)$$

$$RPS(\%) = \frac{(S_0 - S)}{S_0} \cdot 100 \quad (11)$$

$$Q_P = \frac{(P - P_0)}{t_F} \quad (12)$$

Onde:

0,511: fator de conversão máximo teórico de substrato em etanol;

E.F.: eficiência de fermentação (%);

P: concentração final de etanol (g.L^{-1});

- P_0 : concentração inicial de etanol (g.L^{-1});
 Q_p : produtividade volumétrica em etanol ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);
RPS: redução percentual de substrato (%);
 S : concentração final de glicose (g.L^{-1});
 S_0 : concentração inicial de glicose (g.L^{-1});
 t_f : tempo de fermentação (h);
 $Y_{P/S}$: fator de rendimento de produção de etanol (g.g^{-1}).

5.5.4. Determinação do Teor de Glicose e Etanol

A determinação do teor de glicose e etanol das amostras coletadas na fermentação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras, previamente diluídas, foram filtradas em cartucho SEP-PAK C18 antes da análise cromatográfica. A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector de índice de refração (SHIMADZU), coluna HPX-37H (BioRad), fase móvel H_2SO_4 5 mM, temperatura do forno de 45°C e volume de injeção de 20 μL . Para a quantificação dos analitos foram construídas curvas de calibração com soluções-padrão de glicose e etanol. As análises foram realizadas no Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos (CECOM) na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização dos Grãos de Arroz

A caracterização química dos grãos foi realizada para conhecer seus componentes, visto que o conhecimento prévio da matéria prima é importante para a aplicação em qualquer bioprocessos. Segundo Walter et al. (2008), a composição do grão e de suas frações esta sujeita a diferenças varietais e os componentes não estão distribuídos uniformemente nas diferentes frações do grão.

A Tabela 6 apresenta à composição química dos grãos integrais, apenas descascados, e na Tabela 7 está à composição química dos grãos polidos, com remoção do farelo. Os grãos polidos apresentaram maior quantidade de amido e os grãos integrais maior teor de fibra, lipídeos e proteína, para ambas cultivares estudadas. Os resultados estão de acordo com Walter et al. (2008) que relata que o polimento resulta na redução dos componentes, exceto do amido, originando as diferenças nas composições entre o arroz polido e o integral. Isso se dá devido às camadas externas apresentarem maior conteúdo de proteína, lipídios e fibras, enquanto que o centro é rico em amido.

Tabela 6 - Composição química dos grãos integrais

	Amido	Umidade	Fibra	Lipídeos	Cinzas	Proteína
BRS AG	76,76 ± 1,69 ^a	12,02 ± 0,03 ^b	0,88 ± 0,04 ^a	2,40 ± 0,08 ^a	1,41 ± 0,04 ^a	9,53
Puitá Inta CL	78,75 ± 0,17 ^a	12,27 ± 0,08 ^a	0,92 ± 0,07 ^a	2,40 ± 0,04 ^a	1,43 ± 0,09 ^a	8,84

*Para cada componente, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 7 - Composição química dos grãos polidos

	Amido	Umidade	Fibra	Lipídeos	Amilose	Proteína
BRS AG	85,21 ± 1,46 ^a	8,47 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	0,40 ± 0,01 ^a	26,40 ± 0,02 ^a	8,45
Puitá Inta CL	80,71 ± 0,15 ^b	12,66 ± 0,19 ^a	0,58 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,02 ^b	26,29 ± 0,18 ^a	8,36

*Para cada componente, as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Os teores de amido, lipídios e proteína nos grãos integrais foram similares aos encontrados por Walter et al. (2008). A quantidade de fibras relatada por estes autores foi superior à encontrada nas cultivares desse estudo. Os grãos integrais não passaram pela etapa de polimento, o que torna o preparo dos grãos, para posterior hidrólise, mais econômico. Ambas as cultivares apresentaram alto teor de amido, que está diretamente relacionado com a obtenção de açúcares. Vale ressaltar ainda que BRS AG é uma cultivar que apresenta alta produtividade agrícola, porém seus grãos possuem baixa qualidade para

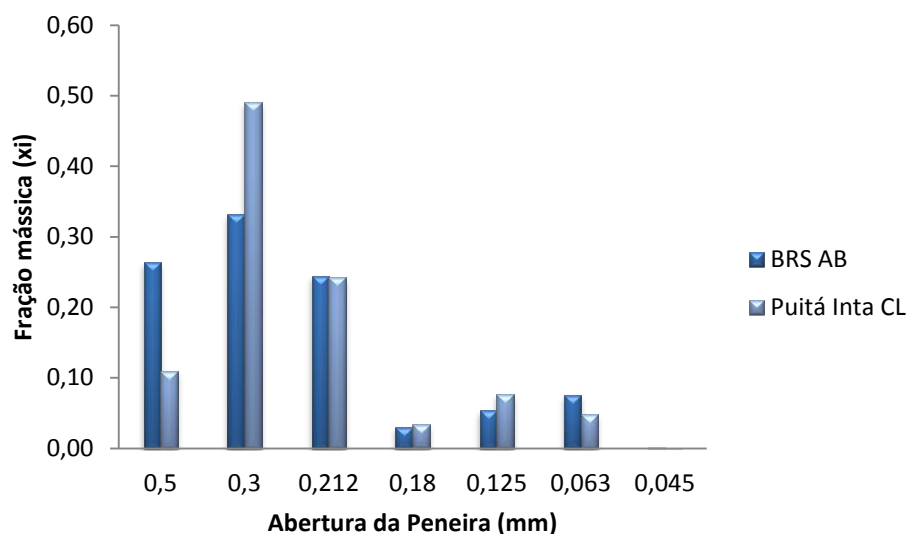
alimentação humana e Puitá Inta CL é uma cultivar de arroz comercial plantada com muita frequência no estado do Rio Grande do Sul.

Os grãos polidos apresentaram 80,71% e 85,21% de amido, para Puitá Inta CL e BRS AG, respectivamente, estando próximo ao apresentado por Zavareze et al. (2009) que encontraram em torno de 89,0% de amido. Contudo, a quantidade de fibras foi inferior a relatada por Walter et al. (2008) que encontraram 2,87% para os grãos polidos da cultivar a qual estudaram. Os teores de lipídeos e fibras foram próximos aos encontrados por Walter et al. (2008) e Syahariza et al. (2013), que estudaram 14 cultivares de arroz as quais apresentaram de 0,16% a 1,01% de lipídeos e de 6,08% a 10,26% de proteína.

Como já mencionado, tendo como objetivo a produção de açúcares fermentescíveis, o amido é o principal componente, pois é quem, através da hidrólise fornece esses açúcares. Segundo Syahariza et al. (2013), a estrutura do amido tem influência na digestibilidade do mesmo e por isso a importância em conhecer o quanto de amilose está presente nos grãos. Ambas as farinhas das cultivares em estudo apresentaram cerca de 26% de amilose em sua composição e, segundo Martinez e Cuevas (1989), apresentam conteúdo de amilose intermediário pois estão dentro da faixa de 23 a 27% de amilose. Esses resultados estão próximo ao encontrado por Santos (2012) que determinou o teor de amilose na cultivar Puitá Inta CL em amostras com diferentes teores de grãos gessados encontrando de 24,47% a 25,98%, em materiais com 0% e com 10% de grãos gessados, respectivamente.

6.1.1. Análise Granulométrica

A análise granulométrica foi realizada para conhecer o tamanho médio das partículas que iriam ser hidrolisadas. A maior fração da farinha dos grãos ficou retida na peneira com abertura de 0,3 mm, para ambas as cultivares. O Diâmetro Médio de Sauter foi utilizado para determinar a distribuição granulométrica, obtendo-se 0,22 mm. A Figura 12 apresenta a distribuição granulométrica das partículas das farinhas de arroz das duas cultivares em estudo.

Figura 12 - Distribuição granulométrica das farinhas de arroz

6.2. Hidrólise Enzimática dos Grãos de Arroz

6.2.1. Planejamento fatorial fracionado 2^{6-2}

Para avaliar o efeito das 6 variáveis estudadas, primeiramente, realizou-se um planejamento fatorial fracionado para cada cultivar. As Tabelas 8 e 9 apresentam as matrizes do planejamento 2^{6-2} , para BRS AG e Puitá Inta CL, com a resposta concentração de açúcares redutores (AR). Observa-se que dentre os 19 ensaios realizados para a cultivar BRS AG, a concentração de AR variou de $118,51 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $162,52 \text{ mg.mL}^{-1}$ e para Puitá Inta CL, de $106,53 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $155,46 \text{ mg.mL}^{-1}$. A eficiência de hidrólise, obtida com auxílio da Equação 6, que possibilita quantificar o teor de amido que foi hidrolisado, foi de 71,8% a 98,5% e 63% a 93%, respectivamente.

Blazek e Gilbert (2010) estudaram a digestão enzimática de amidos comerciais, oriundos de diferentes fontes botânicas, onde o amido de arroz foi o que se mostrou mais suscetível, porém somente 51% do amido dos grãos foi hidrolisado. Nesse estudo foram utilizados enzimas comerciais e tempo de hidrólise de 24 h a 37°C . Já Hera et al. (2013) avaliaram a suscetibilidade de hidrólise do amido de grãos de arroz curtos e longos durante 16 h a 37°C e obtiveram 90,86% de hidrólise do amido presente nos grãos longos e 92,53% do amido presente nos grãos curtos. Assim observa-se que os resultados obtidos na execução do planejamento fracionário são superiores aos encontrados em alguns estudos relatados na literatura.

Tabela 8 - Açúcares Redutores delineamento fracionado 2⁶⁻⁴ para BRS AG

Ensaio	α -Amilase			AMG			AR mg.mL ⁻¹
	Dosagem (μ L.g ⁻¹ grão)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Dosagem (μ L.g ⁻¹ grão)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
1	20 (-1)	70 (-1)	30 (-1)	20 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	118,51
2	100 (+1)	70 (-1)	30 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	127,22
3	20 (-1)	90 (+1)	30 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	141,83
4	100 (+1)	90 (+1)	30 (-1)	20 (-1)	50 (-1)	60 (+1)	145,94
5	20 (-1)	70 (-1)	60 (+1)	20 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	119,50
6	100 (+1)	70 (-1)	60 (+1)	20 (-1)	50 (-1)	60 (+1)	128,97
7	20 (-1)	90 (+1)	60 (+1)	20 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	123,82
8	100 (+1)	90 (+1)	60 (+1)	20 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	123,17
9	20 (-1)	70 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	50 (-1)	60 (+1)	129,02
10	100 (+1)	70 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	132,42
11	20 (-1)	90 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	155,13
12	100 (+1)	90 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	151,96
13	20 (-1)	70 (-1)	60 (+1)	100 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	134,22
14	100 (+1)	70 (-1)	60 (+1)	100 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	128,75
15	20 (-1)	90 (+1)	60 (+1)	100 (+1)	50 (-1)	60 (+1)	162,52
16	100 (+1)	90 (+1)	60 (+1)	100 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	155,57
17	60 (0)	80 (0)	45 (0)	60 (0)	55 (0)	45 (0)	152,83
18	60 (0)	80 (0)	45 (0)	60 (0)	55 (0)	45 (0)	151,68
19	60 (0)	80 (0)	45 (0)	60 (0)	55 (0)	45 (0)	149,71

Tabela 9 - Açúcares Redutores delineamento fracionado 2⁶⁻⁴ para Puitá Inta CL

Ensaio	α -Amilase			AMG			AR mg.mL ⁻¹
	Dosagem (μ L.g ⁻¹ grão)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Dosagem (μ L.g ⁻¹ grão)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
1	20 (-1)	70 (-1)	30 (-1)	20 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	106,53
2	100 (+1)	70 (-1)	30 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	121,14
3	20 (-1)	90 (+1)	30 (-1)	20 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	131,38
4	100 (+1)	90 (+1)	30 (-1)	20 (-1)	50 (-1)	60 (+1)	127,71
5	20 (-1)	70 (-1)	60 (+1)	20 (-1)	60 (+1)	60 (+1)	127,22
6	100 (+1)	70 (-1)	60 (+1)	20 (-1)	50 (-1)	60 (+1)	135,10
7	20 (-1)	90 (+1)	60 (+1)	20 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	114,57
8	100 (+1)	90 (+1)	60 (+1)	20 (-1)	60 (+1)	30 (-1)	126,23
9	20 (-1)	70 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	50 (-1)	60 (+1)	128,53
10	100 (+1)	70 (-1)	30 (-1)	100 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	133,78
11	20 (-1)	90 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	155,46
12	100 (+1)	90 (+1)	30 (-1)	100 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	146,10
13	20 (-1)	70 (-1)	60 (+1)	100 (+1)	60 (+1)	30 (-1)	133,62
14	100 (+1)	70 (-1)	60 (+1)	100 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	141,50
15	20 (-1)	90 (+1)	60 (+1)	100 (+1)	50 (-1)	60 (+1)	141,99
16	100 (+1)	90 (+1)	60 (+1)	100 (+1)	60 (+1)	60 (+1)	148,56
17	60 (0)	80 (0)	45 (0)	60 (0)	55 (0)	45 (0)	148,84
18	60 (0)	80 (0)	45 (0)	60 (0)	55 (0)	45 (0)	147,91
19	60 (0)	80 (0)	45 (0)	60 (0)	55 (0)	45 (0)	149,77

A Tabela 10 apresenta os efeitos das variáveis sobre a resposta analisada. Dentre as 6 variáveis estudadas, somente a dosagem de enzima AMG foi estaticamente significativa ($p < 0,05$) na concentração de AR, para ambas as cultivares. A concentração de AMG apresentou efeito positivo, indicando que ao aumentar a dosagem de 20 para 100 μ L de enzima/g farinha ocorreu um aumento na produção de AR.

O tempo de reação para a ação das duas enzimas não apresentou efeito significativo para nenhuma das cultivares e, por isso, foi fixado em 30 min, nível inferior para as duas etapas, assim o processo demandará menor tempo e conseqüentemente custo mais baixo que do que com os tempos mais longos. A temperatura da AMG também não apresentou efeito significativo e assim foi fixada no valor de 55 °C. Os tempos e a

temperatura fixada vão de encontrado com as condições apresentadas por Barcelos (2012) em seu estudo na hidrólise de amido dos grãos de sorgo. A concentração e a temperatura da α -amilase apesar de não terem apresentado efeito significativo foram mantidas no planejamento seguinte, a fim de investigar melhor a quantidade necessária de enzima e buscar em combinação com os fatores fixados e com os novos níveis estudados a possibilidade de trabalhar a etapa de liquefação nos níveis mais baixos.

Tabela 10 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2^{6-2}

Fatores	Gigante				Puitá Inta CL			
	AR (mg.mL ⁻¹)				AR (mg.mL ⁻¹)			
	Efeito	Erro Padrão	t(12)	p - valor	Efeito	Erro Padrão	t(12)	p - valor
Média	138,57	2,28	60,73	0,00	135,05	2,41	56,00	0,00
[α-amilase] (μ Enzima/g Farinha)	1,18	4,97	0,24	0,82	5,10	5,26	0,97	0,35
Temperatura α-amilase (°C)	17,67	4,97	3,55	0,00	8,07	5,26	1,54	0,15
Tempo α-amilase (min)	-3,19	4,97	-0,64	0,53	2,27	5,26	0,43	0,67
[AMG] (μ Enzima/g Farinha)	15,08	4,97	3,03	0,01	17,46	5,26	3,32	0,01
Temperatura AMG (°C)	-0,05	4,97	-0,01	0,99	4,42	5,26	0,84	0,42
Tempo AMG (min)	6,62	4,97	1,33	0,21	3,64	5,26	0,69	0,50

6.2.2. Planejamento fatorial completo 2^3

Após a avaliação dos efeitos através do planejamento fatorial fracionário, foram mantidas apenas 3 variáveis independentes, temperatura ^{α -amilase} (°C), dosagem ^{α -amilase} (μ L) e dosagem^{AMG} (μ L). Assim foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com 3 repetições no ponto central, para cada uma das cultivares, com o objetivo de obter a maior concentração de açúcares redutores (AR). A Tabelas 11 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis. Foram fixados os tempos de reação em 30 min para ambas as etapas e a temperatura de sacarificação em 55 °C.

Tabela 11 - Valores utilizados no delineamento fatorial completo 2^3

Variáveis		Código	Níveis		
			-1	0	+1
α-Amilase	Dosagem ($\mu\text{L.g}^{-1}$ grão)	x_1	36,19	60	83,81
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	x_2	74,05	80	85,95
Glucoamilase	Dosagem ($\mu\text{L.g}^{-1}$ grão)	x_3	88,33	130	171,67

A dosagem de α -amilase foi explorada em níveis dentro do intervalo já estudado no planejamento fatorial fracionário pois a quantidade de enzima está diretamente ligada com a eficiência de hidrólise do amido e também com o custo do processo. No planejamento fatorial completo manteve-se os níveis da temperatura dentro dos estudados no planejamento fatorial fracionário. A Tabela 12 apresenta a matriz do planejamento 2^3 .

Tabela 12 - Matriz do planejamento 2^3

Ensaio	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

6.2.2.1. Delineamento para a cultivar BRS AG

Na Tabela 13 encontram-se a matriz e os resultados do planejamento fatorial completo 2^3 do estudo da dosagem e temperatura da α -amilase e da dosagem da AMG para a cultivar BRS AG. A maior concentração de AR, 164 mg.mL^{-1} , representando uma eficiência de hidrólise de 99,35%, obtida no ensaio 8.

Tabela 13 - Açúcares Redutores delineamento completo para BRS AG

Ensaio	α -Amilase		AMG	AR mg.mL ⁻¹
	Dosagem ($\mu\text{L.g}^{-1}$ grão)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Dosagem ($\mu\text{L.g}^{-1}$ grão)	
1	36,2 (-1)	74,1 (-1)	88,3 (-1)	134,99
2	83,8 (+1)	74,1 (-1)	88,3 (-1)	137,51
3	36,2 (-1)	85,95 (+1)	88,3 (-1)	150,31
4	83,8 (+1)	85,95 (+1)	88,3 (-1)	144,40
5	36,2 (-1)	74,1 (-1)	171,67 (+1)	136,85
6	83,8 (+1)	74,1 (-1)	171,67 (+1)	141,78
7	36,2 (-1)	85,95 (+1)	171,67 (+1)	150,86
8	83,8 (+1)	85,95 (+1)	171,67 (+1)	164,00
9	60,0 (0)	80,0 (0)	130,0 (0)	146,15
10	60,0 (0)	80,0 (0)	130,0 (0)	144,73
11	60,0 (0)	80,0 (0)	130,0 (0)	144,62

Na Tabela 14 encontram-se os efeitos que as três variáveis e suas interações causam na produção de AR. Todas as variáveis causaram efeitos positivos, porém a dosagem de α -amilase não causa efeito significativo, mas sua interação com a dosagem de AMG provoca um efeito positivo significativo na concentração de AR.

Tabela 14 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2³ para BRS AG

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(4)	p - valor
Média	145,11	0,91	160,24	0,00
(x₁) Dosagem α-amilase ($\mu\text{L/g}$ farinha)	3,67	2,12	1,73	0,16
(x₂) Temperatura α-amilase ($^{\circ}\text{C}$)	14,61	2,12	6,88	0,00
(x₃) Dosagem AMG ($\mu\text{L/g}$ farinha)	6,57	2,12	3,09	0,04
x₁ x₂	-0,05	2,12	-0,03	0,98
x₁ x₃	5,36	2,12	2,53	0,06
x₂ x₃	3,50	2,12	1,65	0,17

Na Tabela 15 encontram-se os coeficientes do modelo de regressão, obtidos a partir da matriz codificada. Mesmo os termos que não foram significativos foram mantidos no modelo matemático, Equação 13, pois a retirada desses termos resultaria na redução da variação explicada o que poderia prejudicar a aplicação do modelo.

Tabela 15 - Coeficientes de regressão para cultivar BRS AG

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(4)	p-valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	145,11	0,91	160,24	0,00	142,60	147,62
(x₁) Dosagem α-amilase (μL.g⁻¹ farinha)	1,83	1,06	1,73	0,16	-1,11	4,78
(x₂) Temperatura α-amilase (°C)	7,31	1,06	6,88	0,00	4,36	10,26
(x₃) Dosagem AMG (μL.g⁻¹ farinha)	3,28	1,06	3,09	0,04	0,34	6,23
x₁ x₂	-0,03	1,06	-0,03	0,98	-2,98	2,92
x₁ x₃	2,68	1,06	2,53	0,06	-0,27	5,63
x₂ x₃	1,75	1,06	1,65	0,17	-1,20	4,70

$$AR = 145,11 + 1,83x_1 + 7,31x_2 + 3,28x_3 - 0,03x_1x_2 + 2,68x_1x_3 + 1,75x_2x_3 \quad (13)$$

Todos os termos foram utilizados para o cálculo da ANOVA apresentada na Tabela 16. Como o valor do F calculado, 11,50, foi superior ao valor do F tabelado e a porcentagem de variação explicada (R²) pelo modelo foi alta, 94 %, verifica-se que o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 16 - Análise de variância para BRS AG

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	de Quadrado médio	F _{cal}
Regressão	622,42	6,00	103,74	11,50
Resíduo	36,08	4,00	9,02	
Total	658,50	10,00		

$$R^2 = 94 \% ; F_{6; 4; 0,05} = 6,16$$

Na Tabela 17 pode-se verificar os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração de AR, os erros de ajuste (e) e o erro relativo para cada ensaio do planejamento completo 2^3 para a cultivar BRS AG. Observa-se que os erros relativos são baixos para todos os ensaios realizados, confirmando o bom ajuste do modelo.

Tabela 17 - Valores de AR experimental, previstos no modelo, erro de ajuste e erros relativos para BRS AG

Ensaio	AR experimental (mg/mL)	AR previsto (mg/mL)	e = (Y - Ŷ)	Erro relativo (%)
1	134,99	137,09	-2,10	-1,56
2	137,51	135,45	2,06	1,50
3	150,31	148,26	2,06	1,37
4	144,40	146,51	-2,10	-1,46
5	136,85	134,79	2,06	1,50
6	141,78	143,88	-2,10	-1,48
7	150,86	152,96	-2,10	-1,39
8	164,00	161,94	2,06	1,25
9	146,15	145,11	1,04	0,71
10	144,73	145,11	-0,38	-0,26
11	144,62	145,11	-0,49	-0,34

Observa-se nas Figuras, 13 e 14, que o aumento da temperatura e para toda a faixa de dosagem de α -amilase acarretam um aumento concentração de açúcares redutores. Porém na faixa de temperatura próxima a 85,95°C, a análise das figuras indica que a variação de concentração em função da mudança da dosagem de α -amilase é pequena, assim sugerindo uma investigação experimental para verificar o quanto a variação na dosagem da enzima influencia na formação de açúcares redutores quando a temperatura é fixada a 85,95°C, que resulta em maior concentração de AR.

Figura 13 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura para a cultivar BRS AG

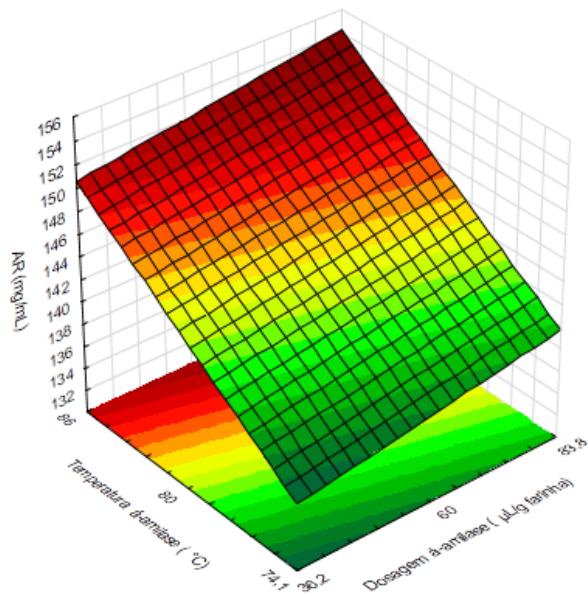
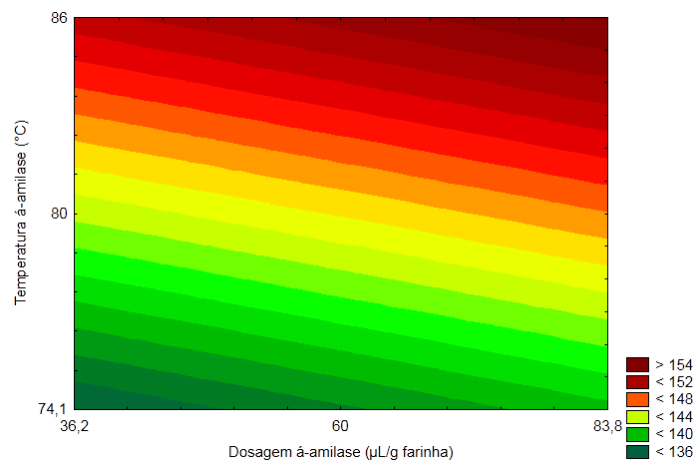


Figura 14 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura α para a cultivar BRS AG



Nas Figuras 15 e 16, é possível visualizar que a concentração de açúcares redutores aumenta quando as dosagens de AMG e α -amilase aumentam.

Figura 15 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG

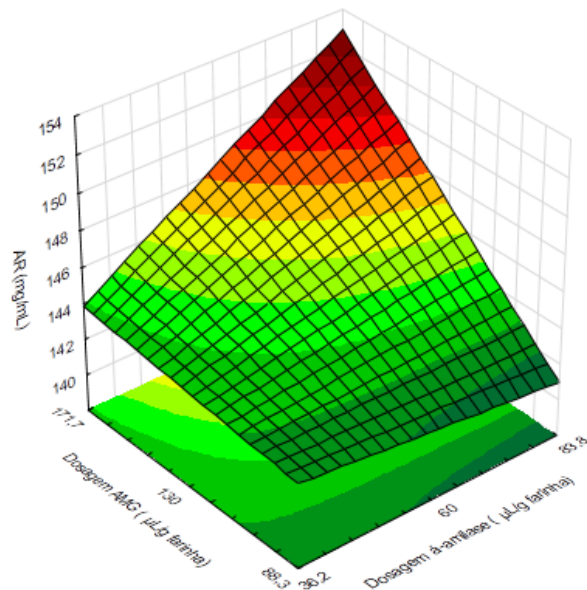
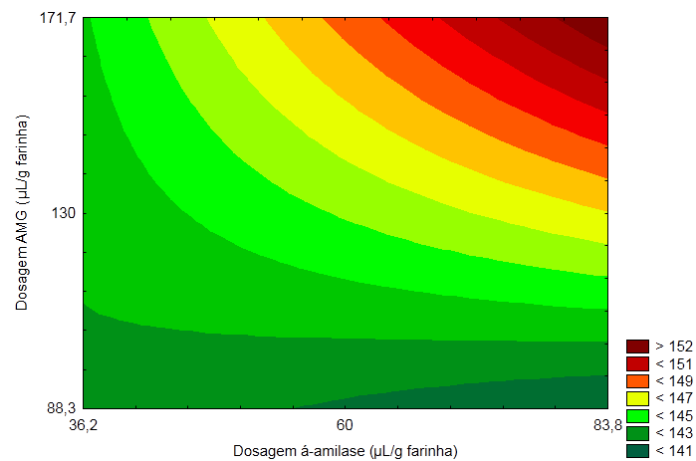


Figura 16 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG



O aumento da dosagem de AMG concomitante com o aumento da temperatura de reação da α -amilase acarreta o aumento da produção de açúcares redutores, como pode ser visualizado nas Figuras 17 e 18.

Figura 17 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG

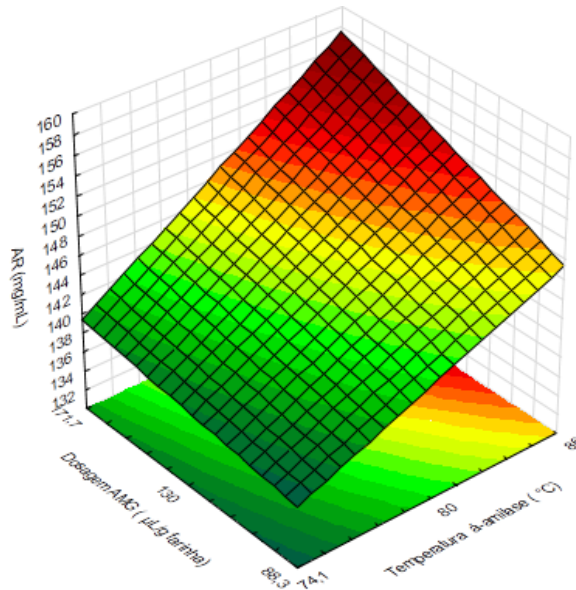
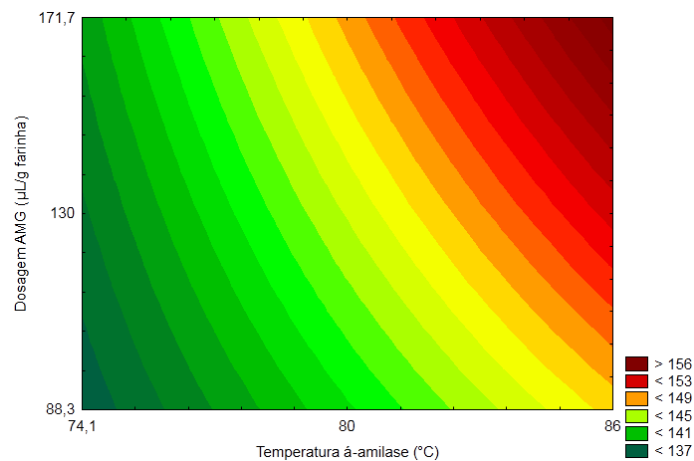


Figura 18 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar BRS AG



Com a análise das superfícies de respostas, Figuras 13, 15 e 17, e das curvas de contorno, Figuras 14, 16 e 18, foi possível verificar quais condições de hidrólise resultaram na maior concentração de açúcares redutores no hidrolisado obtido. Com as condições nos níveis superiores foi possível obter 99,35% de hidrólise do amido presente nos grãos da cultivar BRS AG. O deslocamento para níveis acima destes, elevando a temperatura e o aumentando a dosagem das enzimas, como sugerido pelas superfícies,

acarretaria no aumento de custo do processo e em contrapartida a um pequeno ganho na eficiência de hidrólise já que quase todo o amido presente nos grãos foi hidrolisado.

Para a validação do modelo matemático obtido, as seguintes condições foram selecionadas, temperatura de 85,95°C, dosagem de AMG de 171,67 $\mu\text{L.g}^{-1}$ farinha e para a dosagem de α -amilase foram realizados testes em triplicadas, onde os demais fatores foram fixados, a fim de verificar se variação na dosagem da enzima afetaria a concentração de açúcares redutores. Os ensaios realizados e as condições utilizadas para a validação do modelo encontram-se na tabela 18.

Tabela 18 - Condições experimentais utilizadas no ensaio para validação do modelo para BRS AG

Variável	Condições Experimentais/Valores Codificados		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Dosagem α -amilase ($\mu\text{L.g}^{-1}$ farinha)	36,2 (-1)	60 (0)	83,8 (1)
Temperatura α -amilase (°C)	86 (1)	86 (1)	86 (1)
Dosagem AMG ($\mu\text{L.g}^{-1}$ farinha)	171,67 (1)	171,67 (1)	171,67 (1)

A Tabela 19 apresenta os resultados preditos e observados e o desvio relativo entre eles obtido nos ensaios de validação experimental. Observa-se que estatisticamente não houve diferença entre os ensaios, sendo assim pode-se trabalhar com a menor dosagem de enzima, 36,2 $\mu\text{L/g}$ farinha, que irá se obter a mesma concentração de AR que quando utilizada a maior dosagem. Os desvios relativos foram menores do que 5%, mostrando a proximidade entre os resultados experimentais e os resultados preditos, indicando a precisão do modelo matemático gerado.

Tabela 19 - Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo da hidrólise para BRS AG

Ensaio	AR mg.mL ⁻¹		Desvio relativo
	Resultado experimental	Resultado predito	
1	160,74 ^a	152,96	4,84
2	165,14 ^a	157,45	4,65
3	163,72 ^a	161,94	1,09

6.2.2.2. Delineamento para a Cultivar Puitá Inta CL

Na Tabela 20 encontram-se a matriz e os resultados do planejamento completo 2³ do estudo da dosagem e temperatura da α -amilase e da dosagem da AMG para a cultivar Puitá Inta CL. A maior concentração de AR, 162,68 mg/mL, tendo uma eficiência de hidrólise de 96,66%, foi obtida nas condições do ensaio 7.

Tabela 20 - Açúcares Redutores delineamento completo para a cultivar Puitá Inta CL

Ensaio	α -Amilase		AMG	AR (mg.mL ⁻¹)
	Dosagem (μ L.g ⁻¹ grão)	Temperatura (°C)	Dosagem (μ L.g ⁻¹ grão)	
1	36,2 (-1)	74,1 (-1)	88,3 (-1)	134,88
2	83,8 (+1)	74,1 (-1)	88,3 (-1)	138,16
3	36,2 (-1)	85,95 (+1)	88,3 (-1)	150,86
4	83,8 (+1)	85,95 (+1)	88,3 (-1)	153,71
5	36,2 (-1)	74,1 (-1)	171,67 (+1)	144,84
6	83,8 (+1)	74,1 (-1)	171,67 (+1)	141,67
7	36,2 (-1)	85,95 (+1)	171,67 (+1)	162,68
8	83,8 (+1)	85,95 (+1)	171,67 (+1)	155,24
9	60,0 (0)	80,0 (0)	130,0 (0)	150,11
10	60,0 (0)	80,0 (0)	130,0 (0)	150,55
11	60,0 (0)	80,0 (0)	130,0 (0)	147,48

Na Tabela 21 encontram-se os efeitos que as três variáveis e suas interações causaram na produção de AR. Somente o aumento da temperatura e da dosagem de AMG

causaram efeitos significativos positivos ($p < 0,05$). Já a interação entre a dosagem de α -amilase e a dosagem de AMG também causaram efeito significativo, porém um efeito negativo na concentração de AR no hidrolisado obtido.

Tabela 21 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2^3 para a cultivar Puitá Inta CL

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(4)	p – valor
Média	148,20	0,55	271,81	0,00
(x_1) Dosagem a (mL/g farinha)	-1,12	1,28	-0,88	0,43
(x_2) Temperatura a (°C)	15,74	1,28	12,31	0,00
(x_3) Dosagem AMG (mL/g farinha)	6,70	1,28	5,24	0,01
$x_1 x_2$	-1,18	1,28	-0,92	0,41
$x_1 x_3$	-4,19	1,28	-3,27	0,03
$x_2 x_3$	-0,03	1,28	-0,02	0,98

Na Tabela 22 encontram-se os coeficientes do modelo de regressão, obtidos a partir da matriz codificada. Mesmo os termos que não foram significativos foram mantidos no modelo matemático, Equação 12, pois a retirada desses termos resultaria na redução da variação explicada o que poderia prejudicar a aplicação do modelo.

Tabela 22 - Coeficientes de regressão para a cultivar Puitá Inta CL

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(4)	p-valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite Inferior	Limite Superior
Média	148,20	0,55	271,81	0,00	146,68	149,71
(x_1) Dosagem a (mL.g ⁻¹ farinha)	-0,56	0,64	-0,88	0,43	-2,34	1,21
(x_2) Temperatura a (°C)	7,87	0,64	12,31	0,00	6,09	9,64
(x_3) Dosagem AMG (mL.g ⁻¹ farinha)	3,35	0,64	5,24	0,01	1,58	5,13
$x_1 x_2$	-0,59	0,64	-0,92	0,41	-2,36	1,19
$x_1 x_3$	-2,09	0,64	-3,27	0,03	-3,87	-0,32
$x_2 x_3$	-0,01	0,64	-0,02	0,98	-1,79	1,76

$$AR = 148,2 - 0,56x_1 + 7,87x_2 + 3,35x_3 - 0,59x_1x_2 - 2,09x_1x_3 - 0,01x_2x_3 \quad (14)$$

Todos os termos foram utilizados para o cálculo da ANOVA apresentada na Tabela 23. Como o valor do F calculado para a regressão, 31,88, foi superior ao valor do F tabelado e a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi, cerca de 98%, verificasse que o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 23 - Análise de variância para a cultivar Puitá Inta CL

Fonte de Variação	Soma de Graus de Quadrado			F_{cal}
	quadrados	liberdade	médio	
Regressão	625,52	6	104,25	31,88
Resíduo	13,08	4	3,27	
Total	638,60	10		

$$R^2 = 98 \% ; F_{6; 4; 0,05} = 6,16$$

Na Tabela 24 pode-se verificar os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração de AR, os erros de ajuste (e) e o erro relativo para cada ensaio do planejamento completo 2^3 . Observa-se que os erros relativos foram baixos para todos os ensaios realizados, confirmando o bom ajuste do modelo.

Tabela 24 - Valores de AR experimental, previstos no modelo, erro de ajuste e erros relativos para a cultivar Puitá Inta CL

Ensaio	AR experimental (mg/mL)	AR previsto (mg/mL)	$e = (Y - \hat{Y})$	Erro relativo (%)
1	134,88	134,84	0,04	0,03
2	138,16	139,08	-0,92	-0,67
3	150,86	151,78	-0,92	-0,61
4	153,71	153,67	0,04	0,02
5	144,84	145,76	-0,92	-0,64
6	141,67	141,63	0,04	0,03
7	162,68	162,65	0,04	0,02
8	155,24	156,16	-0,92	-0,59
9	150,11	148,20	1,91	1,27
10	150,55	148,20	2,35	1,56
11	147,48	148,20	-0,72	-0,49

Observa-se nas Figuras, 19 e 20, que o aumento da temperatura acarretou o aumento da concentração de açúcares redutores. As figuras mostram que a altas temperaturas de liquefação, a variação na dosagem de α -amilase tem pouca ou nenhuma influência na produção de AR. Dessa forma se fez necessário a investigação experimental para avaliar a influência da dosagem de α -amilase na concentração de AR no hidrolisado.

Figura 19 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura para a cultivar Puitá Inta CL

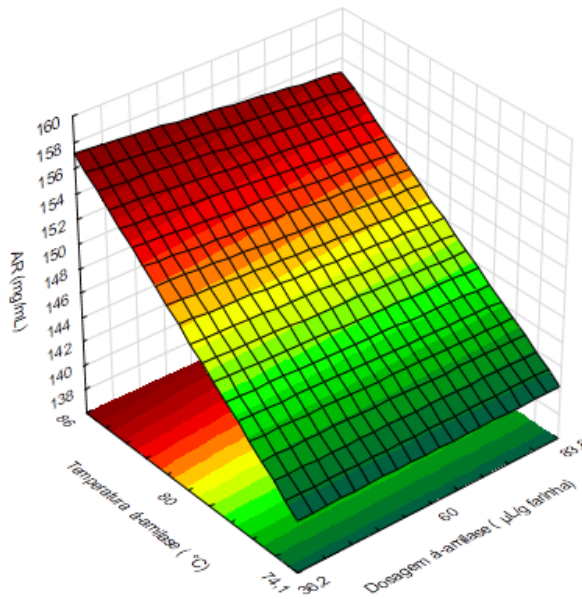
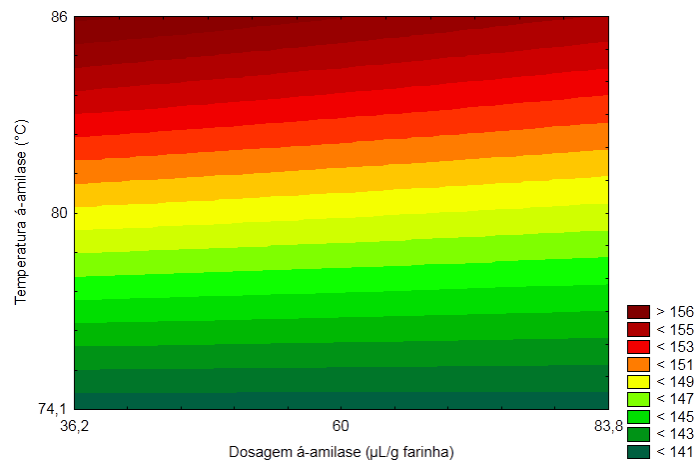


Figura 20 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da temperatura para a cultivar Puitá Inta CL



Nas Figuras 21 e 22, é possível visualizar que a maior concentração de açúcares redutores foi obtida quando ocorreu o aumento da dosagem de AMG e redução da dosagem de α -amilase.

Figura 21 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL

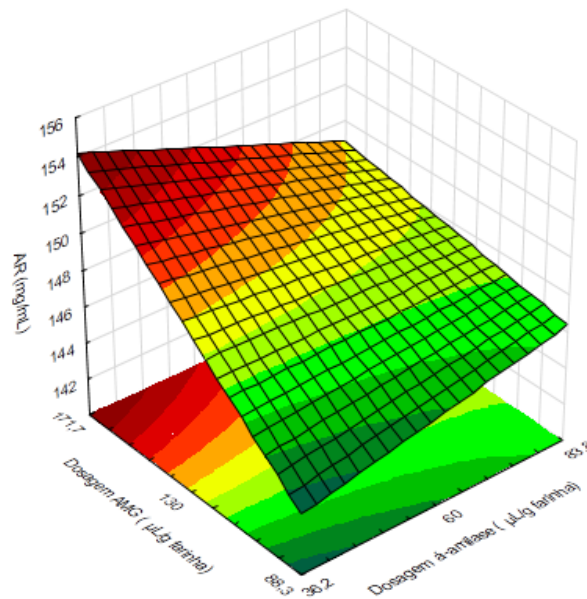
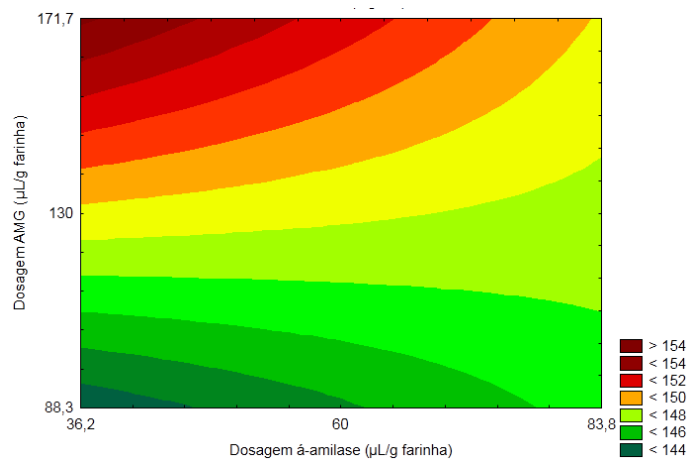


Figura 22 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de α -amilase e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL



O aumento da dosagem de AMG juntamente com o aumento da temperatura de reação da α -amilase acarretou no aumento da produção de açúcares redutores, como pode ser visualizado nas Figuras 23 e 24.

Figura 23 - Superfície de resposta para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL

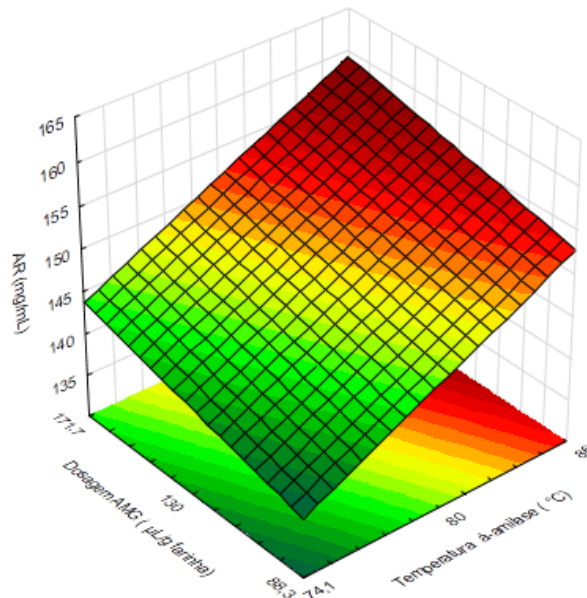
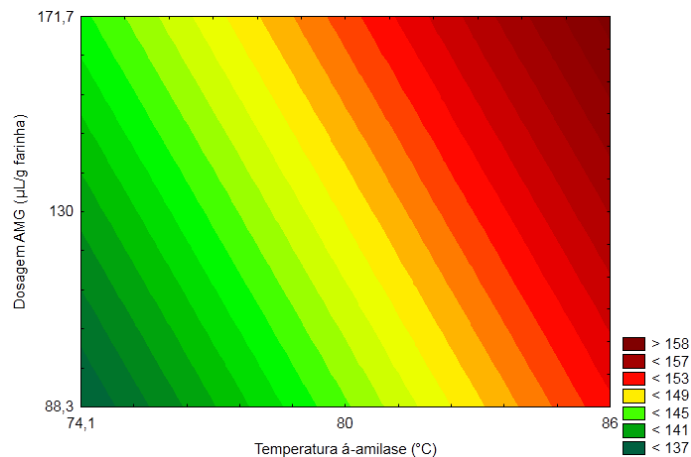


Figura 24 - Curva de contorno para AR em função da dosagem de temperatura e da dosagem de AMG para a cultivar Puitá Inta CL



Com a análise das superfícies de respostas, Figuras 19, 21 e 23, e das curvas de contorno, Figuras 20, 22 e 24, foi possível verificar quais condições de hidrólise resultaram na maior concentração de açúcares redutores no hidrolisado obtido da hidrólise enzimática dos grãos da cultivar Puitá Inta CL. Nas condições estudadas foi possível obter 96,6% de hidrólise do amido presente nos grãos da cultivar. Assim o deslocamento para valores acima dos níveis superiores explorados, elevando a temperatura e aumentando a dosagem das enzimas, como sugerido pelas superfícies de resposta, da mesma forma que para a cultivar BRS AG acarretaria no aumento de custo do processo e em contrapartida um

pequeno aumento na eficiência de hidrólise já que quase todo o amido presente nos grãos foi hidrolisado.

Para a validação do modelo matemático obtido, as seguintes condições foram selecionadas após a análise das superfícies de respostas, temperatura de 85,95°C, dosagem de AMG de 171,67 $\mu\text{L/g}$ farinha e para a dosagem de α -amilase foram realizados testes em triplicatas, com o demais fatores fixados, a fim de verificar se variação na dosagem da enzima afetaria a concentração de açúcares redutores. Os ensaios realizados e as condições utilizadas para a validação do modelo encontram-se na Tabela 25.

Tabela 25 - Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação do modelo para a cultivar Puitá Inta CL

Variável	Condições Experimentais/Valores Codificados		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Dosagem α -amilase ($\mu\text{L.g}^{-1}$ farinha)	36,2 (-1)	60 (0)	83,8 (1)
Temperatura α -amilase ($^{\circ}\text{C}$)	86 (1)	86 (1)	86 (1)
Dosagem AMG ($\mu\text{L.g}^{-1}$ farinha)	171,67 (1)	171,67 (1)	171,67 (1)

A Tabela 26 apresenta os resultados preditos e observados e o desvio relativo entre eles obtido nos ensaios de validação experimental. Observa-se que estatisticamente não houve diferença entre os ensaios 2 e 3, que utilizaram mais enzima e que também apresentaram maior concentração de AR. Assim, pode-se trabalhar com dosagem intermediária de enzima, 60 $\mu\text{L/g}$ farinha, que irá se obter uma hidrólise satisfatória. Os desvios relativos ficaram próximos a 5%, mostrando a proximidade entre os resultados experimentais e os resultados preditos, indicando a precisão do modelo matemático gerado.

Tabela 26 - Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo da hidrólise para a cultivar Puitá Inta CL

Ensaio	AR mg/mL		Desvio relativo
	Resultado experimental	Resultado predito	
1	157,36 ^a	162,65	3,36
2	167,13 ^{ab}	159,40	4,62
3	167,89 ^b	156,16	6,98

A Tabela 27 apresenta os teores de AR obtidos para ambas as cultivares de arroz e foi possível observar que os teores de AR foram bastante próximos em todos os ensaios de hidrólise enzimática de ambas as cultivares, nas mesmas condições de temperatura de liquefação (temperatura ^{α -amilase}) de 85,95°C, tempo de liquefação (tempo de reação ^{α -amilase}) de 30 min, temperatura de sacarificação (temperatura^{AMG}) de 55 °C, dosagem de AMG (dosagem^{AMG}) de 171,67 $\mu\text{L.g}^{-1}$ de farinha e tempo de sacarificação (tempo de reação^{AMG}) de 30 min. Em relação à dosagem de α -amilase (dosagem ^{α -amilase}) ($\mu\text{L.g}^{-1}$ de farinha), as amostras apresentaram uma pequena diferença no teor de AR, porém quando se utilizou 60 $\mu\text{L.g}^{-1}$ esse aumento não foi significativo quando comparado com a maior dosagem estudada e os resultados mostraram que existe um bom ajuste ao modelo matemático, apresentando desvio relativo menor que 5%.

Tabela 27 - Comparativo dos Teores de AR (mg.mL^{-1}) entre amostras de ambas cultivares

Ensaio	BRS AG	Puita Inta CL
1	160,74 ^a	157,36 ^a
2	165,14 ^a	167,13 ^{ab}
3	163,72 ^a	167,89 ^b

Dessa forma verificou-se que a hidrólise enzimática pode ser realizada nas mesmas condições operacionais para ambas cultivares, BRS AG e Puitá Inta CL, sem prejudicar a eficiência de hidrólise. Sendo assim, a Tabela 28 apresenta as condições experimentais selecionadas para a hidrólise enzimática dos grãos de arroz das cultivares BRS AG e Puitá Inta CL.

Tabela 28 - Condições experimentais de hidrólise

Temperatura ^{α-amilase}	85,95°C
Dosagem ^{α-amilase}	60 $\mu\text{L.g}^{-1}$ de farinha
Tempo de reação ^{α-amilase}	30 min
Temperatura ^{AM}	55 °C
Dosagem ^{AMG}	171,67 $\mu\text{L.g}^{-1}$ de farinha
Tempo de reação ^{α-amilase}	30 min

6.3. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado

6.3.1. Fermentação Puitá Inta CL

Afim de avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados de grãos de arroz das cultivares em estudo e a influência da presença dos sólidos da hidrólise enzimática, realizou-se a fermentação da cultivar Puitá Inta CL na presença e ausência de sólidos residuais da hidrólise enzimática. A concentração inicial de glicose foi de 158 g.L^{-1} e de 174,97 g.L^{-1} , para o hidrolisado com sólidos e o sem sólidos, respectivamente. A esterilização a 120°C pode ter sido responsável pelo aumento da concentração de açúcares nos materiais. O processo foi conduzido durante 36 horas. As Figuras 25 e 26 mostram o perfil de consumo de glicose e produção de etanol na presença de sólidos residuais e na ausência dos mesmos, respectivamente, para a cultivar Puitá Inta CL.

Figura 25 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar Puitá Inta CL, com sólidos

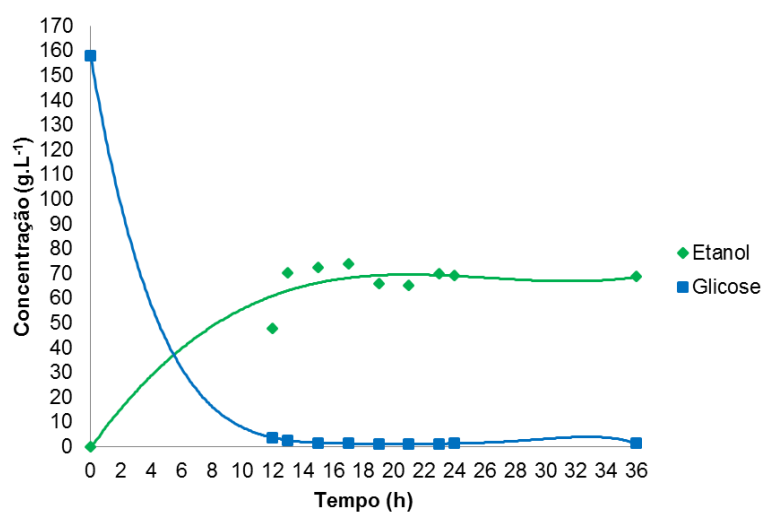
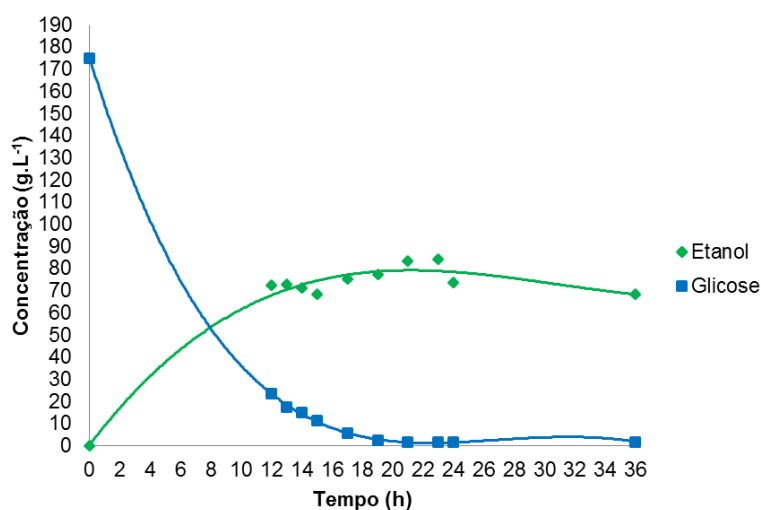


Figura 26 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar Puitá Inta CL, sem sólidos



Para o ensaio na presença de sólidos, a concentração de etanol com 17 horas de reação foi de 73,95 g.L⁻¹, correspondendo a um valor de produtividade volumétrica de 4,35 g.L⁻¹.h⁻¹, a maior relação entre os ensaios. Para o ensaio sem os sólidos concentração de etanol com 23 horas de reação foi de 84,1 g.L⁻¹, superior ao ensaio fermentativo com a mesma cultivar correspondendo a um valor de produtividade volumétrica de 3,66 g.L⁻¹.h⁻¹.

Para ambos os ensaios a redução percentual de substrato foi de 99,1% resultando em 1,35 g.L⁻¹ e 1,52 g.L⁻¹ de glicose residual, para o ensaio com sólidos e sem sólidos, respectivamente. O último apresentou a maior quantidade de glicose residual entre os ensaios. Os fermentados da cultivar Puitá Inta CL apresentaram fatores de rendimento de produção de etanol 0,47 g.g⁻¹ e 0,48 g.g⁻¹ para o hidrolisado com sólidos e sem sólidos, respectivamente e a eficiência de fermentação foi de 92,38% e 94,88%, nessa ordem.

Os resultados dos fatores de rendimento de produção de etanol e eficiência de fermentação foram próximos aos encontrados por Kawa-Rygielska e Pietrzak (2014) que correspondem a 0,52 g.g⁻¹ e 91,85%. No estudo desses autores foi realizada a fermentação de milho a 36°C, durante 96 h com agitação de 150 rpm utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como levedura. Zhang et al. (2013) na fermentação de batata doce com *Zymomonas mobilis*, durante 72 h a 30 °C, encontraram para o fator de rendimento de produção de etanol 0,45 g.g⁻¹, próximo a ao encontrado nesse trabalho, e eficiência de fermentação de 87,2% inferior ao alcançado na fermentação da cultivar Puitá Inta CL, com e sem o resíduo sólido da hidrolise enzimática.

6.3.2. Fermentação da Cultivar BRS AG

Nos hidrolisados obtidos com a cultivar BRS AG a concentração inicial de glicose foi de 148,4 g.L⁻¹ e 173 g.L⁻¹ para o hidrolisado com sólidos e sem sólidos, respectivamente. A fermentação destes hidrolisados foi conduzida durante 36 horas. As Figuras 27 e 28 mostram o perfil de consumo de glicose e a produção de etanol na presença de sólidos residuais e na ausência dos mesmos, respectivamente.

Figura 27 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar BRS AG com sólidos

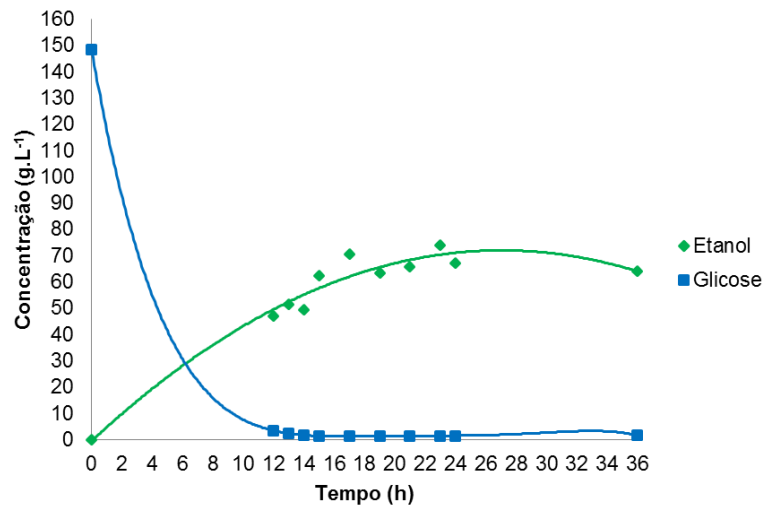
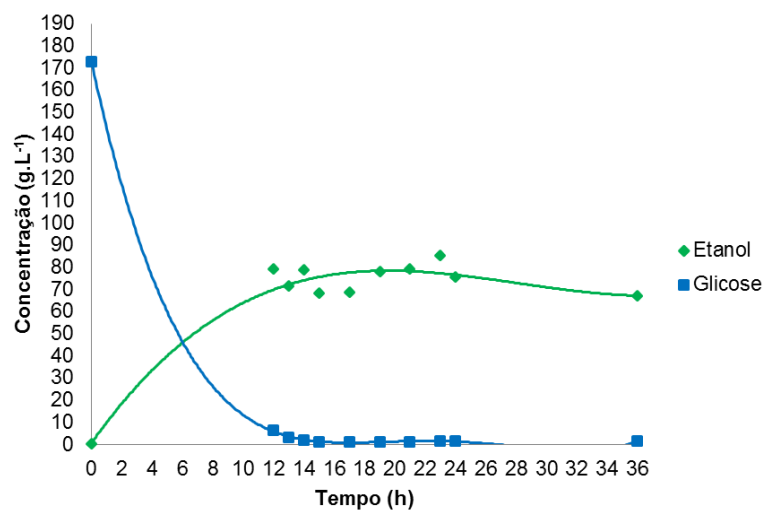


Figura 28 - Perfil de consumo de substrato e produção de etanol na fermentação do hidrolisado dos grãos da cultivar BRS AG sem sólidos



Para ambos os ensaios, a maior concentração de etanol foi observada com 23 horas de fermentação. Na presença de sólidos a maior concentração de etanol foi de 73,85 g.L⁻¹, correspondendo a um valor de produtividade volumétrica de 3,21 g.L⁻¹.h⁻¹. Para o ensaio sem os sólidos a concentração de etanol com 23 horas de reação foi de 84,9 g.L⁻¹, superior ao ensaio fermentativo com a mesma cultivar, correspondendo a um valor de produtividade volumétrica de 3,69 g.L⁻¹.h⁻¹. As concentrações obtidas foram semelhantes as que foram observadas na fermentação da cultivar Puitá Inta CL nas mesma condição experimentais. A produtividade volumétrica nos dois casos estudados para cultivar BRS AG foi superior a relatada por Yamada et. al (2011), 1,2 g.L⁻¹.h⁻¹, também para a fermentação durante 24 h, de grãos de arroz integrais de uma cultivar de alto rendimento de grãos.

Para ambos os ensaios a redução percentual de substrato foi de aproximadamente 99% resultando em 1,49 g.L⁻¹ e 1,00 g.L⁻¹ de glicose residual, para o ensaio com sólidos e sem sólidos, respectivamente. Os fermentados da cultivar BRS AG apresentaram fatores de rendimento de produção de etanol 0,50 g.g⁻¹ e 0,49 g.g⁻¹ para o hidrolisado com sólidos e sem sólidos, respectivamente e eficiência de fermentação de 98,37% e 96,6%, ambas superiores as observadas para a cultivar Puitá Inta CL.

6.3.3. Estimativa Produção de Etanol

A estimativa da produção de etanol, em volume por massa de grão e por área de grãos cultivados é um importante indicativo da potencialidade da cultura para produção de biocombustíveis. Com as concentrações máximas de etanol obtidas nas fermentações e com a massa inicial de farinha utilizada nas hidrólises (10 g) foi possível realizar as estimativas apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29 - Estimativas produção de etanol

	Ensaio 1 Puitá Inta CL**	Ensaio 2 Puitá Inta CL	Ensaio 3 BRS AG***	Ensaio 4 BRS AG
Sólidos	Sim	Não	Sim	Não
Concentração máxima de etanol (g.L⁻¹)	73,95	84,1	73,85	84,9
Volume de etanol por massa de grãos (L.ton⁻¹)*	318,67	362,41	318,24	365,86
Volume de etanol por área plantada (L.ha⁻¹)	2321,81	2640,49	2469,53	2839,04

*Utilizada massa específica do etanol de 0,789 g.mL⁻¹; Produtividades médias: ** 9,445 ton.ha⁻¹ (BASF), ***10 ton.ha⁻¹ (EMBRAPA, 2015)

As concentrações máximas de etanol obtidas assim como o volume de etanol produzido por massa de grãos nos ensaios de fermentação realizados para as cultivares nas mesmas condições, com e sem resíduo sólido da hidrólise enzimática, foram próximas e em torno de 74 g.L^{-1} e 84 g.L^{-1} , respectivamente. Isso se dá devido as cultivares Puitá Inta CL e BRS AG apresentarem características físico-químicas semelhantes. Os ensaios com presença de sólidos nos hidrolisados apresentaram menor concentração final de etanol e isso pode ter ocorrido devido à alta concentração de sólidos no meio, que pode acarretar em uma situação de estresse para a levedura (Barcelos, 2012), consequentemente prejudicando a fermentação. Porém, é necessário avaliar se a melhora obtida pela adição da etapa de centrifugação, para a remoção dos sólidos residuais, é viável economicamente.

Devido a cultivar BRS AG apresentar produtividade média de 10 ton.ha^{-1} , superior à produtividade da cultivar Puitá Inta CL, essa apresenta também um maior volume de etanol por área plantada, alcançando cerca de 14% a mais que a outra cultivar em estudo.

7. CONCLUSÃO

- Os teores de lipídeos, cinzas, fibra bruta e amido são iguais para os grãos integrais das duas cultivares;
- Os teores de amido e lipídeos nos grãos polidos da cultivar BRS AG são superiores aos teores da cultivar Puitá Inta CL;
- O teor de fibra bruta nos grãos polidos da cultivar Puitá Inta CL é maior do que na cultivar BRS AG;
- As cultivares não apresentam diferença no teor de amilose;
- As condições de hidrólise enzimática que apresentaram maior concentração de açúcares redutores para ambas as cultivares foram: Dosagem de α -amilase: 60 μ L/g farinha, Temperatura de liquefação: 85,95°C, Tempo de Liquefação: 30 min, Dosagem de AMG: 171,67 μ L/g farinha, Temperatura de sacarificação: 55°C Tempo de sacarificação: 30 min;
- A fermentação com hidrolisado sem a presença de sólidos apresentou concentração final de etanol superior à realizada com material com sólidos;
- O desempenho para produção de etanol de ambas as cultivares é o mesmo.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a avaliação econômica do processo de produção de etanol proposto nesse trabalho;
- Estudar a fermentação dos grãos sem retirar a casca;
- Estudar a potencialidade para a produção de etanol quando utilizada todas as frações da planta, incluindo a palha e a casca

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINIFAR, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, 2009, 828–833.

AI, Y.; HASJIM, J.; JANE, J. Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, 2013, 120-127.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, 4851-4861.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 47, 2015, 60-88.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioetanol**. 2012. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

BARCELOS, C. A.; MAEDA, R. N.; BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JR., N. Ethanol production from sorghum grains [*sorghum bicolor* (L.) moench]: evaluation of the enzymatic hydrolysis and the hydrolysate fermentability. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 28, n. 04, 2011, 597 – 604.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J.M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos e tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, p. 274-315, 2000.

BLAZEK, J.; GILBERT, E. P. Effect of enzymatic hydrolysis on native starch granule structure. **Biomacromolecules**, v. 11, 2010, 3275-3289.

CORDONA, C. A.; SANCHEZ, O. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, 2007, 2415–2457.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010, 181-188.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO; Acompanhamento da safra brasileira Grãos. V. 1 – Safra 2013/14, n. 2, 2013, 39 p.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO; Acompanhamento da safra brasileira Grãos. V. 1 – Safra 2013/14, n. 2, 2013, 66 p.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, 2010, 613-617.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA CLIMA TEMPERADO; Nota Técnica (1/3/2013); Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/imprensa/noticias/2013/01032013/01032013.php>. Acessado em Dezembro de 2013.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA CLIMA TEMPERADO; Disponível em : <http://www.cpact.embrapa.br/pesquisa/arrozirrigado.php> . Acessado em Dezembro de 2013.

HERA, E. L.; GOMEZ, M.; ROSELL, C. M. Particle size distribution of rice flour affecting the starch enzymatic hydrolysis and hydration properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, 2013, 421-427.

HSU, T.; GUO, G.; CHEN, W.; HWANG, W. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, 4907–4913.

KAWA-RYGIELSKA, J.; PIETRZAK, W. Ethanol fermentation of very high gravity (VHG) maize mashes by *Saccharomyces cerevisiae* with spent brewer's yeast supplementation. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, 2014, 50 – 57.

KHAWLA, B. J.; SAMEH, M.; IMEN, G.; DONYES, F.; DHOUHA, G.; RAOUDHA, E. G.; OUMÈMA, N. E. Potato peel as feedstock for bioethanol production: A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, 2014, 144-149.

LUQUE, R.; HERRERO-DAVILA, L.; CAMPELO, J. M.; CLARK, J. H.; HIDALGO, J. M.; LUNA, D.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A. Biofuels: a technological perspective. **Energy Environmental Science**, v. 1, 2008, 542–564.

MACHADO, C. M. M. *Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

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

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO; Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. Acessado em: Dezembro de 2013.

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

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**, v. Jan/Jun, 2009, 9-23.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, 2015, 888–903.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, 2010, 817–830.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, 2010, 578–597.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed Editora S. A. 2011.

OKUDOH, V.; TROIS, C.; WORKNEH, T.; SCHMIDT, S. The potential of cassava biomass and applicable Technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, 2014, 1035 – 1052.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, 2010, 1549-1558.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass e Bienergy**, v. 58, 3013, 390-405.

POTUMARTHI, R.; BAADHE, R. R.; NAYAK, P.; JETTY, A. Simultaneous pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochaete chrysosporium* for improved production of reducing sugars. **Bioresource Technology**, v. 128, 2013, 113–117.

RAMCHANDRAN, D.; JOHNSTON, D. B.; TUMBLESON, M. E.; RAUSCH, K. D.; SINGH, V. Seasonal variability in ethanol concentrations from a dry grind fermentation operation associated with incoming corn variability. **Industrial Crops and Products**, v. 67, 2015, 155-160.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 3ª edição. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. XY, Nº 00, 2012, 1-7.

SANTOS, F., COLODETTE, J., QUEIROZ, J. H. **Bioenergia e biorrefinaria: cana-de-açúcar e espécies florestais**. Viçosa, MG: Os Editores, 2013.

SILVEIRA, J. L.; MARTINELLI, V. J.; VANE, L. F.; FREIRE JUNIOR, J. C.; VIGOUROUX, R. A. Z.; TUNA, C. E.; LAMAS, W. Q.; PAULINO, R. F. S. Incorporation of hydrogen production process in a sugar cane industry: Steam reforming of ethanol. **Applied Thermal Engineering**, v. 71, 2014, 94-103.

SHANAVAS, S.; PADMAJA, G.; MOORTHY, S. N.; SAJEEV, M. S.; SHERIFF, J. T. Process optimization for biethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, 2011, 901-909.

SLUITER, A.; SLUITER, J. Determination of Starch in Solid Biomassa Samples by HPLC. **National Renewable Energy Laboratory**. 2008.

SURESH, K.; KIRANSREE, N.; RAE, L. V. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 68, 1999, 301-304.

SYAHARIZA, Z. A.; SAR, S.; HASJIM, J.; TIZZOTTI, M. J.; GILBERT, R. G. The importance of amylose and amylopectin fine structures for starch digestibility in cooked rice grains. **Food Chemistry**, v. 136, 2013, 742-749.

WALTER, M., MARCHEZAN, E., AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, 2008, 1184-1192.

WANI, A. A.; SINGH, P.; SHAH, M. A.; WANI, I. A.; GÖTZ, A.; SHOTTB, M.; ZACHERL, C. Physico-chemical, thermal and rheological properties of starches isolated from newly released rice cultivars grown in Indian temperate climates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, 2013, 176-183.

YAMADA, R.; YAMAKAWA, S.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct and efficient ethanol production from high-yielding Rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, 2011, 393-396.

ZAVAREZE, E. R.; EI HALAL, S. L. M.; PEREIRA, J. M.; RADÜNZ, A. L.; ELIAS, M. C.; DIAS, A. R. G. Caracterização química e rendimento de extração de amido de arroz com diferentes teores de amylose. **Braz. J. Food Technol.**, II SSA, 2009.

ZHANG, P.; CHEN, C.; SHEN, Y.; DING, T.; MA, D.; HUA, Z.; SUN, D. Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 128, 2013, 835–838.