



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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO HIDROTÉRMICO E
ENZIMÁTICO PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES A
PARTIR DA PALHA DE ARROZ - BRS AG**

MIRAL MIRANDA NETO

RIO GRANDE – RS

2018

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

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO HIDROTÉRMICO E
ENZIMÁTICO PARA A OBTENÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES A
PARTIR DA PALHA DE ARROZ - BRS AG**

MIRAL MIRANDA NETO

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade Federal
do Rio Grande.

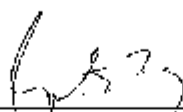
Orientador: Prof. Dr. Walter Augusto-Ruiz

RIO GRANDE – RS

2018

APROVAÇÃO

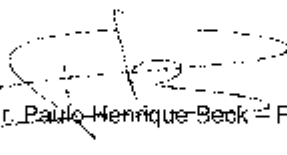
Dissertação defendida por Miral Miranda Neto e aprovada em 23 de abril de 2018,
pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Walter Augusto Ruiz – FURG



Profa. Dra. Vanessa Bongalhardo Mortola – FURG



Prof. Dr. Paulo Henrique Beck – FURG



Prof. Dr. Ricardo Perça Toralles – IF-Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por além de ter me guiado ao longo desta jornada, por também ter colocado excelentes pessoas junto à mim para realização do trabalho necessário para atingir os objetivos.

Aos meus pais, por seu contínuo incentivo, amor e suporte em todos os momentos.

Ao meu irmão Pedro que me apoiou, na torcida para que os resultados fossem sempre os melhores possíveis.

Ao professor Dr. Walter Augusto-Ruiz, que me orientou e acompanhou em todos os momentos do trabalho relativo à dissertação, sendo sempre muito prestativo e paciente. Obrigado por sua atenção contínua, amiga e interessada.

Aos técnicos da EQA com quem mantive relação, em especial Michele Moraes com quem compartilhei as dificuldades, as alegrias e tivemos diversos momentos de bate-papo sobre os mais diversos assuntos, sendo ela sempre extremamente prestativa e com uma conversa esclarecedora. Agradeço ao já aposentado técnico Marcus Gobbi que, no começo do trabalho, me ajudou a sanar dúvidas e me mostrou alguns caminhos. Também importante lembrar do técnico Jean Arias com quem dialoguei bastante sobre as etapas finais do projeto e me ajudou bastante. Aos técnicos do CEME-SUL Caroline Pires Ruas e Rudmar Krumreick por sua atenção e auxílio na obtenção das microfotografias obtidas por MEV.

Aos meus avós, padrinhos e tios que, mesmo longe, sempre torceram para que tudo convergisse para o melhor.

Igualmente agradeço aos meus colegas de mestrado, em especial ao Rodrigo, com quem troquei conhecimentos, artigos, trabalhos e realizei experimentos em conjunto.

Às estudantes de engenharia Marcella Gaio e Luci Leyva pelas suas colaborações para o presente trabalho, obrigado.

Agradeço a FURG pela oferta de um programa de pós-graduação em Engenharia Química, excelente oportunidade para aperfeiçoamento profissional e pessoal.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a Embrapa por toda colaboração ao longo do projeto.

Agradeço, finalmente, a todas as pessoas que estiveram diretamente ou indiretamente relacionadas à realização deste trabalho, muito obrigado.

*"O entusiasmo é a maior força da alma.
Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas."*

Napoleon Hill

RESUMO

Combustíveis renováveis, como no caso do etanol celulósico, podem ser obtidos a partir de diversas fontes de biomassa, tais como bagaços, talos, espigas, palhas, cascas e outros resíduos de produção agrícola e florestal. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver processo de tratamento hidrotérmico e enzimático para obtenção de açúcares redutores a partir da "palha de arroz" da cultivar BRS AG. A palha foi, portanto, caracterizada em sua composição proximal e teores de celulose, hemicelulose e lignina e exame por MEV revelaram a estrutura antes e depois do pré-tratamento hidrotérmico. Com o objetivo de encontrar a condição de hidrólise enzimática que fornecesse maior concentração de açúcares redutores (AR), fez-se um planejamento fatorial com diferentes faixas de operação da hidrólise enzimática, aplicando um fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central e todos tratamentos em duplicata. De modo a se avaliar qual a variável exerceu maior influência sobre o sistema, pôde-se observar que o tempo de reação teve um efeito mais pronunciado, sendo que nas reações que ocorreram em 24 horas o rendimento em AR foi de, em média, $1,7 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que reações de 72 horas o rendimento dobrou, ou seja, $3,4 \text{ g.L}^{-1}$. Pôde-se observar que a influência do tempo de reação no rendimento de AR foi maior quando comparado com os demais fatores em estudo. Para a melhor condição de hidrólise enzimática foi feita a fermentação do hidrolisado. Foi possível constatar presença de etanol a partir da fermentação dos hidrolisados de palha de arroz.

PALAVRAS CHAVE: Hidrólise enzimática, Biomassa lignocelulósica, Palha de arroz, Etanol 2G.

ABSTRACT

Renewable fuels, being cellulosic ethanol an example, can be obtained from various sources of biomass such as bagasses, cobs, straws, husks and other residues from agricultural and forestry production. In this way, the objective of this work was to develop a process of hydrothermal and enzymatic treatment to obtain reducing sugars from rice straw of BRS AG grow crop. The straw was, therefore, characterized in its proximal composition and cellulose amounts, hemicellulose and lignin and SEM images revealed the structure before and after the hydrothermal treatment. With the objective of finding the condition of enzymatic hydrolysis that provides the greatest concentration of reducing sugars, it was made factorial planning strategy with different operation limits of enzymatic hydrolysis, applying a factorial 2^3 with 4 repetition on central point planning and all treatments in duplicate. To evaluate which variable had greater influence over the system, it was observed that reaction time had a more pronounced effect, such that reactions that occurred in 24 hours the yield in reducing sugar was, in average, 1.7 g.L^{-1} , while reactions that occurred in 72 hours the yield just doubled, that is, 3.4 g.L^{-1} . It was observed the biggest influence of reaction time on the reducing sugar yield when compared to other factors considered. For the best condition of enzymatic hydrolysis it was conducted fermentation of the hydrolysate. It was noticed ethanol in solution after the fermentation of rice straw hydrolysates.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Lignocellulosic biomass, Rice straw, 2G Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Diagramada estrutura da palha de arroz.....	18
Figura 2 - Duas unidades de glicose em uma cadeia de celulose.....	19
Figura 3 - Composição do O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (hemicelulose de angiosperma). Os números indicam os átomos de carbono que sofreram substituição	20
Figura 4 - Estrutura da lignina	21
Figura 5 - Precursores primários da lignina: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico	22
Figura 6 - Etapas de processamento para a obtenção de açúcares redutores	22
Figura 7 - Representação da ação catalítica do complexo celulase sobre a celulose	32
Figura 8 - Estratégias de processamento de biomassa lignocelulósica	34
Figura 9 - Fluxograma operacional do desenvolvimento do processo.....	36
Figura 10 - Reações que podem ocorrer durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos..	41
Figura 11 - Foto da bomba de teflon utilizada para o pré-tratamento.....	43
Figura 12- Autoclave utilizado nos testes	45
Figura 13 - Curva-padrão de Ácido Gálico equivalente	54
Figura 14 - Curva-padrão de Glicose equivalente.....	56
Figura 15 - Gráfico de Pareto relativo ao tratamento hidrotérmico	58
Figura 16 - Valores observados versus valores preditos para o tratamento hidrotérmico	61
Figura 17 - Perfil de atividade do blend de enzimas CelicCTec2 em palha de arroz sem pré-tratamento	64
Figura 18 - Diagrama de Pareto para o planejamento 2 ³ para hidrólise enzimática	67
Figura 19 - Valores observados versus valores previstos para a hidrólise enzimática	69
Figura 20 - Superfície de resposta para AR em função do tempo de reação e da relação sólido/líquido	71
Figura 21- Curvas de nível para AR em função do tempo de reação e da relação sólido/líquido..	71
Figura 22 - Superfície de resposta para AR em função do tempo de reação e da carga de enzima	72
Figura 23 - Curvas de nível para AR em função do tempo de reação e da carga de enzima	72
Figura 24 - Superfície de resposta para AR em função da relação sólido/líquido e da carga de enzima.....	73
Figura 25 - Curvas de nível para AR em função da relação sólido/líquido e da carga de enzima..	73
Figura 26 - Imagens da palha de arroz obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) antes e após pré-tratamento hidrotérmico	74
Figura 27 - Imagem do teste colorimétrico para detecção de etanol.....	76
Figura 28 - Cromatograma de separação de inibidores obtidos em líquido de tratamento hidrotérmico a 200 °C, 60 minutos e 16 mL de líquido.g palha ⁻¹	93
Figura 29 - Cromatograma de separação de inibidores obtidos em líquido de tratamento hidrotérmico a 200 °C, 60 minutos e 14 mL de líquido.g palha ⁻¹	94
Figura 30 - Cromatograma de separação de açúcares obtidos no hidrolisado a 72 h, 2,5% p/v e 16,5 FPU/g.....	95
Figura 31 - Cromatograma de separação de açúcares obtidos no hidrolisado a 72 h, 2,5% p/v e 66 FPU/g.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de cada tipo de pré-tratamento	30
Tabela 2 - Variáveis codificadas utilizadas no delineamento 2^3 para tratamento com bomba de teflon	44
Tabela 3 - Matriz do planejamento 2^3 para bomba de teflon	44
Tabela 4 - Condições de processamento em autoclave	45
Tabela 5 - Valores utilizados no delineamento fatorial completo 2^3 para hidrólise enzimática	47
Tabela 6 - Planejamento experimental 2^3 para hidrólise enzimática de palha de arroz BRS AG após pré-tratamento	48
Tabela 7 - Composição da solução salina	49
Tabela 8 - Composição química da palha de arroz moída	52
Tabela 9 - Comparativo da composição da palha de arroz de diferentes origens	52
Tabela 10 - Comparativo da composição de diferentes biomassas lignocelulósicas	53
Tabela 11 - Análise de inibidores por HPLC	55
Tabela 12 - Açúcares redutores obtidos da cultivar BRS AG após execução do planejamento experimental para o tratamento hidrotérmico	57
Tabela 13 - Estimativa dos efeitos para açúcares redutores no planejamento 2^3 para o tratamento hidrotérmico	59
Tabela 14 - Coeficientes de regressão para o pré-tratamento hidrotérmico	60
Tabela 15 - Análise de variância para o pré-tratamento hidrotérmico	61
Tabela 16 - Valores de AR experimental, previstos no modelo e erros relativos para o pré-tratamento hidrotérmico	62
Tabela 17 - Rendimento de açúcares redutores a partir do processamento em autoclave	63
Tabela 18 - Açúcares redutores do delineamento da hidrólise enzimática	65
Tabela 19 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2^3	66
Tabela 20 - Coeficientes de regressão para a hidrólise enzimática	68
Tabela 21 - Análise de variância para a hidrólise enzimática	69
Tabela 22 - Valores de AR experimental, previstos no modelo e erros relativos para a hidrólise enzimática	70

LISTA DE ABREVIACÕES

LI – Líquidos Iônicos

SC-CO₂ – Extração por CO₂ supercrítico

LHW – gua Líquida Quente (*Liquid Hot Water*)

AR – Augar Redutor

SHF – Fermentação e Hidrólise Separados (*Separated Hydrolysis and Fermentation*)

SSF – Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

SSCF – Sacarificação e co-fermentação simultâneos (*Simultaneous Saccharification and cofermentation*)

CBP – Bioprocesso consolidado (*Consolidated Bioprocess*)

AFEX – Explosão de Fibras por uso de Amônia (*Ammonia Fiber Explosion*)

3,5-DNS – cido 3,5 dinitrosalicílico

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

SEM – *Scanning Electron Microscopy* (MEV, em inglês)

FPU – *Filter Paper Unit* (Unidade de papel filtro, em inglês)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.2 Aspectos do arroz e da palha de arroz.....	18
3.3 Celulose.....	19
3.4 Hemicelulose.....	20
3.5 Lignina.....	21
3.6 Pré-tratamento	22
3.6.1 Pré-tratamento com Água Líquida Quente (Liquid Hot Water - LHW)	23
3.6.2 Explosão a vapor	23
3.6.3 Pré-tratamento ácido.....	24
3.6.4 Pré-tratamento alcalino.....	24
3.6.5 Pré-tratamento Organosolv.....	25
3.6.6 Explosão por fibra de amônia (AFEX).....	26
3.6.7 Pré-tratamento com radiação de microondas e pré-tratamento por irradiação de feixe de elétrons	26
3.6.8 Explosão por CO ₂ supercrítico (SC-CO ₂).....	27
3.6.9 Pré-tratamento com Líquidos Iônicos.....	28
3.6.10 Comparativo entre os diferentes tipos de pré-tratamentos	30
3.7 Hidrólise enzimática.....	31
3.8 Estratégias para produção de etanol de biomassa.....	32
3.8.1 Hidrólise e fermentação em separado (SHF).....	33
3.8.2 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).....	33
3.8.3 Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF).....	34
3.8.4 Bioprocesso consolidado (CBP).....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Fluxograma do processo experimental.....	35
4.2 Matéria-prima.....	36
4.3 Caracterização Física da matéria-prima	37

4.3.1	Moagem e peneiramento	37
4.3.2	Densidade da palha.....	37
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
4.4	Caracterização proximal da “palha de arroz”	37
4.4.1	Determinação do teor de umidade	37
4.4.2	Determinação do teor de cinzas.....	38
4.4.3	Determinação do teor de lipídios.....	38
4.4.4	Determinação do teor de nitrogênio total	38
4.5	Determinação do teor de celulose.....	38
4.6	Determinação do teor de fibras.....	39
4.7	Determinação do teor de lignina.....	39
4.8	Determinação de açúcares redutores na palha antes do pré-tratamento	40
4.9	Determinação do teor de açúcares redutores pelo método do 3,5-DNS.....	40
4.10	Determinação de inibidores enzimáticos.....	41
4.11	Análise de fenólicos totais.....	42
4.12	Levantamento do perfil cromatográfico de açúcares.....	42
4.13	Pré-tratamentos hidrotérmicos da palha de arroz	42
4.13.1	Pré-tratamento utilizando bomba de teflon	42
4.13.2	Planejamento experimental para Tratamento com a Bomba de teflon	43
4.13.3	Pré-tratamento utilizando autoclave	45
4.14	Hidrólise enzimática da palha de arroz cultivar "BRS AG"	46
4.14.1	Determinação da atividade enzimática (Atividade da enzima ou teste FPU).....	46
4.14.2	Planejamento experimental da hidrólise enzimática.....	47
4.15	Teste de Fermentação	48
4.16	Teste qualitativo para etanol.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Densidade da palha de arroz.....	51
5.2	Caracterização da palha de arroz.....	51
5.3	Determinação do teor de açúcares redutores totais presentes na amostra antes do processamento.....	54
5.4	Fenólicos totais.....	54
5.5	Teores de inibidores enzimáticos	55
5.6	Determinação de Açúcares Redutores.....	56
5.7	Pré-tratamento hidrotérmico da palha de arroz	56
5.7.1	Pré-tratamento utilizando bomba de teflon	56
5.7.2	Pré-tratamento utilizando autoclave	62
5.8	Hidrólise enzimática.....	63

5.8.1	Atividade da enzima ou teste FPU	63
5.8.2	Testes preliminares de hidrólise enzimática sem realização de pré-tratamento hidrotérmico sobre a palha de arroz.....	63
5.8.3	Resultados da hidrólise enzimática segundo o planejamento proposto.....	64
5.9	Microfotografias (MEV) da palha de arroz sem pré-tratamento e com pré-tratamento hidrotérmico.....	74
5.10	Teste qualitativo de etanol.....	75
6.	CONCLUSÕES.....	77
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
8.	REFERÊNCIAS	80
9.	APÊNDICES	93
9.1	Apêndice I: Cromatogramas relativos aos inibidores.....	93
9.2	Apêndice II: Cromatogramas relativos ao perfil de açúcares.....	95

1. INTRODUÇÃO

Atualmente vêm sendo produzidos biocombustíveis que fazem uso, primariamente, de terras aráveis, sendo, portanto, dependentes das safras e de seus produtos sazonais. Uma alternativa para a obtenção de biocombustíveis sem aumentar a área de terra arável e para não depender unicamente das safras seria o uso de resíduos agroindustriais e demais matérias-primas lignocelulósicas, incluindo cascas, palhas e demais partes descartadas das plantas (do milho, soja, arroz, etc.), sendo esta alternativa chamada de segunda geração. O biocombustível de segunda geração consiste na produção de etanol celulósico a partir da quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal dos resíduos lignocelulósicos (DE ANDRADE *et. al.*, 2009).

Em face das variadas matérias-primas de biomassas lignocelulósicas, uma que se destaca especialmente no Rio Grande do Sul é a palha de arroz, a qual é produzida na base de 1 kg para cada 1 kg de arroz (BINOD, 2010).

Existem alguns fins para o uso da palha de arroz, sendo eles: **a)** alimentação animal, **b)** queima para geração de energia em caldeira, **c)** obtenção de açúcares redutores para posterior fermentação e geração de bioetanol. A sílica presente na palha de arroz (aprox. 14%) é um fator que torna essa biomassa de difícil digestão no trato intestinal de animais, sendo, portanto, a palha destinada para queima. Mesmo este tipo de solução não é a ideal, uma vez que a sílica é um potencial composto carcinogênico (BROWN, 2009). A alternativa de processamento químico ou enzimático da palha do arroz para obtenção de, primeiramente, açúcares redutores e, posteriormente, etanol, para uso em automóveis, é uma alternativa mais coerente em termos ecológicos.

Diante do dilema do uso de terras aráveis para produção de bioetanol, o presente trabalho mostra uma alternativa, o uso de resíduos, o que, no caso do Rio Grande do Sul, pode vir a ser amenizado se for explorada a palha de arroz, um resíduo abundante, sendo produzidas 37,2 milhões de toneladas somente nas Américas (KARIMI *et al.*, 2006).

A palha de arroz, por apresentar resistência ao processamento biológico, exige pré-tratamento, antes de submetê-la ao tratamento enzimático. É aconselhável a escolha de um pré-tratamento que proporcione um acesso maior das enzimas à celulose, de modo a facilitar

a produção de açúcares redutores. Após este pré-tratamento, um objetivo para o uso de açúcares redutores é a obtenção de etanol.

Foi demonstrado experimentalmente que: (1) um tipo de pré-tratamento, denominado tratamento hidrotérmico, facilita o acesso das enzimas à celulose, o que torna possível a obtenção de açúcares redutores a partir da palha de arroz; (2) é possível a obtenção de etanol a partir de açúcares redutores obtidos a partir da palha de arroz utilizando enzimas celulase (etapa de hidrólise enzimática) e levedura comercial Fleischmann na fermentação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de um pré-tratamento hidrotérmico na palha de arroz, cultivar BRS AG, visando a produção de açúcares redutores, passíveis de fermentação, para a produção de etanol de segunda geração.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição proximal da palha de arroz e os teores de fibra, celulose, lignina, compostos fenólicos, inibidores e açúcares redutores;
- Estudar as condições de pré-tratamento hidrotérmico (variáveis: temperatura, tempo de processamento e relação água/palha), de modo a modificar a matriz lignocelulósica;
- Estabelecer as condições de hidrólise enzimática da biomassa modificada pelo tratamento hidrotérmico (variáveis: tempo de reação, relação sólido/líquido e carga de enzima).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocombustíveis 1G e 2G

Biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo em motores a combustão. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol obtido, principalmente, a partir de cana-de-açúcar e o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis (ANP, 2016).

O etanol é um composto químico com fórmula molecular C_2H_6O , produzida especialmente via fermentação de açúcares. É um biocombustível utilizado em motores de combustão interna com ignição por centelha em substituição à gasolina. O Brasil é pioneiro na utilização em larga escala de etanol combustível desde o fim da década de 1970. Atualmente, é um dos que mais utilizam o produto e ainda o segundo maior produtor mundial (ANP, 2016).

A maior parte do etanol produzido no Brasil é proveniente de cana-de-açúcar, sendo que cerca de 50% da cana moída no Brasil é usada para produzir etanol e este representa cerca de 40% dos combustíveis para motores leves (LEITE *et al.*, 2007).

A produção de etanol conforme descrita acima, a partir de materiais sacarínicos ou amiláceos, como no caso da cana-de-açúcar, milho ou arroz, é denominada de primeira geração. Por outro lado, a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é denominada segunda geração (RODRIGUES, 2011).

De modo a diversificar as matérias-primas para a obtenção de etanol de segunda geração, são incentivados os usos de materiais geralmente descartados para a obtenção do álcool combustível, sendo estas: palhas, folhas, cascas, talos, raízes ou sabugos, materiais esses que são resíduos de diversas culturas. (FARIA *et al.*, 2016).

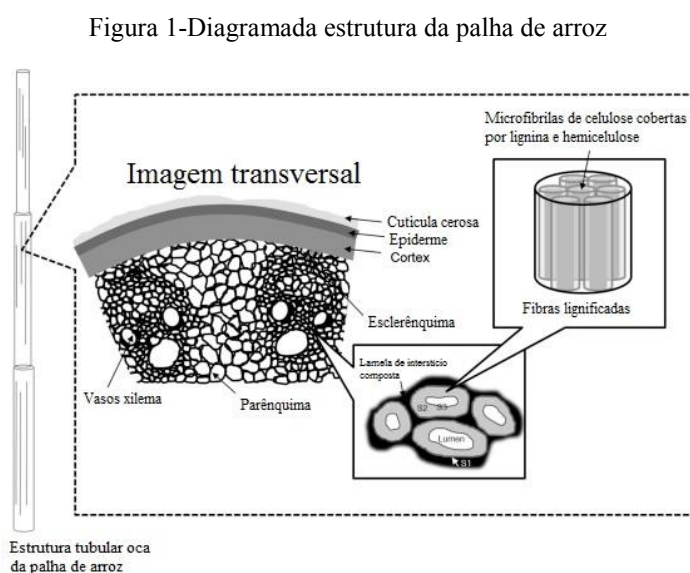
O etanol de segunda geração tem por vantagens: aproveitamento ao máximo da cultura agrícola sendo produzida e seus subprodutos, utilização de insumos já disponíveis nas unidades industriais (vantagem logística), aumento da fabricação de etanol sem ampliar a área de cultivo, produção de biocombustível mesmo durante a entressafra, e redução da emissão de carbono durante a produção.

3.2 Aspectos do arroz e da palha de arroz

O Arroz (*Oryza sativa*) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ficando atrás somente do milho. O Brasil se destaca como um dos maiores produtores mundiais de arroz, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro. O estado do Rio Grande do Sul apresenta um rendimento de 7,9 t/ha (IRGA, 2017), superior ao rendimento nacional de 6,23 t/ha (CONAB, 2017), demonstrando a importância da região na agricultura brasileira.

O arroz é uma matéria-prima promissora para a produção de etanol, pois fornece biomassa amilácea e também lignocelulósica. Tratando da biomassa lignocelulósica, um dos resíduos da produção do arroz é a palha, sendo que, para cada quilograma de grão recolhido, aproximadamente um quilograma de palha de arroz também é gerada (BINOD *et al.*, 2001).

Estruturalmente, em contraste com o caule de madeira, o caule da palha de arroz não possui o câmbio, mas possui numerosos feixes vasculares em diferentes camadas consistindo de cutícula cerosa, epiderme silicada, córtex (colênquima), uma camada lignificada grossa (esclerênquima) e tecido moído (parênquima) como demonstrado na FIGURA 1 (SEO *et al.*, 2014).



Fonte: (SEO *et al.*, 2014) adaptado

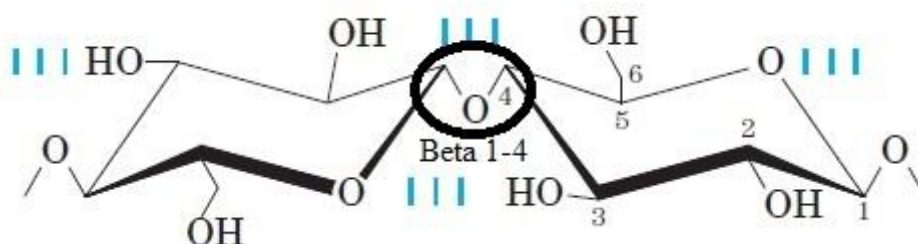
Comparada com outras biomassas lenhosas e monocotiledôneas, uma das propriedades intrínsecas da palha de arroz é o seu corpo rico em sílica, o qual se sabe ser a principal

barreira física ao transporte de material, também apresentando papel importante nos mecanismos de defesa da planta aos patógenos externos. Enquanto isso, a lignina tem papel estrutural, de modo que auxilia a determinar a maior ou menor rigidez da planta, sendo um material que reduz a susceptibilidade ao ataque enzimático se presente em grandes quantidades (CURRIE *et al.*, 2007). Foi reportado por Seo *et al.* (2014) que a proporção entre as quantidades de lignina e sílica em diferentes partes da palha de arroz mostram uma correlação negativa com a performance da hidrólise da celulose. Mas os fatores estruturais que governam a sacarificação enzimática da celulose da palha de arroz (maior ou menor influência de sílica e lignina na ação das enzimas e transferência de massa) ainda estão sendo elucidados (CURRIE *et al.*, 2007).

3.3 Celulose

Anualmente, as plantas produzem aproximadamente 180 bilhões de toneladas de celulose, sendo o maior reservatório de carbono orgânico no planeta (FESTUCCI-BUSELLI *et al.*, 2007). A celulose é um polímero linear de subunidades de glicose associados por ligações β (1 \rightarrow 4), sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero.

Figura 2 - Duas unidades de glicose em uma cadeia de celulose



Fonte: (NELSON *et al.*, 2014)

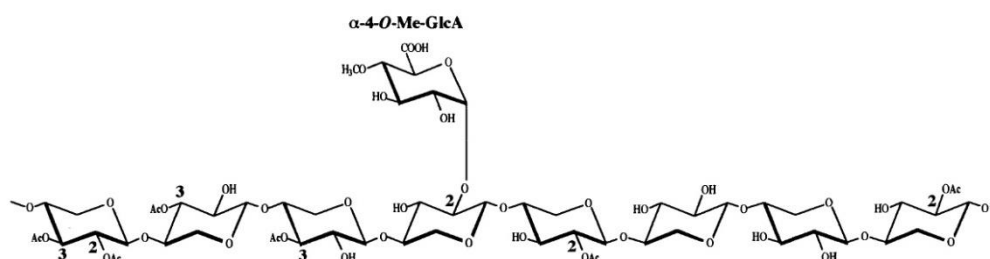
Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares. Essas estruturas são formadas devido à presença de ligações covalentes, pontes de hidrogênio e forças de van der Waals (FENGEL *et al.*, 1984; AGBOR *et al.*, 2011). As pontes de hidrogênio intramoleculares conferem uma estrutura retilínea à cadeia de celulose,

enquanto as pontes de hidrogênio intermoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e amorfas (AGBOR *et al.*, 2011).

3.4 Hemicelulose

A hemicelulose consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldo-hexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém, ainda, substituintes, como grupamentos acetila, L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico e ácido 4-O-metilglicurônico, na cadeia principal ou nas ramificações. A variedade de ligações e de ramificações assim como a presença de diferentes unidades monoméricas contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações. Esse polissacarídeo estabelece a ligação entre a celulose e a lignina (MALBURG *et al.*, 1992; JACOBSEN *et al.*, 2000).

Figura 3 - Composição do O-acetil-4-O-metilglicuronoxilana (hemicelulose de angiosperma). Os números indicam os átomos de carbono que sofreram substituição



Fonte: (SUNNA *et al.*, 1997)

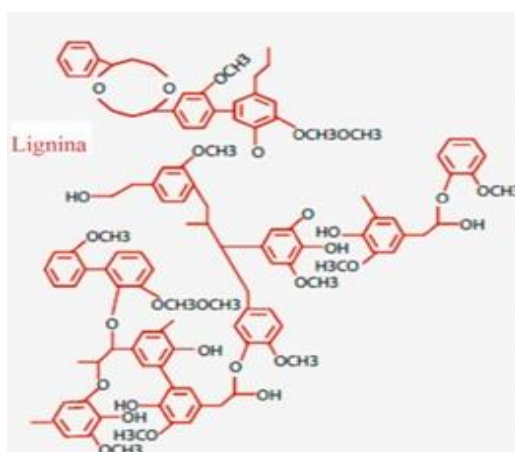
As hemiceluloses (xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas) são polissacarídeos de baixa massa molecular, apresentando entre 100 e 200 unidades glicosídicas. Consistem em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como D-xilose e L-arabinose, e aldo-hexoses, como D-glicose, D-manose e D-galactose. Contém, também, acetatos e substituintes como, L-arabinofuranosila, ácido D-glicurônico, ácido D-galacturônico e ácido α -D-4-O-metilglicurônico, na cadeia principal ou nas ramificações.

A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações. Diferentemente da celulose, a estrutura hemicelulósica não contém regiões cristalinas, e é, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas (ELBA *et al.*, 2008).

3.5 Lignina

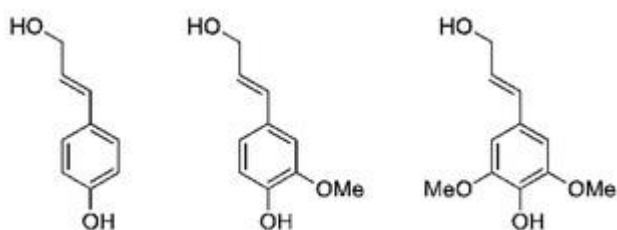
A lignina, juntamente com a hemicelulose e a pectina, preenche os espaços entre as fibras de celulose além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular. Representa um dos maiores estoques de carbono (ou energia) da natureza e é, ainda, o maior depósito natural de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Apresenta estrutura não-uniforme, altamente complexa (Figura 4), com massa molecular extremamente elevada. A lignina é uma macromolécula tridimensional formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. A lignina é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: i) álcool cumárico, ii) álcool coniferílico, e iii) álcool sinapílico, que se caracterizam por possuírem um anel aromático com diferentes substituintes (ELBA *et al.*, 2008).

Figura 4 - Estrutura da lignina



Fonte: (BAMDAD *et al.*, 2017)

Figura 5 - Precursores primários da lignina: álcool cumárico, álcool coníferílico e álcool sinapílico



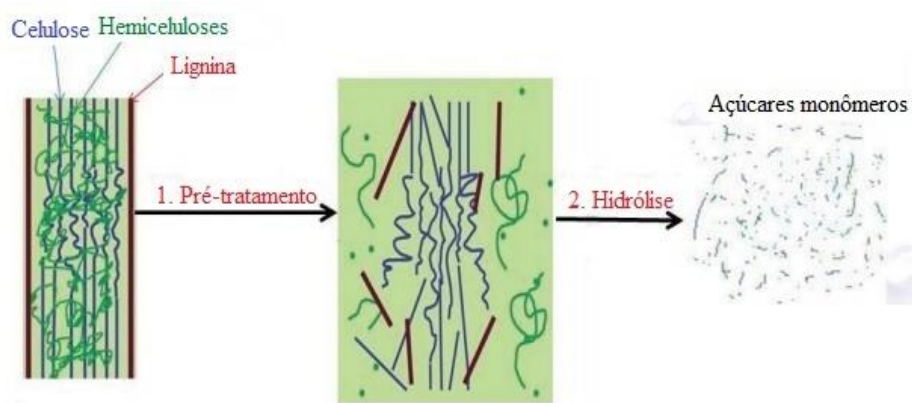
Fonte: (RATNAWEERA *et al.*, 2015)

3.6 Pré-tratamento

O maior desafio, em termos de processo, para a produção de etanol de biomassa lignocelulósica é o pré-tratamento da matéria-prima, uma vez que o complexo lignocelulósico é composto de celulose, hemicelulose e lignina ligados entre si (ELBA *et al.*, 2008).

Durante o pré-tratamento, esta matriz deve ser quebrada de modo a reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a sua fração amorfa, a mais adequada forma para o ataque enzimático, conforme ilustrado na Figura 6 (MADADI *et al.*, 2017).

Figura 6 - Etapas de processamento para a obtenção de açúcares redutores



Fonte: (MADADI *et al.*, 2017)

Adicionalmente, a maior parte da hemicelulose deve ser hidrolisada e a lignina deve ser liberada ou, até mesmo degradada. O fato de que a hidrólise da celulose é afetada pela porosidade de materiais lignocelulósicos deve também ser considerada.

O rendimento da hidrólise da celulose é inferior quando o pré-tratamento não é conduzido, de tal forma que o rendimento após o pré-tratamento geralmente é superior (LYND *et al.*, 1996). Portanto, o objetivo do pré-tratamento é a remoção da lignina e da hemicelulose, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade do material. Além disso, o pré-tratamento deve aumentar a formação de açúcares ou a tendência de formá-los durante a hidrólise enzimática e evitar a formação de inibidores para a subsequente fermentação. Para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, vários processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido propostos e desenvolvidos (SUN *et al.*, 2002). Alguns destes processos são brevemente explicados nos próximos itens.

3.6.1 Pré-tratamento com Água Líquida Quente (Liquid Hot Water - LHW)

O método LHW utiliza água líquida quente comprimida (a uma pressão acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose (DAS NEVES *et al.*, 2007). Este é um pré-tratamento hidrotérmico que libera grandes quantidades de açúcares hemicelulósicos na forma de oligômeros.

O tratamento geralmente ocorre a temperaturas na faixa de 170 a 230 °C e pressões acima de 5 MPa por 20 minutos. Isto, entretanto, também contribui para a produção de pequenas quantidades de compostos de degradação indesejados, tais como furfural e ácido carboxílico, que são muito tóxicos para a fermentação etanólica, sendo que eles inibem o crescimento microbiano (TAHERZADEH *et al.*, 2008; TALEBNIA *et al.*, 2010).

3.6.2 Explosão a vapor

Explosão a vapor é um método de pré-tratamento que torna a biomassa mais acessível ao ataques da celulase (DAS NEVES *et al.*, 2007). Este método de pré-tratamento, que não

faz uso de catalisador, é promissor, e a biomassa é fracionada, podendo resultar em ácido levulínico, xilitol e álcoois (BALAT *et al.*, 2008).

Neste método, a biomassa é aquecida utilizando vapor a alta pressão (20 a 50 bar, 160 a 290 °C) por alguns minutos; a reação para através de uma descompressão repentina a pressão atmosférica (DAS NEVES *et al.*, 2007; SANCHEZ *et al.*, 2008). Quando o vapor é utilizado para expandir a biomassa, ele causa a fibrilação do material (BALAT *et al.*, 2008).

3.6.3 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido é considerado como uma das mais importantes técnicas de pré-tratamento e visa altos rendimentos de açúcares a partir de materiais lignocelulósicos. Pode ser conduzida por ácidos concentrados ou diluídos (concentrações entre 0,2% e 2,5% p/p) a temperaturas entre 130 e 210 °C. Ácido sulfúrico é amplamente utilizado para o pré-tratamento ácido, dentre vários tipos de outros ácidos, tais como ácido clorídrico, ácido nítrico e ácido fosfórico (CARDONA *et al.*, 2010). O meio ácido ataca os polissacarídeos, especialmente hemiceluloses que são mais fáceis de hidrolisar do que a celulose (CARDONA *et al.*, 2010).

Entretanto, o pré-tratamento ácido resulta na produção de vários inibidores de fermentação como ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Esses produtos são inibidores de crescimento de microorganismos. Hidrolisados a serem utilizados na fermentação, portanto, precisam ser desintoxicados.

3.6.4 Pré-tratamento alcalino

Pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos digere a matriz de lignina e deixa a celulose e a hemicelulose disponível para degradação enzimática (PANDEY *et al.*, 2000). O tratamento alcalino de material lignocelulósico rompe a parede celular dissolvendo as hemiceluloses, lignina e sílica, hidrolisando ésteres urônicos e acéticos e intumescendo a celulose. A cristalinidade da celulose é reduzida devido ao intumescimento.

Através deste processo, os substratos podem ser fracionados em lignina solúvel em álcali, hemiceluloses e resíduos, o que facilita o seu uso como produtos mais valiosos. O resíduo final (principalmente celulose) pode ser utilizado para produzir tanto papel como derivados de celulose (CARDONA *et al.*, 2010). Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio podem ser utilizados neste processo. Processos de pré-tratamento alcalino utilizam baixas temperaturas e pressão comparados com outras tecnologias de pré-tratamento (MOSIER *et al.*, 2005).

3.6.5 Pré-tratamento Organosolv

Processo de produção de polpa por solventes orgânicos ou Organosolv é um método alternativo para a deslignificação do material lignocelulósico. A utilização de misturas de solventes orgânicos e água elimina a necessidade de queimar o licor e facilita o isolamento da lignina (através de destilação do solvente orgânico). Entre os solventes orgânicos que podem ser utilizados para deslignificação estão metanol, etanol, ácido acético, ácido peracético, acetona, etilenoglicol, glicerol, fenol, etc. (ZHAO *et al.*, 2009b). Por razões de economia, o uso de álcoois de menor peso molecular tem sido favorecido.

A faixa de temperatura de operação do organosolv está entre 150 e 200 °C. Solventes orgânicos são caros e o seu uso requer equipamentos que operem a alta pressão devido a sua alta volatilidade. Os solventes utilizados devem ser recuperados e reciclados para reduzir os custos de operação. A remoção de solventes da biomassa pré-tratada é necessário porque quaisquer solvente residual pode ser inibidor dos processos de hidrólise enzimática e fermentação. A principal vantagem do organosolv é que lignina relativamente pura e de baixo peso molecular é recuperada como subproduto. O processo organosolv ainda é muito complexo e caro para atrair interesse industrial (ZHENG *et al.*, 2009).

3.6.6 Explosão por fibra de amônia (AFEX)

O pré-tratamento por explosão por fibra de amônia envolve amônia líquida e explosão a vapor (BALAT *et al.*, 2008). AFEX é um tratamento térmico alcalino que expõe o material lignocelulósico através de altas temperaturas e pressões, seguido de rápida descompressão. Este método não produz inibidores do processamento downstream e um pequeno tamanho de partículas não é requerido para sua eficácia (SUN *et al.*, 2002).

Este pré-tratamento apresenta as desvantagens de ser menos eficiente para biomassas contendo altos teores de lignina (por exemplo: madeira macia para papel de jornal), assim como causa a solubilização de somente uma pequena fração de material sólido, particularmente hemicelulose (SUN *et al.*, 2002; TALEBNIA *et al.*, 2010). As vantagens são que é um método simples, apresenta um tempo curto de processamento e o tratamento AFEX é mais efetivo para tratamento de substratos com menor conteúdo de lignina.

Este sistema não libera diretamente quaisquer açúcares, mas permite aos polímeros (hemicelulose e celulose) serem atacados enzimaticamente, quebrando desta forma os açúcares. O processo AFEX requer recuperação eficiente de amônia para ser economicamente atraente. Uma possível abordagem é recuperar a amônia após o pré-tratamento por evaporação.

Os parâmetros mais importantes influenciando o processo AFEX são a carga de amônia, temperatura, alta pressão, teor de umidade da biomassa e tempo de residência (TALEBNIA *et al.*, 2010). Temperaturas moderadas na faixa de 60 a 100 °C são usadas e tempo de residência pode variar desde 5 a 30 minutos, dependendo do grau de saturação da biomassa (TEYMOURI *et al.*, 2003; ALIZADEH *et al.*, 2005; CHUNDAWAT *et al.*, 2007).

3.6.7 Pré-tratamento com radiação de microondas e pré-tratamento por irradiação de feixe de elétrons

Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica em um forno de microondas é também um método praticável, o qual utiliza a alta eficiência de aquecimento de um forno de microondas, sendo de fácil operação (BJERRE *et al.*, 1996). Tratamento por microondas utiliza efeitos térmicos e não-térmicos gerados por microondas em ambientes aquosos. No

método térmico, calor interno é gerado na biomassa através de irradiação por microondas, resultando das vibrações das ligações polares da biomassa e do meio aquoso das vizinhanças. Assim, um ponto de aquecimento é criado dentro do material não-homogêneo. Este recurso particular de aquecimento resulta em um efeito de explosão entre as partículas e melhora a ruptura das estruturas recalcitrantes do material lignocelulósico (HU *et al.*, 2008). O pré-tratamento térmico proporciona um ambiente ácido para autohidrólise através da liberação de ácido acético a partir do material lignocelulósico.

No método não-térmico, fazendo-se uso do método da irradiação por feixe de elétrons, ligações polares vibram, de modo que estão alinhadas com o campo magnético que muda constantemente e o rompimento das ligações polares aceleram processos químicos, físicos e biológicos (SRIDAR *et al.*, 1998). A alta irradiação resulta em mais modificações na biomassa celulósica, incluindo o aumento da área superficial, reduções no grau de polimerização e cristalinidade da celulose, hidrólise da hemicelulose e parcial despolimerização da lignina. Ooshima *et al.* (1984) relatou um aumento na produção de açúcares redutores totais por um fator de 1,6 a 3,2 através da irradiação por microondas em palha de arroz e bagaço, respectivamente.

3.6.8 Explosão por CO₂ supercrítico (SC-CO₂)

Tratamento por CO₂ supercrítico é um método que utiliza fluido supercrítico, ou seja, um material que existe a uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, onde gás e líquido já não podem se distinguir.

Fluidos supercríticos podem ser utilizados para romper a estrutura cristalina de materiais lignocelulósicos e remover, eficientemente, a lignina, aumentando a digestibilidade da celulose (MCHARDY *et al.*, 1998). Entre eles, CO₂ supercrítico mostra grande potencialidade para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

Zheng *et al.* (1995) foram os primeiros que utilizaram explosão por CO₂ como método de pré-tratamento para materiais celulósicos comerciais (Avicel) e eles utilizaram este método novamente em 1998 para tratar papel reciclado e bagaço de cana-de-açúcar. Eles mostraram rendimentos de até 75% melhores em glicose comparados com biomassa não-tratada (ZHENG *et al.*, 1998).

Outro fator que deve ser levado em conta é que a energia demandada para levar o CO₂ ao seu ponto supercrítico é menor em relação a outros solventes, isso porque a sua temperatura crítica é 31 °C e a pressão é de 73,8 bar (SHELDON *et al.*, 2005). Moléculas de CO₂ são capazes de penetrar nos pequenos poros de materiais lignocelulósicos, assim como também são capazes água e amônia; então, explosão por CO₂ supercrítico é um processo basicamente igual ao AFEX ou explosão a vapor. Mas, em contraste com explosão a vapor, explosão por SC-CO₂ resulta em rendimentos em açúcares redutores menores e não causa degradação de açúcares devido à baixa temperatura do processo e não produz inibidores; enquanto, em comparação com AFEX, ele apresenta um custo menor (ZHENG *et al.*, 1995).

A explosão por CO₂ facilita a alteração da estrutura da biomassa, diminuindo o grau de cristalinidade e aumentando a permeabilidade, a acessibilidade e a área superficial da celulose (ZHENG *et al.*, 1998). Isto resulta em maiores quantidades de açúcares redutores após a hidrólise enzimática, diferentemente do que seria obtido de uma biomassa não pré-tratada. Parâmetros que influenciam a explosão por SC-CO₂ são temperatura, pressão, tempo de tratamento, teor de umidade e relação CO₂/biomassa (CAPOLUPO *et al.*, 2016). Outra tecnologia interessante é a adição de co-solventes, tais como etanol-água ou ácido acético-água.

Este processo pode melhorar a deslignificação por diversas razões: o CO₂ aumenta a capacidade do etanol de dissolver a lignina; dissolução de CO₂ na água causa a formação de ácido carbônico, que aumenta a taxa da reação de hidrólise enzimática; e a água é um solvente polar que pode quebrar as ligações entre hemicelulose e lignina (PASQUINI *et al.*, 2005). Todas estas vantagens produzem um pré-tratamento que remove potenciais inibidores da celulase (HUI SHENG *et al.*, 2013). Por outro lado, o processo por SC-CO₂ é muito caro para o desenvolvimento de uma planta de escala industrial por causa do alto custo associado a grande quantidade de CO₂ necessária.

3.6.9 Pré-tratamento com Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos (LI) são denominados "solventes verdes", uma vez que nenhum componente químico tóxico é formado, sendo que 100% dos solventes podem ser recuperados (HEINZE *et al.*, 2005). Portanto, pré-tratamento por LI pode ser considerado como um método verde.

LIs são sais particulares que podem existir na forma líquida a temperaturas abaixo de 100 °C e também a temperatura ambiente, feitos de grandes cátions orgânicos e ânions inorgânicos menores (MARSH *et al.*, 2004). As suas propriedades, as quais são diferentes daqueles de outros solventes orgânicos comuns, podem mudar com a variação do grau de deslocalização de carga aniônica e o comprimento e simetria de constituintes alquílicos dos cátions. Graças a algumas propriedades, tais como baixa toxicidade, baixa hidrofobicidade, alta viscosidade, baixa pressão de vapor, estabilidade térmica, elevada estabilidade eletroquímica e propriedades de não-flamabilidade, o seu uso tem baixa absorção de energia e potencial baixo impacto ambiental (CAPOLUPO *et al.*, 2016).

Muitos tipos de LIs têm sido utilizados, mas os LIs baseados em imidazolium tem recebido maior parte das atenções. Entretanto, recentemente, LIs contendo cátions cholinium e aminoácidos, conhecidos como líquidos biônicos, demonstraram eficiência para pré-tratar diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, removendo a lignina. Estes LIs são considerados solventes verdes e mais econômicos do que os baseados em imidazolium porque eles derivam de materiais naturais e renováveis (LIU *et al.*, 2012; HOU *et al.*, 2012).

Sun *et al.*, (2011) descobriu que a fonte de celulose, cátions, ânions, temperatura e tempo empregados neste método são os principais fatores que afetam a dissolução da biomassa. Por exemplo, a celulose pode ser dissolvida eficientemente em LI contendo ânions tais como cloro, acetato ou aminoácidos, porque estes ânions formam ligações de hidrogênio fortes com prótons hidroxila de açúcares (ZHAO *et al.*, 2009a; ZAVREL *et al.*, 2009).

Por outro lado, as interações π - π dos cátions com a lignina ajudam na solubilização da lignina (SHILL *et al.*, 2011). Como resultado, a degradação da rede complexa de interações entre celulose, hemicelulose e lignina é observada com menor grau de degradação dos produtos. A celulose, recuperada com anti-solventes, tais como etanol, acetona ou água, parece ter o mesmo número de resíduos glicosídicos (conhecidos como grau de polimerização) que a celulose não-tratada, mas com cristalinidade reduzida e porosidade aumentada. Como resultado, se torna mais suscetível a degradação pela celulase com maior rendimento de glicose (ZHU *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2012).

3.6.10 Comparativo entre os diferentes tipos de pré-tratamentos

As diferentes alternativas de pré-tratamentos acima apresentadas encontram-se resumidas e, para cada tipo, foram levantadas diferentes pontos, sendo apresentados na Tabela 1 as vantagens e desvantagens de cada tipo de pré-tratamento.

Tabela 1- Vantagens e desvantagens de cada tipo de pré-tratamento

Pré-tratamento	Vantagens			Desvantagens		
	Boa recuperação de açúcares	Sem uso de catalisador ou solvente	Baixa formação de inibidores	Baixo rendimento de açúcares	Faz uso de catalisador ou solvente	Forma inibidores
Explosão a vapor	✓	✓				✓
LHW	✓	✓	✓			
AFEX	✓		✓		✓	
SC-CO ₂			✓	✓	✓	
Organo-solv	✓		✓		✓	
LI	✓		✓		✓	
H ⁺	✓				✓	✓
OH ⁻			✓	✓	✓	
Micro-ondas	✓		✓		✓	

3.7 Hidrólise enzimática

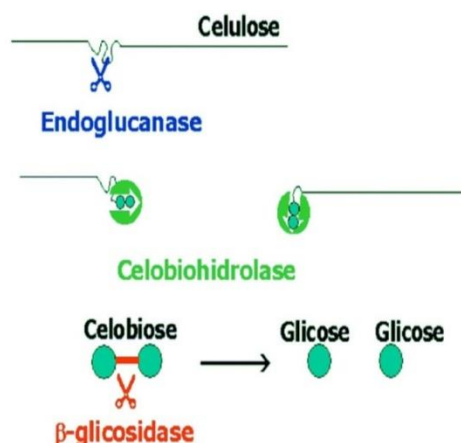
Após a biomassa lignocelulósica passar por um pré-tratamento, o material pode ser submetido à hidrólise enzimática, tipo de processamento esse que transforma os carboidratos presentes na biomassa em açúcares redutores, sendo que as enzimas utilizadas fazem parte de um mistura de diferentes tipos de enzimas, principalmente quando se faz referência ao complexo blend de celulases. O mecanismo de ação de cada enzima está ilustrado na Figura 7.

As enzimas que compõem o blend são: exo-celobiohidrolase ou celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91, 1,4- β -D-glicano-celobiohidrolase), endo-1,4- β -D-glicanase (EC 3.2.1.4, 1,4- β -D-glicano-glicanohidrolase) e a β -glicosidase ou β -D-glicosideglico-hidrolase (EC 3.2.1.21, β -D-glicoside, glicohidrolase) (WOOD *et al.*, 1988; OGEDA *et al.*, 2010).

As enzimas endo-1,4- β -D-glicanase ou endoglucanases quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose, criando novos terminais. Enquanto isso, as enzimas exo-1,4- β -D-glicanases ou celobiohidrolases são responsáveis pela ação nos terminais, levando à celobiose. Finalmente, as enzimas 1,4- β -D-glicosidases hidrolisam a celobiose a glicose (OGEDA *et al.*, 2010).

Sistemas celulase que contenham baixos níveis de β -glicosidases tem baixo poder sacarificante devido a inibição de endoglicanase e celobiohidrolase por parte da celobiose. β -glicosidases hidrolisam celooligossacarídeos a uma taxa decrescente conforme aumenta o grau de polimerização, mas a celulose em si não é atacada. Algumas β -glicosidases podem hidrolisar aril- β -glicosídios, mas não a celobiose. Outras características são de que elas não são específicas para as ligações β -(1,4) e elas possuem atividades de transferases que atuam nas unidades de glicose para formar outras moléculas de açúcar, tais como dímeros, trímeros e maiores oligossacarídeos (WOOD *et al.*, 1988).

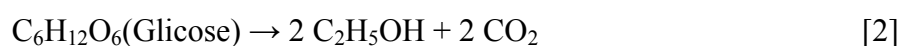
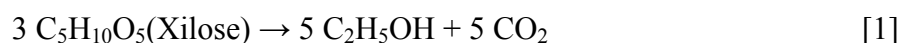
Figura 7 - Representação da ação catalítica do complexo celulase sobre a celulose



Fonte: (adaptado de TEBEKA *et al.*, 2009)

3.8 Estratégias para produção de etanol de biomassa

Uma grande quantidade de microorganismos, geralmente bactérias, leveduras ou fungos, fermentam os carboidratos em bioetanol sob condições livres de oxigênio. Assim, eles podem obter energia e crescer. De acordo com as reações, a produção teórica máxima é 0,51 kg de bioetanol e 0,49 kg de dióxido de carbono por kg de xilose e glicose (LORA *et al.*, 2012).



Métodos para a fermentação de hexoses já são bem conhecidos; por esta razão, a conversão de pentoses tornou-se de muito interesse nos últimos tempos. Estas representam uma alta porcentagem dos açúcares disponíveis; portanto, a habilidade de recuperá-los e fermentá-los em bioetanol é muito importante para maior eficiência e melhor economia do processo (LORA *et al.*, 2012).

Uma das leveduras mais eficientes para a produção de bioetanol, a *Saccharomyces cerevisiae*, tem muitas vantagens referentes à alta produção de bioetanol a partir de hexoses e à alta tolerância ao bioetanol. Porém, não pode ser utilizada para a fermentação de

pentoses (BALAT *et al.*, 2008). Os microrganismos para a fermentação de bioetanol podem ser descritos em termos de seus parâmetros de desempenho, sendo os principais parâmetros: faixa de temperatura, faixa de pH, tolerância ao álcool, taxa de crescimento, produtividade, tolerância osmótica, estabilidade genética e tolerância aos inibidores (BALAT *et al.*, 2008). Diferentes modos de conduzir o processamento da biomassa, de modo a obter, primeiramente, açúcares redutores, para em seguida fermentá-los, são descritos nos itens a seguir.

3.8.1 Hidrólise e fermentação em separado (SHF)

Esta é a concepção tradicional, na qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da matéria-prima, é anterior ao da fermentação. Nesse processo, conhecido por SHF - *Separated Hydrolysis and Fermentation* - pode ocorrer a inibição parcial das celulasas pelo acúmulo de celobiose, dependendo da formulação das enzimas utilizada (ELBA *et al.*, 2008).

3.8.2 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Nesse caso, a hidrólise enzimática de celulose e a fermentação ocorrem simultaneamente. O consumo simultâneo pelo microorganismo dos açúcares resultantes da hidrólise enzimática desloca o equilíbrio da reação de hidrólise, evitando a inibição das enzimas do complexo celulolítico. Entretanto, se por um lado, esse processo oferece a vantagem de se minimizar os problemas inibitórios, por outro, as condições operacionais ideais para a hidrólise enzimática não são necessariamente as mesmas da fermentação. Esforços têm sido feitos no sentido da obtenção de enzimas que atuem em temperaturas e valores de pH próximos àqueles empregados na fermentação alcoólica. A fração hemicelulósica é hidrolisada e fermentada em etapa separada. Esse processo é conhecido por SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (ELBA *et al.*, 2008).

3.8.3 Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF)

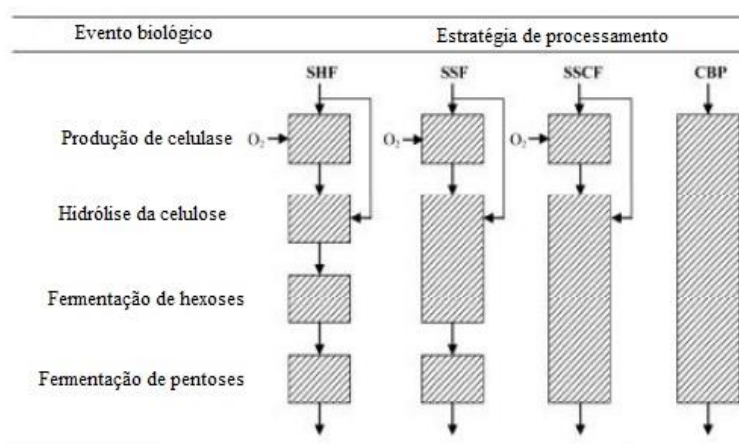
Esse processo adiciona ao processo SSF o hidrolisado de hemicelulose (corrente líquida rica em pentoses), utilizando um microorganismo recombinante capaz de fermentar pentoses e hexoses. A maior vantagem desta estratégia reside no fato de apenas um reator ser utilizado para a produção de etanol. A fração hemicelulósica é hidrolisada em etapa separada. Este processo é conhecido por SSCF (*Simultaneous Saccharification and co-fermentation*) (ELBA *et al.*, 2008).

3.8.4 Bioprocesso consolidado (CBP)

É o processo de concepção mais integrada e que também apresenta os maiores desafios, necessitando de grandes avanços em engenharia genética. Nesse processo são produzidos no mesmo reator todas as celulases e xilanases necessárias à hidrólise da biomassa, simultaneamente à fermentação de glicose e pentose por um único microorganismo recombinante. Esse processo é conhecido por CBP (*Consolidated Bioprocess*) (ELBA *et al.*, 2008).

A Figura 8 apresenta um esquema das estratégias de processamento das biomassas lignocelulósicas.

Figura 8 - Estratégias de processamento de biomassa lignocelulósica



Fonte: (ZHENG *et al.*, 2009 - Adaptado)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma do processo experimental

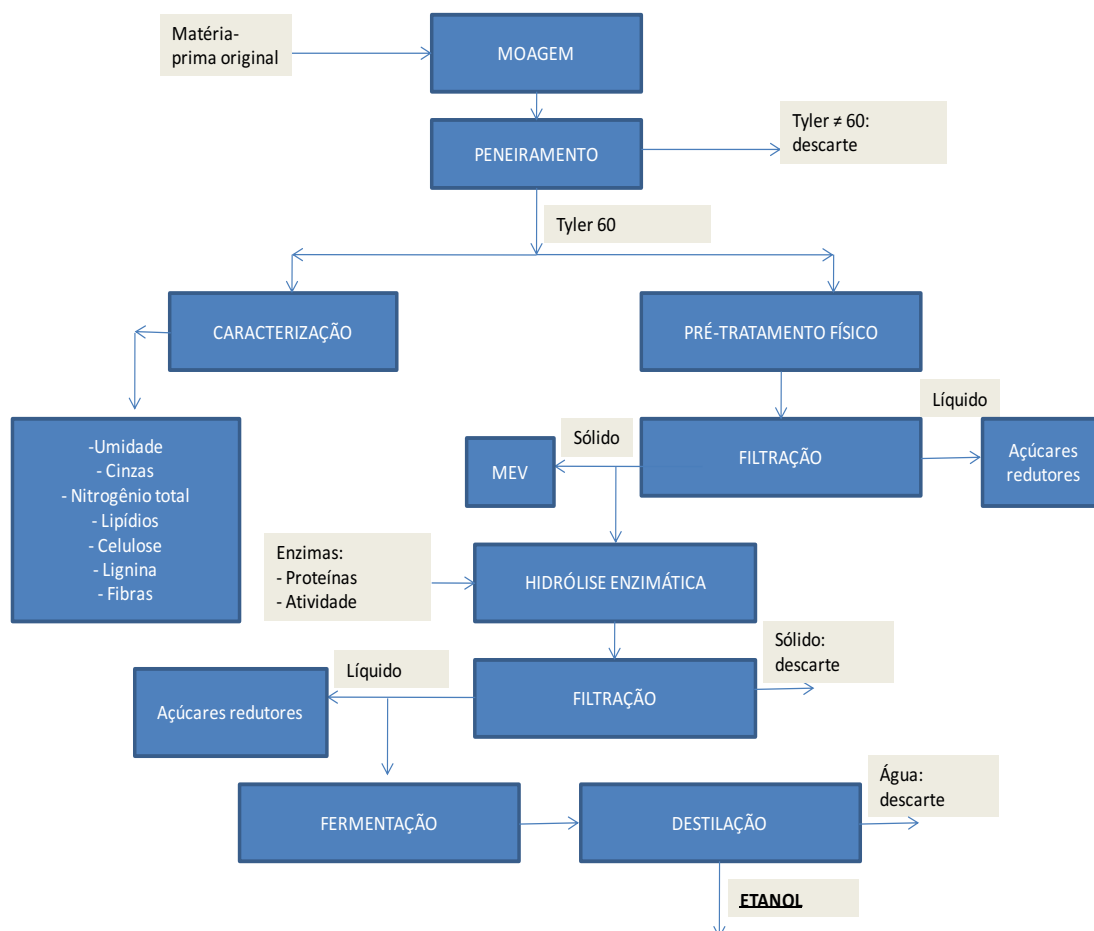
O processo teve seu início com a moagem da matéria-prima em moinho de facas. Em seguida, o material foi reservado e encaminhado para peneiramento, em cuja etapa se determinou que a fração passante em Tyler 28 e retida em Tyler 60 seria a fração utilizada no processamento geral e caracterização da matéria-prima, sendo que a fração retida em Tyler 60 foi a obtida em maior quantidade após peneiramento.

Passando pelo pré-tratamento físico hidrotérmico (alta temperatura e alta pressão), o material esteve após este tratamento mais propício à produção de açúcares redutores. Seguiu uma etapa de filtração, onde o primeiro filtrado foi reservado e foi analisado o teor de açúcares redutores presentes; o material sólido foi lavado com metanol, hidróxido de sódio 1% e água a 60 °C, sendo o sólido resultante da filtração reservado e seco para posterior etapa de hidrólise enzimática, enquanto a fração líquida da lavagem foi descartada.

Antes de se proceder ao ataque enzimático à palha de arroz pré-tratada, foi feita uma análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) comparando o estado da palha antes do pré-tratamento e depois de tal processo, assim determinando qualitativamente se o pré-tratamento foi eficaz na quebra da biomassa lignocelulósica; ainda antes da hidrólise enzimática, foi feita caracterização do coquetel de enzimas, onde se determinou o teor de proteínas e a atividade enzimática.

Após os pré-tratamentos, foi realizada a hidrólise enzimática, separando a fração sólida da líquida por filtração. A fração sólida foi levada para a obtenção de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A fração líquida serviu de base para a continuidade do projeto.

Figura 9 - Fluxograma operacional do desenvolvimento do processo



4.2 Matéria-prima

A palha de arroz, da cultivar BRS AG da safra de 2016, foi cedida pela Embrapa Terras Baixas, Pelotas, RS, acondicionada em embalagens de papel e estocadas em amparo da luz e temperatura ambiente no laboratório.

4.3 Caracterização Física da matéria-prima

4.3.1 Moagem e peneiramento

A “palha de arroz” foi moída em moinho de facas marca Wiley Mill. Em uma etapa subsequente, a palha foi peneirada em um agitador de peneiras marca Solotest, de onde foi aproveitada a fração passante em peneira Tyler 28 e retida em peneira Tyler 60. Esta fração foi obtida em maior quantidade, sendo portanto a fração escolhida.

4.3.2 Densidade da palha

Pelo método da proveta determinou-se a massa específica da palha de arroz em estudo. A palha de arroz foi compactada, dentro de uma proveta de 25 mL, fazendo uso de um bastão de vidro para compactação do material.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da Zona Sul (CEME-SUL). A amostra foi seca durante 8h em estufa a 105 °C. No dia da varredura, foi recoberta com ouro por meio do equipamento Dentum Vacuum DESK V, corrente de 19 mA e tempo de 120 s. As imagens foram obtidas com uso do Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JSM - 6610LV, com microsonda de EDS.

4.4 Caracterização proximal da “palha de arroz”

4.4.1 Determinação do teor de umidade

Foi utilizado o método 012/IV-Instituto Adolfo Lutz, 2008.

4.4.2 Determinação do teor de cinzas

Foi utilizado o método 942.05, AOAC, 1990.

4.4.3 Determinação do teor de lipídios

Foi utilizado o método 032/IV-INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008.

4.4.4 Determinação do teor de nitrogênio total

Foi utilizado o método 037/IV-INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008.

4.5 Determinação do teor de celulose

O teor de celulose foi determinado por método adaptado de (EMBRAPA, método 2.8, 2010): Primeiramente preparou-se amianto como meio de filtração e tarou-se cadinhos de porcelana, incinerando cada cadinho a 550 °C durante 30 minutos. Para a amostra foi pesado aproximadamente 1 g de amostra previamente seca (2 h em estufa a 105 °C), em triplicata e levada à digestão em tubos de ensaio contendo uma solução de ácido acético (72,7%), água destilada (18,2%) e ácido nítrico (9,1%) durante 30 minutos.

Após adição de etanol e resfriamento a temperatura ambiente, a solução foi filtrada, sendo em seguida levada a uma estufa a 105 °C para secagem durante 2 horas.

Após resfriar em dessecador e fazer a pesagem (cadinho + celulose + minerais), a amostra foi incinerada em mufla a 550 °C para obtenção do peso de celulose.

O teor de celulose foi obtido através do cálculo apresentado na equação (1).

$$\%celulose = \frac{m_{GCM} - m_{GM}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

%celulose: teor de celulose total na amostra (%)

m_{GCM} : massa do cadinho de gooch, celulose e minerais - após secagem, antes da incineração(g)

m_{GM} : massa do cadinho de gooch e minerais - após a incineração(g)

$m_{amostra}$: massa de amostra (g)

4.6 Determinação do teor de fibras

O teor de fibras na amostra foi determinada através do método de fibra em detergente ácido, método proposto por (EMBRAPA, método 5.2, 2010). Foi pesado 0,3 g de amostra desengordurada, em triplicata, e a amostra foi levada à digestão ao se misturar com uma solução de 5% de ácido sulfúrico e 10% de brometo de cetiltrimetil amônio a uma temperatura de 120 °C durante 1 hora.

Depois da digestão, a amostra é filtrada em cadinho de vidro, sendo lavada com água quente (90 a 100 °C) e acetona (30 a 40 mL) até que a amostra se torne incolor.

Posteriormente, a amostra é seca em estufa a 105 °C durante 2 horas, sendo posteriormente transferida para dessecador para esfriar até temperatura ambiente, quando será então pesada.

O teor de fibras foi obtido através do cálculo apresentado na equação (2).

$$\%fibras = \frac{m_{AC} - m_C}{m_{amostra}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

%fibras: teor de fibra na amostra (%)

m_{AC} : massa de amostra e do cadinho de gooch(g)

m_C : massa do cadinho de gooch(g)

$m_{amostra}$: massa de amostra (g)

4.7 Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi determinado através do método de lignina em detergente ácido proposto por (EMBRAPA, método 5.3, 2010). A primeira etapa de digestão ocorre de modo semelhante à digestão de fibras.

Após a determinação de fibras, a amostra passou por lavagens sucessivas com ácido sulfúrico 72% para quebrar as fibras secas e restar somente lignina e matéria orgânica. Após lavagens com ácido sulfúrico, o material é lavado com água quente para remoção do ácido utilizado. A amostra é novamente seca, pesada e então é encaminhada para forno mufla (550

°C), onde toda a matéria orgânica remanescente é queimada e o teor de lignina é determinado por diferença.

O teor de lignina foi obtido através do cálculo apresentado na equação (3).

$$\%lignina = \frac{m_{estufa} - m_{mufla}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

%lignina: teor de lignina amostra (%)

m_{estufa} : massa de amostra e do cadinho de gooch após secagem em estufa (g)

m_{mufla} : massa do cadinho de gooch e das cinzas após incineração (g)

$m_{amostra}$: massa de amostra (g)

4.8 Determinação de açúcares redutores na palha antes do pré-tratamento

De modo a determinar o teor total de açúcares redutores na palha de arroz, foi adotado o método proposto por Hoebler *et al.* (1989). Tal método consiste na digestão da amostra em ácido sulfúrico (72% p/p) durante uma hora. Em seguida, o material recebe uma quantidade de água e é submetido a aquecimento em banho-maria fervente durante uma hora, para depois ser resfriado e adicionar hidróxido de sódio (32% p/v). Após esta neutralização, o teor de açúcares redutores foi determinado através do método colorimétrico de glicose com 3,5-DNS descrito por Miller *et al.* (1959).

4.9 Determinação do teor de açúcares redutores pelo método do 3,5-DNS

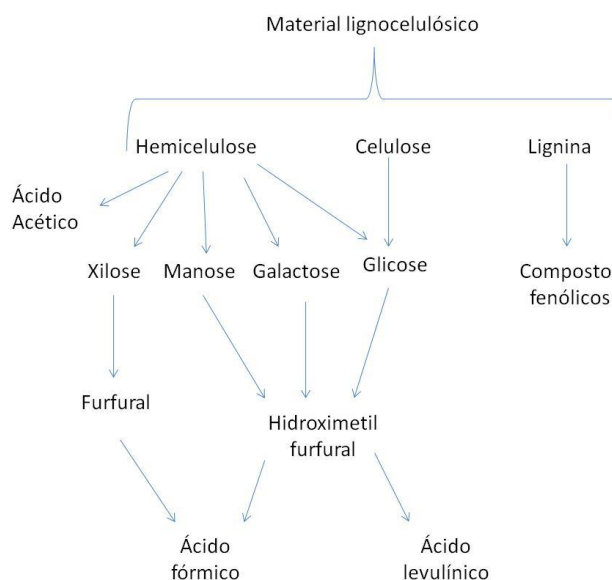
Segundo método descrito por Miller *et al.* (1959), portanto, foi determinado o teor de açúcares redutores (AR), tanto no produto do tratamento hidrotérmico quanto no hidrolisado da palha de arroz.

4.10 Determinação de inibidores enzimáticos

As análises e quantificações dos produtos de degradação dos açúcares foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba modelo LC-20AD, forno modelo CTO-20A, detector UV SPD-20A, coluna cromatográfica modelo CLC-ODS de 25 cm, pré-coluna modelo G-ODS e injetor automático modelo SIL-20A, todo o kit marca Shimadzu. As determinações foram realizadas a temperatura constante de 40°C para coluna e o detector. A eluição foi realizada no modo isocrático, sendo a fase móvel composta por 90% de água ultrapura e 10% de acetonitrila, com vazão de 1 mL/min. Para os ácidos, as determinações foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm, enquanto que para o HMF e o furfural foi utilizado 284 nm, sendo o tempo total de análise de 13 minutos.

Os inibidores que podem estar presentes devido às condições drásticas de tratamento hidrotérmico (200 °C e 60 minutos) podem ser Furfural, 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico. Na Figura 10 estão ilustrados os componentes principais dos materiais lignocelulósicos e os seus componentes que podem ser originados a partir de processamento.

Figura 10 - Reações que podem ocorrer durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos



Fonte: LORA *et al.* (2012) adaptado

4.11 Análise de fenólicos totais

Sabendo da presença de lignina e compostos aromáticos na palha de arroz, o teor total de fenólicos no líquido remanescente do tratamento hidrotérmico foi determinado pelo método colorimétrico utilizando reagente de Folin-Ciocalteu com adaptações mínimas (Wang *et al.*, 2017). Cinquenta microlitros de amostra foram adicionados a 950 microlitros de água Milli-Q e então 1500 microlitros do reagente de Folin-Ciocalteu foram adicionados no tubo de ensaio. Após 3 minutos, 2000 microlitros de carbonato de sódio (10% p/v) foi adicionado. As amostras foram mantidas no escuro por 4 horas a temperatura ambiente, para então ser lida a absorbância a 765 nm. Ácido gálico foi utilizado como padrão para a curva de calibração.

4.12 Levantamento do perfil cromatográfico de açúcares

A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Para tal foi utilizado um cromatógrafo líquido Prominence (Shimadzu, Japão) equipado por uma bomba modelo LC-20AD, um forno modelo CTO-20A, um detector RID-10A, e um injetor automático modelo SIL-20A, todos da Shimadzu. A coluna cromatográfica utilizada foi a Aminex HPX-87H (Bio-Rad) de 30 cm. As determinações foram realizadas a temperatura constante de 65°C para coluna e 60°C o detector. A eluição foi realizada no modo isocrático, sendo a fase móvel composta por H_2SO_4 5 mmol.L^{-1} , com vazão de 0,6 mL min^{-1} . O tempo total de análise foi de 15 minutos.

4.13 Pré-tratamentos hidrotérmicos da palha de arroz

4.13.1 Pré-tratamento utilizando bomba de teflon

Primeiramente foi medido o volume de capacidade da bomba de teflon, resultando em 43 mL. Por questões de segurança, aproximadamente 2/3 do volume (29 mL) foi utilizado como volume de operação, sendo estimado em 14 mL o volume de cabeça.

Foi calculado qual seria o volume a ser ocupado pela água destilada e pela palha de arroz através das equações (4) e (5). Após adição de água destilada e palha de arroz, a bomba foi fechada e então foi levada a aquecimento em estufa com temperatura controlada.

As variáveis analisadas foram: tempo de tratamento térmico (20 a 60 minutos), temperatura (140 a 200 °C) e relação mássica entre água e palha (14 a 16 g água.g palha⁻¹).

$$Volume_{\text{água}} = 29 \times fração_{\text{água}} \quad (4)$$

$$Massa_{\text{palha}} = (29 - Volume_{\text{água}}) \times \rho_{\text{palha}} \quad (5)$$

Onde:

Volume_{água}: volume a ser ocupado pela água destilada (mL)

fração_{água}: fração de água utilizada (%)

Massa_{palha}: massa de palha de arroz a ser utilizada (g)

ρ_{palha} : 0,1991 (g.mL⁻¹)

Figura 11 - Foto da bomba de teflon utilizada para o pré-tratamento



4.13.2 Planejamento experimental para Tratamento com a Bomba de teflon

Para analisar o efeito da temperatura (X_1), do tempo (X_2), e da relação palha/água (X_3) ao final do pré-tratamento hidrotérmico, um planejamento fatorial 2^3 foi adotado para três variáveis (X_1 , X_2 e X_3), dois níveis (+1 e -1) e adição de um ponto central (0), Tabela 2.

O planejamento experimental foi configurado com oito pontos axiais replicado duas vezes e o ponto central replicado 4 vezes (Tabela 3).

Tabela 2–Variáveis codificadas utilizadas no delineamento 2^3 para tratamento com bomba de teflon

Fatores	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	X_1	140	170	200
Tempo (min)	X_2	20	40	60
Relação água/palha (g.g ⁻¹)	X_3	16	15	14

Tabela 3 - Matriz do planejamento 2^3 para bomba de teflon

Ensaio	Fatores (variáveis independentes)		
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Relação água/palha (g.g ⁻¹)
1	140(-1)	20 (-1)	16 (-1)
2	140(-1)	20 (-1)	14(+1)
3	140 (-1)	60 (+1)	16 (-1)
4	140 (-1)	60 (+1)	14 (+1)
5	200 (+1)	20 (-1)	16 (-1)
6	200 (+1)	20 (-1)	14 (+1)
7	200 (+1)	60 (+1)	16 (-1)
8	200 (+1)	60 (+1)	14 (+1)
9	170 (0)	40 (0)	15 (0)

4.13.3 Pré-tratamento utilizando autoclave

Em um recipiente de 100 mL foram adicionados água destilada e palha de arroz em razão calculada pelas equações (4) e (5), sendo alimentados ao autoclave as mesmas quantidades em relação a bomba de teflon para que se pudesse traçar um paralelo comparativo entre os dois processamentos. O aquecimento se deu em banho de areia a 180 °C, fazendo-se uso de chapa aquecedora IKA C-MAG HS 7. As variáveis analisadas foram pressão (2 a 7 kgf/cm²), tempo de processamento (40 minutos) e relação de alimentação entre água e palha (15 g água.g palha⁻¹). As condições do processo estão expressas na Tabela 4 e podem ser comparadas com Hidenó *et al.* (2012).

Tabela 4 - Condições de processamento em autoclave

Ensaio	Pressão (kgf.cm⁻²)	Tempo (min)	Relação líquido/sólido (g.g⁻¹)
1	2	40	15
2	3	40	15
3	5	40	15
4	7	40	15

Figura 12- Autoclave utilizado nos testes



4.14 Hidrólise enzimática da palha de arroz cultivar "BRS AG"

4.14.1 Determinação da atividade enzimática (Atividade da enzima ou teste FPU)

A enzima utilizada foi CellicCTec2 cedido pela empresa Novozymes (Araucária, PR, Brasil). A atividade foi determinada pelo método proposto por Adney et al. (1996). Este teste mede a atividade celulolítica em termos de unidades de papel filtro por mililitro de solução enzimática original. O teste utilizado para determinar a atividade foi o teste da fita de papel filtro Whatman No. 1, sendo que a quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do 3,5-DNS (MILLER *et al.*, 1959).

Uma tira de papel filtro Whatman No. 1 equivalente a 50 mg foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução tampão citrato pH 4,8, 50 mM e 0,5 mL de extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 50 °C durante 60 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 1 mL de 3,5-DNS. Os tubos foram fervidos a 100 °C, em banho-maria fervente, durante 5 minutos. A seguir foram adicionados 8 mL de água destilada e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. A curva-padrão foi construída com glicose (Synth), com concentração de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 µmol.

A concentração da enzima foi estimada para exatamente 2 mg de glicose liberada durante a reação enzimática (definição de *Filter Paper Unit* - FPU), através da equação da reta entre as concentrações de glicose após cada reação e os logaritmos das respectivas diluições da enzima.

Algumas variáveis da hidrólise enzimática foram fixados, tais como temperatura (50 °C) e pH (4,8 - solução tampão citrato) conforme Adney *et al.* (1996), enquanto os parâmetros que foram utilizados como variáveis foram tabelados a seguir.

Tabela 5 - Valores utilizados no delineamento fatorial completo 2³ para hidrólise enzimática

Fatores	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Tempo (h)	Y ₁	24	48	72
Relação sólido/líquido (%p/v)	Y ₂	0,625	1,25	2,50
Carga de enzima (FPU.g ⁻¹)	Y ₃	16,5	33	66

4.14.2 Planejamento experimental da hidrólise enzimática

Com o objetivo de avaliar a influência das variáveis estudadas na hidrólise enzimática, foi utilizado um planejamento 2³ completo, em duplicata, com 4 repetições no ponto central, sendo analisada posteriormente se o modelo obtido é significativo e preditivo através da Análise de Variância (ANOVA), em termos de produção de açúcares redutores.

Foi também realizado o teste de Tukey para informar se as médias obtidas para as diferentes condições operacionais eram estatisticamente diferentes ou não em um nível de significância de 5%.

Os níveis utilizados no planejamento fatorial basearam-se nos estudos de Mendes (2010), Oliveira (2012) e Santos *et al.* (2014).

Tabela 6 - Planejamento experimental 2³ para hidrólise enzimática de palha de arroz BRS AG após pré-tratamento

Ensaio	Fatores (variáveis independentes)		
	Tempo (h)	Relação sólido/líquido (%p/v)	Carga de enzima (FPU/g)
1	24 (-1)	0,625 (-1)	16,5 (-1)
2	24 (-1)	0,625 (-1)	66 (+1)
3	24 (-1)	2,5 (+1)	16,5 (-1)
4	24 (-1)	2,5 (+1)	66 (+1)
5	72 (+1)	0,625 (-1)	16,5 (-1)
6	72 (+1)	0,625 (-1)	66 (+1)
7	72 (+1)	2,5 (+1)	16,5 (-1)
8	72 (+1)	2,5 (+1)	66 (+1)
9	48 (0)	1,25 (0)	33 (0)

4.15 Teste de Fermentação

O teste para fermentação foi realizado conforme proposto por Santos *et al.* (2009) e por Farias (2015). Uma alíquota 16,2 mL do hidrolisado enzimático foi transferida a um erlenmeyer de 50 mL, adicionou-se água destilada para completar volume de 18 mL, logo se adicionou uma alíquota 0,72 mL de solução salina descrita na Tabela 7. A seguir uma suspensão 8 g.L⁻¹ de levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial Fleischmann foi adicionada 0,144 g, sendo também adicionados Uréia (1,25 g.L⁻¹) e KH₂PO₄ (1,1 g.L⁻¹).

Tabela 7 - Composição da solução salina

Sal	Concentração (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
Ácido Cítrico	12,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,9
CuSO ₄ .5H 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

Os erlenmeyers foram colocados em shaker orbital, sendo incubados a 37 °C, agitação de 150 rpm por 24 horas. Após reação, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, procedendo teste colorimétrico.

4.16 Teste qualitativo para etanol

De modo a se detectar a presença de etanol a partir do hidrolisado, foi utilizado o teste proposto por Salik *et al.* (1993). O teste consiste na reação de redução do íon Cr⁶⁺ para Cr³⁺, oxidando o etanol a ácido acético.



A redução do cromo e oxidação do etanol em ácido acético implica na mudança de cor da solução de dicromato de laranja para verde.

Para o teste colorimétrico, foi preparada uma solução contendo 8,4 g de dicromato de potássio, 80 mL de ácido sulfúrico concentrado (18 mol.L⁻¹) e 200 mL de água destilada. A

cada tubo de ensaio foram transferidos 5 mL de solução contendo analito (etanol), 2 mL de água destilada e 2 mL da solução de dicromato de potássio. Os tubos foram colocados em banho-maria com temperatura controlada (60 °C, 30 minutos), sendo que posteriormente os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e se observou a mudança de cor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Densidade da palha de arroz

Uma vez que o valor da densidade da palha de arroz do presente trabalho é de $0,1991 \text{ g.mL}^{-1}$ isto significa dizer que a palha é muito leve, ocupa muito espaço com pouca massa. Em algumas referências, observou-se a densidade de $0,18 \text{ g.mL}^{-1}$ (KARGBO *et al.*, 2010) e $0,19 \text{ g.mL}^{-1}$ (ZHANG *et al.*, 2012).

Comparando o valor observado com os obtidos em referências externas, pôde-se constatar que a densidade da palha de arroz do presente trabalho encontra-se próxima dos valores de outros trabalhos.

5.2 Caracterização da palha de arroz

As características químicas da palha de arroz moída e obtida da etapa de peneiramento estão na tabela 8.

Os valores encontrados estão de acordo com os valores de Vaz Júnior (2015). Segundo Rambo *et al.* (1997) a composição específica da palha de arroz depende da cultivar, do tipo de solo e do clima da região de cultivo.

Tabela 8 - Composição química da palha de arroz moída

Parâmetro	%
Umidade	7,67 ± (0,15)
Nitrogênio total	1,18 ± (0,00)
Lipídios	5,90 ± (0,30)
Cinzas	14,52 ± (0,14)
Carboidrato total	71,92 ± (0,34)
Celulose	36,15 ± (2,48)
Fibras	44,35 ± (1,06)
Lignina	7,85 ± (1,20)
Hemicelulose	27,92 ± (0,57)

Tabela 9 - Comparativo da composição da palha de arroz de diferentes origens

Componente/ Referência	Presente trabalho	Jin 2007	Karimi 2006	Figueiró 2011	Sindhu 2012	Garay 2009	Média [demais trabalhos] ± (desvio padrão)
Celulose	36,15 ± (2,48)	33,9	39	32,7	34,12	46	37,1 ± (5,5)
Hemicelulose	27,92 ± (0,57)	25,6	27	35,5	28,45	25,5	28,4 ± (4,1)
Lignina	7,85 ± (1,20)	10,2	12	4,5	18,12	14	11,7 ± (5,0)
Cinzas	14,52 ± (0,14)	11,8	11	10,7	7,45	17,5	11,6 ± (3,7)
Origem	Brasil/RS	China	Irã	Brasil/SP	Índia	Chile	

Na Tabela 9 foi feito um comparativo da composição da palha de arroz do presente trabalho com outras referências que utilizaram outras cultivares. Conforme observado, os valores médios de celulose e hemicelulose estão bastante próximos em relação aos valores médios observados em outros trabalhos. As médias dos valores de cinzas e de lignina, apesar de apresentarem médias um pouco afastadas das médias apresentadas em outros trabalhos, ainda estão dentro da faixa que abrangem os desvios padrão.

Na tabela 10 foi feita uma análise comparativa de magnitude dos valores de composição de biomassa lignocelulósica da palha de arroz do presente trabalho com outras biomassas lignocelulósicas. Apesar da cana-de-açúcar não ser um cereal, como no caso do arroz, milho, trigo e sorgo, cabe comparar os resíduos dessas matérias-primas, que são todos abundantes no Brasil.

Conforme observado na tabela 10, os valores de celulose variam dentro de uma faixa de 8,5% (desde 31,7 até 40,2%, sendo 36,15% da palha de arroz), enquanto a hemicelulose não difere mais do que 18% (desde 26,4 até 44,0%, sendo 27,92% apresentado pela palha de arroz) entre os diversos materiais lignocelulósicos.

O presente trabalho se diferencia no teor de lignina, que está mais do que 10% abaixo do apresentado nas demais matrizes (7,85% contra 20% da palha de sorgo, teor mais baixo de lignina referenciado).

Tabela 10 - Comparativo da composição de diferentes biomassas lignocelulósicas

Componente/Biomassa	Palha de arroz (Presente trabalho)	Sabugo de Milho	Bagaço de cana	Palha de trigo	Palha de sorgo
Celulose	36,15	31,7	40,2	33,8	34,0
Hemicelulose	27,92	34,7	26,4	31,8	44,0
Lignina	7,85	20,3	25,2	20,1	20,0

Fonte: Vaz Júnior (2015)

5.3 Determinação do teor de açúcares redutores totais presentes na amostra antes do processamento

O teor de açúcares redutores totais encontrado foi de 46,57%, ou seja, para cada 1 kg de palha, se tem 465,7 g de AR. Foram aplicadas condições experimentais conforme Hoebler et al. (1989), sendo que nesta referência foram encontrados teores de AR em (i) palha de trigo entre 50 e 70%, (ii) casca de soja entre 55 e 65%, (iii) polpa de beterraba entre 45 e 65%, e (iv) casca de girassol entre 40 e 50%.

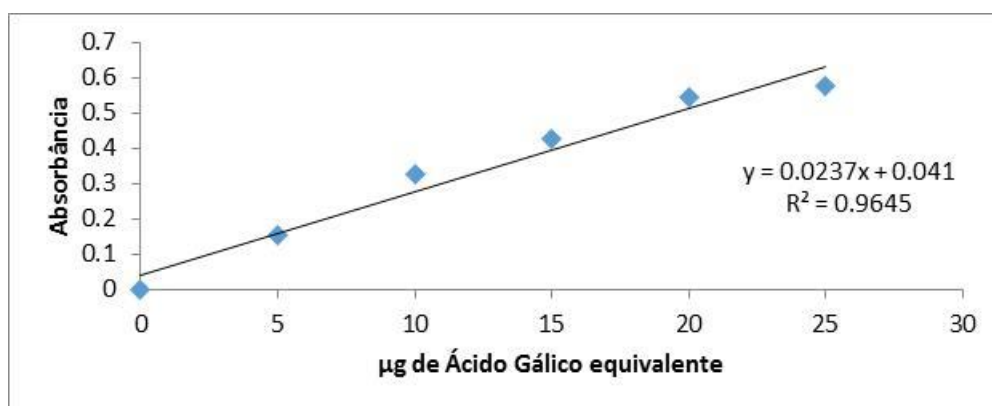
Diante dos valores de AR observados, pode-se constatar que os teores de AR presentes inicialmente na palha de arroz estão, em boa parte, dentro das faixas apresentadas por outras biomassas lignocelulósicas. Vale ressaltar que não foram encontrados valores de AR de palhas de arroz de outras cultivares para comparação no período de desenvolvimento do presente estudo.

5.4 Fenólicos totais

Em um volume amostral de 50 μL , o total de fenólicos encontrado foi de 402 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Foi constatado em Santos *et al.* (2009) que a produção de biomassa é afetada somente quando a presença de fenólicos é superior a 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os resultados encontrados permitem dizer que o processo de tratamento hidrotérmico proposto não produz compostos fenólicos em quantidades que venham a inibir os processos de hidrólise enzimática e fermentação.

A curva-padrão de Ácido Gálico obtida está ilustrada na Figura 13, com absorvâncias lidas em 765 nm.

Figura 13 - Curva-padrão de Ácido Gálico equivalente



5.5 Teores de inibidores enzimáticos

Depois de realizadas as análises por HPLC para determinar os teores de inibidores, foi notada a presença de apenas de furfural e 5-HMF nas seguintes quantidades, em média, nas amostras de líquido remanescente do tratamento hidrotérmico, conforme apresentado na tabela 11.

Tabela 11 - Análise de inibidores por HPLC

Concentrações de inibidores (mg.L⁻¹)				
Ácido Acético	Ácido Fórmico	Ácido Levulínico	Furfural	5-HMF
Não detectado	Não detectado	Não detectado	0,580 ± (0,090)	1,322 ± (0,522)

De acordo com Weil *et al.* (2002) o teor de furfural que inibe a fermentação é da ordem de 0,1% ou 1 g.L⁻¹, o que representa mais de 1000 vezes acima do teor encontrado na amostra analisada.

Quanto aos teores de 5-HMF, segundo Sanchez *et al.* (1988) a inibição de crescimento da levedura *Saccharomyces sp.* ocorre quando se atinge o limite de 1,5 g.L⁻¹. Segundo Larsson *et al.* (1999) em concentrações de aproximadamente 6,3 g.L⁻¹ a produção de etanol não é prejudicada. Portanto, os teores de 5-HMF encontrados estão bastante abaixo dos teores que causariam inibição dos meios fermentativos.

Os teores de furfural e 5-HMF encontrados podem significar que o tratamento hidrotérmico pode degradar os açúcares dos quais resulta o 5-HMF (a partir de manose, galactose e glicose) e do qual pode resultar furfural (xilose) - vide Figura 10. Porém, em ambos os casos, a degradação é pequena, formando ambos os inibidores em quantidades na ordem de mil vezes inferiores aos teores que viriam a inibir a fermentação.

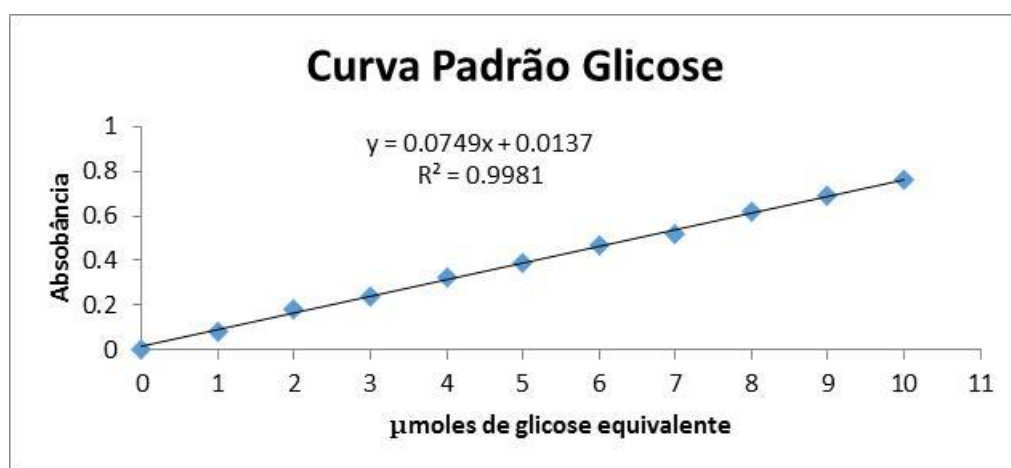
Cabe ressaltar que também foram analisadas amostras de material após hidrólise enzimática, sendo que nestas não foram detectados os inibidores citados na Tabela 11.

No Anexo I estão os cromatogramas relativos às análises de inibidores por HPLC.

5.6 Determinação de Açúcares Redutores

O teor de açúcares redutores foram determinados segundo a curva de calibração apresentada na Figura 14, com absorbâncias lidas a 540 nm. O padrão utilizado para a construção da curva foi Glicose (Synth), variando a sua concentração desde 0 até 10 μmol .

Figura 14 - Curva-padrão de Glicose equivalente



5.7 Pré-tratamento hidrotérmico da palha de arroz

5.7.1 Pré-tratamento utilizando bomba de teflon

Na tabela 12 tem-se o delineamento dos experimentos com as condições empregadas e os resultados experimentais para as médias do açúcar redutor resultante do tratamento hidrotérmico.

Os ensaios 7 e 8, com AR 1,71 e 1,75 g.L^{-1} , respectivamente, foram significativamente superiores aos demais ensaios. Ambos a 200 °C e 60 minutos, mas o ensaio 7 com uma relação de alimentação palha/água de 16 g.g^{-1} . Tal fato deixa claro que a relação palha/água não tem influência no AR.

Tabela 12 - Açúcares redutores obtidos da cultivar BRS AG após execução do planejamento experimental para o tratamento hidrotérmico

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Relação de alimentação água/palha (g.g⁻¹)	Concentração de açúcares redutores média (g.L⁻¹)
1	140 (-1)	20 (-1)	16 (-1)	0,99 ± 0,17 ^b
2	140 (-1)	20 (-1)	14 (+1)	1,39 ± 0,33 ^b
3	140 (-1)	60 (+1)	16 (-1)	1,30 ± 0,01 ^b
4	140 (-1)	60 (+1)	14 (+1)	1,34 ± 0,11 ^b
5	200 (+1)	20 (-1)	16 (-1)	1,13 ± 0,13 ^b
6	200 (+1)	20 (-1)	14 (+1)	1,29 ± 0,21 ^b
7	200 (+1)	60 (+1)	16 (-1)	1,71 ± 0,05 ^a
8	200 (+1)	60 (+1)	14 (+1)	1,75 ± 0,01 ^a
9	170 (0)	40 (0)	15 (0)	1,29 ± 0,09 ^b

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

Os resultados da tabela 12 não deixam claro se existe interação entre as variáveis temperatura e tempo, porém a estimativa do efeito de cada uma dessas variáveis e interação foi analisado através do teste "t" e sumarizado através da tabela 13.

Segundo Yu *et al.* (2010) é necessário um tratamento hidrotérmico a temperaturas na faixa de 180 a 230 °C para facilitar o acesso das enzimas celulase à celulose cristalina (nesta faixa de temperatura pode também ocorrer mudança de estado da celulose, de mais cristalina para mais amorfa) presente na palha de arroz.

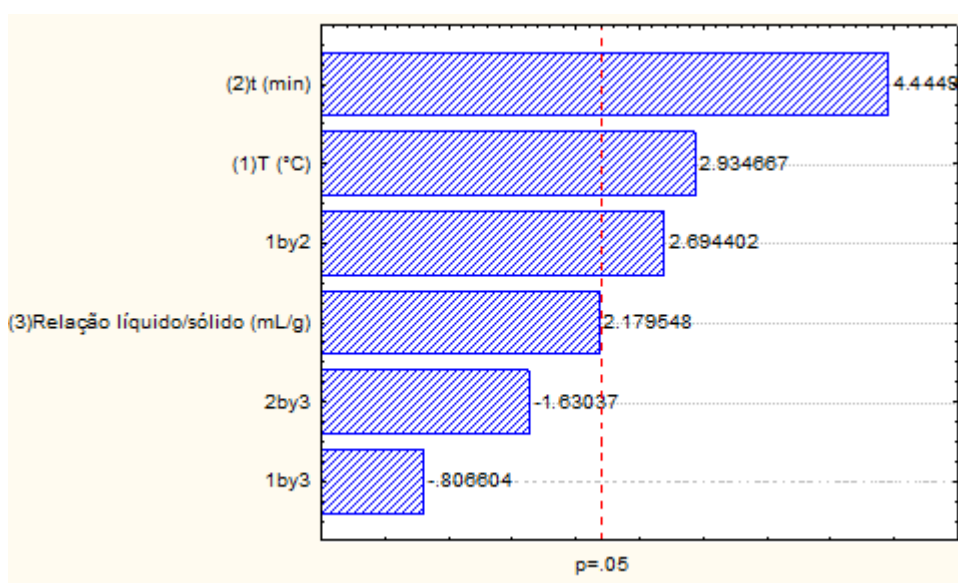
No caso de outras biomassas lignocelulósicas, por exemplo álamo (KIM *et al.*, 2009) o tratamento a temperatura de 200 °C por 10 minutos também facilitou o acesso das enzimas para posterior hidrólise enzimática. De acordo com Garrote *et al.* (1999) o tratamento hidrotérmico (temperaturas de processamento na faixa de 180 a 210°C para diversos resíduos agroindustriais) apresenta como efeitos favoráveis: (i) aumento da área superficial, causado pela deslignificação, degradação da hemicelulose e aumento dos volumes dos

poros, e (ii) mudanças na microestrutura, incluindo redução de cristalinidade e rompimento das fibras.

Nos ensaios onde se obteve uma maior extração de AR foram nos ensaios 7 e 8. Isso provavelmente se deu devido às drásticas condições de processamento (200 °C e 60 minutos de processamento), condições nas quais as fibras celulósicas são atacadas de modo mais efetivo, liberando um teor maior de AR.

Na figura 15 consta o Diagrama de Pareto para o processo de tratamento hidrotérmico.

Figura 15 - Gráfico de Pareto relativo ao tratamento hidrotérmico



Observa-se uma correlação positiva entre o tempo de processamento e a temperatura, significando que se ambos tiverem seus valores acrescidos, maior será a quantidade de AR extraído da palha de arroz e ambos os parâmetros apresentam significância estatística ($p < 0,05$). Os efeitos que estiverem a direita da linha divisória ($p=0,05$) foram considerados na tabela 13.

Tabela 13 - Estimativa dos efeitos para açúcares redutores no planejamento 2³ para o tratamento hidrotérmico

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(13)	p-valor
Média global	1,346	0,032	42,02	0,000
Temperatura (°C)	0,214	0,072	2,984	0,011
Tempo (min)	0,324	0,072	4,520	0,001
Relação sólido/líquido (g.g⁻¹)	0,159	0,072	2,216	0,045
T vs t	0,196	0,072	2,740	0,017

Dentre as três variáveis estudadas, tempo e temperatura apresentam maior influência, sendo que a relação água/palha também foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na concentração de açúcares redutores.

No nível de confiança de 95%, o valor de t correspondente a 13 graus de liberdade é de 2,16. Consideramos estatisticamente significativo um efeito cujo valor absoluto exceder $(0+2,16*0,072) = 0,1555$. Aplicando este critério aos valores da Tabela 14 vemos que os efeitos temperatura e tempo são significativos. Portanto, uma análise comparativa entre os resultados experimentais (Tabela 12) e a estimativa dos efeitos (Tabela 13), pode-se dizer que a elevação de temperatura (combinado) com tempo de processamento aumentaram o rendimento do tratamento hidrotérmico em termos de AR.

Na Tabela 14 encontram-se os coeficientes do modelo de regressão, obtidos a partir da matriz codificada. Abaixo na Equação 6 estão apresentados os termos estatisticamente significativos, com os seus coeficientes.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão para o pré-tratamento hidrotérmico

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(13)	p-valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	1,346	0,032	42,02	0,000	1,277	1,415
Temperatura (°C)	0,107	0,036	2,984	0,011	0,029	0,184
Tempo (min)	0,162	0,036	4,520	0,001	0,084	0,239
Relação sólido/líquido (g.g⁻¹)	0,079	0,036	2,216	0,045	0,002	0,157
T vs t	0,098	0,036	2,740	0,017	0,020	0,175

$$AR = 1,346 + 0,107 X_1 + 0,162 X_2 + 0,098 X_1 X_2 \quad (6)$$

Todos os termos foram utilizados para o cálculo da Análise de Variância apresentada na Tabela 15. O valor de F calculado, 7,529, foi superior ao valor de F tabelado e o coeficiente de correlação (R^2) apresentado pelo modelo foi de 78%. Apesar de o R^2 ter sido afastado de 100% e a relação entre o F calculado e o F tabelado foi inferior a 3, isto significa que os dados estão ligeiramente dispersos, conforme pode ser observado na Figura 14, e que a tendência a linearidade está afastada em alguns pontos.

No tratamento hidrotérmico, no entanto, existe um aumento de extração de açúcares redutores da palha de arroz conforme são aumentados os valores dos fatores analisados.

Figura 16 - Valores observados versus valores preditos para o tratamento hidrotérmico

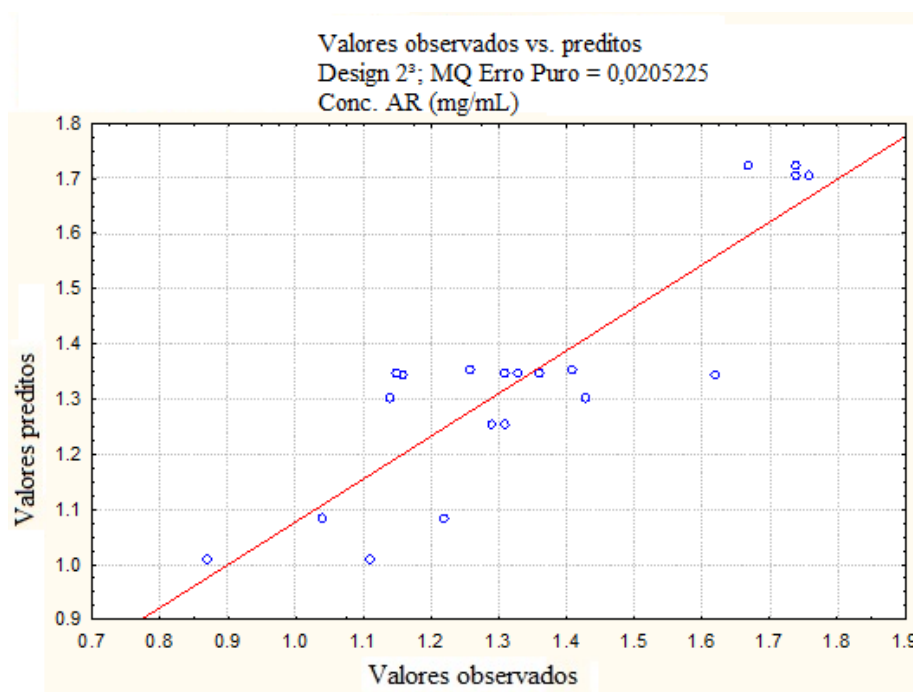


Tabela 15 - Análise de variância para o pré-tratamento hidrotérmico

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	0,927088	6	0,154515	7,52903
Resíduo	0,266793	13	0,020523	
Falta de Ajuste	0,033367	2	0,016684	0,78621
Erro Puro	0,233425	11	0,021220	
Total	1,193880	19		

$$R^2 = 78\% ; F_{13;6;0,05} = 2,92$$

Na Tabela 16 pode-se verificar os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração de AR, os erros de ajuste e o erro relativo para cada ensaio do planejamento para o pré-tratamento hidrotérmico com bomba de teflon.

É possível notar que os desvios, em geral, apontam para valores de AR previstos inferiores aos valores de AR obtidos no laboratório. Mesmo com uma certa tendência ao

desvio a valores inferiores, o modelo predito (equação 6) se mostra bastante fiel aos dados experimentais.

Tabela 16 - Valores de AR experimental, previstos no modelo e erros relativos para o pré-tratamento hidrotérmico

Ensaio	AR experimental médio (g/L)	AR previsto (g/L)	Erro relativo (%)
1	0,99 ± 0,17	1,17	15,4
2	1,39 ± 0,33	1,17	-18,8
3	1,30 ± 0,01	1,30	0,0
4	1,34 ± 0,11	1,30	-2,8
5	1,13 ± 0,13	1,19	5,3
6	1,29 ± 0,21	1,19	-8,1
7	1,71 ± 0,05	1,71	0,0
8	1,75 ± 0,01	1,71	-2,2
9	1,29 ± 0,09	1,34	4,1

5.7.2 Pré-tratamento utilizando autoclave

Conforme pode ser observado na Tabela 17, a concentração de açúcares redutores permite verificar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico utilizando autoclave. Para se obter um aumento de pressão (2 kgf.cm⁻²) foi necessário manter a temperatura do banho de areia em 180 °C, na qual é liberado 1,31 mg.mL⁻¹, condição de aquecimento entre intermediária (170 °C, liberando 1,29 g.L⁻¹ de AR) e elevada (200 °C, liberando 1,7 g.L⁻¹ de AR) em relação às condições utilizando a bomba de teflon.

O uso do autoclave propiciou liberação de AR em quantidades maiores, porém sob condições de gastos energéticos superiores às das utilizadas na bomba de teflon. No autoclave, era necessário submeter o equipamento a temperaturas superiores a 300 °C para então poder dar partida, o que tomou aproximadamente 1 hora além do tempo de cada batelada. O fato é que, em temperaturas do banho abaixo de 180 °C, não se notou aumento

da pressão dentro do autoclave, o que o deixa em desvantagem em relação a bomba de teflon que pôde operar a partir de 140 °C e com o sistema pressurizado.

Tabela 17 - Rendimento de açúcares redutores a partir do processamento em autoclave

Ensaio	Pressão (kgf.cm⁻²)	Tempo (min)	Relação líquido/sólido (g.g⁻¹)	Concentração de AR (g.L⁻¹)
1	2	40	15	1,31
2	3	40	15	1,43
3	5	40	15	1,52
4	7	40	15	1,59

5.8 Hidrólise enzimática

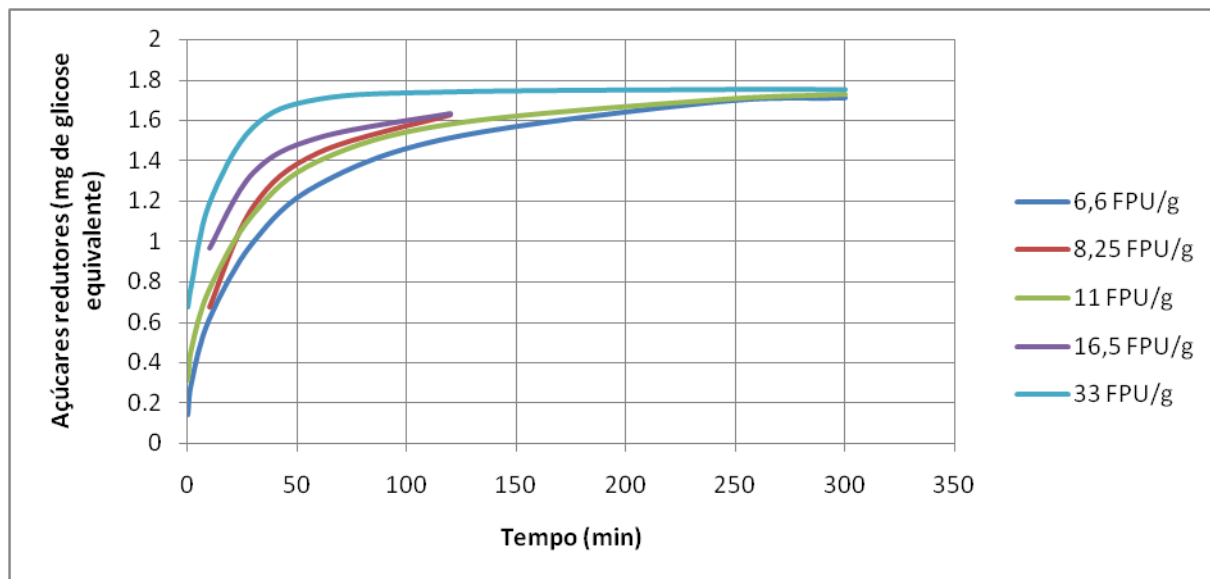
5.8.1 Atividade da enzima ou teste FPU

Quanto a atividade enzimática, o blend utilizado no presente trabalho, Cellic CTec2 da Novozymes, apresentou uma atividade de 330 FPU.mL⁻¹. Se comparada com Santos *et al.* (2009), que utilizou blend de celulasas Celluclast com atividade 86,14 FPU.mL⁻¹ para processar bagaço de cana-de-açúcar e Morone *et al.* (2017) que utilizou blend Sigma-Aldrich, obtido de *Trichoderma Reesei*, apresentou atividade de 60 FPU.mL⁻¹ no processamento de palha de arroz. Portanto, a atividade de 330 FPU.mL⁻¹ pode ser considerada alta.

5.8.2 Testes preliminares de hidrólise enzimática sem realização de pré-tratamento hidrotérmico sobre a palha de arroz

De modo a se testar qual seria o comportamento do processamento da biomassa "palha de arroz", foram feitas hidrólises enzimáticas com a palha, primeiramente, sem pré-tratamento hidrotérmico, somente a biomassa moída, peneirada e seca.

Figura 17 - Perfil de atividade do blend de enzimas CelicCTec2 em palha de arroz sem pré-tratamento



Pôde-se observar que o máximo de AR produzido pela hidrólise enzimática sem tratamento hidrotérmico ficou no limite de 1,8 g de AR por L de solução, sendo a maior parte do AR produzido na faixa de tempo entre 50 e 100 minutos, dependendo da carga de enzima (FPU/g) utilizada.

Um exemplo a ser citado, no trabalho de Yu *et al.* (2010), especialmente voltado para o processamento da palha de arroz, o rendimento da hidrólise atingiu 60% (após 30 minutos de pré-tratamento) e 72 horas de hidrólise enzimática (pH 5,0 e 50 °C). O presente trabalho obteve rendimento de 11%, dentro de um tempo de reação de 5 horas.

Pelo fato da eficiência da hidrólise enzimática ser baixa, foram feitos dois planejamentos experimentais: (i) para o pré-tratamento, no caso hidrotérmico, de modo a facilitar o ataque enzimático na etapa de hidrólise, e (ii) para a hidrólise enzimática, com o intuito de obter as melhores condições para a obtenção de açúcares redutores a partir da palha de arroz pré-tratada.

5.8.3 Resultados da hidrólise enzimática segundo o planejamento proposto

Na Tabela 18 encontra-se a matriz e os resultados do planejamento completo 2^3 do estudo das três variáveis citadas para a palha da cultivar de arroz BRS AG. A maior concentração de açúcares redutores, $3,49 \text{ g.L}^{-1}$, obtida nos ensaios 7 e 8. A maior conversão

da biomassa inicial em AR foi obtido no ensaio 7, atingindo uma conversão de 42,72% , sendo o máximo possível de 46,57% conforme consta na página 59.

Tabela 18 - Açúcares redutores do delineamento da hidrólise enzimática

Ensaio	Tempo (h)	Relação sólido/líquido (%p/v)	Carga de enzima (FPU/g)	Concentração de açúcares redutores média (g.L⁻¹)
1	24 (-1)	0,625 (-1)	16,5 (-1)	1,51 ± (0,01) ^f
2	24 (-1)	0,625 (-1)	66 (+1)	1,62 ± (0,01) ^e
3	24 (-1)	2,5 (+1)	16,5 (-1)	1,75 ± (0,01) ^d
4	24 (-1)	2,5 (+1)	66 (+1)	1,75 ± (0,01) ^d
5	72 (+1)	0,625 (-1)	16,5 (-1)	2,43 ± (0,00) ^c
6	72 (+1)	0,625 (-1)	66 (+1)	2,69 ± (0,02) ^b
7	72 (+1)	2,5 (+1)	16,5 (-1)	3,49 ± (0,01) ^a
8	72 (+1)	2,5 (+1)	66 (+1)	3,49 ± (0,00) ^a
9	48 (0)	1,25 (0)	33 (0)	1,75 ± (0,01) ^d

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

Diante dos resultados do Teste de Tukey a 5% para análise das médias dos experimentos, pode-se observar heterogeneidade entre as médias.

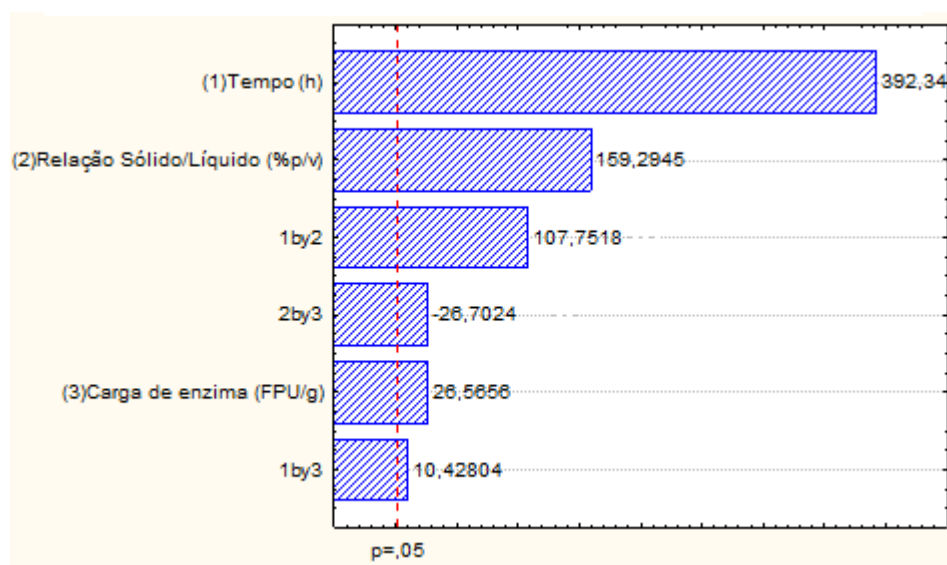
A partir das médias apresentadas, pode-se concluir que o efeito do tempo é mais pronunciado. Ao se comparar este fator, a mudança na resposta concentração de açúcar redutor (AR) é da ordem de, aproximadamente, duas vezes a mais comparando os tempos de 24h a 72h. O fator relação sólido/líquido também exerce influência sobre o sistema, sendo que quando se aumenta este fator, nota-se um aumento de concentração de AR na ordem de 1,2 vezes, variando a relação sólido/líquido de 0,625% a 2,5%. A carga de enzima também apresenta influência sobre o sistema, sendo que este fator, quando alterado, exerce um aumento na resposta de AR em torno de 1,1 vezes, dentro de uma faixa de carga de enzima desde 16,5 FPU/g até 66 FPU/g.

Na Tabela 19 encontram-se os efeitos que as três variáveis e interações causam na produção de açúcares redutores. Todas as variáveis são estatisticamente significativas, em um nível de significância de 5%.

Tabela 19 - Estimativa dos efeitos para AR no planejamento 2³

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(11)	p-valor
Média	2.219537	0.001558	1424.841	0.000000
(1) Tempo (h)	1.366617	0.003483	392.343	0.000000
(2) Relação sólido/líquido (%p/v)	0.554858	0.003483	159.294	0.000000
(3) Carga de enzima (FPU/g)	0.092534	0.003483	26.566	0.000000
1 vs 2	0.375323	0.003483	107.752	0.000000
1 vs 3	0.036323	0.003483	10.428	0.000000
2 vs 3	-0.093010	0.003483	-26.702	0.000000

Como se pode notar no diagrama de Pareto (Figura 18), as variáveis com maior influência são o tempo e a relação sólido/líquido, com menor influência da carga de enzima, no entanto esta não deixa de ter uma parcela de importância no sistema em estudo.

Figura 18 - Diagrama de Pareto para o planejamento 2^3 para hidrólise enzimática

Conforme está demonstrado na Figura 18, existe uma correlação positiva e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre produção de AR e os fatores Tempo e Relação Sólido/Líquido, ou seja, quanto maior o tempo de reação ou quanto maior a relação sólido/líquido, maior é a quantidade de AR obtido a partir da palha de arroz. A interação entre os dois fatores citados acima também é estatisticamente significativa ($p < 0,05$), mostrando-se positiva a correlação entre produção de AR e a interação entre tempo e relação sólido/líquido.

A variável carga de enzima também se mostra estatisticamente significativa, porém com uma correlação menor em relação aos demais fatores, apesar de positiva, ou seja, a enzima não é necessária em grandes quantidades para que a reação tenha o efeito esperado, o que é bom em termos de gastos com este insumo.

Na Tabela 20 encontram-se os coeficientes do modelo de regressão, obtidos a partir da matriz codificada (Tabela 5).

Tabela 20 - Coeficientes de regressão para a hidrólise enzimática

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(11)	p-valor	Estimativas por intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Média	2.219537	0.001558	1424.841	0.000000	2.216108	2.222965
(1) Tempo (h)	0.683308	0.001742	392.343	0.000000	0.679475	0.687142
(2) Relação sólido/líquido (%p/v)	0.277429	0.001742	159.294	0.000000	0.273596	0.281262
(3) Carga de enzima (FPU/g)	0.046267	0.001742	26.566	0.000000	0.042434	0.050100
1 vs 2	0.187662	0.001742	107.752	0.000000	0.183828	0.191495
1 vs 3	0.018162	0.001742	10.428	0.000000	0.014328	0.021995
2 by 3	-0.046505	0.001742	-26.702	0.000000	-0.05033	-0.04267

$$AR = 2.219537 + 0.683308 Y_1 + 0.277429 Y_2 + 0.046267 Y_3 + 0.187662 Y_1 Y_2 + 0.018162 Y_1 Y_3 - 0.046505 Y_2 Y_3 \quad (7)$$

Conforme demonstrado na equação acima, os coeficientes que mais influenciam na produção de AR são, justamente, os relativos ao tempo de reação (0,683308) e a relação sólido/líquido (0,277429), sendo que também exerce influência o coeficiente relacionado à combinação entre tempo e relação sólido/líquido ($Y_1 Y_2 = 0,187662$).

No cálculo da Análise de Variância, Tabela 21, foram utilizados todos os termos do modelo. O valor de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ com um coeficiente de determinação (R^2) de 89%, esses valores indicam que o modelo proposto se ajusta bem aos dados experimentais, observando-

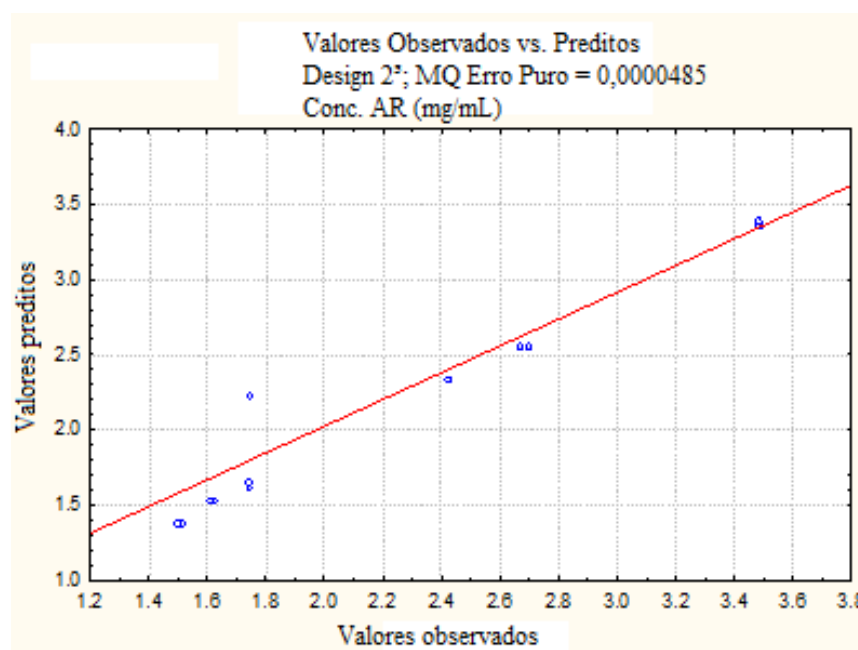
se uma tendência linear para os valores empíricos e os valores previstos pelo modelo. Esta tendência é constatada no gráfico da Figura 19.

Tabela 21 - Análise de variância para a hidrólise enzimática

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	9,339632	6	1,556605	17,83186
Resíduo	1,134816	13	0,087294	
Falta de Ajuste	1,13428	2	0,567141	11686,1
Erro Puro	0,00053	11	0,000049	
Total	10,474448	19		

$$R^2 = 89\% ; F_{13;6;0,05} = 2,92$$

Figura 19 - Valores observados versus valores previstos para a hidrólise enzimática



Na Tabela 22 pode-se verificar os valores experimentais, os previstos pelo modelo para a concentração de AR, os erros de ajuste e o erro relativo para cada ensaio do planejamento para a hidrólise enzimática.

É possível notar que o erro relativo, em geral, apontam para valores de AR previstos subestimados em relação aos valores de AR obtidos no laboratório. Mesmo com uma certa tendência de erro relativo a valores inferiores aos empíricos, o modelo predito apresenta comportamento semelhante ao observado em laboratório.

Tabela 22 - Valores de AR experimental, previstos no modelo e erros relativos para a hidrólise enzimática

Ensaio	AR experimental médio (mg/mL)	AR previsto (mg/mL)	Erro relativo (%)
1 e 11	1,51 ± 0,01	1,37	-9,13
2 e 12	1,62 ± 0,01	1,52	-6,28
3 e 13	1,75 ± 0,01	1,64	-5,72
4 e 14	1,75 ± 0,01	1,61	-7,77
5 e 15	2,43 ± 0,00	2,33	-4,11
6 e 16	2,69 ± 0,02	2,55	-5,05
7 e 17	3,49 ± 0,01	3,35	-3,95
8 e 18	3,49 ± 0,00	3,38	-2,92
9, 10, 19 e 20	1,75 ± 0,01	2,22	27,24

Observa-se nas Figuras 20 e 21 que o aumento no tempo de reação em conjunto com o aumento da relação sólido/líquido acarreta num aumento da concentração de açúcares redutores.

Pode-se observar que a relação sólido/líquido também influencia na obtenção de AR. Vale ressaltar que a relação sólido/líquido não deve ser tão elevada de modo que não venha a dificultar o contato entre a solução enzimática e o sólido (palha).

Figura 20 - Superfície de resposta para AR em função do tempo de reação e da relação sólido/líquido

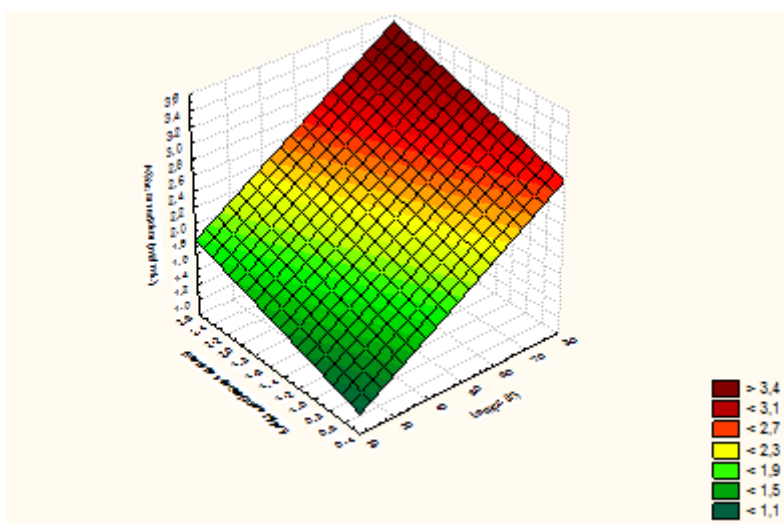
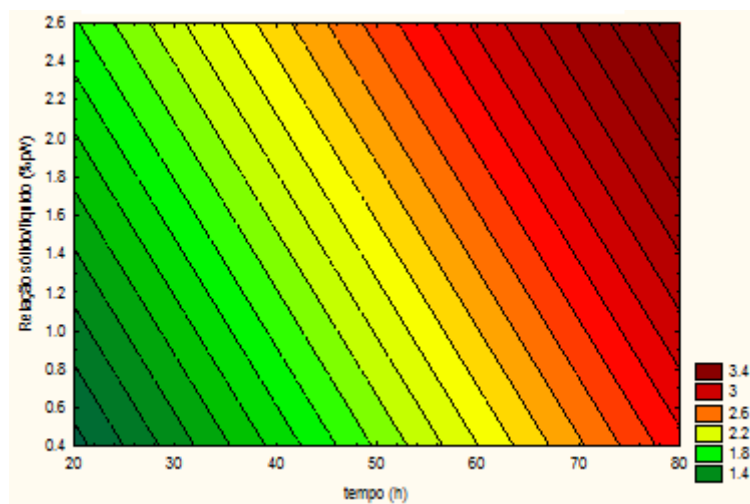


Figura 21 – Curvas de nível para AR em função do tempo de reação e da relação sólido/líquido



Nas Figuras 22 e 23 é possível visualizar que a concentração de açúcares redutores aumenta quando o tempo de reação é maior, enquanto a carga de enzima praticamente não exerce influência.

Pôde-se observar nas figuras citadas que, conforme o tempo de reação aumenta, maior é a quantidade de AR obtida. Esse padrão se observa nos sistemas enzimáticos, especialmente nos sistemas voltados para conversão de biomassas lignocelulósicas.

Por outro lado, a carga de enzima praticamente não influencia a produção de AR, dentro das faixas estudadas. Isto significa que pode-se utilizar uma pequena concentração de enzimas, uma vez que o resultado será o mesmo caso se experimente utilizar concentrações mais elevadas.

Figura 22 - Superfície de resposta para AR em função do tempo de reação e da carga de enzima

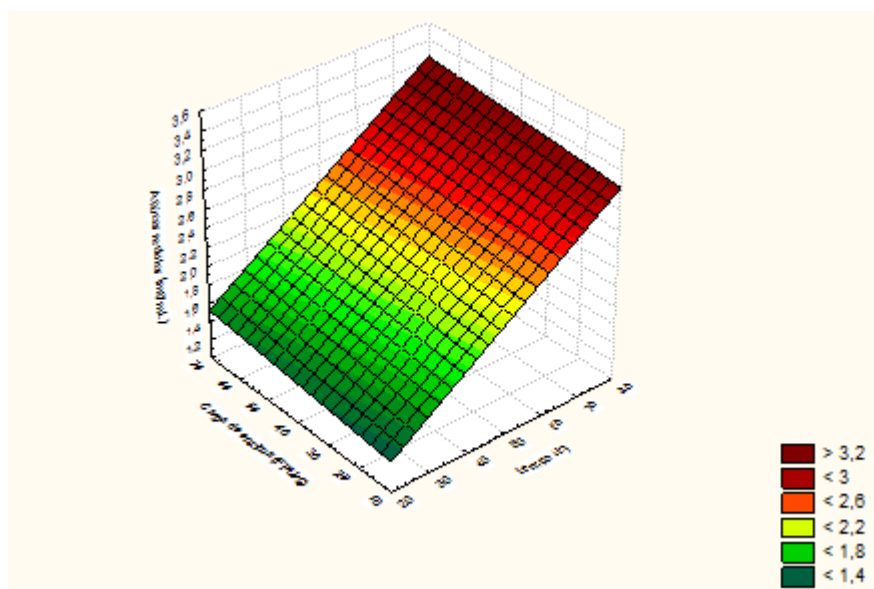
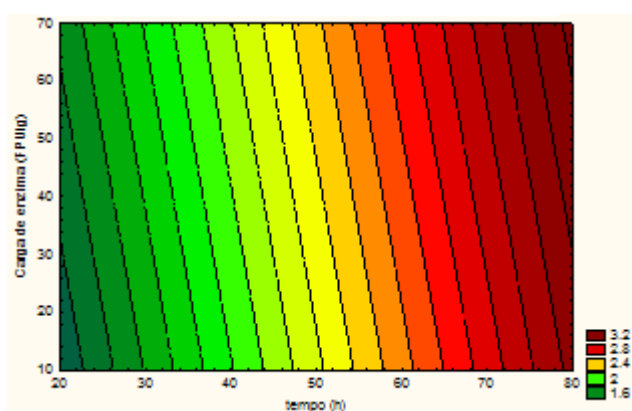


Figura 23 - Curvas de nível para AR em função do tempo de reação e da carga de enzima



Em um sistema onde a relação sólido/líquido é alta, existe uma tendência maior a se obter o composto de interesse, no presente trabalho é AR. Mas, para isso, é necessário que essa relação não seja tão alta de modo que venha a dificultar o contato entre sólido e a

solução contendo enzimas em agitação, por exemplo. Nas concentrações estudadas, o aumento da relação sólido/líquido está diretamente relacionada com o aumento das concentrações de AR.

Corroborando o que já foi observado anteriormente, a concentração de enzima pode ser utilizada em concentrações mais baixas, dentro das margens estudadas, que vai surtir os mesmos efeitos se fosse utilizada em concentrações maiores, é isso o que informam as Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Superfície de resposta para AR em função da relação sólido/líquido e da carga de enzima

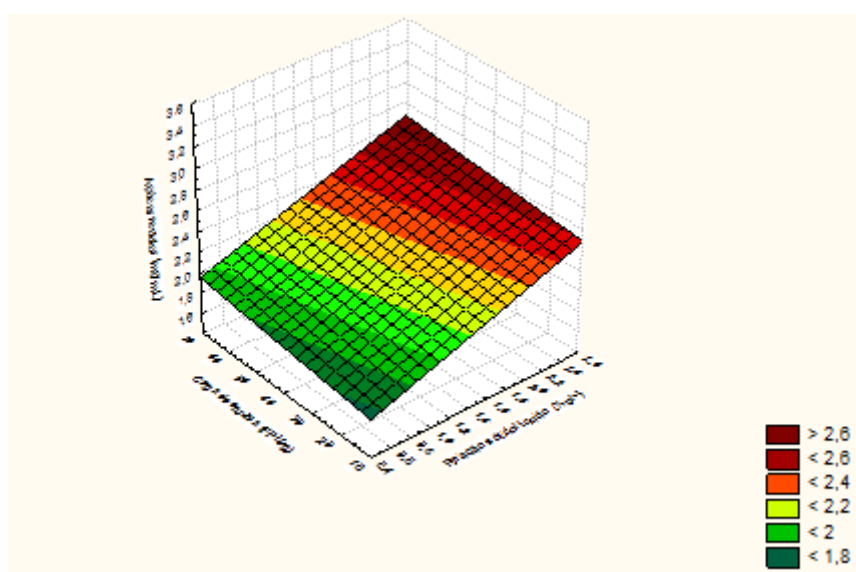
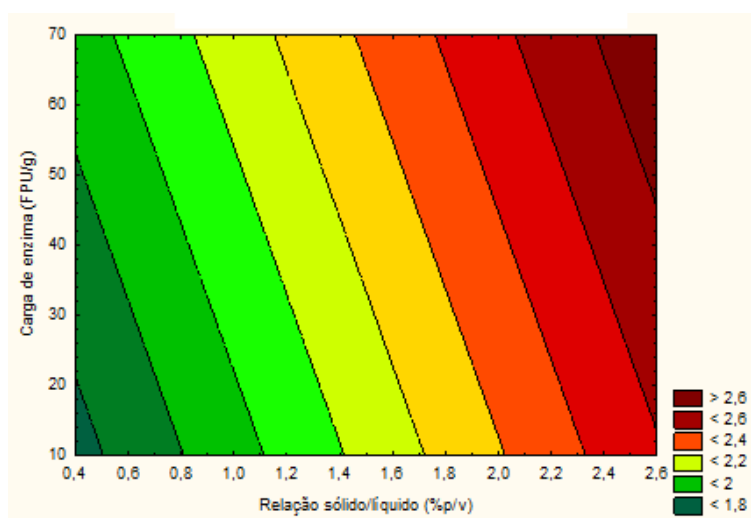


Figura 25 - Curvas de nível para AR em função da relação sólido/líquido e da carga de enzima



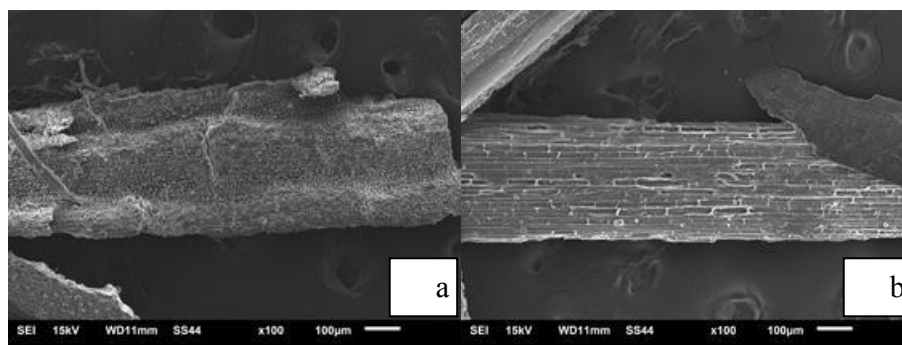
As superfícies de resposta, figuras 20, 22 e 24, e as curvas de nível, figuras 21, 23 e 25, permitem verificar quais condições de hidrólise resultaram na maior concentração de açúcares redutores no hidrolisado obtido.

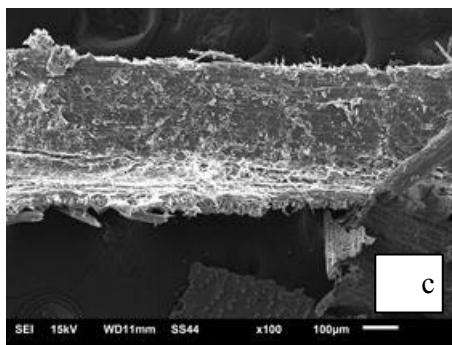
Cabe ressaltar que a carga de enzima, temperatura, agitação utilizadas e as demais variáveis avaliadas na hidrólise enzimática também foram utilizados por Silva (2009), Oliveira (2012) e Santos *et al.* (2014), embora esses autores tenham utilizado o bagaço de cana-de-açúcar, material que apresenta composição e conformação diferentes da palha de arroz.

5.9 Microfotografias (MEV) da palha de arroz sem pré-tratamento e com pré-tratamento hidrotérmico

O principal propósito do pré-tratamento hidrotérmico é o de facilitar o acesso das enzimas à celulose contidas na palha de arroz. A influência do pré-tratamento pode ser visualizado nas Figuras 6b e 6c, onde alterações nas fibras celulósicas são observadas. Estas alterações facilitam o acesso às enzimas, portanto, quanto maior a alteração estrutural se espera um aumento no rendimento das reações de hidrólise enzimática.

Figura 26 - Imagens da palha de arroz obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) antes e após pré-tratamento hidrotérmico





(a) palha de arroz BRS AG antes de sofrer quaisquer pré-tratamentos; (b) palha de arroz BRS AG pré-tratada a 140 °C, 20 minutos e 16 g de água/g sólido; (c) palha de arroz BRS AG pré-tratada a 200 °C, 60 minutos e 14 g de água/g sólido.

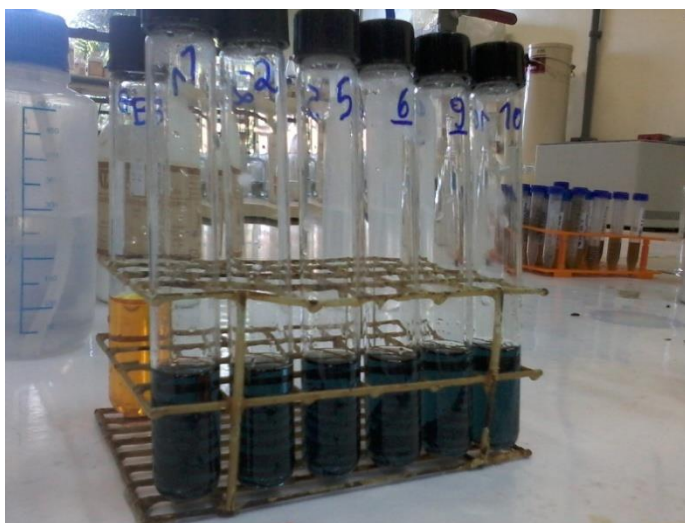
Muitas estruturas vasculares foram evidenciadas após pré-tratamento a 140 °C, especialmente durante 20 minutos (Figura 6b), quando comparadas com a palha original (Figura 6a). Já o pré-tratamento a 200 °C e 60 minutos aparentemente quebrou muitas das estruturas celulósicas (Figura 6c). O ataque por enzimas celulolíticas desintegrou efetivamente estruturas celulósicas após pré-tratamento, com rendimentos em glicose de 42,7%. Diferentemente, se a palha de arroz fosse hidrolisada enzimaticamente sem pré-tratamento hidrotérmico, as enzimas poderiam apenas atacar a superfície, obtendo um rendimento de glicose na ordem de 11%. O uso do pré-tratamento hidrotérmico mostrou-se efetivo num aumento do rendimento de glicose.

5.10 Teste qualitativo de etanol

Após reações de hidrólise enzimática, foram tomadas as amostras relativas aos melhores testes e foram realizadas fermentações conforme condições descritas em Materiais e Métodos. A seguir são apresentados imagens relativas aos testes qualitativos para detecção de etanol no meio reacional.

Após o tempo de incubação foi observada a seguinte formação de coloração verde nos tubos, acompanhando um branco (coloração laranja) para comparação.

Figura 27 - Imagem do teste colorimétrico para detecção de etanol



A mudança de coloração de laranja para verde sinaliza a mudança de estado de oxidação do cromo presente no composto $K_2Cr_2O_7$. Neste estado, o cromo está na forma Cr^{6+} . Ao reagir com o agente redutor etanol, o cromo muda de estado de oxidação de Cr^{6+} para Cr^{3+} , resultando em coloração verde, conforme demonstrado na reação [3] apresentada em Materiais e Métodos, com conseqüente oxidação do etanol a ácido acético.

6. CONCLUSÕES

Pelo fato de ser uma biomassa resistente à degradação biológica, a palha de arroz foi definida como matéria-prima do presente estudo. Com o intuito de avaliar se a hidrólise enzimática, sem quaisquer pré-tratamentos, seria o suficiente para uma eficiente extração de açúcares redutores, foram conduzidos alguns testes de hidrólise enzimática apenas com a palha moída e seca, que permitiram 11% de rendimento, sendo que rendimentos acima de 40% foram reportados por Yu *et al.* (2010). Diante desta primeira etapa, se procedeu a verificar que tipo de tratamento poderia ser realizado para obter maior rendimento na hidrólise enzimática. Foram realizados tratamentos hidrotérmicos seguidos de hidrólise enzimática, permitindo atingir maiores rendimentos.

O rendimento da hidrólise enzimática, com pré-tratamento foi de 42,7%, em muito ampliado quando comparado com os rendimentos da hidrólise enzimática sem prévio tratamento hidrotérmico (11%). O tratamento hidrotérmico, como um tratamento prévio às reações, mostrou-se adequado quando se tem por intuito utilizar a palha processada em etapas biológicas, tais como hidrólise enzimática e fermentação, uma vez que permitiu maior rendimento em termos de açúcares redutores e baixa produção de inibidores, inclusive sendo detectado etanol após alguns testes fermentativos.

Planejamento experimental provou ser uma ferramenta importante por permitir realizar um estudo detalhado do processo. Verificou-se também a influência de diferentes parâmetros na extração de açúcares redutores pelos diversos índices estatísticos que facilitaram a análise e obtenção de modelos empíricos característicos dos processos. Assim, as condições do processo de tratamento hidrotérmico, otimizadas para pré-tratamento da palha de arroz, foram Temperatura de 200 °C, tempo de 60 minutos e relação água/palha de 14 g.g⁻¹, com rendimento de açúcares redutores de 1,75 g.L⁻¹. Nessas condições foi otimizada a hidrólise enzimática, sendo as melhores condições: Tempo de 72 horas, relação sólido/líquido de 2,5 %p/v e carga de enzima de 16,5 FPU.g⁻¹. A maior concentração de AR foi de 3,5 g.L⁻¹.

Pelo fato de existirem xilose e glicose nos extratos da palha de arroz, é possível concluir que tanto a celulose (fonte de hexoses) como a hemicelulose (fonte de pentoses e hexoses) foram parcialmente degradadas pelo tratamento hidrotérmico. Pequenas quantidades de

compostos fenólicos (presentes na lignina) presentes no extrato na faixa de 400 ppm pouco afetaram a hidrólise enzimática.

Seguido dos processos de tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática, foi realizado um teste qualitativo de fermentação para saber se o hidrolisado viria a produzir etanol. Testes qualitativos foram positivos à presença de etanol. Com isso, foi possível mostrar que é possível a obtenção de etanol celulósico a partir de palha de arroz.

É possível concluir que a aplicação de uma combinação de processos hidrotérmicos e enzimáticos para a extração de açúcares redutores é tecnicamente viável a partir da palha de arroz cultivar BRS-AG.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar os efeitos de diferentes tipos de pré-tratamento sobre a biomassa, otimizando suas condições e realizando combinações entre eles;
- Otimizar condições de hidrólise enzimática e analisar influência de diversas fatores (T, t, pH, agitação, força iônica, carga de enzima, relação enzima/substrato, etc);
- Estudar outros blends de celulasas comerciais;
- Analisar fatores que podem influenciar processos fermentativos e otimizar obtenção de etanol celulósico (T, t, testes com diversas leveduras, rendimento de etanol, tolerância ao etanol por parte da levedura, tipo de solução salina, pH, etc);
- Explorar a separação de diversos subprodutos obtidos em um contexto de biorrefinaria;
- Realizar avaliação econômica do processo de obtenção de etanol de segunda geração, bem como exploração de outros produtos provenientes de materiais lignocelulósicos com potencial interesse comercial.

8. REFERÊNCIAS

ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of cellulase activities. **Laboratory analytical procedure**, v. 6, p. 1996, 1996.

AGBOR, Valery B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.

ALIZADEH, Hasan et al. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1133-1141, 2005.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS; Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis> . Acessado em 26 de julho de 2017.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS; Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/etanol> . Acessado em 26 de julho de 2017.

AOAC. AOAC método 942.05— Ash of Animal Feed. In: Helrick K, editor. Official method of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th ed., Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists; 1990.

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva; ÖZ, Cahide. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

BINOD, Parameswaran et al. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

BJERRE, Anne Belinda et al. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, n. 5, p. 568-577, 1996.

BROWN, Terry. Silica exposure, smoking, silicosis and lung cancer—complex interactions. **Occupational medicine**, v. 59, n. 2, p. 89-95, 2009.

CAPOLUPO, Laura; FARACO, Vincenza. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9451-9467, 2016.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARDOSO, Gláucen César et al. Desempenho de novilhos Simental alimentados com silagem de sorgo, cana-de-açúcar e palhada de arroz tratada ou não com amônia anidra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 2132-2139, 2004.

CHUNDAWAT, Shishir PS; VENKATESH, Balan; DALE, Bruce E. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 219-231, 2007.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO; Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_07_12_11_17_01_boletim_graos_julho_2017.pdf. Acessado em 31 de julho de 2017.

CURRIE, Heather A.; PERRY, Carole C. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. **Annals of Botany**, v. 100, n. 7, p. 1383-1389, 2007.

DE ANDRADE, Ednilton Tavares; DE CARVALHO, Sergio Roberto Garcia; DE SOUZA, Lucas Fernandes. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. 2009.

ELBA, P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Interciência, 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA; Disponível em:<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4448825/arroz-brs-ag-e-apresentado-no-ix-cbai>. Acessado em: 28 de maio de 2017.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA; Disponível em:<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886571/1/CITE04.pdf>. Acessado em 3 de agosto de 2017.

EMBRAPA. Método 2.8.Celulose. Ruben Cassel Rodrigues, autor. Documentos 306: Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS: Embrapa; 2010.

EMBRAPA. Método 5.2.Determinação de fibra em detergente ácido (FDA). Ruben Cassel Rodrigues, autor. Documentos 306: Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS: Embrapa; 2010.

EMBRAPA. Método 5.3.Determinação de lignina em detergente ácido (LDA). Ruben Cassel Rodrigues, autor. Documentos 306: Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS: Embrapa; 2010.

FARIA, Douglas et al. Cenários e perspectivas das principais culturas do Rio Grande do Sul em processos de biorrefinaria. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 2, n. 3, p. 291-306, 2016.

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

FENGEL, Dietrich; WEGENER, Gerd. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Walter de Gruyter**, v. 613, p. 1960-82, 1984.

FESTUCCI-BUSELLI, Reginaldo A.; OTONI, Wagner C.; JOSHI, Chandrashekhar P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007.

FIGUEIRÓ, Gláucia Garcia; GRACIOLLI, Luiz Antônio. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, p. 924-930, 2011.

GARAY, Rose Marie M. et al. Characterization of anatomical, chemical, and biodegradable properties of fibers from corn, wheat, and rice residues. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 69, n. 3, p. 406-415, 2009.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999.

HE, Yanfeng et al. Physicochemical characterization of rice straw pretreated with sodium hydroxide in the solid state for enhancing biogas production. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 4, p. 2775-2781, 2008.

HEINZE, Thomas; SCHWIKAL, Katrin; BARTHEL, Susann. Ionic liquids as reaction medium in cellulose functionalization. **Macromolecular bioscience**, v. 5, n. 6, p. 520-525, 2005.

HIDENO, Akihiro et al. Combination of hot compressed water treatment and wet disk milling for high sugar recovery yield in enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource technology**, v. 104, p. 743-748, 2012.

HOEBLER, Christine et al. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid

chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 360-367, 1989.

HOU, Xue-Dan et al. Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2484-2493, 2012.

HU, Zhenhu; WEN, Zhiyou. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 3, p. 369-378, 2008.

HUISHENG, L. Ü. et al. Pretreatment of corn stover using supercritical CO₂ with water-ethanol as co-solvent. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 5, p. 551-557, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Método 032/IV— Lipídios ou extrato etéreo - Extração direta em Soxhlet. Odair Zenobon, NeusSadoccoPascuet, Paulo Tiglea, coordenadores. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed., São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz; 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Método 037/IV— Protídios - Método de Kjeldahl modificado. Odair Zenobon, NeusSadoccoPascuet, Paulo Tiglea, coordenadores. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed., São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz; 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Método 012/IV— Perda por dessecação (umidade) - Secagem direta em estufa a 105 °C. Odair Zenobon, NeusSadoccoPascuet, Paulo Tiglea, coordenadores. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz, 4ª ed., São Paulo, SP: Instituto Adolfo Lutz; 2008.

IRGA - INSTITUTO RIOGRANDENSE DO ARROZ; Disponível em: http://www.irga.rs.gov.br/upload/20170724112804produco_rs_historica.pdf. Acessado em 31 de julho de 2017.

JACOBSEN, Sigrud E.; WYMAN, Charles E. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. In: **Twenty-first symposium on biotechnology for fuels and chemicals**. Humana Press, 2000. p. 81-96.

JIN, Shengying; CHEN, Hongzhang. Near-infrared analysis of the chemical composition of rice straw. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 207-211, 2007.

KARGBO, Foday Robert et al. Property analysis and pretreatment of rice straw for energy use in grain drying: a review. **Agric. Biol. JN Am**, v. 1, n. 3, p. 195-200, 2010.

KARIMI, Keikhosro; EMTIAZI, Giti; TAHERZADEH, Mohammad J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopusoryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 138-144, 2006.

KIM, Youngmi; MOSIER, Nathan S.; LADISCH, Michael R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 340-348, 2009.

LARSSON, Simona et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 151-159, 1999.

LEITE, Rogério Cezar de Cerqueira; LEAL, Manoel Régis LV. O biocombustível no Brasil. **Novos estudos - CEBRAP**, n. 78, p. 15-21, 2007.

LIU, Qiu-Ping et al. Ionic liquids from renewable biomaterials: synthesis, characterization and application in the pretreatment of biomass. **Green Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 304-307, 2012.

LORA, E. E. S.; VENTURINI, Osvaldo J. Biocombustíveis, Volumes 1 e 2. **Editora Interciência, Rio de Janeiro**, 2012.

LYND, Lee R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual review of energy and the environment**, v. 21, n. 1, p. 403-465, 1996.

MALBURG JR, L. M.; TAMBLYN LEE, J. M.; FORSBERG, C. W. Degradation of cellulose and hemicelluloses by rumen microorganisms. **Microbial Degradation of Natural Products**, p. 127-159, 1992.

MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures—a review. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, n. 1, p. 93-98, 2004.

MCHARDY, J.; SAWAN, S. P. Supercritical fluid cleaning: fundamentals. **Technology and Applications**, Noyes, Westwood, NJ, 1998.

MENDES, Fernanda Machado. **Digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar tratado quimio-mecanicamente**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORONE, Amruta; CHAKRABARTI, Tapan; PANDEY, R. A. Assessment of alkaline peroxide-assisted wet air oxidation pretreatment for rice straw and its effect on enzymatic hydrolysis. **Cellulose**, v. 24, n. 11, p. 4885-4898, 2017.

MOSIER, Nathan et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NOTÍCIAS

AGRÍCOLAS;

Disponível

em: <https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/graos/151937-rio-grande-do-sul-tem->

potencial-para-producao-de-etanol-a-partir-do-arroz.html#.WYI_dYTyvIU. Acessado em 2 de agosto de 2017.

OGEDA, Thais Lucy et al. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, Luís Ricardo Martins. **Estudo de alternativas de pré-tratamento e hidrólise do bagaço e palha de cana-de-açúcar para obtenção de etanol a partir de celulose**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OOSHIMA, H. et al. Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 5, p. 289-294, 1984.

PANDEY, Ashok et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PASQUINI, Daniel et al. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and Pinustaeda wood chips using ethanol–water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **The Journal of supercritical fluids**, v. 36, n. 1, p. 31-39, 2005.

RAGAB, Ahmed ME et al. Bioethanol production from rice straw enzymatically saccharified by fungal isolates, *Trichoderma viride* F94 and *Aspergillus terreus* F98. In: **Soft**. Scientific Research Publishing, 2014. p. 19.

RAMBO, Carlos Renato. " **Obtenção de sílica e carbeto de silício a partir da exposição da palha de arroz a microondas e a campos eletromagnéticos na faixa de r. f.** 1997. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

RATNAWEERA, DilruR. et al. The impact of lignin source on its self-assembly in solution. **RSC Advances**, v. 5, n. 82, p. 67258-67266, 2015.

RODRIGUES, José Augusto R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

SAHA, Badal C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, 2005.

SALIK, F. L. M.; POVH, N. P. Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: **Congresso Nacional da STAB**. 1993. p. 262-266.

SANCHEZ, Berta; BAUTISTA, Juan. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial technology**, v. 10, n. 5, p. 315-318, 1988.

SANCHEZ, Oscar J.; CARDONA, Carlos A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, Fernando A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, p. 56-62, 2014.

SANTOS, JRA de; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande**, v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SEO, Dong-June; SAKODA, Akiyoshi. Assessment of the structural factors controlling the enzymatic saccharification of rice straw cellulose. **Biomass and Bioenergy**, v. 71, p. 47-57, 2014.

SHEN, Zhanhui et al. Synergy of lignocelluloses pretreatment by sodium carbonate and bacterium to enhance enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource technology**, v. 249, p. 154-160, 2018.

SILVA, ViniciusFernandesNunes da. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SINDHU, Raveendran et al. Organosolvent pretreatment and enzymatic hydrolysis of rice straw for the production of bioethanol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 473-483, 2012.

SHELDON, Roger A. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. **Green Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 267-278, 2005.

SHILL, Kierston et al. Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 3, p. 511-520, 2011.

SRIDAR, V. Microwave radiation as a catalyst for chemical reactions. **Current Science**, p. 446-450, 1998.

SUMMERS, M. D.; HYDEB, P. R.; JENKINS, B. M. Yields and property variations for rice straw in California. In: **5th International Biomass Conference of the Americas Orlando, Florida, USA**. 2001.

SUN, Ning et al. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass?. **Chemical Communications**, v. 47, n. 5, p. 1405-1421, 2011.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical reviews in biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39-67, 1997.

TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TALEBNIA, Farid; KARAKASHEV, Dimitar; ANGELIDAKI, Irini. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.

TEBEKA, Iris RM; SILVA, Artur GL; PETRI, Denise FS. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. **Langmuir**, v. 25, n. 3, p. 1582-1587, 2009.

TEYMOURI, Farzaneh et al. Ammonia fiber explosion treatment of corn stover. In: **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4-7, 2003, in Breckenridge, CO**. Humana Press, 2004. p. 951-963.

VAZ JÚNIOR, S. et al. **Análise química de biomassa**. Embrapa, 2015.

VLASENKO, E. Yuet al. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. **Bioresource technology**, v. 59, n. 2-3, p. 109-119, 1997.

WANG, Hui; GURAU, Gabriela; ROGERS, Robin D. Ionic liquid processing of cellulose. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1519-1537, 2012.

WANG, Xiahui et al. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource technology**, v. 244, p. 1059-1067, 2017.

WEIL, Joseph R. et al. Removal of fermentation inhibitors formed during pretreatment of biomass by polymeric adsorbents. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 41, n. 24, p. 6132-6138, 2002.

WOOD, Thomas M.; BHAT, K. Mahalingeshwara. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988.

WU, Han et al. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. **Bioresource technology**, v. 241, p. 70-74, 2017.

XIA, Meng-lei et al. A novel digital color analysis method for rapid glucose detection. **Analytical Methods**, v. 7, n. 16, p. 6654-6663, 2015.

YU, Guoce et al. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 539-551, 2010.

ZAVREL, Michael et al. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-) cellulose. **Bioresource technology**, v. 100, n. 9, p. 2580-2587, 2009.

ZHANG, QiuZhuo; CAI, WeiMin. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1130-1135, 2008.

ZHANG, Yaning et al. Physical properties of rice residues as affected by variety and climatic and cultivation conditions in three continents. **American Journal of Applied Sciences**, v. 9, n. 11, p. 1757-1768, 2012.

ZHAO, Hua et al. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 139, n. 1, p. 47-54, 2009a.

ZHAO, Xuebing; CHENG, Keke; LIU, Dehua. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815, 2009b.

ZHENG, Yi; PAN, Zhongli; ZHANG, Ruihong. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.

ZHENG, Yizhou et al. Supercritical carbon dioxide explosion as a pretreatment for cellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 8, p. 845-850, 1995.

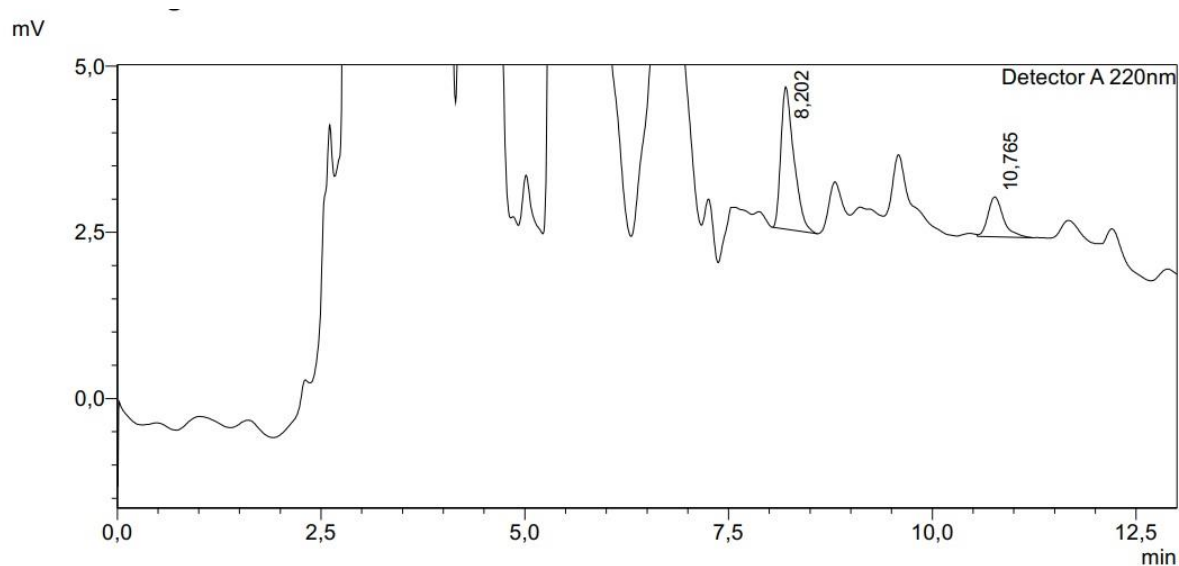
ZHENG, Yizhou; LIN, H.-M.; TSAO, George T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 6, p. 890-896, 1998.

ZHU, Shengdong. Use of ionic liquids for the efficient utilization of lignocellulosic materials. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 777-779, 2008.

9. APÊNDICES

9.1 Apêndice I: Cromatogramas relativos aos inibidores

Figura 28 - Cromatograma de separação de inibidores obtidos em líquido de tratamento hidrotérmico a 200 °C, 60 minutos e 16 mL de líquido.g palha⁻¹

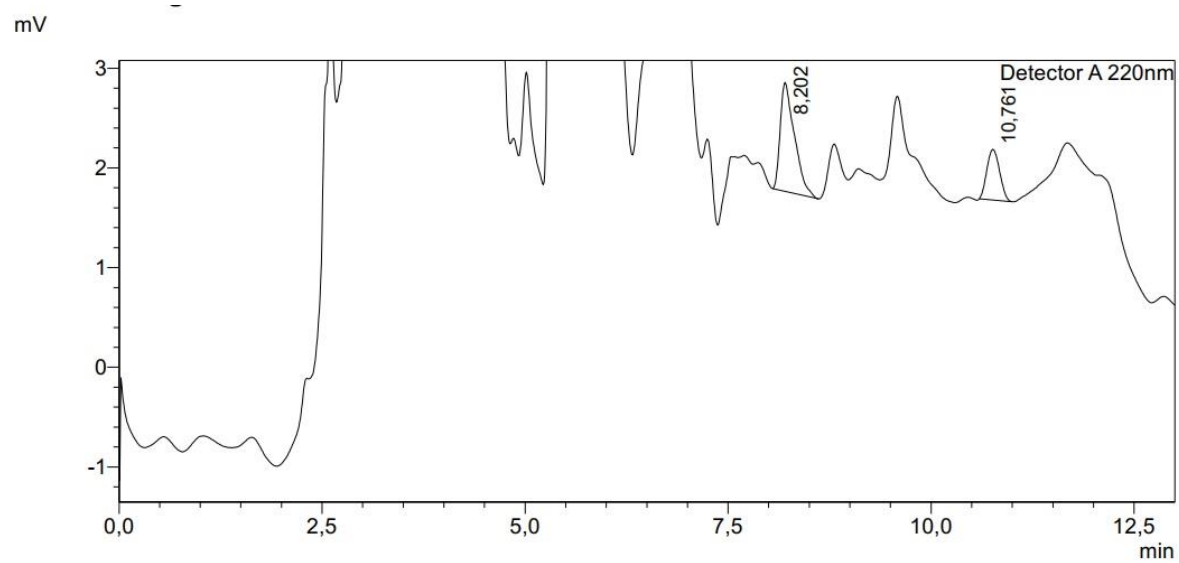


Os picos dos cromatogramas são equivalentes a:

- 8,202 minutos: HMF;
- 10,765 (Figura 26) e 10,761 (Figura 27): Furfural

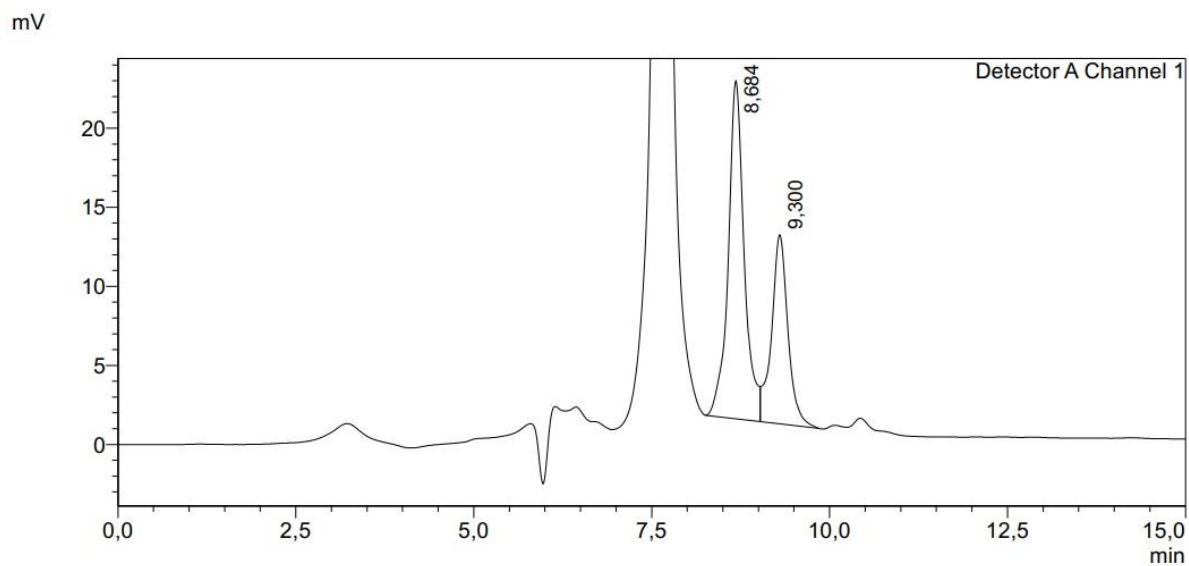
OBS.: Ácido Acético, Ácido Fórmico e Ácido Levulínico não foram detectados.

Figura 29 - Cromatograma de separação de inibidores obtidos em líquido de tratamento hidrotérmico a 200 °C, 60 minutos e 14 mL de líquido.g palha⁻¹



9.2 Apêndice II: Cromatogramas relativos ao perfil de açúcares

Figura 30 - Cromatograma de separação de açúcares obtidos no hidrolisado a 72 h, 2,5% p/v e 16,5 FPU/g



Os picos dos cromatogramas são equivalentes a:

- 8,684 minutos: Glicose;
- 9,300 (Figura 28) e 9,306 (Figura 29): Xilose + Galactose

Figura 31 - Cromatograma de separação de açúcares obtidos no hidrolisado a 72 h, 2,5% p/v e 66 FPU/g

