

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

HEITOR SUYAMA

**HIDRÓLISE DE PALHA DE CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO
DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)**

DISSERTAÇÃO

**PONTA GROSSA
2019**

HEITOR SUYAMA

**HIDRÓLISE DE PALHA DE CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO
DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elenise Sauer

PONTA GROSSA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa
n.56/20

S967 Suyama, Heitor

Hidrólise de palha de casca de arroz para produção de etanol de segunda geração
(2G). / Heitor Suyama, 2020.
59 f.; il. 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Elenise Sauer

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação
Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2020.

1. Cascas (Engenharia). 2. Arroz. 3. Hidrólise. 4. Fermentação. 5. Álcool. I. Sauer,
Elenise. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Título.

CDD 660



**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná Campus de Ponta Grossa**
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**



FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação N° 06/2019

HIDRÓLISE DE PALHA DE CASCA DE ARROZ PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

por

Heitor Suyama

Esta dissertação foi apresentada às 09 horas do dia **09 de dezembro de 2019** como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, com área de concentração em Desenvolvimento de processos, linha de pesquisa em processos de separação e tecnologia ambiental do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

**Prof.^a Dr.^a Luciana de Boer
Pinheiro de Souza (UEPG)**

**Prof.^a Dr.^a Simone
Delezuk Inglez
(UTFPR)**

**Prof.^a Dr.^a Maria Helene
Giovanetti Canteri (UTFPR)**

**Prof.^a Dr.^a Elenise Sauer
(UTFPR) - *Orientadora***

**Prof.^a Dr.^a Giane Gonçalves
Lenzi (UTFPR) Coordenadora
do PPGEQ**

- A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa -

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elenise Sauer pelos ensinamentos, paciência, dedicação, amizade e dedicação.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos amigos que estiveram lá quando precisei.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pelo auxílio prestado.

Aos membros da banca pela ajuda, disponibilidade e gentileza em participação neste trabalho.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo apoio financeiro para conclusão deste trabalho.

E por último, a todos que estiveram envolvidos direta e indiretamente na conclusão do trabalho.

Assim, agradeço.

RESUMO

SUYAMA, Heitor. **Hidrólise de palha de casca de arroz para produção de etanol de segunda geração (2G)**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

Esta pesquisa apresentou a avaliação de hidrólise ácida de palha e casca de arroz para produção de etanol 2G, sob diferentes condições usando planejamento experimental. A matéria prima lignocelulósica utilizada foi resíduo de colheita formado pela mistura de casca e a palha de arroz, em partes iguais e sem nenhum tratamento prévio, moída em moinho de martelos. A hidrólise da biomassa foi realizada sob aquecimento nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C, após pré-tratamento de hidratação, adicionadas de solução de ácido fosfórico, 5, 10 e 15%, exposição ao ultrassom nos tempos de 5, 10 e 15 minutos, de acordo com planejamento experimental 2³. A avaliação do processo foi realizada por meio do teor em sólidos solúveis obtido por refratometria em ° Brix. Os hidrolisados foram fermentados utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* SC (CA-11) sob agitação rotativa, a 36 °C, 130 rpm, por 48 horas. O teor de etanol obtido foi avaliado por cromatografia gasosa. A análise estatística dos resultados avaliou a influência do efeito das variáveis, temperatura de hidrólise, tempo de exposição ao ultrassom e concentração de ácido. Os resultados indicaram que a concentração de 15% de ácido fosfórico seguida da temperatura de 70 °C foram variáveis significativas. A análise dos efeitos estimados e as superfícies de resposta confirmaram que a temperatura de hidrólise, a concentração, e a interação entre a temperatura e concentração foram estatisticamente significativas na hidrólise do material utilizado e resultaram num modelo com bom ajuste entre os valores previstos e os valores obtidos experimentalmente. Isso indica que pode ser utilizada na predição de valores de °BRIX, dentro dos limites estudados. A análise estatística dos resultados de etanol indicou que a temperatura foi estatisticamente significativa, enquanto concentração de ácido e o tempo de exposição ao ultrassom não tiveram significância nas condições estudadas.

Palavras-chave: Casca e palha de arroz, Hidrólise, Fermentação, Etanol 2G.

ABSTRACT

SUYAMA, Heitor. **Hydrolysis of rice wastes for the production of second generation 2G ethanol**. 59 p. Thesis (Master's Degree in Chemical Engineering) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

This research presented the evaluation of acid hydrolysis of straw and rice husk for the production of 2G ethanol, under different conditions using experimental design. The lignocellulosic raw material used was crop residue formed by the mixture of husk and rice straw, in equal parts and without any previous treatment, ground in a hammer mill. The hydrolysis of the biomass was carried out under heating at temperatures of 30, 50 and 70 °C, after pre-treatment of hydration, added with phosphoric acid solution, 5, 10 and 15%, exposure to ultrasound at times 5, 10 and 15 minutes, according to experimental design 2³. The evaluation of the process was performed by the soluble solids content obtained by refractometry in ° Brix. The hydrolysates were fermented using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC (CA-11) under rotational agitation, at 36 °C, 130 rpm, for 48 hours. The ethanol content obtained was evaluated by gas chromatography. The statistical analysis of the results evaluated the influence of the effect of the variables, hydrolysis temperature, time of exposure to ultrasound and acid concentration. The results indicated that the concentration of 15% phosphoric acid followed by the temperature of 70 °C were significant variables. The analysis of the estimated effects and the response surfaces confirmed that the hydrolysis temperature, the concentration, and the interaction between the temperature and concentration were statistically significant in the hydrolysis of the material used and resulted in a model with good adjustment between the predicted values and the values obtained experimentally. This indicates that it can be used in the prediction of ° BRIX values, within the studied limits. The statistical analysis of the ethanol results indicated that the temperature was statistically significant, while the acid concentration and the time of exposure to ultrasound were not significant under the conditions studied.

Keywords: Rice wastes Hydrolysis, Fermentation, 2G Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção percentual de arroz por continente.....	16
Figura 2 - Maiores produtores mundiais de arroz em toneladas.....	17
Figura 3 - Estrutura lignocelulósica.....	18
Figura 4 - Estrutura básica de Celulose.....	19
Figura 5 - Unidades básicas componentes da hemicelulose.....	19
Figura 6 - Estruturas presentes na lignina.....	20
Figura 7- Moinho de martelos utilizado na moagem da palha de arroz.....	30
Figura 8- Estrutura para hidrólise.....	32
Figura 9 - Refratômetro portátil TE697 -TZ.....	33
Figura 10 - Hidrólise e Fermentação alcóolica de palha e casca de arroz.....	34
Figura 11 - Cromatógrafo Gasoso 6100.....	36
Figura 12 - Valores previstos pelo modelo <i>versus</i> valores obtidos experimentalmente para o °BRIX dos hidrolisados.....	41
Figura 13 - Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura <i>versus</i> concentração na hidrólise em °BRIX.....	43
Figura 14 - Superfícies de respostas do efeito combinado da temperatura <i>versus</i> ultrassom na hidrólise em °BRIX.....	43
Figura 15 - Superfície de resposta do efeito combinado da concentração <i>versus</i> ultrassom na hidrólise em °BRIX	44
Figura 16 - Valores previstos pelo modelo <i>versus</i> valores obtidos experimental na produção de etanol.....	47
Figura 17 - Superfície de resposta do efeito combinado de temperatura <i>versus</i> concentração no teor de etanol 2G.....	48
Figura 18 - Superfície de resposta do efeito combinado de concentração <i>versus</i> ultrassom no teor de etanol 2G.....	49
Figura 19 - Superfície de resposta do efeito combinado de temperatura <i>versus</i> ultrassom no teor de etanol 2G.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento experimental 2 ³ com triplicata no ponto central.....	31
Tabela 2 - Concentração de sólidos solúveis nos hidrolisados e fermentado casca e palha de em °BRIX.....	39
Tabela 3 - Análise ANOVA para o °BRIX dos hidrolisados.....	40
Tabela 4 - Análise dos efeitos das variáveis concentração de ácido fosfórico, temperatura e tempo de exposição ao ultrassom na hidrólise em °BRIX	40
Tabela 5 - Valores médios da concentração de etanol 2G nos fermentados.....	46
Tabela 6 - Tabela ANOVA da concentração de etanol 2G após fermentação.....	46
Tabela 7 - Tabela dos efeitos estimados para a produção de etanol 2G após fermentação.....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS.....	14
2.2 O ARROZ.....	15
2.3 MATÉRIA PRIMA LIGNOCELULÓSICA.....	17
2.3.1 Celulose.....	19
2.3.2 Hemicelulose.....	19
2.3.3 Lignina.....	20
2.4 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	20
2.5 HIDRÓLISE CELULÓSICA.....	21
2.5.1 Hidrólise Enzimática.....	22
2.5.2 Hidrólise Básica.....	23
2.5.3 Hidrólise Ácida.....	25
2.5.4 Ultrassom.....	26
2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 REAGENTES.....	29
3.2 MATÉRIA PRIMA LIGNOCELULÓSICA.....	29
3.3 LEVEDURA (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	29
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE CASCA E PALHA DE ARROZ.....	29
3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
3.6 HIDRÓLISE DA CASCA E PALHA DE ARROZ.....	31
3.7 CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS NO HIDROLISADO.....	34
3.8 FERMENTAÇÃO ACOÓLICA DOS HIDROLISADOS.....	34
3.9 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO FERMENTADO DE CASCA E PALHA DE ARROZ.....	35
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS NOS HIDROLISADOS.....	39
4.1.1 Análise ANOVA dos valores de °BRIX nos hidrolisados.....	39
4.1.2 Análise dos efeitos das variáveis na hidrólise em BRIX.....	40
4.1.3 Superfícies de resposta do efeito combinado das variáveis na hidrólise em °Brix.....	42

4. 2 TEOR ETANOL 2G DOS FERMENTADOS.....	44
4.2.1 Análise ANOVA na produção etanol 2G nos fermentados.....	45
4.2.2 Análise dos efeitos na produção de etanol 2G nos fermentados....	46
4.2.3 Superfícies de resposta do efeito combinado das variáveis no teor de etanol 2G dos fermentados.....	48
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A agricultura ocupa grande e importante espaço na economia brasileira, resultado de muitos fatores, dentre os quais, a semelhança de tendência mundial no aumento da população e o conseqüente aumento da demanda de alimentos e energia.

Ao considerar a produção de alimentos, o Brasil produz cerca de 12,7 milhões de toneladas de arroz, estando entre os dez maiores produtores do mundo (FERNANDES et al., 2014). Deste volume de produção, estima-se que cerca de 2,74 milhões de toneladas de casca de arroz sejam produzidas por ano em todo o território nacional (REIS et al., 2015), além da palha que sobra nos campos após a colheita, somando uma quantidade expressiva em resíduos.

Esses resíduos em sua maioria são utilizados como suplemento alimentar para animais ou como material para compostagem. Porém, existe a possibilidade de processá-los e transformá-los em etanol, agregando valor ao resíduo e fornecendo uma alternativa para a produção de biocombustível.

Os biocombustíveis entram na categoria de produtos ecologicamente corretos com fonte de energia renovável, o que os tornam um atrativo para as economias mundiais. No que se refere à produção de biocombustíveis, avalia-se a limitação de recursos naturais disponíveis e de espaço para cultivo, bem como a competição de área cultivável com a produção de alimentos.

Dentre os biocombustíveis, o etanol apresenta grande representatividade não se restringindo apenas como combustível, mas como importante matéria prima na indústria química e farmacêutica para fabricação de produtos para uso pessoal e de superfícies no combate a vírus, fungos e bactérias. Essa demanda reforça a importância do estudo de matérias primas potencialmente utilizáveis para sua produção minimizando a competição com fontes alimentares.

Nessa perspectiva, cresce a demanda de estudos que avaliem a utilização de resíduos agroindustriais para produção de etanol, denominado etanol de segunda geração (etanol 2G), com diferentes métodos apresentados na literatura especializada que fundamentam a conversão de uma biomassa de interesse em etanol. Essa via de produção de etanol a partir de matéria prima lignocelulósica, provinda de restos de cultivos e processamento agroindustrial, requer processos

de pré-tratamento (químicos ou físicos), seguidos de hidrólise celulósica (ácida, básica ou enzimática), para viabilizar a fermentação de interesse.

Ao considerar os resíduos do cultivo e do processamento do arroz, existem muitas variáveis a serem estudadas, principalmente quanto à otimização, e da comunicação de seus resultados ao meio acadêmico e outros segmentos. Tão relevante quanto os resultados obtidos em uma pesquisa, considera-se a formação de recursos humanos para o desenvolvimento dessas atividades, hoje em sua maioria sob responsabilidade das Universidades e Institutos Tecnológicos.

De forma geral a produção de etanol 2G no Brasil, apresenta grandes desafios para solucionar problemas técnicos no processo de produção, dentre os quais destaca-se a etapa de pré-tratamento da amostra, com custo elevado de reagentes, enzimas e equipamentos para pesquisa e ou produção. Esta pesquisa visa em primeiro plano buscar alternativas de baixo custo para sua realização para que possa ser replicada em estudos posteriores.

Seguindo os diferentes argumentos apresentados, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes condições de hidrólise ácida de palha e casca de arroz para produção de etanol 2G por meio de planejamento experimental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Biocombustíveis são definidos conforme a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2019a), como produtos derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia.

Quando se considera o uso de biocombustíveis, o Brasil é pioneiro mundial principalmente de biodiesel derivado de óleos vegetais e/ou gorduras animais, e de etanol derivado da cana-de-açúcar (ANP, 2019a).

Embora o etanol seja utilizado como combustível em larga escala e estudado desde a década de 1970 (ANP, 2019b), os carros, um dos principais meios de transporte ainda utilizados, são movidos em sua maioria com combustíveis de origem fóssil, o petróleo.

O etanol pode ser produzido sinteticamente, a partir de etileno derivado de hidrocarbonetos (CADENAS; CABEZUDO, 1998). Essas fontes não renováveis segundo Puppán (2002) são consideradas economicamente esgotadas com uso de 80% de sua reserva. Ao extrapolar essa análise estima-se que, com o consumo atual do petróleo, as reservas se esgotem até 2046.

Ao esgotamento de fontes renováveis soma-se o aumento populacional, previsto em 8,5 bilhões de pessoas para 2030, e 11,8 bilhões até 2100, representando um aumento de 17 e 53% da população atual (ONU, 2019). Esse aumento acarretará consequente crescimento na demanda de combustíveis, energia, matéria prima para produtos químicos e farmacêuticos, e alimentos. Nesse contexto, haverá aumento na relevância de processos produtivos a partir de fontes renováveis, considerados chave para atender a demanda crescente e o esgotamento dos recursos não renováveis.

As fontes renováveis para produção de biocombustíveis dividem atualmente o espaço útil para agricultura, que a longo prazo será limitado, mesmo para o Brasil que é privilegiado, com clima favorável e terras férteis para grande variedade de culturas. Esses fatores direcionam a importância de estudos da

utilização de biomassa residual oriunda da produção agrícola na produção do biocombustível etanol.

A biomassa para obtenção de etanol, além de se apresentar como matéria prima renovável, tem propriedades ambientalmente positivas devido a reciclagem de dióxido de carbono e baixo teor de enxofre, além do grande potencial econômico devido ao aumento no preço dos combustíveis fósseis (CADENAS; CABEZUDO 1998), além de gerar renda, diminuir o uso de materiais não renováveis e gerar contribuições econômicas (SATYANARAYANA et al., 2007).

O etanol produzido a partir de fontes renováveis é obtido a partir da fermentação de plantas ricas em açúcares ou amido (CADENAS; CABEZUDO, 1998), de caldos ricos em açúcares obtidos de cereais ou de cana de açúcar. A fermentação normalmente é realizada por leveduras gerando um produto contendo 12% de etanol, que deve ser destilado até uma concentração de 96%, quando a solução se torna azeotrópica, necessitando de métodos de separação especiais para maior concentração (DERMIBRAS, 2008).

Considera-se que a condição destaque da biomassa para obtenção de bioetanol é o teor de carboidratos para fermentação (PUPPÁN, 2002). Dessa forma pode ser obtida de diferentes fontes, dentre as quais se cita o arroz, com grande importância na agricultura brasileira principalmente nas regiões mais ao sul do país. Porém o destaque desta cultura se direciona na quantidade de 'resíduos' gerados durante sua colheita e processamento, como a palha e casca do arroz, que em sua maioria acabam recebendo destinação com baixo valor agregado como na complementação na alimentação animal.

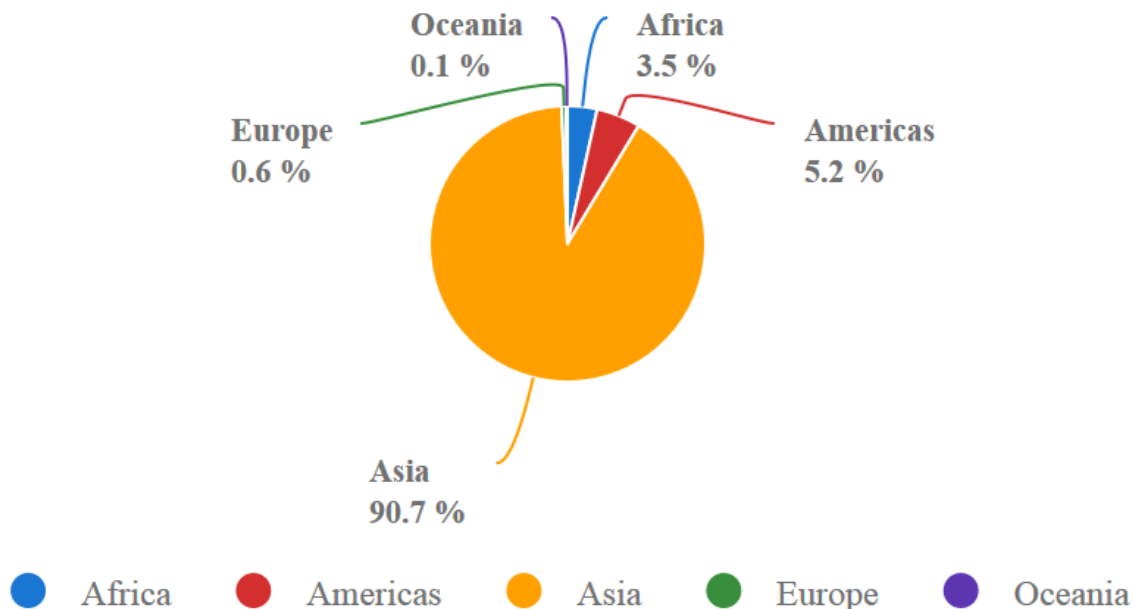
Essa biomassa residual do cultivo e do processamento do arroz é fonte de celulose que, com os devidos tratamentos pode ser transformada em bioetanol, que neste caso se chama em etanol de segunda geração, agregando valor ao subproduto e aproveitando da cultura arrozeira.

2.2 O ARROZ

O arroz é uma gramínea subaquática, podendo ser cultivada em uma ampla variedade de condições climáticas. A estrutura de um grão de arroz pode ser dividida em casca, pericarpo, revestimento da semente, nucela, embrião, aleurona e endosperma (MARSHALL; WADSWORTH, 1993).

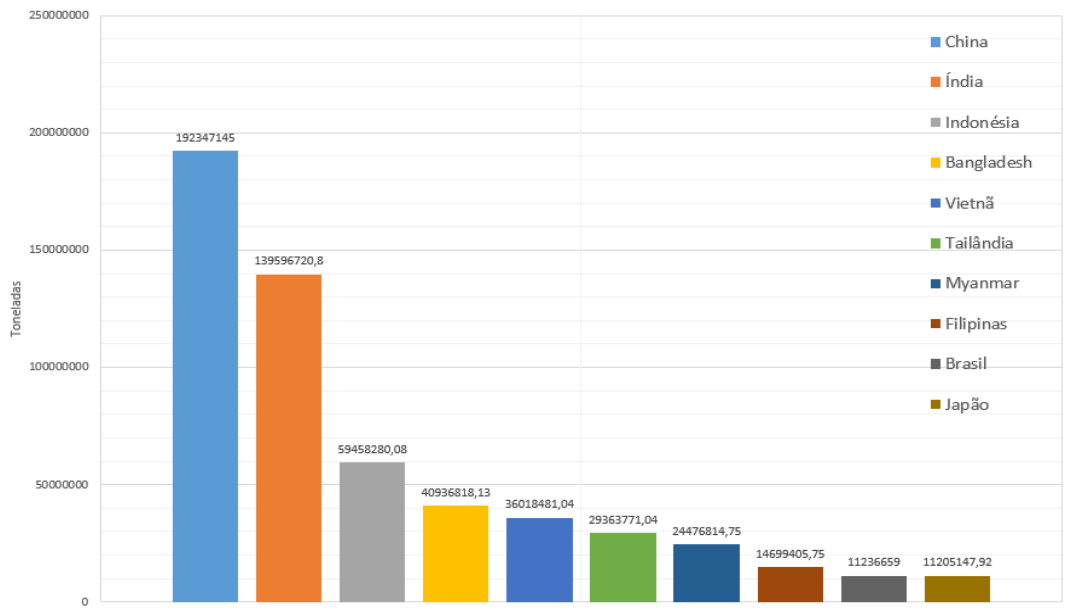
Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017), o arroz foi o terceiro cereal mais consumido no mundo, ficando apenas atrás do milho e do trigo. O milho teve participação de 36,3% no total de grãos, o trigo 26,3% e o arroz 16,9%. A produção mundial de arroz segundo a Organização das nações unidas para Agricultura e Alimentação (FAOSTAT, 2018) foi de quase 770 milhões de toneladas, lideradas pela Ásia com produção de aproximadamente 692 milhões de toneladas. As Américas se encontram em terceiro lugar na produção mundial, com aproximadamente 35 milhões de toneladas. Os percentuais de todos os continentes em produção de arroz no ano de 2017 podem ser observados na Figura 1.

Figura 2- Produção percentual de arroz por continente



Fonte FAOSTAT (2018)

Ainda segundo a FAOSTAT, a América do Sul produziu em 2017 aproximadamente 25 milhões de toneladas de arroz sendo que 12,5 milhões foram apenas no Brasil. Em 2017 a produção de arroz brasileira ocupava a nona posição mundial (Figura 2) e cerca de 78% da produção nacional se concentrava na região sul do país. A perspectiva é que até 2023 o consumo deste cereal aumente em 9% segundo a Federação das Indústrias de São Paulo (FIESP, 2013).

Figura 2 - Maiores produtores mundiais de arroz em toneladas

Fonte: FAOSTAT (2018)

Aliada à cultura do arroz há geração de grande quantidade de ‘resíduos’ sólidos, dando destaque a palha e casca de arroz. Estimativas segundo Reis; Silva; Neves (2015), apontam uma geração de cerca de 2,74 milhões de toneladas de casca de arroz em todo o território nacional.

A casca de arroz é composta de 43,5% de celulose, 22% hemicelulose, 17,2% lignina, 11,4% de cinzas e os outros 5,9% são outros compostos (FERNANDES et al., 2015). A alta quantidade, abundância e a composição dos resíduos provenientes da cultura arrozeira torna essa biomassa altamente atrativa para uso como matéria prima na produção de etanol 2G.

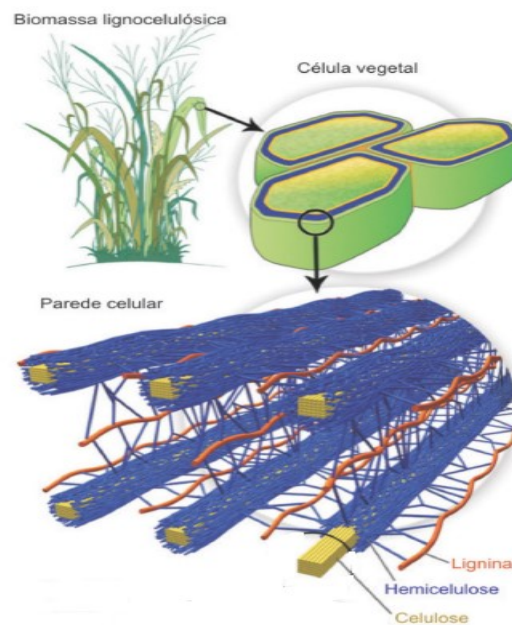
2.3 MATÉRIA PRIMA LIGNOCELULÓSICA

A matéria prima lignocelulósica é o material mais abundante no planeta, sendo compostas de hemicelulose, celulose, lignina e baixas quantidades de outros compostos (RABELO, 2010).

A biomassa de origem lignocelulósica apresenta vantagens quanto ao baixo custo e a disponibilidade em diferentes locais (ACHINAS; EUVERINK, 2016), sendo considerada fonte de carbono renovável e sustentável de origem vegetal de ampla ocorrência (KIM et al, 2010).

As fibras lignocelulósicas são basicamente compostas por microfibrilas, contendo alta quantidade de celulose. Essas fibrilas são envoltas por uma matriz amorfa constituída de lignina e hemicelulose (Figura 3). Essa matriz funciona como proteção o que torna a estrutura pouco reativa e rígida (SANTOS et al., 2012). Portanto, as duas maiores barreiras que impedem a hidrólise da celulose em matérias primas lignocelulósicas são a alta proteção proveniente da lignina e a recalcitrância da celulose cristalina, compactada em microfibrilas de estrutura linear (RABELO, 2010).

Figura 3 - Estrutura lignocelulósica



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012)

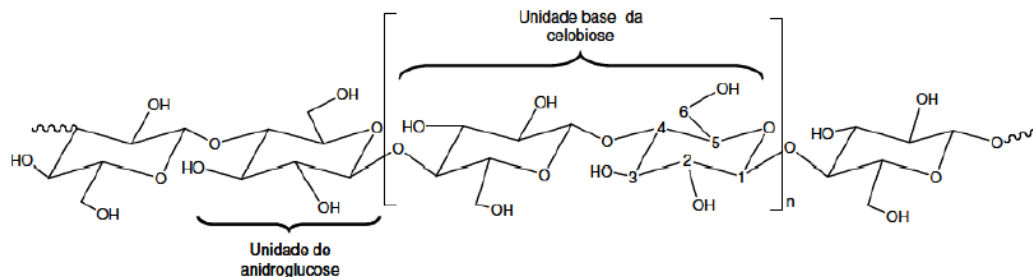
Em razão dessas características de cristalinidade, a quebra desta estrutura ou sua diminuição é um passo muito importante para que os microrganismos tenham mais fácil acesso a celulose aumentando assim o rendimento da fermentação. Este processo de 'quebra' pode ser realizado por meio de pré-tratamentos da matéria prima lignocelulósica.

2.3.1 Celulose

A celulose é um polímero linear e sua unidade básica repetitiva é a celobiose, um dímero de anidro-D-glicose, conforme estrutura básica

apresentada na Figura 4. A celulose atua no suporte, proteção e forma das células vegetais (PIETROBON, 2008).

Figura 4 - Estrutura básica da celulose

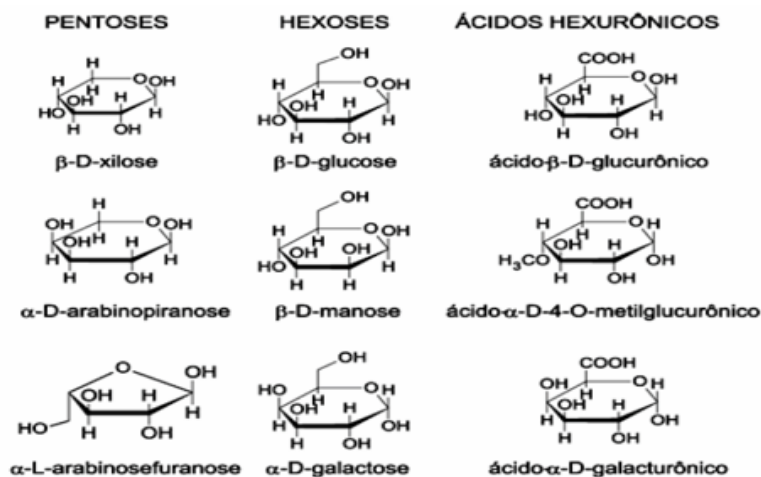


Fonte: Klemm et al. (1998)

2.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo que apresenta em sua estrutura basicamente urânicos polymerizados, além de hexoses e pentoses (Figura 5), com considerável de ramificação, ausência de cristalinidade, baixa massa molar e elevada hidrofiliçidade. Atua como agente acoplante entre a celulose e a lignina, sua estrutura ramificada permite a fácil reação com a celulose proporcionando a esta estabilidade e maleabilidade. A taxa de decomposição da hemicelulose é superior à da celulose devido a suas características, em consequência, possui elevada capacidade degradativa (CARVALHO, et al., 2010).

Figura 5 - Unidades básicas componentes da hemicelulose



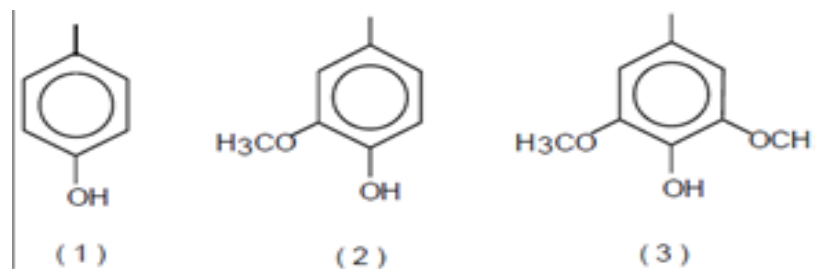
Fonte: Carvalho et al. (2010)

2.3.3 Lignina

A lignina é o segundo composto mais abundante nas plantas após a celulose. Ela atua como cimento e agente enrijecedor no interior das fibras conferindo rigidez a parede celular, o que gera resistência à compressão, à dobra e ao impacto, além de diminuir a permeação de água através das paredes da fibra vegetal (MOREIRA, 2010).

As estruturas presentes na lignina são a p - Hidroxifelina (1), Guaiacila (2) e Siringela (3) apresentadas na figura 6, sendo que as moléculas isoladas destes compostos tem massa molecular variando entre 1000 a 20000 g/mol. Entretanto, seu grau de polimerização na natureza é de difícil mensuração, pois durante a extração da lignina ocorre sua fragmentação em moléculas menores (ALEN, 2000).

Figura 6 - Estruturas presentes na lignina



(1) p - Hidroxifelina, (2) Guaiacila, (3) Siringela.

Fonte Paiva.; Trindade; Frollini (2000)

2.4 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

Etanol de segunda geração é assim denominado quando produzido a partir de biomassa lignocelulósica. Essa biomassa ganha interesse pela possibilidade de obtida de resíduos agroindustriais e industriais (BALAT; BALAT, 2008), não competindo com fontes alimentícias (THOMPSON; MEYER, 2013).

A quantidade de biomassa disponível depende de fatores como condições climáticas e encontra limitações na redução a açúcares redutores comparadas a conversão do amido; ainda assim, diferentes fontes vegetais têm sido pesquisadas na produção de bioetanol (ROBAK; BALCEREK, 2018).

O bioetanol pode ser produzido a partir de diferentes tipos de materiais, como açúcares simples, amido ou lignocelulose, cujo preço influencia o custo de

produção. Os materiais de fonte lignocelulósica são muito atrativos nesse aspecto por sua abundância e baixo custo (BALAT; BALAT; Öz C. 2011).

A quantidade necessária da biomassa varia tanto em função dos tratamentos e método de hidrólise, quanto da facilidade para liberação e conversão da matéria prima em açúcares (DERMIBRAS, 2008)

Para a produção de etanol de segunda geração, deve-se fazer um pré-tratamento na matéria prima, seguido da hidrólise para liberação dos açúcares, da fermentação do caldo e da destilação do etanol. A celulose é associada à hemicelulose e lignina, tornando assim os processos de pré-tratamentos tão importantes, visto que permitem o aumento da área de contato com a celulose e reduzem a sua cristalinidade (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Após o pré-tratamento, vem a etapa de hidrólise na qual a hemicelulose é hidrolisada em sua maioria em xilose, e a celulose em glicose; a lignina não libera açúcares para a produção alcoólica (CADENAS; CABEZUDO, 1998). Além dos açúcares, quando hidrolisada a biomassa lignocelulósica gera alguns subprodutos como a ácido acético, o hidrometilfurfural (HMF), a vanilina, o ácido gálico e o ácido p-hidroxibenzóico (MUSSATTO, 2004)

A produção de E2G no Brasil até o momento concentra-se na GranBio, da Raízen e do CTC. Somadas, essas empresas possuem plantas com uma capacidade instalada de 125 milhões de litros de E2G por ano, quarto país do mundo em capacidade instalada, atrás somente dos Estados Unidos, China e Canadá. Entretanto, cerca de 10% ou menos desse potencial anual foi produzido até agora, sendo o maior problema para a operação dessas plantas as dificuldades na etapa de pré-tratamento.

O etanol 2G ganha relevância adicional porque utiliza resíduos de diferentes origens, como resíduos agroindustriais encontrados em grande disponibilidade e de baixo custo em várias localizações geográficas (ACHINAS; EUVERINK, 2016).

2.5 HIDRÓLISE CELULÓSICA

A hidrólise celulósica consiste na transformação da celulose em açúcares, para uso como alimento das leveduras na fermentação. A hidrólise é necessária pois as leveduras normalmente utilizadas para fermentação são capazes de

metabolizar açúcares simples, como a glicose. Assim, este processo objetiva quebrar as cadeias celulósicas em seus monômeros simples.

A hidrólise da celulose pode ser enzimática, química (ácida, básica), ou física, como o ultrassom.

2.5.1 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática da celulose ocorre pela ação de enzimas celulases, compostas de β -glicosidase, de endo- β -1,4-glucohidrolase e exo- β -1,4-glucoce-lo-biohidrolase. A exo- β -1,4-glucoce-lo-biohidrolase degrada a molécula removendo unidades de celobiose de extremidades livres, a β -glicosidase faz a produção de glicose a partir da celobiose, e a endo- β -1,4-glucohidrolase age em regiões de baixa cristalinidade, o que cria extremidades livres de cadeia. Ao final da ação destas enzimas, os principais produtos são a xilose e a glicose (PARISI, 1989).

As condições de pH, pressão e temperatura da hidrólise enzimática são mais brandas se comparada às hidrólises químicas, além da alta especificidade, o que reduz a formação de substâncias inibitórias para fermentação, como o hidrometilfurfural (MOSCON, 2014, MOSCON, et al., 2015).

A hidrólise enzimática pode ser do tipo Hidrólise e Fermentação Separadas (HFS), onde essas etapas, como o nome sugere, são feitas separadamente no processo. Uma limitação nesse método é que com o aumento na concentração de glicose e celobiose pode haver a inibição das enzimas catalíticas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), mas como vantagem há a possibilidade de se atuar em cada um dos processos com suas condições ótimas (SZZODRAK; FIRDUREK, 1996).

O outro tipo é a Sacarificação e Fermentação Simultânea (SFS), onde esses dois processos ocorrem juntos, o que evita o problema de inibição do SHF, pois a glicose é formada e fermentada a etanol, o que gera uma maior conversão da celulose. (MARTÍN et al., 2008). A desvantagem deste processo vem do fato das diferentes temperaturas necessárias para a hidrólise e fermentação. Na hidrólise necessita-se de temperaturas perto dos 50 °C, enquanto para a fermentação esta temperatura não deve passar muito dos 36 °C. Para a utilização

deste processo então, é necessário a utilização de leveduras termo sensíveis (ROSSELL, 2006)

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico tem sido precedida de pré-tratamento da biomassa, que podem ser processos de: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação a vapor, líquidos iônicos, deslignificação oxidativa ou com solventes orgânicos (BADIEI, 2014). Quando utilizados são considerados essenciais no preparo de material para fermentação (Wyman et al., 2005), pois garantem melhores rendimentos na etapa de hidrólise enzimática.

Dessa forma, a hidrólise como um pré-tratamento é considerada efetiva quando reduz o grau de cristalinidade da celulose, alterando a estrutura celulósica, facilitando o acesso do agente hidrolítico à celulose (MOSIER, 2005).

Nesse processo de hidrólise como pré-tratamento para hidrólise enzimática, alguns inibidores de fermentação podem ser gerados, como os derivados do furano, oriundos da degradação de hexoses e pentoses, ácidos fracos (acético ou fórmico), metais advindos da corrosão do reator ou compostos fenólicos e outros aromáticos gerados pela degradação parcial da lignina (SILVA; FELIPE; CANILHA, 2017).

Existem outras possibilidades para melhorar a hidrólise enzimática, como fazer a remoção da lignina e da hemicelulose, ou no aumento da área de contato e porosidade. Em um pré-tratamento considerado ideal deve ocorrer a formação limitada de produtos inibitórios, tanto para hidrólise enzimática quanto para a fermentação (HARMSEN et al., 2010).

De forma geral, a hidrólise enzimática tem como vantagem a possibilidade de recuperação e reutilização das enzimas, além de serem altamente específicas e não gerarem subprodutos inibitórios (PEREIRA, 2013). Apesar disto, as enzimas utilizadas na catálise têm preço elevado, e, a lignina pode gerar a adsorção destas enzimas, aumentando assim a quantidade necessária para a hidrólise, assim como impossibilita a recuperação das enzimas adsorvidas, gerando um grande impacto econômico no processo.

2.5.2 Hidrólise Básica

A hidrólise básica, voltada para a produção de etanol a partir de material celulósico utilizada como pré-tratamento, opera em baixas temperaturas e remove

lignina e grupos acetil que podem inibir o processo de hidrolítico (MOOD et al., 2013). O processo alcalino ataca os grupos acetil da hemicelulose e as ligações ésteres da lignina-carboidrato (SOUZA, et al., 2009) diminuindo a polimerização e diminuição da cristalinidade da celulose (MCMILLAN, 1994).

A digestão alcalina tem a vantagem de quebrar a lignina e facilitar o acesso de enzimas na degradação da hemicelulose e da celulose (SARKAR, et al., 2012; CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). Esse tratamento também leva a formação de ligações cruzadas entre a hemicelulose e a degradação de outros componentes, aumentando a porosidade da biomassa (MOOD et al., 2013). Além disso, pode conduzir à deslignificação do substrato resultando na quebra de ligações ésteres entre lignina e xilano (MOOD et al., 2013).

De forma geral a hidrólise alcalina melhora a digestibilidade da celulose e a solubilidade da lignina dos compostos celulósicos em relação ao tratamento ácido (ALVIRA et al., 2010). Também supera a hidrólise ácida na menor degradação dos açúcares (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; MOOD et al., 2013).

Os compostos que apresentam melhores resultados na hidrólise básica são hidróxido de sódio (NaOH), amônia (NH₃), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), hidróxido de potássio (KOH), e hidróxido de amônio (NH₄OH) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; MOOD et al., 2013).

O hidróxido de sódio é uma base de alto custo e de recuperação difícil que aumenta o custo da hidrólise. A amônia é uma base cara, mas de fácil recuperação devido à sua volatilidade com cuidados extras no manuseio. A ureia apresenta alto custo e fácil manuseio, mas não há aumento significativo no rendimento da hidrólise enzimática (UKITA; IMAI; HUNG, 2006). Há registros de uso em soluções diluídas e condições mais amenas comparada à hidrólise ácida (MCMILLAN, 1994).

As principais desvantagens do método alcalino são o tempo de digestão necessário para efetividade da degradação e a necessidade de sua retirada do meio, mais efetiva em resíduos agrícolas em relação a resíduos de madeira (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; ALVIRA, 2010). Vários estudos confirmaram a efetividade desse método (WAN; ZHOU, 2011, WANG, et al., 2010, XU; CHENG, 2011).

2.5.3 Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida de biomassa de fonte lignocelulósica para produção de etanol é realizada com os ácidos nítrico (HNO_3), clorídrico (HCl), sulfúrico (H_2SO_4) e fosfórico (H_3PO_4), em geral em soluções diluídas (OROZCO et al., 2011; MOOD, et al., 2013).

A presença de água é essencial para obter alto rendimento, uma vez que o ácido se dissocia em íons hidroxônio que, uma vez carregados para o interior da biomassa promovem a quebra das ligações glicosídicas (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Em concentrações menores que 5% m/v se considera uma hidrólise com ácido diluído (GURGEL, 2010).

Os ácidos atuam solubilização da lignina e da hemicelulose da biomassa e hidrolisam os polissacarídeos em monossacarídeos, facilitando uma hidrólise por enzimas em processo subsequente (SOUSA, et al., 2009; MOOD, et al., 2013).

A hemicelulose se degrada em condições mais amenas de operação, sendo necessárias condições mais severas para a hidrólise da celulose, o que pode causar a degradação dos açúcares já obtidos da hemicelulose assim como a sua degradação, formando produtos inibidores da fermentação (BRETHAUER, 2009).

A principal diferença entre os ácidos utilizados está na concentração, mais diluídas ou mais concentradas, de forma que na operacionalização com soluções concentradas as temperaturas são reduzidas, e soluções diluídas em temperaturas mais altas, principalmente visando uma diminuição nos custos do processo, sem muitas alterações na método (MOOD et al., 2013).

O uso de ácidos concentrados apresenta a desvantagens como toxicidade, corrosão de equipamentos, produção de compostos como ácidos fenólicos, furfural e aldeídos indesejáveis para os processos de hidrólise enzimática e fermentação (SOUSA, et al., 2009; MOOD et al., 2013).

O ácido mais utilizado neste tipo de hidrólise é o ácido sulfúrico (MOOD et al., 2013, LINARES et al., 2014), e quando em concentração relativamente baixa (0,05-5%) pode reduzir a formação de compostos indesejáveis (GALLETTI; ANTONETTI, 2012; KUMAR, et al., 2009). Esse ácido diluído evita a utilização de enzimas para hidrolisar a hemicelulose com redução no custo de produção

(MOOD et al., 2013). Foi utilizado com bons resultados de rendimento em diferentes condições experimentais em resíduos de palha de arroz por (HSU et al., 2010), resíduos de canola (LU; ZHANG; ANGELIDAKI, 2009), e capim (SUN; CHENG, 2002). Entretanto, apresenta alta periculosidade de operação, sendo altamente corrosivo para equipamentos.

Embora os processos que utilizem ácido ainda representem alto custo com uso de energético e de água, indicam melhora de rendimento em carboidratos; assim, o ácido fosfórico não é tóxico, de baixo custo comparado a outros ácidos (OROZCO et al. 2011a; LINARES et al., 2014). Apresenta vantagens no processo ao ser neutralizado com hidróxido de sódio forma fosfato de sódio, nutriente para microrganismos no meio de fermentação, podendo ser uma alternativa benéfica, eficiente e econômica (OROZCO et al., 2011b)

2.5.4 Ultrassom

O ultrassom corresponde a ondas sônicas de frequências altas, acima da audível pelos humanos, com faixa de audição entre 20 Hz e 200 kHz. O ultrassom de potência atinge entre 20 kHz e 1 MHz e o ultrassom de diagnóstico vai além disso (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011).

A utilização do ultrassom pode ativar alguns tipos de mecanismos, como ruptura mecânica, agitação, aquecimento localizado, difusão, entre outros. (GALLEGO-JUÁREZ, 2010). O ultrassom melhora a transferência de massa em sistemas heterogêneos por efeitos térmicos, ou por meio da cavitação, na qual numerosas microbolhas com vapor de solvente são geradas em movimento radial onde a energia acústica se propaga pelo meio líquido (ZHANG et al, 2014). As flutuações na pressão decorridas do campo sonoro do ultrassom fazem com que haja a formação, crescimento e colapso de microbolhas dentro do líquido. Esse colapso gera uma alta turbulência liberando calor como forma de energia, havendo assim aumento significativo na pressão e temperatura (THORNEYCROFT; BARNABY, 1895).

Assim, o ultrassom é considerado um processo limpo, não tóxico e de fácil utilização e, quando empregado na biomassa melhora a extração de lignina, hemicelulose e celulose, aumentando assim a eficiência da hidrólise (ESFAHANI; AZIN, 2012).

A hidrólise ácida assistida de ultrassom foi considerada mais efetiva em 44% quando comparada à comum em experimentos realizados por Moscon (2014) e Moscon et. al. (2015), com 113 gramas de açúcar por quilo de biomassa para a hidrólise comum, dos quais 60,9 gramas eram açúcares. Já, para a hidrólise ácida assistida de ultrassom, este valor subiu para 162 gramas de açúcares por quilograma de biomassa, com 79,5 gramas de açúcares fermentescíveis.

Entretanto, Perrone (2015) realizou estudos de hidrólise enzimática assistido de ultrassom, com resultados considerados desfavoráveis para a hidrólise enzimática, atribuídos à formação de produtos inibitórios na hidrólise devido a irradiação.

Embora haja controvérsias no uso do ultrassom, Belal (2013) sugere efetividade do ultrassom no pré-tratamento de resíduos de arroz e subsequente tratamento enzimático, a partir de resultados obtidos no aumento do rendimento de açúcares redutores, atribuído a uma alteração da estrutura cristalina da celulose.

2.6 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um processo altamente difundido e estudado, sendo registrado em vários trabalhos que uma das leveduras mais eficientes para fermentar glicose é a *Sacharomyces cerevisiae*, com anos de emprego em escala industrial, tendo criado seletividade e resistência ao etanol (LIMA, et al., 2001).

A *Sacharomyces sp.* é excelente fermentadora de glicose, mas para, principalmente tecnologias 2G, onde o rendimento é baixo, faz-se mais interessante o uso combinado ou seleção e recombinação de genes para que subprodutos, como a xilose e pentoses possam ser convertidas também a etanol.

Segundo Silva; Felipe e Canilha (2017), a espécie do microrganismo utilizada e a adaptação desta ao meio influencia a concentração máxima dos compostos inibitórios, assim como o tipo de processo de fermentação a ser realizado, o número dos inibidores presentes e o seu efeito combinado.

A fermentação alcoólica em estudos para obtenção de etanol a partir de resíduos de arroz registram a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* no processo (ABEDINIFAR, et al., 2009; YOSWATHANA et al., 2013)

Neste estudo a *Saccharomyces cerevisiae* de escolha foi CA- 11, uma cepa selvagem isolada, cultivada em condições estéreis e testada para produção de etanol. Os registros de uso dessa cepa são em sua maioria para fermentação de cachaça de alambique, seguindo a recomendação de pré-hidratação e temperatura de fermentação de 33 °C até 36 °C.

A escolha considerou principalmente resultados da efetividade da levedura CA-11 demonstrados no estudo realizado por Garcia (2016), em que sua utilização produziu uma cachaça de melhor qualidade e baixos teores de componentes secundários quando comparado com outras cepas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, Sulfato de sódio (Na_2SO_4 anidro), Ácido fosfórico (H_3PO_4), Hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste de pH dos hidrolisados. Etanol e Metanol grau cromatográfico (Merk, Alemanha).

Gases especiais, Nitrogênio (N_2), hidrogênio (H_2) e Ar sintético, todos 99,99% de pureza adquiridos da Oxigenisis.

3.2 MATÉRIA PRIMA LIGNOCELULÓSICA

A matéria prima lignocelulósica utilizada como fonte para a produção de etanol 2G foi formado pela mistura de casca e a palha de arroz em partes iguais, resíduo da colheita e processamento. Esse material foi disponibilizado por um produtor rural do município de Jesuítas-PR e armazenado nos laboratórios da UTFPR-PG.

3.3 LEVEDURA (*Saccharomyces Cerevisiae*)

A levedura utilizada para fermentação alcoólica da biomassa de casca e palha de arroz foi a *Saccharomyces cerevisiae* SC (CA-11 UFLA), estudada na produção de fermentados de cana e misturas resíduos de diferentes origens. Foi selecionada a partir de cepa selvagem, isolada, cultivada em condições estéreis e testada outras vezes quanto ao potencial para produção de etanol em trabalhos prévios (DUARTE et al., 2009; CAMPOS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; DUARTE, AMORIM, SCHWAN, 2013).

3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS DE CASCA E PALHA DE ARROZ

A palha de arroz é uma matéria volumosa, característica que dificulta sua utilização e armazenagem em escalas laboratorial. Assim, esta matéria prima foi moída em moinho de martelos modelo GV/ 02 (Figura 7), disponível no laboratório

de vegetais da UTFPR -PG. A casca oriunda do descasque de arroz foi utilizada sem nenhum tratamento físico prévio, em razão de características do resultado de processamento de moagem foram consideradas aptas ao uso.

Figura 7- Moinho de martelos utilizado na moagem da palha de arroz



Fonte: Autoria Própria

3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental 2^3 foi desenvolvido visando avaliar o efeito das variáveis, temperatura de hidrólise, tempo de exposição ao ultrassom e concentração de ácido fosfórico sobre a hidrólise da casca e palha de arroz em relação ao ° BRIX e produção de etanol.

O planejamento experimental foi constituído por onze experimentos com repetição no ponto central. Neste foram utilizados três níveis para cada variável de (-1, 0, +1), correspondentes a 5, 10 e 15% para variável concentração de fosfórico (H_3PO_4), 10, 20 e 30 para o tempo de ultrassom, e 30, 50 e 70 °C na temperatura de hidrólise (Tabela 1).

Tabela 1 - Planejamento experimental 2³ com triplicata no ponto central

Experimento	Concentração de H ₃ PO ₄		Tempo de ultrassom		Temperatura de hidrólise	
	%	Codificado	Minutos	Codificado	°C	Codificado
1	5	-1	30	+1	70	+1
2	10	0	20	0	50	0
3	15	+1	30	+1	30	-1
4	5	-1	10	-1	70	+1
5	10	0	20	0	50	0
6	15	+1	10	-1	70	+1
7	5	-1	10	-1	30	-1
8	10	0	20	0	50	0
9	15	+1	30	+1	70	+1
10	5	-1	30	+1	30	-1
11	15	+1	10	-1	30	-1

Fonte: Autoria própria

Os onze experimentos foram realizados de forma randômica, seguindo em todos, a sequência de pré-tratamento de alíquotas de casca e palha de arroz, a hidrólise seguida de neutralização, a avaliação de °Brix, a fermentação alcoólica e avaliação teor de etanol, descritas nos itens subsequentes.

3.6 HIDRÓLISE DA CASCA E PALHA DE ARROZ

A Hidrólise da casca e palha de arroz (Figura 10) foi realizada conforme procedimentos desenvolvidos por adaptação da metodologia proposta por Moscon (2014) e Moscon et al. (2015).

O pré-tratamento da biomassa (casca e palha de arroz) foi realizado adicionando porções de 5g de cada fração em balão de fundo redondo de 250 mL, somando 10 g, sobre a qual foram adicionados 100 mL de solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 5%, 10% e 15%, conforme planejamento experimental, e permaneceram em hidratação durante um período de 24 horas.

Após o período de hidratação a biomassa foi aquecida em manta de aquecimento nas temperaturas de 30, 50 e 70 °C, conforme planejamento experimental, por uma hora. Foi montado um condensador para que os vapores gerados durante o processo fossem condensados de volta para o balão, conforme estrutura utilizada para hidrólise apresentada na Figura 8 e procedimento na Figura 9.

Figura 8- Estrutura para hidrólise

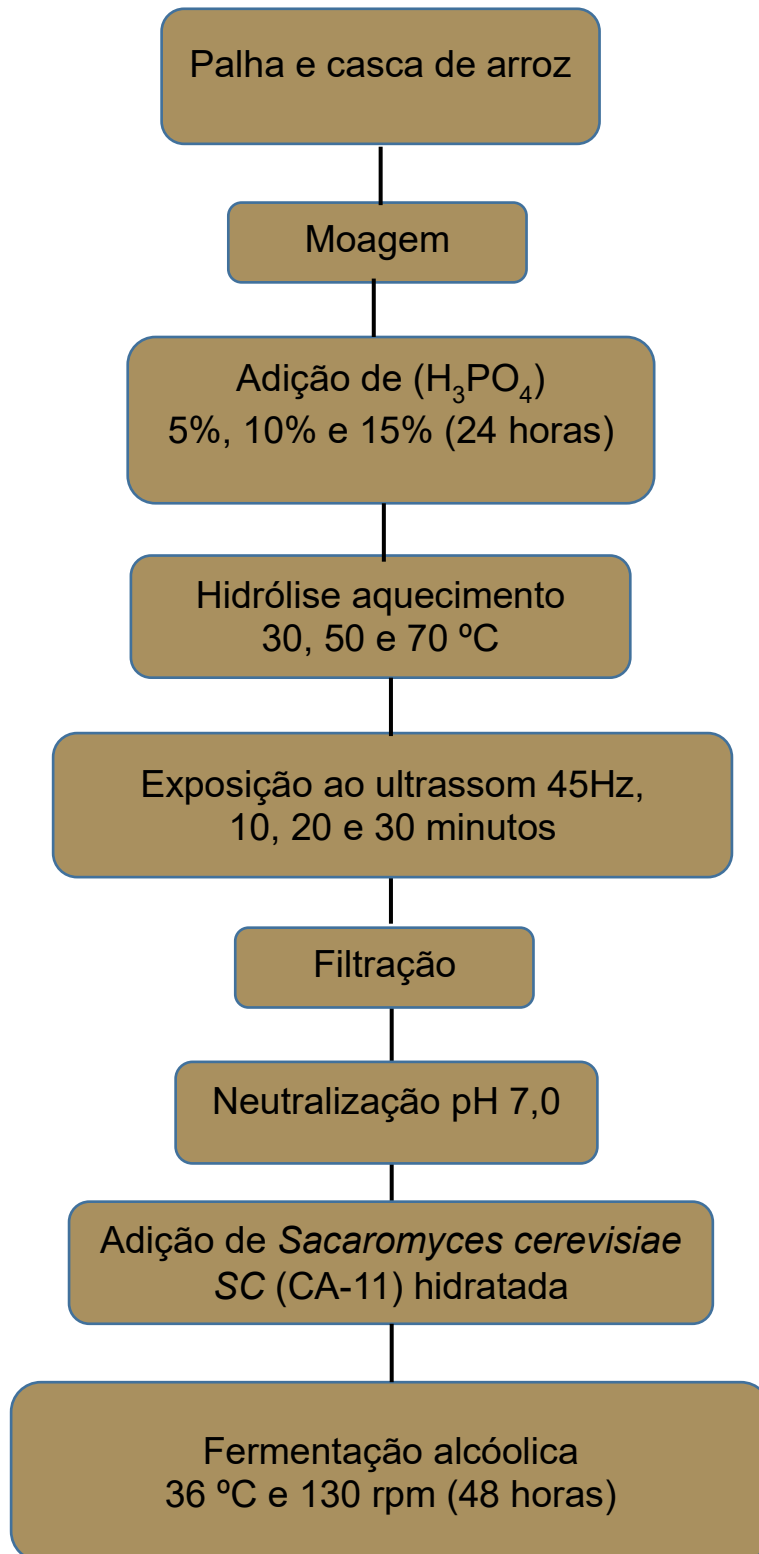


Fonte: Autoria própria

Após procedimento de aquecimento em manta aquecedora o balão de fundo redondo contendo a biomassa foi levado para exposição ao ultrassom a uma frequência contínua de 45Hz, nos tempos de 10, 20 e 30 minutos, conforme planejamento experimental.

Após tratamento por ultrassom a amostra foi filtrada com auxílio de funil, filtro de gaze e algodão, devido à alta viscosidade do meio e alta concentração de sólidos. Após a primeira filtragem, foram realizadas lavagens da biomassa com 150 mL de água ultrapura, visando extrair o máximo dos açúcares fermentescíveis formados durante a hidrólise ácida. As soluções coletadas foram neutralizadas a pH 7,0 (SANTOS; GUSMÃO; GOUVEIA, 2010), com solução de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, e filtradas novamente.

Figura 9 - Procedimentos de Hidrólise e Fermentação alcóolica de palha e casca de arroz



Fonte: Autoria própria

3.7 CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS NO HIDROLISADO

A concentração de sólidos solúveis nos hidrolisados neutralizados a pH 7,0, obtidos nas diferentes condições de estudo e dos respectivos fermentados foi analisada por refratometria, em refratômetro portátil TE697-SZ (Figura 10). Além das amostras, foram preparados brancos de soluções de ácido nas concentrações de 5%, 10% e 15%, neutralizadas com solução de hidróxido de sódio a pH 7,0, em triplicata para descontar dos valores das amostras. O resultado foi expresso em °Brix em que cada unidade desta medida corresponde a um grama de açúcar por cem mililitros de solução.

Figura 10 - Refratômetro portátil TE697 -TZ



Fonte: Autoria própria

3.8 FERMENTAÇÃO ACOÓLICA DOS HIDROLISADOS

A fermentação alcoólica foi realizada seguindo procedimentos (Figura 10), a partir modificações das metodologias utilizadas por Duarte et al. (2009); Campos et al. (2010); Oliveira et al. (2011) e Duarte, Amorim, Schwan, (2013). Essa etapa foi antecedida pela fase de hidratação da levedura Ca-11, para a qual 0,25 gramas de levedura foram adicionadas a 30 mL de água por 30 minutos. Decorridos esse tempo, as leveduras hidratadas foram adicionadas aos kitazatos de 500 mL contendo os hidrolisados preparados conforme delineamento

experimental, fechados com rolhas, e na saída lateral foi encaixada uma mangueira de silicone, mergulhada em água para que não houvesse entrada de oxigênio e que permitisse saída de gás carbônico.

A fermentação foi conduzida em Shaker rotativo nas condições de operação a temperatura de 36 °C e 130 rpm, durante um período de 48 horas.

3.9 CONCENTRAÇÃO DE ETANOL NO FERMENTADO DE CASCA E PALHA DE ARROZ

A avaliação da concentração de etanol nos fermentados de casca e palha de arroz foi realizada em Cromatógrafo Gasoso 6100GC, da marca Young Lin, com detector por ionização de chama (DIC), equipado com *headspace* com injetor automático, coluna capilar ZB-WAX, de 30 metros, 0,25 milímetros e 0,25 micrômetros disponível no Laboratório de Métodos Instrumentais da UTFPR-PG, (Figura 10).

O método de quantificação de etanol foi modificado de Bertrand (1975), em condições experimentais avaliadas e otimizadas em vários experimentos prévios. Foi utilizada calibração com padrão interno de metanol, para o qual inicialmente foi preparada uma solução estoque de padrão interno de metanol a 1% v/v, usando uma alíquota de 1 mL de álcool metílico grau cromatográfico, transferida para balão volumétrico de 100 mL e avolumada com água ultrapura. Esta solução foi diluída para uso, por transferência de uma alíquota de 0,2 mL em balão volumétrico e avolumada para 100 mL. Na sequência, foi preparada uma solução padrão de etanol, para a qual 5 mL de álcool etílico cromatográfico foram pesados diretamente em balão volumétrico de 100 mL e avolumados com água ultrapura. Essa solução foi diluída para uso, por transferência de uma alíquota de 1 mL em balão volumétrico avolumado para 100 mL.

Figura 11 - Cromatógrafo Gasoso 6100



Fonte: Autoria própria

O processo de extração do etanol da solução de referência e dos fermentados foi realizado pela técnica *headspace*, utilizando para ambos *vials* de 20 mL, previamente limpos e secos, onde se adicionou 1 grama de sulfato de sódio. Para preparo da solução de referência, foram utilizados 5 mL de solução padrão de etanol e 1 mL de solução padrão de metanol e para as amostras, 5 mL do fermentado 1 mL de solução padrão de metanol.

Cada vial foi climpado individualmente com septo de teflon e tampa de alumínio, agitado vigorosamente até total dissolução do sulfato de sódio. Na sequência, os *vials* foram colocados no amostrador automático do cromatógrafo, acionado para serem individualmente conduzidos para o forno do *headspace* para condicionamento da amostra sob agitação e aquecimento a 60 °C, durante 10 minutos. Concomitante a essa fase, durante os três minutos finais, ocorria a limpeza da seringa com N₂ (Quadro 1). Ao finalizar o processo uma alíquota de 1000 uL era coletada da fase gasosa de cada *vial* e injetada no cromatógrafo gasoso.

As condições de análise no cromatógrafo foram estabelecidas e conduzidas com programação de rampas de temperatura, iniciando-se em 40 °C e permanecendo durante 5 minutos, seguindo a 25 °C/min até uma temperatura final de 220 °C, onde se manteve por 6,8 minutos. A temperatura do injetor foi de

220 °C, e do detector 230 °C, a chama formada por 300 mL min⁻¹ de ar mais 40 mL min⁻¹ de N₂, sem uso de *make-up* com gás de arraste utilizado: Nitrogênio Split de 1/2 (Quadro 1).

Quadro 1 - Condições de operação do *Headspace* e do Cromatógrafo gasoso

Condicionamento da amostra no <i>headspace</i>	Limpeza da seringa com N ₂ , durante 3 minutos. Aquecimento e agitação a 60 °C durante 10 minutos. Temperatura da seringa de injeção: 60 °C.
Programação e rampas de temperatura	Isoterma de 40 °C durante 5 minutos, seguida de rampa a 25 °C min ⁻¹ até uma temperatura de 220 °C, mantendo-se em isoterma durante 6,8 minutos.
Condições do detector	Chama formada por 300 mL min ⁻¹ de ar e 40 mL min ⁻¹ de N ₂ . Temperatura do detector de 230 °C sem uso de <i>Make-up</i>
Gás de arraste utilizado: Nitrogênio Split de ½	Gás de arraste utilizado: Nitrogênio Split de 1/2

Fonte: Autoria própria

Após eluição, os cromatogramas foram plotados tanto para os padrões de referência quanto para as amostras. A identificação dos picos de metanol e etanol foram realizados por comparação entre os tempos de retenção da referência e da amostra.

A quantificação do teor de etanol foi realizada considerando a concentração correspondente à área do pico nos cromatogramas e o cálculo realizado conforme a proporcionalidade das áreas dos picos de etanol e metanol da Equação 1.

$$C = c_0 * \frac{H}{h} * \frac{i}{I} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

- C é a concentração de etanol na amostra;
- c₀ é a concentração de etanol na nossa solução padrão;
- I é a área de metanol na nossa amostra;

- i é a área de metanol na nossa solução padrão;
- H é a área de etanol na nossa amostra;
- h é a área de etanol na nossa solução padrão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS

A análise estatística de dados foi realizada para avaliar a influência do efeito das variáveis, temperatura de hidrólise, tempo de exposição ao ultrassom e concentração de ácido, por meio do software STATISTICA 5.0 para realizar o tratamento estatístico dos dados através da tabela ANOVA, tabela de efeitos e gráficos de superfícies de resposta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS NOS HIDROLISADOS

Os resultados da concentração de sólidos solúveis nos hidrolisados de casca e palha de arroz em °Brix, correspondentes a cada experimento do planejamento, são apresentados na Tabela 2, onde são observados valores mínimos de 2,2 para amostra 7 a máximo 4,9 para amostra 9.

Tabela 2 - Concentração de sólidos solúveis nos hidrolisados e fermentado da casca e palha expressos em °Brix

Experimento (Amostra)	BRIX do hidrolisado	BRIX do fermentado
1	2,3	2 0
2	3,1	2,6
3	3,3	2,4
4	2,7	2,0
5	3,2	2,6
6	4,3	3,3
7	2,2	2,0
8	3,6	2,6
9	4,9	4,2
10	2,4	1,2
11	2,6	2,1

Fonte: Autoria própria

4.1.1 Análise de variância (ANOVA) dos valores de °BRIX nos hidrolisados

A partir da análise dos valores de °BRIX dos hidrolisados foi realizada construção da Tabela 3, na qual se observa que a concentração de ácido fosfórico foi significativa na hidrólise de casca e palha de arroz, seguida da temperatura.

Tabela 3 - Análise ANOVA para o °BRIX dos hidrolisados

Fator	de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	p
(1) Temperatura	1	1,71	1,71	25,37	0,01
(2) Concentração	1	3,78	3,78	56,07	0,00
(3) Ultrassom	1	0,15	0,15	2,24	0,21
(1) - (2)	1	1,05	1,05	15,59	0,02
(1) - (3)	1	0,06	0,06	0,91	0,39
(2) - (3)	1	0,28	0,28	4,17	0,11
Erro	4	0,27	0,07		
Total	10	7,31			

Fonte: Autoria própria

A significância estatística pode ser confirmada na Tabela 3, com confiabilidade de 95%, com fatores estatisticamente significativos os que apresentaram p-valor menor do que 0,05. Além disto a partir do teste f, é possível afirmar a significância dos fatores, caso o valor calculado seja maior do que o valor tabelado.

4.1.2 Análise dos efeitos das variáveis na hidrólise em °BRIX

A análise dos efeitos das variáveis concentração de ácido fosfórico, temperatura e tempo de exposição ao ultrassom no °BRIX dos hidrolisados (Tabela 4), corrobora a significância do efeito da concentração de ácido fosfórico na hidrólise de casca e palha de arroz com valor de 7,50, seguido do efeito significativo da temperatura com valor de 5,04, e do efeito não significativo do ultrassom com valor de 1,50.

Tabela 4 - Análise dos efeitos das variáveis concentração de ácido fosfórico, temperatura e tempo de exposição ao ultrassom na hidrólise em °BRIX

Média global	3,15 ± 0,08	Significância	T(4)
(1) Temperatura	0,92 ± 0,18	Significativo	5,04
(2) Concentração	1,38 ± 0,18	Significativo	7,49
(3) Ultrassom	0,28 ± 0,18	Não significativo	1,50
(1) - (2)	0,73 ± 0,18	Significativo	3,94
(1) - (3)	-0,17 ± 0,18	Não significativo	-0,95
(2) - (3)	0,37 ± 0,18	Não significativo	2,04

Fonte: Autoria própria

A partir dos resultados obtidos na análise ANOVA (Tabela 4) e na análise dos efeitos estimados, observa-se que a temperatura de hidrólise, a concentração e a interação entre a temperatura e concentração foram estatisticamente significativas em relação ao aumento do °BRIX na hidrólise do material lignocelulósico de casca e palha de arroz.

Considerando os fatores significativos, obteve-se a equação que representa o modelo da pesquisa como:

$$Y = 3,1454 + 0,4625T + 0,6875C + 0,3635TC \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

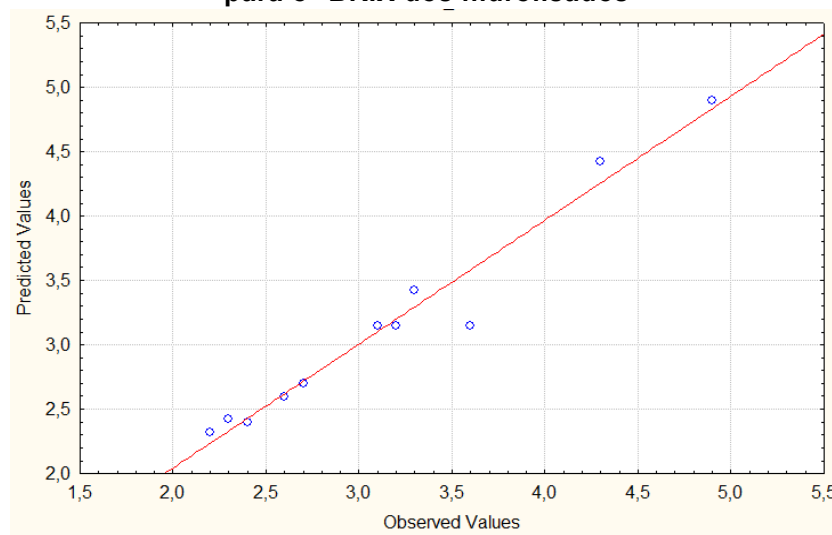
Y é o valor do ° BRIX;

T é a temperatura em valor codificado;

C é a concentração de ácido fosfórico em valor codificado.

A partir da equação 2 foi possível plotar gráfico de valores previstos pelo modelo *versus* valores obtidos experimentalmente para o °Brix dos hidrolisados (Figura 12).

Figura 12 - Valores previstos pelo modelo *versus* valores obtidos experimentalmente para o °BRIX dos hidrolisados



Fonte: Autoria própria

Os valores previstos e os valores obtidos para °Brix experimentalmente nos hidrolisados foram próximos, o que indica um bom ajuste do modelo, podendo

este, ser utilizado para prever valores de ° Brix a partir dos valores de temperatura e concentração de ácido, desde que estejam entre os limites de máximo e mínimo delimitados pelo modelo. Nesse cenário pode-se assumir que o ajuste linear se adequa para representar o comportamento dos graus Brix. O maior valor obtido para °Brix por meio da equação é 4,69 para temperatura e concentração de ácido no maior valor codificado (+1), respectivamente a 70 °C e 30%.

Os maiores valores de °Brix nos hidrolisados foram obtidos quando se utilizaram as maiores concentrações de ácido fosfórico no processo. Essa ação do ácido fosfórico sobre a hidrólise da lignocelulose foi observada por Zhang et al. (2007) em alta concentração, indicando que uma maior quantidade de ácido influencia consideravelmente na hidrólise do material lignocelulósico.

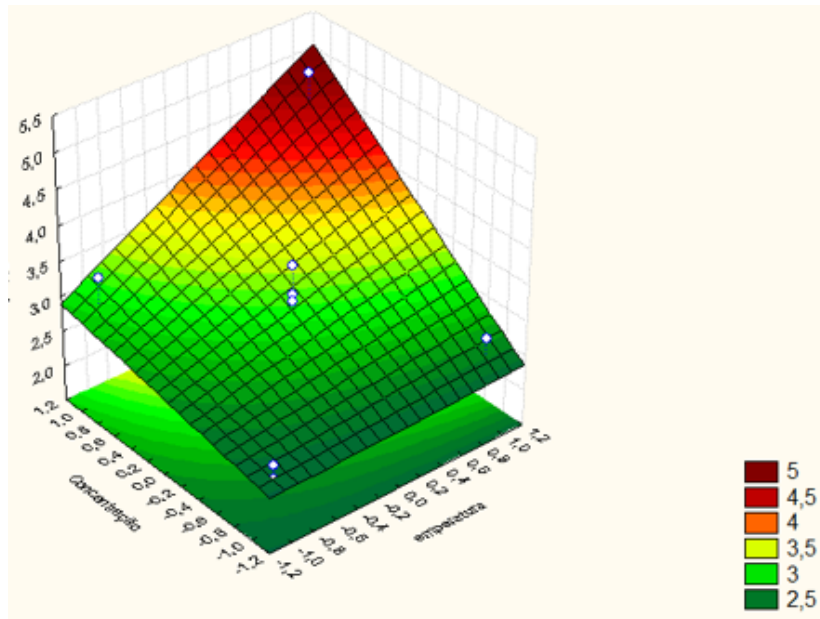
Em estudos realizados por Rabelo (2010) e Rabelo et al. (2014), o aumento da temperatura também aumenta a quantidade de glicose no meio quando realizada a hidrólise enzimática, além disto, o efeito principal da temperatura também se mostrou estatisticamente significativo quanto ao aumento de açúcares nos hidrolisados.

4.1.3 Superfícies de resposta do efeito combinado das variáveis na hidrólise em °Brix

Superfícies de resposta foram plotadas para avaliar o efeito combinado das variáveis estudadas e a significância estatística da concentração de ácido fosfórico, tempo de exposição ao ultrassom e temperatura de hidrólise nos valores de °Brix dos hidrolisados.

A superfície de resposta do efeito combinado da temperatura *versus* concentração, apresentada na Figura 13, indica que o teor de °brix dos hidrolisados aumenta com concentração de ácido fosfórico de 5 para 15%, e com o aumento da temperatura de 30 °C para 75 °C também há o aumento nos valores de °Brix da solução.

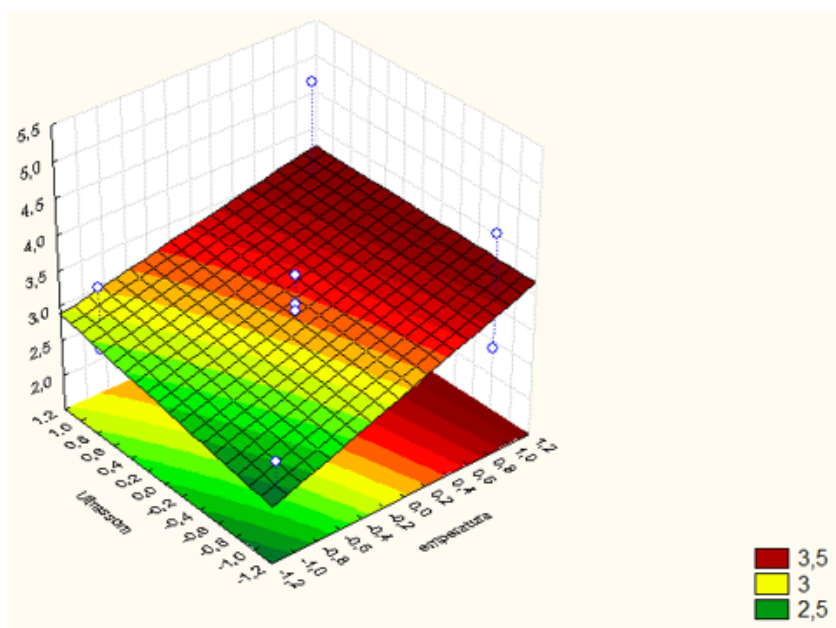
Figura 13 - Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura *versus* concentração na hidrólise em °BRIX



Fonte: Autoria própria

A superfície de resposta do efeito combinado da temperatura *versus* ultrassom apresentada na Figura 14, indica uma significativa influência da temperatura no °Brix da solução enquanto o ultrassom não demonstra este mesmo efeito.

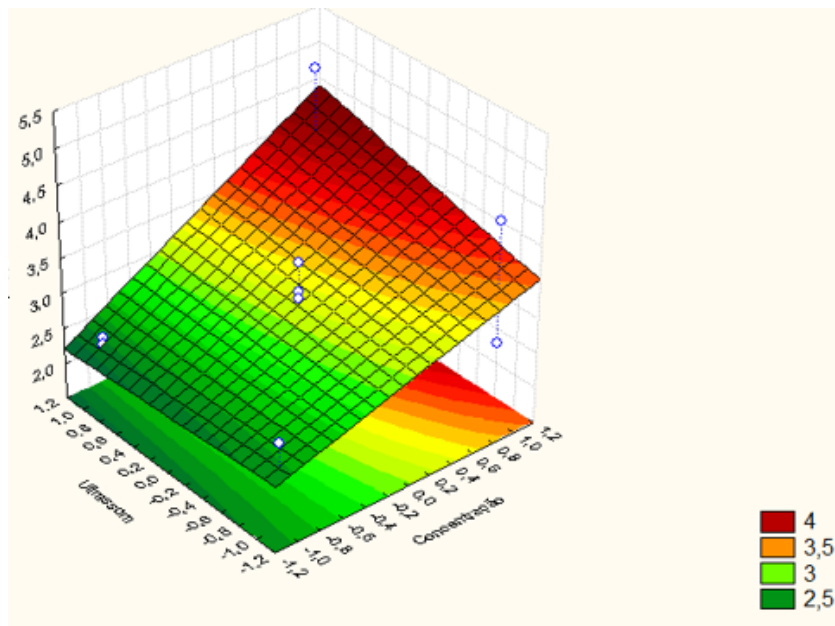
Figura 14 - Superfícies de respostas do efeito combinado da temperatura *versus* Ultrassom na hidrólise em °BRIX



Fonte: Autoria própria

A superfície de resposta do efeito combinado da concentração *versus* ultrassom apresentada na Figura 15, indica uma considerável influência da concentração de ácido durante hidrólise no °BRIX da solução, enquanto o ultrassom indica aumento no BRIX sem a mesma significância.

Figura 15 - Superfície de resposta do efeito combinado da concentração *versus* ultrassom na hidrólise em °BRIX



Fonte: Autoria própria

Os resultados obtidos nesta pesquisa não indicaram ação significativa do ultrassom na hidrólise de casca e palha de arroz, e estão em acordo com resultados obtidos por Perrone (2015) considerados desfavoráveis como pré-tratamento na hidrólise enzimática. Entretanto, os resultados obtidos estão em desacordo com Esfahani; Azin (2012), Belal (2013), Moscon (2014) e Moscon et al. (2015), que obtiveram aumento do rendimento de açúcares redutores.

4. 2 TEOR ETANOL 2G DOS FERMENTADOS

Os resultados do teor de etanol 2G nos fermentados de casca e palha de arroz correspondente a cada experimento do planejamento são apresentados na Tabela 5, apresentaram valores mínimos de $0,41 \text{ g kg}^{-1}$ de biomassa para amostra 7 e máximo de 10 g kg^{-1} de biomassa para amostra 6.

Tabela 5 - Valores médios de etanol 2G nos fermentados

Experimento Amostra	Média da concentração de etanol (g/kg de biomassa)	Desvio padrão	Desvio padrão relativo
1	4,52	0,36	7,88
2	0,82	0,28	34,57
3	1,23	0,20	16,03
4	1,87	0,27	14,43
5	1,30	0,13	9,76
6	10,01	0,68	6,83
7	0,41	0,01	3,31
8	1,41	0,17	11,75
9	9,73	0,67	6,86
10	1,57	0,11	7,02
11	1,39	12,95	9,31

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 5, observa-se os maiores rendimentos para produção de etanol nas amostras 6 e 9, tratadas com 15% de solução de ácido fosfórico e temperatura de hidrólise de 70 °C, porém em diferentes condições quanto ao tempo de exposição ao ultrassom em dez e 30 minutos respectivamente.

Os valores de produção de etanol obtidos (Tabela 6), foram submetidos a análise estatística no software STATISTICA v 5.0.

4.2.1 Análise ANOVA na produção etanol 2G nos fermentados

A partir da ANOVA dos valores da produção de etanol (Tabela 6), onde se observa que a temperatura é a única variável significativa para a produção de etanol, diferentemente do °BRIX onde a concentração e o efeitos combinado entre temperatura e concentração se mostraram significativos.

Tabela 6 - Tabela ANOVA para a produção de etanol 2G após fermentação.

Fator	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	p
(1) Temperatura	1	57,99	57,99	15,23	0,02
(2) Concentração	1	24,45	24,45	6,44	0,06
(3) Ultrassom	1	0,46	0,46	0,12	0,74
(1) - (2)	1	20,17	20,17	5,31	0,08
(1) - (3)	1	1,94	1,94	0,51	0,51
(2) - (3)	1	0,14	0,14	0,04	0,86
Erro	4	15,18	43,80		
Total	10	120,32			

Fonte: Autoria própria

A significância estatística da temperatura foi observada na Tabela 6 a partir do p-valor.

4.2.2 Análise dos efeitos na produção de etanol 2G nos fermentados

A análise dos efeitos das variáveis concentração de ácido fosfórico, temperatura e tempo de ultrassom na produção de etanol nos fermentados (Tabela 7), confirmam a significância do efeito da temperatura na produção de etanol em fermentados de casca e palha de arroz com valor de 3,91, e dos efeitos não significativo da concentração com valor de 2,54, e do ultrassom com valor de -0,35.

Tabela 7 - Tabela dos efeitos estimados para a produção de etanol 2G após fermentação

Média Global	3,17 ± 0,59	Significância	T (4)
(1) Temperatura	5,39 ± 1,38	Significativo	3,91
(2) Concentração	3,50 ± 1,38	Não significativo	2,54
(3) Ultrassom	-0,48 ± 1,38	Não significativo	-0,35
(1) - (2)	3,18 ± 1,38	Não significativo	2,31
(1) - (3)	-0,98 ± 1,38	Não significativo	-0,71
(2) - (3)	0,26 ± 1,38	Não significativo	0,19

Fonte: Autoria própria

Utilizando os valores obtidos pela análise ANOVA (Tabela 6) e da análise dos efeitos estimados (Tabela 7), observa-se que a temperatura de hidrólise foi a única variável significativa no rendimento de etanol do fermentado a partir de

matéria prima lignocelulósica de casca e palha de arroz. A equação representativa do modelo de pesquisa foi obtida desconsiderando os fatores não significativos, sendo apresentada na Equação 3.

$$Y = 3,1648 + 2,6923T \quad \text{Equação 3}$$

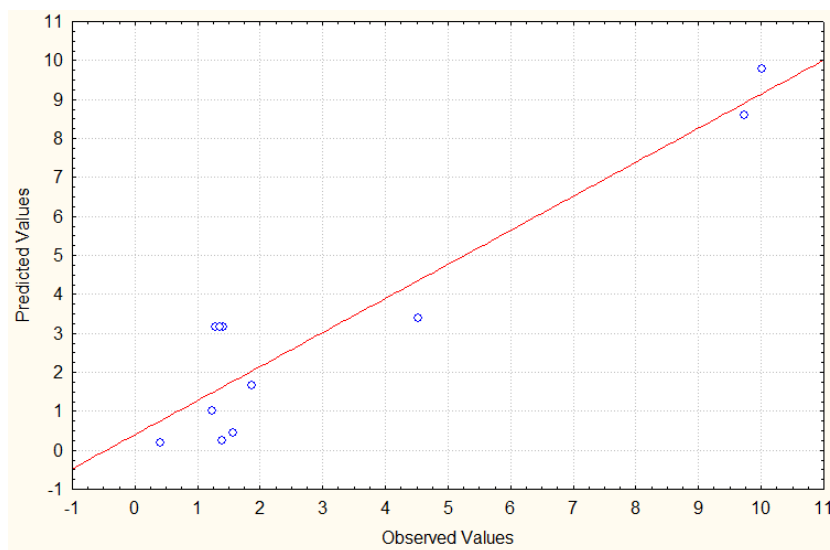
Onde:

- Y é a concentração de etanol;
- T é a temperatura em valor codificado.

A partir da equação 3 foi possível plotar um gráfico comparando os valores obtidos experimentalmente para o rendimento de etanol nos fermentados com aqueles obtidos no modelo (Figura 16).

Na figura 16 observa-se certo distanciamento entre os valores previstos e os valores obtidos experimentalmente, o que indica uma falta de ajuste no modelo proposto. Assim, não é indicado a utilização deste modelo para a predição da produção de etanol a partir da temperatura de hidrólise, mesmo que os valores se encontrem dentro dos limites estudados no modelo.

Figura 16 - Valores previstos pelo modelo *versus* valores obtidos experimental para a produção de etanol



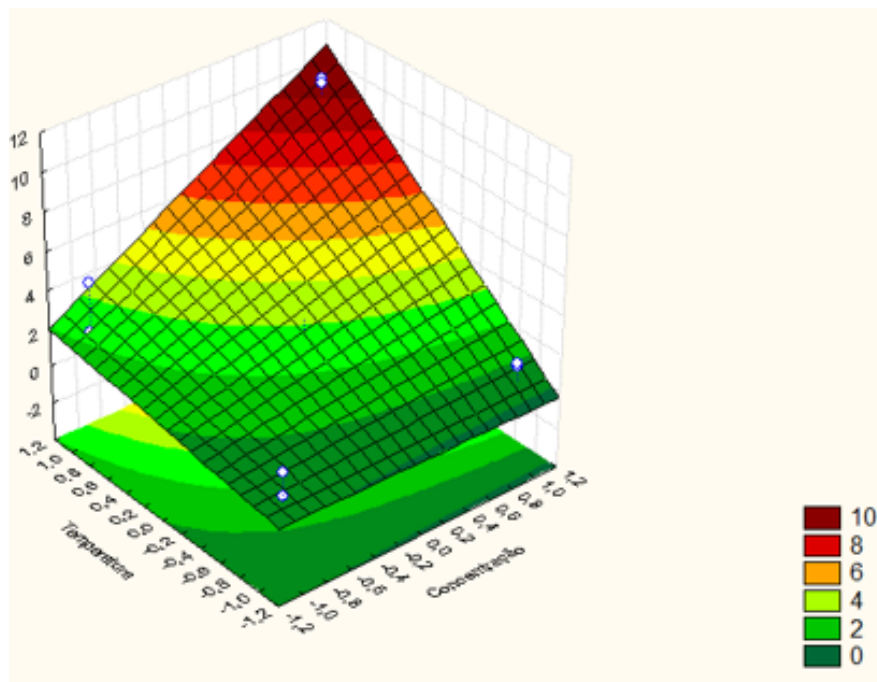
Fonte: Autoria própria

4.2.3 Superfícies de resposta do efeito combinado das variáveis no teor de etanol 2G dos fermentados

Superfícies de resposta foram plotadas para avaliar o efeito combinado das variáveis estudadas e a significância estatística da concentração de ácido fosfórico, tempo de exposição ao ultrassom e temperatura de hidrólise no rendimento de etanol dos fermentados.

Na Figura 17 observa-se um aumento no rendimento de etanol com o aumento da temperatura, de 30 °C para 75 °C, também é observado quanto ao aumento da concentração de ácido fosfórico no meio, de 5% para 15%. Entretanto, a análise estatística de dados indica que apenas a temperatura é estatisticamente significativa.

Figura 17 - Superfície de resposta do efeito combinado de temperatura versus concentração no teor de etanol 2G

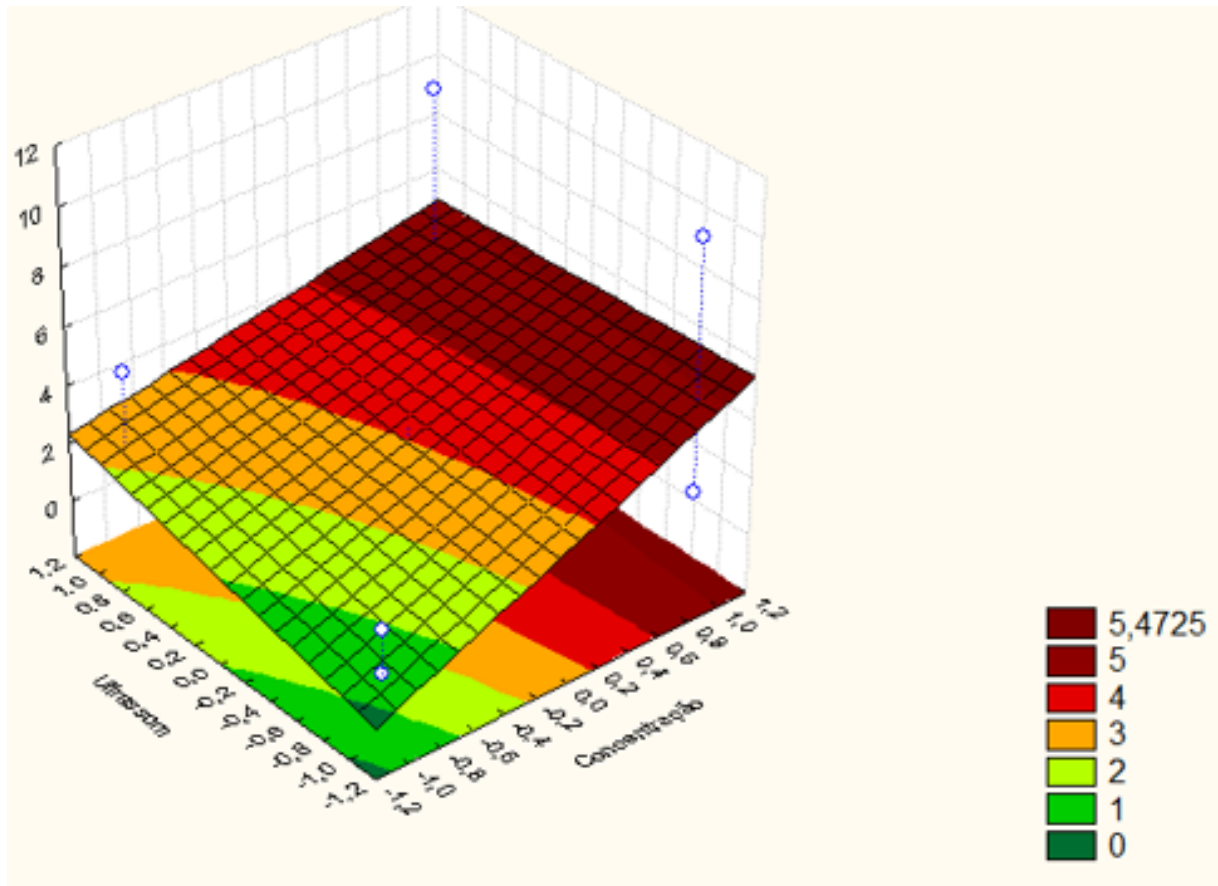


Fonte: Autoria própria

Na Figura 18, observa-se um aumento no rendimento de etanol com o aumento da concentração de ácido, de 5% para 15%, enquanto para o aumento no tempo de exposição ao ultrassom, de 10 minutos para 30 minutos não é observado. Entretanto para menores concentrações de ácido fosfórico no meio

observou-se um maior rendimento de etanol quando utilizados maiores tempos de exposição ao ultrassom.

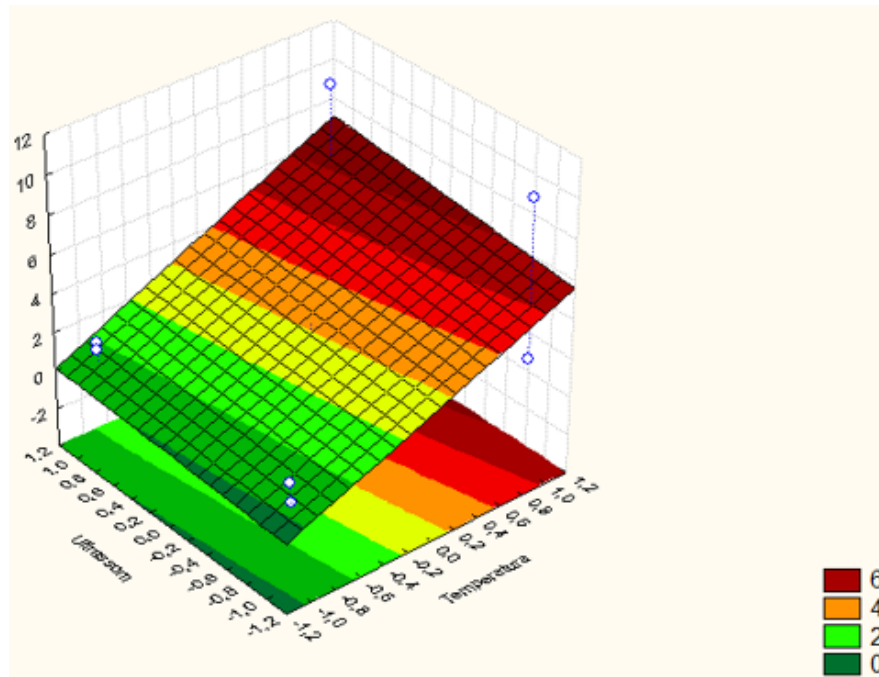
Figura 18 - Superfície de resposta do efeito combinado de concentração *versus* ultrassom no teor de etanol 2G



Fonte: Autoria própria

Na Figura 19 observa-se um aumento no rendimento de etanol no processo fermentativo com o aumento da temperatura de 30°C até 70°C. Enquanto, o aumento do tempo de exposição ao ultrassom de 10 a 30 minutos não se apresenta significativa no aumento no rendimento de etanol.

Figura 19 - Superfície de resposta do efeito combinado de temperatura versus ultrassom no teor de etanol 2G



Fonte: Autoria própria

A partir do conjunto de superfícies de respostas conclui-se que a temperatura de hidrólise tem o maior efeito sobre o rendimento fermentativo. A concentração também teve influência, mas não o suficiente para ser estatisticamente significativa na tabela ANOVA. Enquanto, o tempo de exposição ao ultrassom não contribuiu para o aumento na produção de etanol, ao contrário aumentou consideravelmente esse rendimento em baixa concentração de ácido no meio.

Esses resultados obtidos na produção de etanol em relação ao uso de ácido fosfórico (H_3PO_4) na hidrólise, apresentaram a mesma tendência de recomendação do uso de soluções diluídas conforme estudos anteriores (OROZCO et al., 2011; MOOD, et al., 2013).

Já os resultados obtidos na produção de etanol em relação ao uso do ultrassom na hidrólise podem ter ocorrido pelas mesmas razões apresentadas por Perrone (2015) ao considerar que o ultrassom foi desfavorável no pré-tratamento de hidrólise enzimática, em razão da formação de produtos inibitórios pela irradiação.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram avaliar o efeito de diferentes condições de hidrólise ácida de palha e casca de arroz para produção de etanol 2G por meio de planejamento experimental 2³.

A hidrólise realizada nas condições de temperatura de 70°C, 30 minutos de ultrassom e 15% de ácido fosfórico apresentou maior valor de °Brix obtido de 4,9. A análise estatística dos dados indicou que concentração de 15% de ácido fosfórico seguida da temperatura de 70 °C foram significativas. E, a análise dos efeitos estimados indicou que a temperatura de hidrólise, a concentração e a interação entre a temperatura e concentração foram estatisticamente significativas na hidrólise do material utilizado.

Após análise estatística dos dados em °Brix e a construção das superfícies de resposta confirmou-se que as variáveis estatisticamente significativas para hidrólise foram a temperatura e a concentração de ácido fosfórico no meio, assim como o efeito combinado entre as duas. Esses dados resultaram num modelo com bom ajuste entre os valores previstos e os valores obtidos experimentalmente, e indica que pode ser utilizado na predição de valores de °Brix, desde que estejam dentro dos limites estudados.

A produção de etanol obtida nas condições estabelecidas no planejamento experimental foi de 0,40 g kg⁻¹ de biomassa nas condições de 30 °C, 10 minutos de ultrassom e 5% de ácido fosfórico no meio a 9,73 g kg⁻¹ de biomassa, em condições de 70°C, 30 minutos de ultrassom e 15% de ácido fosfórico. A análise estatística dos dados, indicou que a temperatura foi estatisticamente significativa, enquanto concentração de ácido e o tempo de exposição ao ultrassom não tiveram significância nas condições estudadas.

Os resultados do modelo de comparação entre os valores de etanol obtidos experimentalmente e os valores obtidos apresentaram uma diferença significativa, cuja falta de ajuste não indica sua utilização na predição de valores do rendimento de etanol nos limites das variáveis estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABEDINIFAR, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. **Biomass Bioenergy**. v. 33, n.5, p. 828-833, 2009.
- ACHINAS, S.; EUVERINK G.J.W. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. **Electron J. Biotechnol.**, p.23:44-53, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP (a). **Biocombustíveis - O que são os biocombustíveis**. Disponível em <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis>. Acesso em nov 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP (b). **Etanol**. Disponível em <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/etanol>. Acesso em 5 nov. 2019.
- ALEN, R.; Basic Chemistry of wood delignification. **Papermaking Sci. Technology**., v.3. p.58, 2000.
- ALVIRA, E. P.; TOMÁS-PEJÓ, M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresour. Technol.** v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- BADIEI, M.; ASIM, N.; JAHIM, J.M, SOPIAN, K. Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. **Procedia Soc Behav Sci**, v. 9, p.170-174, 2014.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion And Management**, v. 52, n. 2, p.858-875, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H.; Öz C. Progress in bioethanol processing. **Prog Energy Combust Sci.**, 2008.
- BERTRAND, A. **Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse**. 1975. 291f. Tese (Doctorat d'État ès Sciences) - Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II, Talence.
- BELAL, E. Bioethanol production from rice straw residues. **Brazilian journal of microbiology**: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v.44, n.1, p.225-234, 2013.

BRETHAUER, S.; WYNAN, C. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Cioresource Technology**, California, v. 10, n.13, p4862-4874, 2009.

CADENAS, A.; CABEZUDO, S. Biofuels as Sustainable Technologies: Perspectives for Less Developed Countries. **Technological Forecasting And Social Change**, v. 58, n. 1-2, p.83-103, 1998.

CAMPOS, C. R.; SILVA, C. F.; DIAS, D. R.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; SCHWAN, R. F. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage cachaça in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 6, p. 1871-1879, 2010.

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamentals factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Duluth, v. 84-86, n. 1-9, p.5-37, 2000.

CARVALHO, A. M.; DANTAS, R. A.; COELHO, M. C.; LIMA, W. M.; SOUZA, J. P. S. P.; FONSECA, O. P.; GUIMARÃES JUNIOR, R. Teores de Hemicelulose, Celulose e Lignina em Plantas de Cobertura com Potencial para Sistema Plantio Direto no Cerrado. **EMBRAPA - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 290**, Embrapa Cerrados, Planaltina, Distrito Federal, 2010.

SOUSA, L. DA C.; CHUNDAWAT, S.P.; BALAN, V., DALE, B. E. 'Cradle-to-grave'assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 20, n.3, p.339-347. 2009.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Technology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, 2009.

DUARTE, W. F.; AMORIM, J.C.; SCHWAN, R.F. The effects of co-culturing non-*Saccharomyces* yeasts with *S. cerevisiae* on the sugar cane spirit (cachaça) fermentation process. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 175-194, 2013.

ESFAHANI, M. R.; AZIN, M. Pretreatment of sugar cane bagasse by ultrasound energy and dilute acid. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, Malden, v. 7, p. 274- 278, 2012.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DE SÃO PAULO (FIESP); **Outlook Fiesp 2023 projeções para o agronegócio brasileiro**; São Paulo; 2013.

FERNANDES, I.; SANTOS, E. C. A.; OLIVEIRA, R.; REIS, J. M.; CALHEIRO, D.; MORAES, C.A.M.; MODOLO, R.C.E. **Caracterização do resíduo industrial casca de arroz com vistas a sua utilização como biomassa**. Fórum Internacional de Resíduos Sólidos, 6. 2015, São José dos Campos. Anais eletrônicos. São José dos Campos: Instituto Venturi, 2015. Disponível em:<<http://www.institutoventuri.org.br/ojs/index.php/firs/article/view/616/476>>. Acesso em: 25 de novembro de 2018.

FERNANDES, L.; SABINO, M. G.; ROSSETTO, H. L. Método de extração de sílica da casca do arroz. **Cerâmica**, v. 60, n. 353, p.160-163, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT), 2018. Disponível em : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

GALLEGO-JUÁREZ, J. A.; RODRIGUES, G.; ACOSTA, V.; RIERA, E. Powerultrasonic transducers with extensive radiators for industrial processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, Coventry, v. 17, p. 953-964, 2010.

GALLETTI, A.M.R.; ANTONETTI, C. Biomass Pretreatment: Separation of Cellulose, Hemicellulose, and Lignin-Existing Technologies and Perspectives (From Biomass to Chemicals and Fuels), **Biorefinery**, 2012.

GARCIA, G. **Tratamento de caldo e tipos de fermentos sobre os componentes secundários e qualidade da cachaça de alambique**. 2016. 70 f. Tese (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

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

HARMSSEN, P.; HUIJGEN, W.J.J.; BERMUDEZ, L.; BAKKER, R. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, **ECN Biomass, Coal and Environmental Research**, 2010.

HSU, T.C.; GUO, G.L.; CHEN, W.H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** v.10, n13, p.4907-4913, 2010.

KIM, J.H.; BLOCK D.E.; MILLS, D.A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 88, n. 5, p. 1077-1085, 2010.

KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The physical and chemical effects of ultrasound. In: FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WEISS, J. eds. **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. New York: Springer, 2011.

KLEMM D., PHILIPP B., HEINZE T., HEINZE U., WAGENKNECHT W.,
Comprehensive Cellulose Chemistry, **Wiley - VCH**, Weinheim. 1998.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 48, n. 8, p.3713-3729, 2009.

LIMA, U.A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos** - Vol. 3 - Editora Edgard Blucher, 2001.

LINARES, J.C.L.; CARA, C.; CASTRO, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; MOYA, M. Fermentable sugar production from rapessed straw by dilute phosphoric acid pretreatment. **Journal of Cleaner Production**, v.66, 2014.

LU, X.; ZHANG, Y.; ANGELIDAKI, I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. **Bioresour. Technol.** v.100, n.12, p.3048-3053, 2009.

MARSHALL, W., E.; WADSWORTH, J., I. **Rice Science and Technology**. Nova Orleans, 1993, 470p.

MARTINEZ, M.; REIS, P.; SANTOS, D.; SCHMIDELL, W. Estudo da fermentação submersa não aerada por *saccharomyces cerevisiae* para determinação dos parâmetros de consumo de glicose e produção de glicerol e etanol. **Eclética Química Journal**, v. 39, n. 1, p.91-106, 2014.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. eds. **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. 1 ed. Washington: American Chemical Society, p.292-324. 1994.

MARTÍN, C.; THOMSEN, M.H.; HAUGGAARD-NIELSEN, H.; BELINDATHOMSEN, A. Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8777-8782, 2008.

MOOD, S.H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renew. Sust. Energy Rev.** 27, p. 77-93, 2013.

MOSCON, J. M. **Hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz usando tecnologias alternativas**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Processos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

MOSCON, J. M.; PRIAMO, W. L.; SILVA, J.R.F.; COLLAZZO, G. C.; FOLETTTO, E. L.; JAHN, S. L.; KUHN, R.C.; CANCELIER, A.; MAZUTTI, M. A. Hydrolysis of agricultural waste to obtain reducing sugars using conventional and ultrasound-assisted technologies. **GlobalNEST International Journal**, v.17, p. 816-824, 2015.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 96, n. 6, p.673-686, abr. 2005.

MUSSATTO, S. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p.1-10, maio, 2004.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU); Departamento e economia e assuntos sociais; **Population**, 2015. Disponível em : <http://www.un.org/en/sections/issues-depth/population/index.html>

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS(ONU); Departamento e economia e assuntos sociais; **World Populations Prospects** , 2019. Disponível em : <https://population.un.org/wpp/>

OLIVEIRA, M. E. S.; PANTOJA, L.; DUARTE, W. F.; COLLELA, C. F.; VALARELL, L. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

OROZCO, A.M.; AL-MUHTASEB, ALA'A H.; ALBADARIN, A. B.; ROONEY, D.; WALKER, G. M.; AHMAD, M. N. M. Diluted phosphoric acid-catalysed hydrolysis of municipal bio-waste wood shavings using autoclave parr reactor system. **Bioresource Technology**, v.102, 2011a.

OROZCO, A. M.; AL-MUHTASEB, ALA'A H.; ALBADARIN, A. B.; ROONEY, D.; WALKER, G. M.; AHMAD, M. N. M.. Acid-catalyzed hydrolysis of cellulose and cellulosic waste using a microwave reactor system. **J. RSC Advances**, v. 5, 2011b.

PAIVA, J. M. F.; TRINDADE, W.G.; FROLLINI, E. Compósitos de matriz termofixa fenólica reforçada com fibras vegetais. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n.2, p 170-176, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p.25-33, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 38, p. 53-87, 1989.

PEREIRA, J.E.S. **Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catalise enzimática**. Dissertação de mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifca Universidade Católica do Rio Grande do Sum, 2013.

PERRONE, O. M. **Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratada com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

PIETROBON, V. C. **Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais**. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PÚPPAN, D., Environmental Evaluation of Biofuels, **Period Polytechnica**, v. 10, n. 1, p. 95-116, 2002.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzmática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RABELO, S. C.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C.; Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p 349-357, 2014.

REIS, A. S.; SILVA, N. C.; NEVES, U. M. produção de carvão ativado a partir de casca de arroz. **Desafios**, v. 2, p. 89-103, dez. 2015.

ROSSELL, C. E. V. **Fermentação do hidrolisado**. Workshop do Projeto Diretrizes de Políticas Públicas para a Agroindústria Canavieira de São Paulo: Hidrólise.São Paulo, 2006.

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B. GOUVEIA; ; E.; R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces Cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.75-80, 2010

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da Palha de Cana de Açúcar para Produção de Etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004- 1010, 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energy*, 37(1), p.19-27, 2012.

SATYANARAYANA, K. *Studies of Lignocellulosic Fibers of Brazil. Part I: Source, Production, Morphology, Properties and Applications. Composites: ScienceDirect*, Parte A, v.38, p.1694-1709, Curitiba, 2007.

SOUSA, L. DA C.; CHUNDAWAT, S.P.; BALAN, V., DALE, B. E., 'Cradle-to-grave'assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 20, n.3, p. 339-347, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresour. Technol.** v. 83, n.1, p.1-11, 2002.

SZZODRAK, J., FIRDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**. 1996.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **Int. J. Mol. Sci.**v.9, n.9, p.1621-1651, 2008.

THORNEYCROFT, J.; BARNABY, S. W. Torpedo-boat destroyers. **Institution of Civil Engineers**, Oxford, v. 122, p. 51-103, 1895.

THOMPSON W.; MEYER, S. Second generation biofuels and food crops: Co-products or competitors, **Glob Food Sec.**p.89-96, 2013.

UKITA, M.; IMAI, T.; HUNG, Y.-T. Food waste treatment. In: WANG, L. K.; HUNG, Y.-T.; LO, H. H.; YAPIJAKIS, C. eds. **Waste treatment in the food processing industry**. 1 ed. New York: Taylor and Francis Group, p. 1-29, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE(USDA); Economic Research Service, **Rice Yearbook**, 2017. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/data-products/rice-yearbook/>

Silva, S. S. da; Felipe, M. das G. A.; Canilha, L. **Processo de obtenção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar**. Universidade de são Paulo (USP). BR nº 102016029286-7 A2, mar. 2017.

WAN, Y. C.; ZHOU, Y. L. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresour. Technol.** v.102, n.10, p. 6254-6259, 2011.

WANG, Z.; KESHWANI, D.R.; REDDING, A. P.; CHENG, J.J. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresour. Technol.** v.101, n.10, p.3583-3585, 2010.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R.T; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p.1959-1966, 2005.

XU, J.; CHENG, J.J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. **Bioresour. Technol.** v.102, n.4, p.3861-3868, 2011.

YOSWATHANA, N.; PHURIPHIPAT, P.; TREYAWUTTHIWAT, P.; ESHTIAGHI, M. Bioethanol production from rice straw. **Energy Res. J.** v.1, p.26-31. 2010.

ZHANG, Y. H. P.; DING, S. Y.; MIELENZ, J. R.; CUI, J. B.; ELANDER, T. T.; LASER, M.; HIMMEL, M. E.; MCMILLAN, J. R.; LYND, L. R.; Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions. **Biotechnol. Bioeng.** v. 97, n.2, p. 214-223, 2007.

ZHANG, D. N.; Guo, X. Y.; Yang, Q. H.; Chen, Z. G.; Tao, L. J. An efficient enzymatic modification of cordycepin in ionic liquids under ultrasonic irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**,v. 21, n, 5, p.1682-1687, 2014.

fBione the straw of estdore s