UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ISABELA SILVEIRA FERREIRA

Estudo da produção de etanol a partir das frações açucaradas da palha de arroz

Lorena – SP

2018

ISABELA SILVEIRA FERREIRA

Estudo da produção de etanol a partir das frações açucaradas da palha de arroz

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorado em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profª. Drª. Inês Conceição Roberto

Versão Corrigida

Lorena - SP

2018

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Isabela Silveira
Estudo da produção de etanol a partir das frações açucaradas da palha de arroz / Isabela Silveira Ferreira; orientadora Inês Conceição Roberto - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
151 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Palha de arroz. 2. Pré-tratamento. 3. Hidrólise enzimática. 4. Etanol. I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

Dedico esta tese aos heróis,
Sukarno Olavo Ferreira e Regina Fátima Silveira Ferreira.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sukarno Olavo Ferreira e Regina Fátima Silveira Ferreira, pelo amor incondicional, carinho, apoio e incentivo constante e por me mostrarem "I can always come back home".

À Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, pela orientação, pela dedicação, o comprometimento e esforço para a realização deste trabalho.

A minha querida irmã, Marina, pelas parcerias e brigas,e principalmente por me lembrar sempre "We can do whatever we want to".

À toda minha família.

Aos grandes amigos que sabem a barra que é gostar de mim, Fernanda, Larissa e a Angela também.

Aos integrantes do quarteto do LabFantástico, Rafael, Túlio e Bruno, que fizeram meus dia de trabalho muito mais divertido.

Meus amigos de laboratório, em especial, João por estar sempre presente e pronto pra ajudar a qualquer instante e Amanda minha ICzinha.

Aos amigos da BQI "só para os fortes", por estarem sempre me apoiando, por me mostrarem que se tudo der errado ainda podemos vender coco na praia.

Aos amigos de Lorena, Alana, Gabriela, Guilherme, Isabelle, Izabela, Juliana, Luisa, Marcela, Otávio, Sara, Túlio, que acompanharam a cada jornada e baladinha.

À todos os amigos do Departamento de Biotecnologia pela troca de ideias e experiências, pelos momentos de confraternização e amizade, em especial, André, Andrés, Cláudio, Diego, Felipe, Gilda, Itzco, Javier, Lívia, Lucas, Luiz, que fizeram cada dia valer a pena.

À todos os professores, funcionários e alunos da Escola de Engenharia de Lorena, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

"I'm only human after all..."

RESUMO

FERREIRA, I. S. **Estudo da produção de etanol a partir das frações açucaradas da palha de arroz.** 2018. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

Neste trabalho foi avaliada a produção de etanol a partir da palha de arroz por processo de sacarificação e fermentação em separado (SHF). Para isto, a biomassa foi processada em quatro etapas: 1) tratamento alcalino, para solubilização de grupos acetil (desacetilação) e parcial remoção de lignina e cinzas e; 2) tratamento ácido, para separação da hemicelulose; 3) hidrólise enzimática, para conversão da celulose em glicose 4) fermentação dos hidrolisados açucarados obtidos. O rendimento de cada etapa, assim como, a composição química das frações obtidas (sólido e líquido) foram determinadas. O tratamento ácido teve como objetivo estabelecer uma condição de tratamento para palha de arroz, previamente tratada com álcali, visando eficiente solubilização da hemicelulose, sem contudo, ocasionar grandes perdas no teor de celulose no sólido. O estudo de temperatura, concentração de ácido e tempo foi feito em reator de aço inox com capacidade de 0,5 L. O processo de hidrólise ácida nas condições otimizadas (85 mg de H_2SO_4/g biomassa, 10% de sólidos, 150 ºC por 10 min em reator 80 L) revelou uma elevada solubilização da hemicelulose (RHH = 94%) e a obtenção de um hidrolisado com menor carga de compostos inibidores. Nestas condições, a composição da celulignina foi de 58,2 de celulose, 19,4 de lignina e 5,9 de hemicelulose m/m. Em seguida, foi então avaliado o processo de sacarificação enzimática da celulignina com altos teores de sólidos (16; 20 e 24% m/v) empregando um reator do tipo Moinho de Bolas Verticais (MBV). Para estes ensaios foram utilizadas as seguintes condições: carga enzimática de 29,5 FPU por grama de celulose, 30 esferas de vidro, temperatura de 46 °C e agitação de 100 rpm. O rendimento de hidrólise enzimática (RHE) em batelada simples foi reduzido de 80 para 72%, com o aumento do teor de sólidos de 16 para 24% m/v. Porém, a condução do processo em batelada alimentada foi capaz de contornar os problemas de mistura causados pelo efeito dos sólidos, o que possibilitou atingir um valor de RHE de 78%, a partir de 24% m/v de substrato. O estudo da fermentabilidade do hidrolisado celulósico (HC) por *Kluyveromyces marxianus* revelou uma melhor performance do processo na ausência dos sólidos residuais, sendo ainda necessária sua suplementação nutricional. Neste hidrolisado, em reator MBV, a produção de etanol atingiu de 32 g/L a partir de 110 g/L de glicose, o que correspondeu a uma eficiência de 67% e produtividade volumétrica de 3,1 g/L.h. Já a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico por *Scheffersomyces stipitis* não foi melhorada com suplementação nutricional e a produção de etanol alcançou 12 a partir de 50 g/L de xilose, o que correspondeu a uma eficiência de 45% e produtividade volumétrica de 0,2 g/L.h, utilizando frascos Erlenmeyer. Com estes resultados e a partir dos rendimentos obtidos em cada etapa do processamento da palha de arroz, foi desenvolvido um balanço de massa para produção global de etanol, foi possível obter 9 g de etanol a partir de 100 g de palha. Em função destes resultados, conclui-se que a palha de arroz é um subproduto agrícola com grande potencial para ser explorado como matéria-prima em biorrefinarias, especialmente para a produção de etanol sendo ainda necessários estudos com vistas a melhorias no processo enzimático e fermentativo.

Palavras chave: Palha de arroz. Pré-tratamento. Hidrólise enzimática. Etanol.

ABSTRACT

FERREIRA, I. S. **Study of ethanol production using rice straw sugar fractions.** 2018. 151 p. Thesis (Doctoral of Science). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

In this work ethanol production from rice straw sugar fractions by saccharification and separate fermentation (SHF) was evaluated. The biomass was treated in four steps: 1) alkaline treatment, for acetyl solubilisation (deacetylation) and partial removal of lignin and ashes; 2) acid treatment, for hemicellulose separation; 3) enzymatic hydrolysis, to convert cellulose in glucose and 4) fermentation of the obtained sugars from rice straw hydrolyzate. In each step, the yield and chemical composition of liquid and solid fractions were determinate. Acid treatment goal was to establish a condition for rice straw previously treated with alkali, aiming at the efficient solubilization of hemicellulose, without causing high losses in the cellulose content in the solid. The study of temperature, acid concentration and time was done in a stainless steel reactor with a capacity of 0.5 L. The process of acid hydrolysis under optimized conditions (85 mg of H_2SO_4/g biomass, 10% de solids, 150 ºC for 10 min in a 80 L reactor) resulted in a high hemicellulose solubilisation (RHH = 94 %) and in a hydrolysate with low charge of inhibitors compounds. Under these conditions, the cellulignin composition was 58.2 cellulose, 19.4 lignin and 5.9 hemicellulose w/w. After that, the use of high solids contents in the process of enzymatic saccharification of the pretreated biomass was evaluated using high solids (16; 20 and 24% m / v) using a Vertical Ball Mill (MBV). The following conditions were used for these assays: enzymatic loading of 29.5 FPU per gram of cellulose, 30 glass beads, temperature of 46 ºC and stirring at 100 rpm. Increasing solid content from 16 to 24% w/v resulted in a reduction of enzymatic hydrolysis yield (HSR), from 80% to 72%. However, the fed batch process overcame the mixing problems caused by the solids, reaching a RHE value of 78%, using 24% w/v of the substrate. The study of the cellulose hydrolyzate (HC) fermentability by *Kluyveromyces marxianus* revealed that the best process condition was in the absence of the residual solids and nutritional supplementation was still necessary. In this hydrolyzate, the ethanol production reached 32 g/L, from 110 g/L glucose, an efficiency of 67% and volumetric productivity of 3.1 g/L.h using MBV reactor. However, the fermentability of the hemicellulosic hydrolyzate by *Scheffersomyces stipitis* was not improved by nutritional supplementation and ethanol production reached 12.0 from 50 g/L xylose, an efficiency of 45% and volumetric productivity of 0.2 g/L.h, using Erlenmeyer flasks. With these results and from the yields obtained in each step of the processing of rice straw, a mass balance was developed for the global production of ethanol, it was possible to obtain 9 g of ethanol from 100 g of straw. Due to these results, it was concluded that rice straw is an agricultural byproduct with great potential to be exploited as a raw material in biorefineries, especially for the production of ethanol. More studies are still required to optimize the enzymatic and fermentative process.

Key word: Rice straw. Pretreatment. Enzymatic hydrolysis. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do material lignocelulósicos 25
Figura 2 - Cadeia de glicose formando unidades de celulose através de ligação glicosídica β(1→4) (A) e ligação de hidrogênio (pontilhado) inter e intramolecular presentes na celulose (B). 25
Figura 3 - Estrutura parcial da molécula de arabinoxilana. 26
Figura 4 - Principais monômeros que consistem a molécula de lignina (a) álcool trans-p-cumaríl, (b) álcool coniferil e (c) álcool trans-sinapil. 27
Figura 5 – Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. 29
Figura 6 - Principais compostos formados a partir da degradação das frações açúcaadas e da lignina. 33
Figura 7 - Esquema de degradação da celulose por fungos, celobiohidrolase (CBH); endoglucanase (EG), β-glicosidase (BGL); celobiohidrolases (CDH); mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO). 37
Figura 8 - As três fases da hidrólise enzimática da celulose. 38
Figura 9 - Vias para fermentação de xilose, (a) em bactérias, (b) em fungos e leveduras em geral e (c) em Pichia stipitis. 43
Figura 10 - Reator de aço inoxidável de 50 litros de capacidade, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo. (1) boca de carga; (2) válvula de descarga; (3) manômetro; (4) termopar; (5) controle de temperatura; 6) sistema de agitação. 52
Figura 11 - Reator de aço inox com capacidade de 0,50 litros. 52
Figura 12 - Curva de calibração da temperatura do banho em função da temperatura de reação. 53
Figura 13 - Reator de aço inoxidável de 80 litros capacidade, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo. 55
Figura 14 - Reator Moinho de Bolas Vertical (MBV) em imagem real (A) e esquemática (B) para mostrar os detalhes internos. (1) entrada e (2) saída de água para o controle da temperatura; (3) duto de amostragem; (4) porta de adição de substrato, enzimas e levedura; (5) porta de saída de gases; (6) motor de agitação; (7) impelidor de pás planas e esferas. 56
Figura 15 - Valores de absorbância a 600 nm em função da concentração celular de K. marxianus (■) e S. stipitis (●). 63

Figura 16 - Curva padrão para converter absorbância em açúcares redutores. 68
Figura 17 - Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de FPAse para diferentes diluições do extrato enzimático. 69
Figura 18 - Curva de calibração para converter absorbância em concentração de pNP. .. 70
Figura 19 - Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β-glicosidases na diluição de 50.000 vezes para o extrato enzimático obtido. 70
Figura 20 - Perfil da cinética de aquecimento nas diferentes temperaturas utilizadas no planejamento de experimentos, sendo 150 °C (▬), 160 °C (▬) e 170 °C (▬), as setas indicam o periodo selecionado para a hidrólise ácida. 76
Figura 21 - Composição química da palha de arroz tratada com álcali após o tratamento ácido, sob diferentes condições operacionais, sendo a celulose (■), hemicelulose (■), lignina (■) e cinzas (■). As linhas tracejadas mostram a composição da palha tratada apenas com álcali, anterior ao tratamento ácido. 78
Figura 22 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos no planejamento quanto ao teor de glicose (■),xilose (■) e arabinose (■), rendimento de hidrólise da hemicelulose (▬)e severidade (indicada na parte superior das barras) nas diferentes condições do planejamento. 79
Figura 23 - Correlação entre rendimento de hidrólise enzimática (**A**) e seletividade (**B**) com a severidade. 80
Figura 24 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos no planejamento quanto ao teor de subprodutos álcool vanilil (■), ácido vanílico (■) e pirocatecol (■) (**A**); siringaldeído (■), ácido p-cumárico (■) e ácido ferúlico (■) (**B**); ácido furóico (■), HMF (■) e furfural (■) (**C**) e severidade (indicada na parte superior das barras) nas diferentes condições do planejamento. 82
Figura 25 - Correlações entre os teores de açúcares e de seus produtos de degradação nas condiçõespropostas no planejamento. 83
Figura 26 - Proporção de recuperação de celulose (A) e hemicelulose (B) na celulignina (■), no hidrolisado hemicelulósico (■) e a perda da fração açúcarada (■), durante o processamento da palha de arroz. 84
Figura 27 - Correlação entre rendimento de hidrólise enzimática e a hemicelulose recuperada na celulignina (**A**) e a severidade com a recuperação total das frações açucaradas (**B**). 85

Figura 28 - Gráfico de Pareto para o rendimento de hidrólise da hemicelulose (A), furanos (B), fenólicos (C), celulose recuperada (D) e sólidos recuperados (E) de acordo com planejamento fatorial proposto. 88
Figura 29 - Superfície de resposta do rendimento de hidrólise da hemicelulose (A), furanos (B), fenólicos (C), celulose recuperada (D) e sólidos recuperados (E) no planejamento fatorial proposto. 91
Figura 30 - Composição química da palha de arroz tratada com álcali após o tratamento ácido, hemicelulose (■), lignina (■), cinzas (■) e celulose (■). 94
Figura 31 - Teor de glicose (■), xilose (■) e arabinose (■) e rendimento de hidrólise da hemicelulose (● e linha de tendência ▬) presentes no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C. 94
Figura 32 - Liberação de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C. 95
Figura 33 - Liberação de furanos no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C, sendo ácido furóico (■), furfural (■) e HMF (■). 95
Figura 34 - Liberação de fenólicos no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C, sendo siringaldeido (■), ácido vanílico (■), ácido p-cumárico(■), ácido ferúlico (■) e pirocatecol (■). 95
Figura 35 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de palha de arroz: in natura (A), tratada com álcali (B) e tratada com álcali e ácido (C). Ampliação: 50 vezes (lado esquerdo) e 2000 vezes (lado direito). 101
Figura 36 - Difratograma de raios-X das amostras de palha de arroz: in natura (preta), tratada com álcali (vermelha) e tratada com álcali e ácido (azul). 103
Figura 37 - Perfil de liberação da glicose (linha sólida) e celobiose (linha tracejada) (**A**), xilose (**B**), rendimento de hidrólise da celulose (**C**) empregado na hidrólise enzimática de palha de arroz tratada com álcali e ácido: batelada contendo 16% m/v (■), batelada contendo 20% m/v (●) e batelada contendo 24% m/v (▲). E a correlação da liberação de glicose e celobiose (■) e rendimento de hidrólise enzimática (●) com o teor de sólidos (**D**). 105
Figura 38 - Perfil de liberação da glicose (**A**) e celobiose (**B**) durante a hidrólise enzimática de palha de arroz tratada com álcali e ácido: batelada simples em reator contendo 16% m/v (■) e batelada alimentada em reator contendo inicialmente 16% m/v, e adição de 4% m/v após 10 h e 24 h, totalizando 24% m/v (●). 110

Figura 39 - Densidade aparente da palha de arroz tratada com álcali (PT_{NaOH} ácido (PT_{H2SO4}) e na álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$). Sem compactação (A) e compactada (B). 111
Figura 40 - Absorção de água no teor de 16% m/v na palha de arroz tratada com álcali (PT_{NaOH}), ácido (PT_{H2SO4}) e álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$). Ao adicionar a água (A) e 10 min após a adição (B). 112
Figura 41 - Perfil de liberação da glicose (linha sólida) e celobiose (linha tracejada) (**A**), xilose (**B**) e rendimento de hidrólise da celulose (**C**) na hidrólise enzimática da palha de arroz tratada com álcali e ácido (■), tratada apenas com ácido (●) e tratada apenas com álcali (▲). 113
Figura 42 - Diagrama do balanço de massa para as condições otimizadas do processamento sequencial (álcali + ácido) da palha de arroz. 117
Figura 43 - Diagrama do balanço de massa na condição otimizada do processamento da palha de arroz, que passou apenas por umaetapa. 118
Figura 44 - Consumo de glicose (**A**) e formação de etanol (**B**) por K. marxianus empregando o slurry celulósico (SC) sem nutriente (■) e com nutriente (●) e o hidrolisado celulósico (HC) sem nutriente (▲) e com nutriente (▼) obtidos a partir da hidrólise enzimática com 24% m/v da palha de arroz pre-tratada. 119
Figura 45 - Consumo de glicose, celobiose (■) e xilose (►) (**A**), produção de etanol (**B**), crescimento celular (**C**), formação de ácido acético (linha sólida) e glicerol (linha tracejada) (**D**) por Kluyveromyces marxianus empregando hidrolisado celulósico de palha de arroz (●) e meio semidefinido (■). 122
Figura 46 - Consumo de glicose (linha tracejada) e xilose (linha sólida) (**A**) e produção de etanol (**B**) por S. stipitis empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz suplementado (■), não suplementado (●) e meio semidefinido (▲). 129
Figura 47 - Diagrama do balanço de massa em função dos açúcares monoméricos disponíveis em cada fração para as condições otimizadas do processamento da palha de arroz tratada com álcali e ácido até etanol. 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais aplicações da palha de arroz 28
Tabela 2 - Principais pré-tratamento.....30
Tabela 3 - Resumo das principais aplicações industriais de K. marxianus. 46
Tabela 4 - Planejamento composto de face centrada do tipo 2^2, para a avaliação do efeito do pré- tratamento ácido variando temperatura/H_2SO_4.....54
Tabela 5 - Composição química, massa recuperada e porcentagem de recuperação das frações da palha de arroz antes e após o tratamento alcalino. 74
Tabela 6 - Composição química do licor alcalino e porcentagem de solubilização das frações da 75
Tabela 7 - O rendimento de hemicelulose, concentração de furanos e fenólicos, perda de celulose e massa recuperada, respectivamente, nas diferentes condições avaliadas de acordo com planejamento fatorial. 87
Tabela 8 - Efeitos estimados das variáveis no nível de 95% de confiança para o rendimento de recuperação de hemicelulose, concentração de furanos e fenólicos, recuperação de celulose e massa recuperada de acordo com planejamento fatorial proposto. 89
Tabela 9 - Resumo do nível ótimo de cada variável dependente para maximizar o desempenho do pré-tratamento com ácido diluído. 92
Tabela 10 - Condição otimizada as respostas previstas pelo modelo assim como a confirmação do modelo estão apresentadas. 92
Tabela 11 - Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção de cada fração durante o processamento da palha de arroz tratada com álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$). 97
Tabela 12 - Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção de cada fração durante o preocessamento palha de arroz tratada apenas com ácido (PT_{H2SO4}).....98
Tabela 13 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico após o tratamento ácido, na condição otimizada em diferentes tempos. 99
Tabela 14 - Intensidade do pico de difração que representa o material cristalino e o vale mínimo do halo que representa o material amorfo e índice de cristalinidade das amostras de palha de arroz: in natura, tratada com álcali e tratada com álcali e ácido. 103
Tabela 15 - Parâmetros obtidos nas diferentes formas de condução do processo de hidrólise enzimática empregando o teor de sólidos de 24% (m/v). 108

Tabela 16 - Eficiência de recuperação em cada fração obtida em cada tratamento.....116
Tabela 17 - Parâmetros fermentativos da produção de etanol por K. marxianus NRRL Y-6860 nos diferentes meios avaliados. 120
Tabela 18 - Parâmetros fermentativos da produção de etanol por K. marxianus NRRL Y-6860 nos diferentes meios avaliados. 124
Tabela 19 - Parâmetros fermentativos da produção de etanol a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas empregando diferentes configurações de processo para produção de etanol. 126
Tabela 20 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico após o tratamento ácido, na condição otimizada em diferentes tempos. 128
Tabela 21 - Parâmetros fermentativos de S. stipitis em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (com e sem suplementação nutricional) e em meio semi sintético contendo xilose e glicose como fonte de carbono. 130
Tabela 22 - Processamento da palha de arroz empregando diferentes configurações de processo.....135

ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BGL	β:glicosidases
C5	hidrolisado hemicelulósico
CBH	Exoglucanases ou celobiohidrolases
CDH	celobiose desidrogenases
CONAB	Companhia Nacional de Abastacimento
DMKU 3:104	linhagem de *K. marxianus*
DO_{600}	densidade ótica a 600 nm
EG	Endoglucanases
FPA	filter paper activity
FPU	Unidade de papel de filtro
GRAS	Generally Recognized as Safe
HC	Hidrolisado celulósico
HCBA	hidrolisados celulósicos obtidos por batelada alimentada em reator MBV
HCBS	hidrolisados celulósicos obtidos por batelada simples em reator MBV
$HH_{NaOH+H2SO4}$	hidrolisado obtido pelo tratamento da palha de arroz tratada com álcali e ácido
HMF	hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
IIPE453	linhagem de *Klyuveromyces* sp.
LOT	Laboratórios de Fermentação do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).
LPMOs	mono:oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre
MBV	Moinho de Bolas vertical
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MS	meio semidefinido
η	eficiência do processo
NBRC1777	linhagem de *K. marxianus*

NREL	*National Renewable Energy Laboratory*
NRRL Y:6860	linhagem termotolerante de *K. marxianus* obtida da Coleção de Culturas ARS, Peoria – IL, EUA
NRRL Y:7124	*Scheffersomyces stipitis*, fornecida pela USDA de Peoria, Illinois.
PD	palha de arroz tratada com álcali
PT_{NaOH}	palha de arroz tratada com álcali
PT_{H2SO4}	palha de arroz tratada com ácido
$PT_{NaOH+ H2SO4}$	palha de arroz tratada com álcali e ácido
Q_P	produtividade volumétrica em etanol
QPS	Qualified Presumption of Safety
RCC	rendimento de conversão da celulose
RHE	rendimento de hidrólise enzimática
RHH	rendimento de hidrólise da hemicelulose
rpm	rotações por minuto
SC	*Slurry* celulósico
Sev	fator de severidade combinada
SHF	processo de sacarificação e fermentação em separado
SSF	processo de sacarificação e fermentação simultânea
STR	biorreator convencional
USDA	United States Department of Agriculture
UTM	*Universal Transversa de Mercator*
$Y_{P/S}$	fator de conversão de substrato em etanol
$Y_{P/X}$	fator de conversão de células em etanol
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em células
ρNP	ρ-nitrofenolato
ρNPG	ρ:nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....24
2.1 Palha de arroz.....24
2.2 Métodos de Pré-tratamento da Biomassa.....28
2.2.1 Solubilização da Hemicelulose.....31
2.3 Hidrólise da celulose.....36
2.3.1 Alto teor de sólidos na hidrólise enzimática.....40
2.4 Fermentação alcoólica – Aspectos Gerais.....42
2.4.1 Fermentação de pentoses.....43
2.4.2 Fermentação de hexoses.....45
3 OBJETIVO.....50
4 METODOLOGIA.....51
4.1 Obtenção da matéria-prima.....51
4.2 Pré-tratamentos.....51
4.2.1 Pré-tratamento alcalino.....51
4.2.2 Tratamento ácido.....52
4.2.3 Curva de tempo na condição otimizada de pré-tratamento ácido.....55
4.2.4 Aumento de escala na condição otimizada de pré-tratamento ácido.....55
4.3. Hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada.....56
4.4 Fermentação da fração celulósica.....58
4.4.1 Micro-organismo.....58
4.4.2 Preparo do inóculo.....58
4.4.3 Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico sobre a fermentação alcoólica de *K. marxianus*.....59
4.4.4 Estudo cinético da bioprodução de etanol em reator de bancada.....59
4.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico.....60
4.5.1 Micro-organismo.....60
4.5.3 Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico sobre a fermentação alcoólica de *S. stipitis*.....61
4.6. Acompanhamento analítico dos experimentos.....61
4.6.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz.....61
4.6.2 Determinação do teor de extrativos.....61

4.6.4 Determinação dos teores dos açúcares, ácido acético, glicerol, xilitol e etanol 62
4.6.5 Determinação dos teores de furanos e compostos fenólicos.....62
4.6.2 Determinação da concentração celular 63
4.6.3 Fotomicrografias 64
4.6.4 Determinação do índice de cristalinidade (I_C) 64
4.7. Metodologia de análise dos resultados.....65
4.7.1 Determinação dos parâmetros fermentativos.....65
4.7.2 Determinação dos parâmetros de hidrólise enzimática.....67
4.7.3 Determinação dos parâmetros de pré-tratamento.....71
4.7.4 Análise estatística.....72
5 RESULTADOS.....73
5.1 Pré-tratamento da palha de arroz 73
5.1.1 Tratamento alcalino da palha de arroz 73
5.1.2 Tratamento ácido.....76
5.1.2.3 Análise Estatística 86
5.1.2.4 Curva de tempo na condição otimizada de tratamento ácido.....93
5.1.2.5 Condição de tratamento ácido em maior escala.....96
5.1.2.6 Análise das mudanças estruturais da palha de arroz 100
5.2 Hidrólise Enzimática.....104
5.3 Impacto da sequencia de pré-tratamento na hidrólise enzimática.....110
5.3.1 Balanço de massa 115
5.4 Fermentação do hidrolisado celulósico.....119
5.5 Fermentação da fração hemicelulósica 127
5.6 Análise do aproveitamento global da palha de arroz 131
6 CONCLUSÕES.....136
REFERÊNCIAS.....138

1 INTRODUÇÃO

A implementação do uso de combustíveis provenientes de fontes renováveis tem se mostrado como uma necessidade crescente do mercado energético mundial. A busca por diferentes formas de energia constitui um dos principais desafios para redução da dependência do petróleo e de seus derivados, além de diminuir a emissão de gases causadores do efeito estufa que afeta todo o planeta. Dessa forma, muitos estudos estão sendo desenvolvidos, no sentido de se obter um combustível menos poluente, a partir de matérias-primas renováveis. Parte da pesquisa científica está focalizada na produção de biocombustíveis de segunda geração, dentre os quais se inclui o bioetanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos.

Uma grande quantidade de biomassa lignocelulósica é gerada através de práticas agrícolas, industriais e florestais. A palha de arroz, por exemplo, que é o principal resíduo do cultivo dessa cultura, apresenta uma produção de 1 a 1,5 quilograma por cada quilograma de arroz colhido, sendo o resíduo mais abundante. Este material é composto, majoritariamente, por polissacarídeos (celulose e hemicelulose), que podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis. Dessa forma, a palha de arroz é uma matéria-prima em potencial para aplicações biotecnológicas, como, por exemplo, a obtenção de etanol.

No entanto, a estrutura e a composição da palha de arroz, assim como outros tipos de biomassa vegetal, dificultam a sua degradação química ou enzimática, limitando as possibilidades de conversão de seus polissacarídeos em monômeros fermentescíveis, sendo esse um dos principais obstáculos para o aproveitamento integral dos polissacarídeos dessa biomassa. Uma alternativa a essa limitação é o estabelecimento de métodos de pré-tratamentos que promovam a desconstrução da estrutura lignocelulósica de forma eficiente.

A hidrólise com ácido diluído é um processo frequentemente empregado para liberar a fração hemicelulósica do material lignocelulósico, devido a sua elevada eficiência em solubilizar a xilana sob a forma de monômeros de xilose. No entanto, vários compostos com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano são formados durante o processo hidrolítico do material lignocelulósico, diminuindo, assim, a eficiência e a produtividade dos processos fermentativos. Esses compostos podem ser divididos em: produtos de degradação de açúcares, produtos de degradação da lignina e produtos da estrutura lignocelulósica.

Nesse sentido, para que possa ser empregado um hidrolisado hemicelulósico menos tóxico em processos fermentativos, é necessário desenvolver diferentes técnicas de pré-tratamento do material lignocelulósico que proporcione uma perda mínima das frações açucaradas. Recentemente, tem sido demonstrado na literatura que um tratamento alcalino da palha de arroz, em condições brandas, produz um sólido com características favoráveis para obtenção tanto do hidrolisado hemicelulósico quanto do celulósico, devido a remoção de grupos acetil da biomassa e redução parcial de lignina e de cinzas.

O tratamento alcalino anterior à etapa de hidrólise com ácido diluído além de melhorar a qualidade do hidrolisado hemicelulósico, por diminuir a concentração de compostos com potencial ação inibitória ao metabolismo microbiano, favoreceu o rendimento de conversão enzimática da celulose, que é uma etapa de fundamental importância para a conversão dos polissacarídeo presente no material lignocelulósico em glicose .

No processo de conversão enzimática da celulose são usualmente utilizados coquetéis de celulases comerciais capazes de atuar de forma específica na porção polissacarídica da biomassa. Um parâmetro importante no processo de hidrólise enzimática é a possibilidade de trabalhar com alto teor de sólidos, o que viabilizaria a obtenção de uma solução com alta concentração de açúcar, possibilitando maior obtenção do etanol.

A diminuição da água durante a hidrólise enzimática reduz o custo de processamento, pois diminui a energia requerida para remoção do líquido. No entanto, a escassez de água no meio reacional altera as propriedades das suspensões fibrosas, aumentando consideravelmente a viscosidade do meio e dificultando a homogeneização da biomassa hidrolisada. Tal condição, faz com que seja necessária uma mistura adequada da reação para garantir contato entre o substrato e as enzimas e para promover a transferência de calor e massa dentro do reator. Dessa forma, o uso de reatores não convencionais e a condução do processo por batelada alimentada têm sido empregada na tentativa de superar os desafios relacionados a hidrólise enzimática da biomassa em elevados teores de sólidos, possibilitando elevados rendimentos de hidrólise da celulose e um hidrolisado celulósico com altos teores de glicose.

Dentre as leveduras não convencionais (ou “não *Saccharomyces*”) com potencial para produção de etanol a partir de glicose, encontram-se aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces*, em particular, a espécie *Kluyveromyces marxianus.* O interesse na utilização de *K. marxianus* em aplicações biotecnológicas tem sido impulsionado devido à característica termotolerante e à elevada taxa de crescimento. Recentemente, uma linhagem

termotolerante de *K. marxianus* (NRRL Y-6860), capaz de fermentar glicose a etanol com produtividades comparáveis à *Saccharomyces cerevisiae*, foi selecionada pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Inês Conceição Roberto.

Destaca-se ainda que durante a etapa de tratamento ácido, é gerada uma corrente líquida (hidrolisado hemicelulósico) rica em pentoses, a qual requer micro-organismos específicos para a produção de etanol. A levedura *Scheffersomyces stipitis* tem sido apontada como uma das mais promissoras para esta bioconversão, apresentando elevados rendimentos e produtividades de etanol.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade do uso da palha de arroz como matéria-prima em biorrefinarias, para produção de etanol utilizando as frações açucaradas (hemicelulose e celulose).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Palha de arroz

O arroz é uma planta herbácea, da família das gramíneas e do gênero *Oryza* e está entre os cereais mais consumidos do mundo. De acordo com dados do United States Department of Agriculture – USDA (2018), a produção mundial do arroz para a safra de 2017/18 atingirá um recorde de 484 milhões de toneladas. O Brasil é o nono produtor mundial desse cereal e as projeções de produção e consumo, avaliadas pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, preveem a colheita de 14,12 milhões de toneladas de arroz na safra 2019/2020 (CONAB, 2018).

O principal resíduo gerado durante a colheita do arroz é a palha, com uma produção de cerca de 1 a 1,5 quilograma por quilograma de arroz colhido (BINOD et al., 2010). Considerando a projeção nacional de arroz para a safra 2019/2020 (CONAB, 2018), o total mínimo de palha de arroz gerado poderá alcançar cerca de 14 milhões de toneladas.

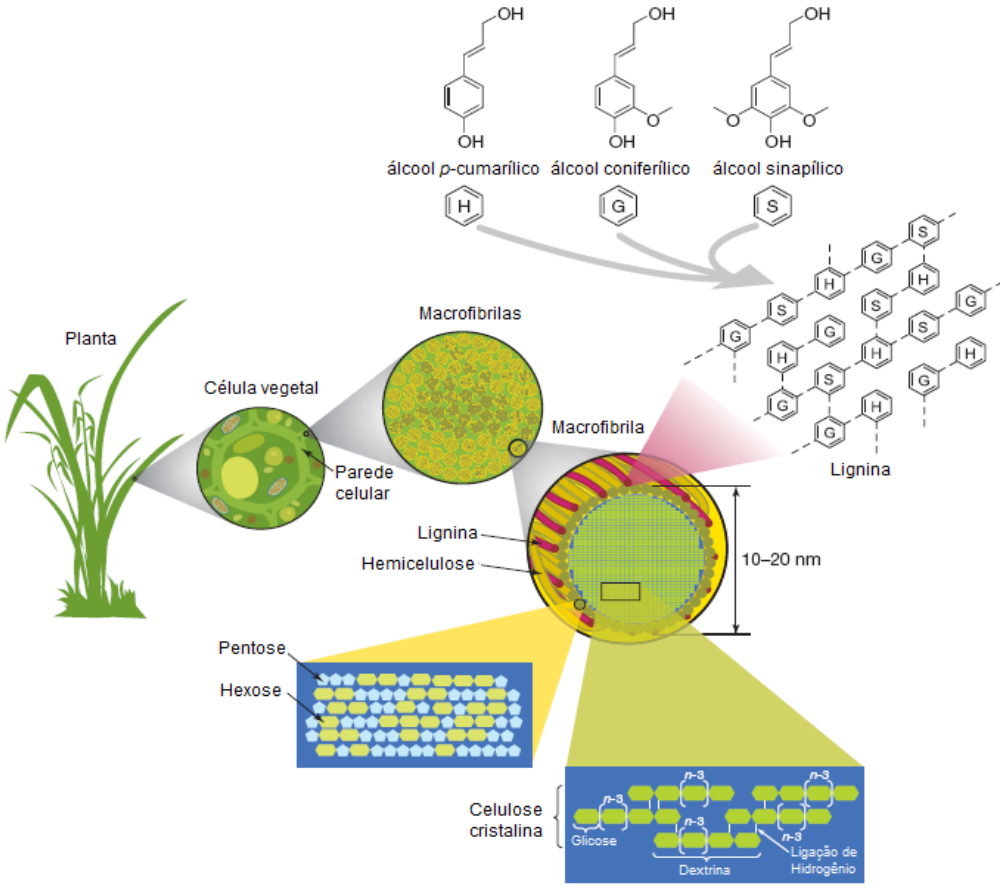
A palha de arroz é classificada como um material lignocelulósico e é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (**Figura 1**) em proporções dependentes da origem do material e das condições ambientais (LEE et al., 2007; BINOD et al., 2010).

A celulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica, podendo ser descrita como uma macromolécula linear, composta de unidades de anidroglicopiranoses ligadas por ligações glicosídicas β-(1→4), como mostrado na **Figura 2 A**. . Esse polissacarídeo apresenta um grau de polimerização de até 25.000 resíduos de glicose, sendo um dos polímeros mais longos até então conhecidos. A ligação covalente entre as unidades de glicose resulta em uma cadeia rígida e compacta, com uma grande força de tensão. Além do mais, os grupos hidroxílicos estabilizam a estrutura molecular pelas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, **Figura 2 B**, dificultando sua degradação (FENGEL; WEGENER, 1989). Na palha de arroz o conteúdo da celulose pode variar de 32 a 47% (BINOD et al., 2010).

A celulose está presente nos vegetais na forma de fibrilas elementares que se unem formando unidades maiores chamadas de microfibrilas. As microfibrilas se agrupam dando origem às fibras de celulose, que se estruturam em uma rede cristalina, onde apenas as cadeias de celulose, presentes na superfície da microfibrila, ficam acessíveis ao ataque por enzimas, produzidas por Micro-organismos de degradação da biomassa vegetal. Aliás, as cadeias de celulose podem se dispor de maneira irregular, resultando em regiões amorfas

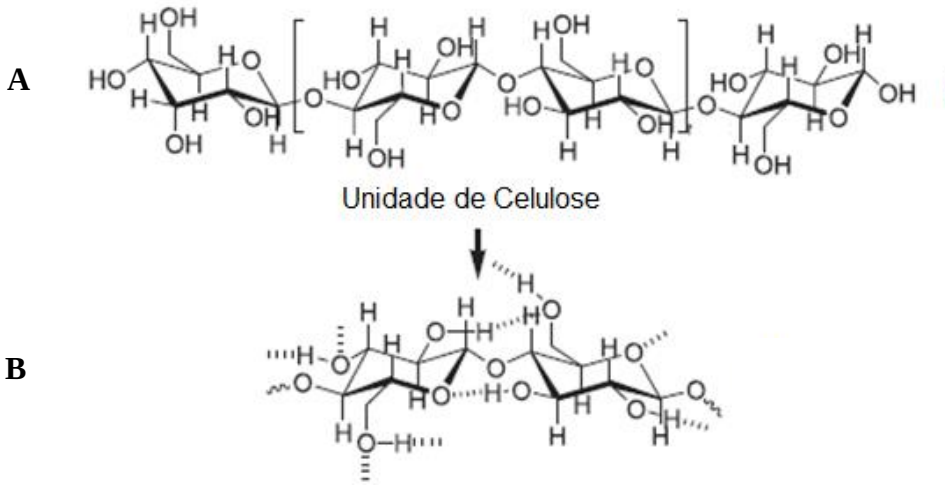
de mais fácil acesso à degradação enzimática (FENGEL; WEGENER, 1989; SUN et al., 2015).

Figura 1 - Estrutura do material lignocelulósicos



Fonte: Alterado de Rubin (2008).

Figura 2 - Cadeia de glicose formando unidades de celulose através de ligação glicosídica β(1→4) (A) e ligação de hidrogênio (pontilhado) inter e intramolecular presentes na celulose (B).

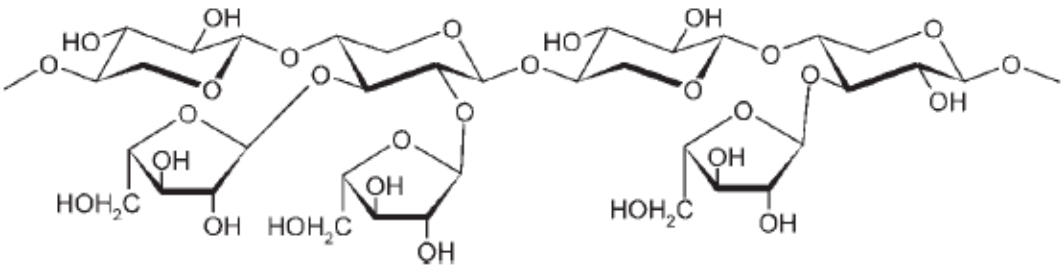


Fonte: Fengel e Weneger (1989).

A hemicelulose é o segundo maior componente da biomassa lignocelulósica. Esse componente está associado às microfibrilas de celulose, principalmente por ligações de hidrogênio, conferindo estabilidade, além de formar ligações covalentes com a lignina (PAULY et al., 2013). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo constituído por unidades de açúcares com grau de polimerização inferior a 200 e com cadeias poliméricas extremamente ramificadas, formando regiões amorfas que conferem à estrutura maior solubilidade e, consequentemente, maior susceptibilidade à hidrólise. Diferentes unidades de açúcares podem constituir a cadeia principal da hemicelulose e de acordo com o tipo de açúcar podem ser classificadas como: mananas, xiloglucanas e xilanas (FENGEL; WEGENER, 1989; PAULY et.al., 2013). Dentre esses grupos, a xilana é a principal poliose, com o esqueleto principal formado por unidades de D-xilopiranose, unidas por ligação do tipo β-(1-4). Esse grupo é subdividido em glucuronoxilanas, arabinoxilanas, arabino-glucuronoxilanas (GÍRIO et al., 2010).

A hemicelulose do tipo arabinoxilana (**Figura 3**) possui o esqueleto principal constituído por xilose, com resíduos de arabinose ligados lateralmente e resíduos de grupos acetil, que se apresentam como grupos pendentes, além da presença de ácidos hidroxicinâmicos, tais como os ácidos ferúlico e *p*-cumárico (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; PENG et al., 2012). A hemicelulose na palha de arroz pode variar de 19 a 27% e é representada majoritariamente pela arabinoxilana (BINOD et al., 2010; GÍRIO et al., 2010).

Figura 3 - Estrutura parcial da molécula de arabinoxilana.

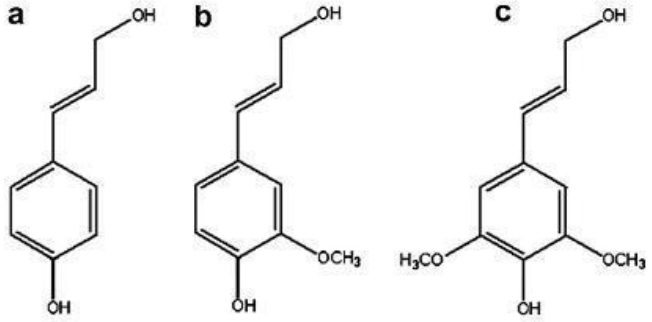


Fonte: Adaptado de Chávez, Bull e Eyzaguirre (2006) e de Ebringerová (2006).

A lignina constitui uma porção não polissacarídica da biomassa vegetal, formando uma rede complexa de estruturas aromáticas, de caráter hidrofóbico. A macromolécula é formada a partir da polimerização radicalar de diferentes unidades de fenil-propano (fenólicos), álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (**Figura 4**), formando uma rede complexa de estruturas aromáticas, de caráter hidrofóbico. A lignina

está fortemente associada à hemicelulose e à celulose, atuando como um cimento de junção entre as fibras, conferindo rigidez aos materiais lignocelulósicos e reduzindo a capacidade de absorção de água e,consequentemente, dificultando o acesso das enzimas ao material lignocelulósico (FENGEL; WEGENER, 1989). O teor de lignina na palha de arroz pode variar de 5 a 24% (BINOD, 2010).

Figura 4 - Principais monômeros que consistem a molécula de lignina (a) álcool trans-p-cumaríl, (b) álcool coniferil e (c) álcool trans-sinapil.



Fonte: Adaptado de Fengel e Wegener (1989).

Além dos principais componentes macromoleculares, a palha de arroz ainda apresenta alto conteúdo de cinzas (10-20%), sendo o dióxido de silício (SiO_2) o maior composto, representando até 75% (BINOD et al., 2010). De acordo com Bin e Hongzhang (2010), o elevado teor de cinzas é também um fator que dificulta o processo de degradação da biomassa.

Considerando a grande quantidade de palha de arroz gerada durante a colheita, esse resíduo pode ser aplicado em diversos setores, e a escolha de sua aplicação depende da localização do plantio e do retorno econômico. Na **Tabela 1**, estão algumas das aplicações da palha de arroz.

Nas últimas décadas, devido à necessidade mundial da busca de fontes de carbono renováveis, muita atenção tem sido direcionada para o desenvolvimento de processos relacionados ao eficiente fracionamento da biomassa lignocelulósica, com vistas à utilização de todos os seus componentes (celulose, hemicelulose e lignina) atendendo, assim, a demanda de uma biorrefinaria. Dentre os diferentes produtos de interesse, destaca-se o etanol que pode ser obtido por rotas biotecnológicas a partir das frações açucaradas desses materiais (celulose e hemicelulose). Logo, a palha de arroz é uma importante matéria-prima para a produção de etanol, com grande potencial para o uso em plataformas de biorrefinarias (KIM; DALE, 2004; MORAES et al., 2014).

Tabela 1 - Principais aplicações da palha de arroz

Setor	Aplicação	Referência
Construção	Produção de chapas aglomeradas	Zhang, Hu 2014
Agropecuária	Adubo para plantas Alimentação animal	Dossou-Yovo et al., 2016 Kang et al., 2015
Bioenergia	Produção de carvão Produção do biogás Produção de etanol Produção de hidrogênio	Chou et al., 2009 Lianhua et al., 2010 Mussatto et al., 2010 Cheng et al., 2011

Fonte: Arquivo Pessoal

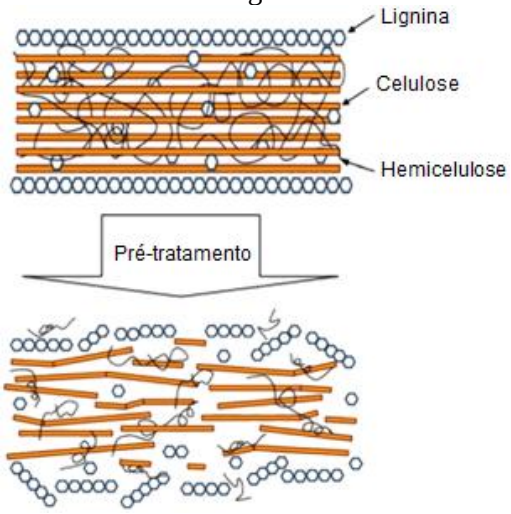
No entanto, a estrutura e a composição da palha de arroz, assim como outros tipos de biomassa vegetal, dificultam a sua degradação química ou enzimática, limitando as possibilidades de conversão de seus polissacarídeos em monômeros fermentescíveis, sendo esse um dos principais obstáculos para o aproveitamento integral dos polissacarídeos dessa biomassa. Uma alternativa a essa limitação é o estabelecimento de métodos de pré-tratamentos que promovam a desconstrução da estrutura lignocelulósica de forma eficiente e com menor impacto ambiental, quando diferentes métodos físicos, biológicos, químicos e térmicos podem ser empregados, separadamente ou combinados (BINOD et al., 2010).

2.2 Métodos de Pré-tratamento da Biomassa

A etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica visa primeiramente à desestruturação das fibras macromoleculares do material, sendo uma fase importante a ser realizada antes da solubilização dos açúcares fermentescíveis. O rearranjo dos componentes da estrutura do material lignocelulósico está mostrado na **Figura 5**. De acordo com a literatura (BINOD et al., 2010; MENON; RAO, 2012; SUN et al., 2015), um pré-tratamento eficaz tem como objetivo modificar a estrutura tridimensional da biomassa, possibilitando assim maiores rendimentos de recuperação de açúcares. Ademais, é necessário avaliar as condições desses tratamentos para minimizar a formação e ou

liberação de subprodutos tóxicos aos processos subsequentes, geralmente hidrólise enzimática e/ou fermentação.

Figura 5 – Esquema do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Mood et al. (2013).

O estudo e o desenvolvimento tecnológico de processos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são grandes desafios, uma vez que há influência sobre a sustentabilidade técnica, econômica e ambiental da produção de etanol celulósico. Vários estudos demonstraram que o pré-tratamento é relativamente oneroso, principalmente quando comparado aos outros processos envolvidos na produção de etanol, representando cerca de 20% do custo total (YANG; WYMAN, 2008). Deve-se buscar o menor consumo de energia, a redução do custo de material para a construção de reatores, a diminuição da geração de resíduos, a utilização de produtos químicos de menor custo ou, ainda, sem a adição de produtos químicos para escolha do pré-tratamento (MOSIER et al., 2005). Embora o pré-tratamento apresente um custo adicional, a consequência de hidrolisar o material lignocelulósico sem pré-tratamento é muito menos favorável, possibilitando, em geral, que apenas cerca de 20% da biomassa nativa seja hidrolisada (MOSIERet al., 2005).

Desse modo, o tipo de matéria-prima utilizada, a concentração de catalisadores, a temperatura, o tempo e a relação sólido:líquido tem uma influência direta na eficiência do pré-tratamento (SUN; CHENG, 2002). Alguns dos parâmetros usados para avaliar este processo são o rendimento de açúcares recuperados e a formação de subprodutos por solubilização de componentes estruturais e/ou degradação de açúcares e lignina.

Como cada processo de pré-tratamento exerce diferentes efeitos na biomassa, a **Tabela 2** apresenta de forma sumarizada as características de alguns pré-tratamentos, empregando a palha de arroz como substrato.

Tabela 2 - Principais pré-tratamento.

Pré-tratamento	**Condições/ Catalisador**	**Vantagens**	**Desvantagens**
Auto hidrólise[1]	T(ºC): 195 - 220 t (min): 0,5 – 20 C: Água	Solubilização da hemicelulose Resíduo sólido rico mais susceptível a hidrólise enzimática.	Pouca solubilização de monômeros de xilose
Explosão a vapor [2] (rápida descompressão)	T(ºC): 165 - 180 t (min): 2 - 20 C: Água	Decomposição da hemiceluloses e lignina Resíduo sólido mais susceptível a hidrólise enzimática.	Decomposição parcial da hemicelulose Formação de subprodutos
Alcalino[3,4]	T(ºC): 55 t (h):3 C: NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ < 4% m/m	Solubilização de parte da hemicelulose Deslignificação da palha, Resíduo sólido mais susceptível a hidrólise enzimática.	Perda de hemicelulose Formação de subprodutos
Ácido diluído [5,6,7]	T(ºC): 121 t (min):10 - 30 C: H_2SO_4 1,0 - 1,6% m/v	Consumo de baixa [ácido] Hemicelulose é hidrolisada Resíduo sólido com altos teores de celulose e mais susceptível a hidrólise enzimática, diminuindo custo com enzimas.	Pouca remoção de lignina Formação de subprodutos Corrosão
	P(bar): 15 – 35 t (min): 3- 10 C: H_2SO_4 0,2 -2,5% m/m		
	T(ºC): 121 t (min):30 - 90 C: H_2SO_4 0,5 - 1,5% m/v		

T = Temperatura; t = tempo; C = catalisador; P = pressão. 1 = Morn et al. (2015); 2 = Chen et al. (2011); 3 = Cheng et al. (2011); 4 = Lee et al. (2015); 5 = Roberto; Mussatto; Rodrigues (2013);6 = Taherzadeh e Karimi, 2006;7 = Castro et al. (2017).
Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2.1 Solubilização da Hemicelulose

Um dos métodos mais empregados para solubilizara hemicelulose é o pré-tratamento com ácido diluído, o qual é capaz de promover elevados rendimentos na solubilização de monômeros de xilose. Essa técnica se baseia na adição de ácido mineral, tais como ácido sulfúrico, clorídrico e fosfórico, em diferentes condições de temperatura, pH, razão sólido:líquido e tempo (TAHERZADEH; KARIMI, 2015). Inicialmente, na hidrólise ácida, o próton do ácido interage com o oxigênio glicosídico que liga as duas unidades de açúcar, formando um ácido conjugado. Em seguida, ocorre uma lenta quebra da ligação C-O e a formação de um intermediário cíclico, um carbocátion, que inicia a adição da molécula de água, produzindo um composto estável e liberando o próton. A hidrólise das ligações glicosídicas ocorre principalmente entre os açúcares que compõem a hemicelulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

A eficiência do rendimento de hidrólise vai depender da concentração do ácido, da temperatura, do tempo e da relação sólido:líquido utilizadas no pré-tratamento ácido que variam de acordo com o material a ser utilizado (MUSSATTO; ROBERTO, 2005; GALBE; ZACCHI, 2007).

Mussatto e Roberto (2005) otimizaram a hidrólise da fração hemicelulósica no pré-tratamento ácido do bagaço de malte, variando relação sólido:líquido (1:8 a 1:12), concentração de ácido (100 a 140 mg/g) e tempo de reação (17 a 37 min) a 120 °C. Em todos os experimentos avaliados, os autores notaram mais de 85% de solubilização da hemicelulose. A maior liberação da fração hemicelulósica foi de 96,5% obtida no ensaio mais severo, com relação sólido:líquido de 1:12 g/g, concentração de ácido de 140mg H_2SO_4 por grama de matéria seca e tempo de reação de 37 minutos, sendo liberado 94,2% de xilana e 100% de arabinana. A menor solubilização de hemicelulose foi de 88,7% nas condições de 1:10 relação sólido:líquido, concentração de H_2SO_4 de 120 mg/g e 27 minutos de reação.

Canilha et al. (2011), otimizaram a hidrólise ácida do bagaço de cana de açúcar, variando temperatura (112,5 a 157,5 °C), tempo de residência (5 a 35 min) e concentração de ácido sulfúrico (0 a 3%). Os autores notaram uma grande variação nas diferentes condições avaliadas. A maior solubilização da fração hemicelulósica foi de 54,6% na temperatura de 135 °C, em 20 min e 3% de ácido. Enquanto a menor foi de 0,9% nas condições de 135°C, em 20 min sem adição de ácido, confirmando a importância da adição

de um catalisador ácido durante o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para melhorar a remoção de hemicelulose a temperaturas moderadas.

Roberto et al. (2003), avaliando o efeito da concentração de ácido sulfúrico e do tempo de reação sobre a hidrólise da palha de arroz a 121°C, verificaram que as maiores concentrações de xilose (20,5 g/L) e glicose (6,3 g/L) foram obtidas com 1,6% H_2SO_4 após 30 minutos de reação, recuperando 77% da hemicelulose, com uma pequena produção de subprodutos.

Lee, Zheng e VanderGheynst (2015) estudaram o efeito do pré-tratamento com ácido diluído na palha de arroz, variando concentração de ácido sulfúrico (0 a 1%) e temperatura (120 a 160 °C). Os autores observaram uma grande variação no rendimento de xilose e arabinose nas condições avaliadas. O maior rendimento de hidrólise da xilose foi de 98%, obtido no ensaio mais severo (1% de H_2SO_4 a 160°C). Nenhuma solubilização de açúcares foi observada sem adição de H_2SO_4, tanto a 120 quanto a 160°C, mostrando a necessidade do uso de ácido para solubilização da xilose nessa faixa de temperatura e pressão.

A hidrólise com ácido diluído, normalmente, não é um processo seletivo, ou seja, o processo produz uma mistura de vários compostos, incluindo açúcares, grupos pendentes de acetil, presentes na estrutura da hemicelulose. Aliás, dependendo da severidade do tratamento, pode haver a degradação dos açúcares com formação de furanos, tais como, furfural e hidroximetil furfural (HMF), a partir de pentoses e hexoses respectivamente, e parte da lignina formando compostos fenólicos (FENGEL; WEGENER, 1989). Tais compostos (**Figura 6**) podem apresentar efeito inibitório sobre o metabolismo fermentativo de micro-organismos, que serão discutidos a seguir.

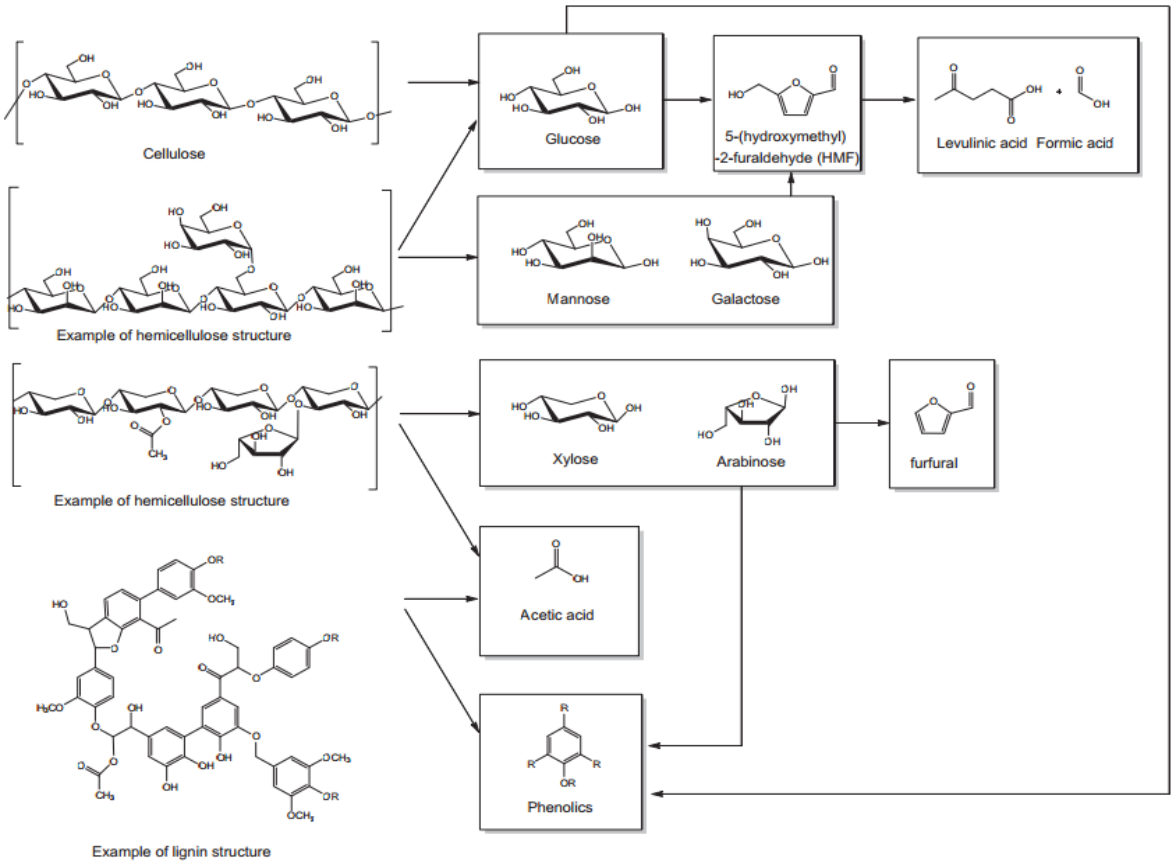
O efeito desses compostos varia em função das características químicas de cada um e da espécie microbianas. Em relação aos furanos, estes podem causar danos à membrana citoplasmática, afetar sítios hidrofóbicos no interior da célula e aumentar a fase *lag* de crescimento microbiano, retardando a produção de etanol e diminuindo a produtividade (LIU et al., 2004; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Os compostos fenólicos, por serem moléculas de caráter hidrofóbico, podem se acumular na membrana citoplasmática e promover um aumento na fluidez desta, o que, consequentemente, facilita a entrada de prótons para o citoplasma, diminuindo a seletividade da membrana (PALMQVIST;HAHN-HAGERDAL, 2000; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Além dos furanos e fenólicos, o ácido acético tem sido apontado como um dos principais compostos tóxicos para diversos micro-organismos (BELLIDO et al., 2011). O

efeito inibitório do ácido acético depende do tipo de micro-organismo utilizado, pH e composição nutricional do meio (MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009). Dentre esses o pH é um fator determinante, visto que valores de pH abaixo do pK_a do ácido acético (4,75), fazem com que esse ácido se apresente predominantemente em sua forma não dissociada, sendo capaz de penetrar na membrana celular. Uma vez em seu interior, o ácido diminui o potencial da membrana da célula e promove uma queda no pH citoplasmático, podendo causar aumento na pressão de turgor (LAWFORD;ROUSSEAU, 1993; OLSSON; HAHNHAGERDAL, 1996; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009).

Figura 6 - Principais compostos formados a partir da degradação das frações açúcaadas e da lignina.



Fonte: Adaptado de Rasmussen, Sørensen e Meyer (2013).

Além da complexa composição do hidrolisado hemicelulósico, em termos de açúcares e componentes tóxicos para as células, esse licor tem um caráter muito ácido devido ao próprio processo (pH<2), portanto sua utilização como meio fermentativo requer um ajuste de pH que pode ser realizado pela adição de diferentes tipos de base, incluindo o hidróxido de cálcio (ARSLAN; EKEN-SARACOGLU,2010), hidróxido de amônio

(ALRIKSSON et al., 2005), hidróxido de potássio (SONG et al., 2015) e hidróxido de sódio (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO,2010).

O uso de $Ca(OH)_2$ e CaO faz com que ocorra uma redução no volume, devido à formação de corpo de fundo e do sulfato de cálcio, diminuindo a concentração de subprodutos e reduzindo a concentração de cátions de sulfato solúveis no hidrolisado (MATEO et al., 2013; SHIN et al., 2015). No entanto, além de precipitar subprodutos, ocorre o arraste de açúcares, reduzindo a quantidade de açúcar disponível para fermentação (SHIN et al., 2015).

Uma das bases mais utilizadas para ajuste de pH é o hidróxido de sódio (NaOH), que forma sais solúveis de sulfato de sódio (Na_2SO_4). Os sais solúveis formados durante a neutralização podem interferir na ionização do meio, na quantidade de solutos disponíveis e podem influenciar a etapa de fermentação, diminuindo a produção de etanol, o consumo de xilose e o crescimento celular (AGBOGBO;WENGER, 2006).

Diversos métodos de destoxificação do licor hemicelulósico vêm sendo propostos para reduzir a concentração dos subprodutos, possibilitando seu uso em processos fermentativos de forma eficiente, minimizando o efeito inibitório desses compostos, através da remoção ou conversão dos mesmos. Esses tratamentos têm sido separados em categorias: físico, químico e/ou biológico. Um dos métodos mais utilizados é a adsorção de furanos e fenólicos utilizando carvão ativo; porém, pode também remover elevados teores de açúcares do meio (até 30%) (LEE et al., 2011; MUSSATTO; SANTOS; ROBERTO, 2004). Villarreal et al. (2006), destoxificando o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto com carvão ativo, verificaram uma redução superior a 80% na concentração de compostos fenólicos e furanos, e um decréscimo de aproximadamente 25% na concentração de glicose do hidrolisado.

Além desse procedimento, a alteração de pH também reduz a toxicidade dos hidrolisados precipitando íons metálicos, decompondo furanos instáveis quimicamente, contudo esse processo deve ser combinado a métodos físicos, pois individualmente não apresentam resultados satisfatórios (MATEO et al., 2013; CHENG et al., 2007). Mateo (2013), estudando a destoxificação de poda de oliveira usando diferentes bases, observaram que, ao empregar CaO para elevar o pH até 10,os níveis de ácido acético, furanos e compostos fenólicos foram reduzidos em 32, 56 e 62%, respectivamente. Além disso, foi constatada uma perda de aproximadamente 30% dos açúcares e de 20% do volume de hidrolisado nessas mesmas condições. A perda de volume de hidrolisado foi associada à precipitação dos sais de cálcio.

Os métodos biológicos de destoxificação usam micro-organismos ou enzimas para promover modificações na estrutura química dos compostos subprodutos, convertendo em substâncias de menor toxicidade (FONSECA et al., 2013; MORENO et al., 2013). Fonseca et al.(2013) estudando a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz utilizando *S. cerevisiae,* observaram uma redução de 50% dos furanos, com consumo de glicose, sem perda de xilose.

O tipo de destoxificação deve ser escolhido pelo tipo e/ou concentração de subprodutos obtidos. A formação de subprodutos nos hidrolisados ácidos depende da severidade do tratamento. No entanto, mesmo com uma baixa severidade, objetivando bons rendimentos de hidrólise da hemicelulose, o ácido acético será solubilizado no hidrolisado hemicelulósico formado (PARK et al., 2015).

Além dos métodos de destoxificação, uma forma de evitar com que esse ácido seja liberado no hidrolisado, é promover uma etapa de desacetilação antecedendo ao pré-tratamento (CHEN et al., 2011,CHEN et al., 2012a, CASTRO et al., 2017).

Chen et al. (2012), estudando o efeito da desacetilação sobre a modificação da biomassa e a recuperação da fração de hemicelulose em diferentes palhas de milho, antecedendo a explosão a vapor (8 mg H_2SO_4 por g de biomassa, a 150 °C), constataram que a solubilização de acetato e lignina foi dependente da espécie vegetal empregada. Segundo os autores, o tratamento alcalino da palha de milho 33A14 permitiu a solubilização de 55% do grupamento acetil, enquanto que para a variedade INL esse valor foi aumentado para 67,7%. Em relação à lignina, os resultados demonstraram que na variedade 33A14, o tratamento alcalino removeu 13,8% da lignina inicial do material, enquanto que na variedade 34M95, apenas 2% da lignina foi solubilizada. Os autores também constataram, para todas as variedades de palha avaliadas, que o rendimento de xilose, após a explosão a vapor na palha de arroz tratada com álcali, foi aumentado em10%, quando comparados ao obtido quando a palha foi submetida apenas à hidrólise ácida, ou seja, sem passar pela desacetilação.

Castro et al. (2017) empregando palha de arroz, investigou os efeitos da desacetilação no processamento da biomassa até o etanol. Os autores variaram a temperatura (50 a 70 °C) e carga de NaOH (20 a 80 mg de NaOH/g de biomassa). Ao utilizar 70 °C durante 45 minutos e 80 mg de NaOH/g de biomassa, o tratamento alcalino da palha de arroz, além da remoção efetiva de grupos acetil (87%), retira parcialmente a fração de lignina e cinzas (34 e 60%), com baixa remoção de polissacarídeos (< 20%). Dessa forma, melhora a qualidade do hidrolisado hemicelulósico, não liberando ácido

acético e diminuindo a concentração de produtos de degradação, em média 50% quando comparada ao hidrolisado hemicelulósico, obtido a apenas após hidrólise ácida, e, consequentemente, aumentando a produtividade do processo fermentativo (de 0,06 para 0,300 g/L.h) na fermentação de etanol por *S stipitis*.

2.3 Hidrólise da celulose

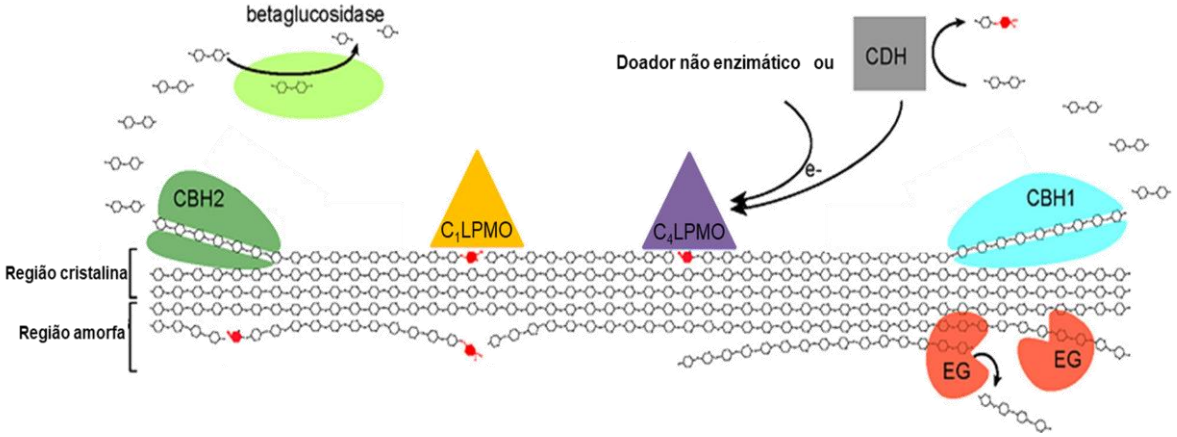
A utilização da fração celulósica da biomassa em processos fermentativos requer liberação dos açúcares monoméricos que pode ser feita através de hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise ácida é um processo mais drástico que requer quantidades elevadas de ácido para solubilização da celulose. Embora seja bastante empregado, a natureza corrosiva e o uso de grandes quantidades de ácido fazem com que seja necessário o uso de ligas especiais na construção de reatores e a recuperação eficiente do ácido, uma etapa onerosa, que demanda alto gasto energético, acarretando um custo considerável (TAHERZADEH; KARIMI 2015). A hidrólise enzimática tem sido considerada uma estratégia mais atrativa para alcançar elevados rendimentos de sacarificação, pois ao contrário da hidrólise ácida, o uso de enzimas celulolíticas ocasiona uma conversão seletiva da celulose em glicose, o que é uma vantagem, pois previne a geração de subprodutos através da degradação do açúcar. Além disso, a hidrólise enzimática causa menos danos ambientais, diminuindo a severidade da hidrólise, com temperaturas e pHs mais amenos (BALAT, 2011).

Para que a hidrólise enzimática ocorra de forma eficiente, é necessário um grupo de enzimas, que atuam de forma cooperativa (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988). As principais enzimas desse grupo são enzimas hidrolíticas, que clivam as ligações glicosídicas β-1→4 adicionando uma molécula de água. Endoglucanases (EG) hidrolisam ligações glicosídicas intramoleculares, agindo em regiões amorfas da celulose, expondo novos terminais livres que serão locais de atuação das exoglucanases. Exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) hidrolisam processivamente ligações glicosídicas das pontas de cadeia de celulose, produzindo celobiose como principal produto. Esse grupo de celulases pode ser divido em dois tipos, CBH I que atuam sobre terminais redutores, e CBH II que hidrolisam terminais não redutores da celulose. β-glicosidases (BGL) clivam a molécula de celobiose e pequenos oligossacarídeos em monômeros de glicose. Outras enzimas de grande atuação na degradação da celulose, através de mecanismos oxidativos, são as

celobiose desidrogenases (CDH) que atuam sobre celobiose e celo-oligossacarídeos, oxidando o terminal redutor e as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos dependentes de cobre (LPMOs) que atuam na superfície do cristal de celulose, clivando as ligações glicosídicas. O modelo de ação dessas enzimas está ilustrado na **Figura 7**, mostrando a ação sinérgica das enzimas na degradação da cadeia de celulose.

As enzimas podem ser produzidas por diversos micro-organismos, como bactérias e fungos, podendo ser tanto aeróbicos quanto anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos. Estirpes mutantes de *Trichoderma sp.* são considerados os melhores organismos produtores de celulases. No entanto, espécies do gênero *Trichoderma* produzem pequenas quantidades de β-glicosidases, sendo seu extrato comercial usualmente suplementado com β-glicosidases de outros micro-organismos para uso em experimentos de hidrólise enzimática, evitando assim o acúmulo de celobiose e diminuindo a inibição por retroalimentação (BALAT et al., 2011).

Figura 7 - Esquema de degradação da celulose por fungos, celobiohidrolase (CBH); endoglucanase (EG), β-glicosidase (BGL); celobiohidrolases (CDH); mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO).



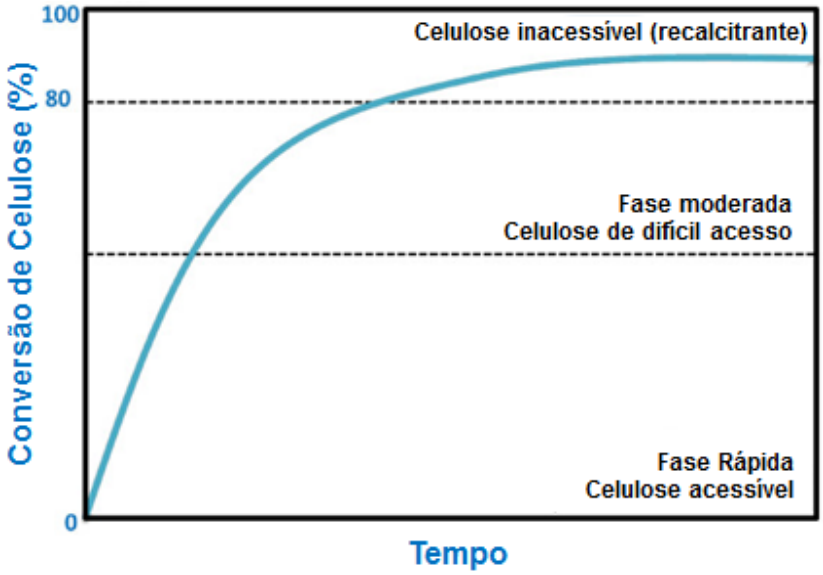
Fonte: Adaptado de Horn et al. (2012).

A hidrólise enzimática pode ser dividida em três fases, em função da atuação das enzimas, como mostrado na **Figura 8**. A primeira fase acontece com a rápida adsorção das celulases na fração mais acessível de celulose, apresentando alta velocidade inicial e alta taxa de conversão de celulose. Em uma fase intermediária, observa-se uma taxa de conversão moderada do substrato com valores situando-se entre 50 a 70%. Na última fase, a velocidade de conversão é ainda mais reduzida devido à maior recalcitrância da celulose residual (ARANTES;SADDLER, 2011).

De acordo com Arantes e Saddler (2011), a hidrólise enzimática é um fenômeno de superfície, ocorrendo através de um contato físico direto da enzima ao substrato, ou seja, a enzima deve adsorver na celulose. Usualmente, essa etapa ocorre em condições brandas de pH (4,8) e temperatura (45 a 50 °C) (CASTRO; ROBERTO, 2014).

Além das condições reacionais de temperatura e pH, carga de enzima, e razão solido:líquido, a composição da biomassa e sua elevada recalcitrância interferem diretamente na solubilização de glicose (BALAT, 2011). A recalcitrância não é devido apenas à estrutura da celulose, mas também devido à associação com os demais componentes da biomassa.

Figura 8 - As três fases da hidrólise enzimática da celulose.



Fonte: Adaptado de Arantes e Saddler (2011).

De acordo com Yu et al. (2011), o teor, a distribuição e a estrutura da lignina tem um impacto significativo sobre a hidrólise enzimática. Os autores observaram como a redução do teor de lignina a 15% na madeira (obtidos após diferentes tratamentos) ocasionou um aumento no rendimento da hidrólise enzimática de celulose, quando comparado com material não tratado. Essa remoção também contribuiu para redução dos produtos derivados da lignina que são considerados capazes de inibir a atividade das celulases (PANAGIOTOU; OLSSON 2007). Além do mais, a lignina atua como uma barreira física protegendo a celulose contra degradação, limitando assim sua hidrólise (JØRGENSEN et al., 2007). A remoção dessa fração melhora a digestibilidade da biomassa frente ao

processo de hidrólise enzimática, uma vez que o teor de lignina está relacionado à acessibilidade da celulose (SIQUEIRA et al., 2017).

Mussatto et al. (2008), avaliando a influência de lignina e hemicelulose na hidrólise enzimática de bagaço de malte, concluíram que quanto menor a porção de hemicelulose e lignina do bagaço de malte, melhor a hidrólise enzimática da celulose. No entanto, os autores observaram que não é necessária a completa remoção dessas frações para uma melhor solubilização da fração celulósica em glicose, tendo sido obtido um valor de 74,8% de eficiência de hidrólise de celulose com uma remoção de hemicelulose e de lignina. A remoção dessas duas frações ocasiona aumento da porosidade e a área superficial do material, favorecendo assim a ação enzimática.

A hidrólise com ácido diluído, a qual principalmente solubiliza a hemicelulose, é um método capaz de diminuir a recalcitrância da celulose, tornando esse polissacarídeo mais acessível à degradação enzimática. Diversos autores têm investigado o efeito do pré-tratamento com H_2SO_4 diluído sobre a solubilização da hemicelulose, assim como a liberação de monômeros de glicose da celulose, a partir da hidrólise enzimática (SUN et al., 2015). Hernandez et al.(2013) avaliaram o efeito de variações das condições de tempo (10 -30 min) e temperatura (130 – 190°C) de hidrólise ácida do substrato de poda de acácia sobre solubilização enzimática da celulose. Nesse estudo foi verificada uma conversão máxima de glucana de 84,3% quando a hidrolise ácida foi realizada a 160 ºC por 30 min. Empregando a palha de arroz, Hsu et al. (2010) estudaram a hidrólise com H_2SO_4 diluído sob diferentes concentrações de ácido (0,5 a 1 % m/v), temperatura (160 a 190 °C) e tempo de reação (1 a 25 minutos). Os autores observaram que a maior liberação de glicose da celulose (85%) foi obtida no substrato submetido ao tratamento mais severo (1% de ácido, 190 °C e 25 min), tendo-se demonstrado que à medida que ocorre um incremento na severidade da hidrólise ácida aumenta a eficiência de hidrólise enzimática.

Os benefícios da combinação de pré-tratamentos na hidrólise enzimática da celulose também têm sido muito estudados (CHEN et al., 2012b; SUN et al., 2015, CASTRO et al., 2017). Alguns trabalhos demonstram que a utilização de etapa de desacetilação antes da hidrólise ácida promove melhorias nos rendimentos de hidrólise enzimática. Castro et al. (2017) estudaram o rendimento da hidrólise enzimática após o tratamento sequencial (tratamento álcali e ácido) de palha de arroz. Nesse estudo foi observado um aumento de 67% na glicose liberada, o que correspondeu a um aumento de 22% no rendimento de hidrólise enzimática em relação ao valor obtido quando a palha de arroz foi submetida, apenas ao tratamento ácido. Comportamento semelhante foi observado por Chen et al.

(2012b) empregando essa mesma sequência de tratamentos (desacetilação e hidrólise ácida) na palha de milho. Os autores observaram que o tratamento sequencial aumentou em 15% o rendimento de conversão de celulose em glicose, quando comparado com o tratamento apenas de hidrólise ácida.

2.3.1 Alto teor de sólidos na hidrólise enzimática

Um parâmetro importante no processo de hidrólise enzimática é a possibilidade de trabalhar com alto teor de sólidos, o que viabilizaria a obtenção de uma solução com alta concentração de açúcar (KRISTENSEN; FELBY; JORGENSEN, 2009). A implementação de um processo de sacarificação com alto teor de sólidos é motivada pelo potencial de obter vantagens econômicas significativas quando comparado a um processo convencional de baixo teor de sólidos, com a decorrência de menores custos: 1) capital devido à redução do volume; 2) operacional em consequência ao menor gasto energético necessário para aquecimento e resfriamento; processamento a jusante uma vez que apresenta maiores concentrações de produtos (MOHAGHEGHI et al,1992).

A alta concentração de substratos durante a conversão enzimática de celulose à glicose é importante. No entanto, existem também desvantagens ao aumentar a concentração de açúcares, uma vez que a glicose e a celobiose inibem significativamente as enzimas: endoglucanases, celobiohidrolases e β-glicosidases, fazendo com que essas enzimas não funcionem de forma otimizada (BEZERRA; DIAS, 2005; XIAO et al, 2004). Os autores Kristensen, Felby e Jorgensen (2009) concluíram que uma maior concentração de sólidos faz com que aumente essa inibição, sendo esse fator significativo e potencialmente determinante.

A quantidade de água em um ensaio de hidrólise com altos teores de sólidos, inicialmente, não é significativa, pois a água presente no meio reacional é absorvida pela biomassa utilizada, restando pouca ou nenhuma água livre (HODGE et al., 2009). No entanto, água não é apenas um substrato e um pré-requisito para atividade das enzimas hidrolíticas, é também crucial para o mecanismo de transporte durante a hidrólise, possibilitando a transferência de massa no processo (FELBY et al., 2008).

A diminuição da água durante a hidrólise enzimática reduz o custo de processamento, pois diminui a energia requerida para remoção do líquido. No entanto, a escassez de água no meio reacional altera as propriedades reológicas das suspensões

fibrosas, aumentando consideravelmente a viscosidade do meio e dificultando a homogeneização da biomassa hidrolisada (SCOTT; SAMANIUK; KLINGENBERG, 2011). Tal condição faz com que seja necessária uma mistura adequada da reação para garantir contato entre o substrato e as enzimas e para promover a transferência de calor e massa dentro do reator. Entretanto, também foi evidenciado que a mistura excessiva pode desativar as enzimas e reduzir o rendimento da conversão, devido ao aumento da produção de bolhas no meio, o que ocasiona o aumento da interface liquido/ar (MUKATAKA et al, 1983).

Outra tentativa utilizada para contornar os problemas causados devido à alta viscosidade é realizar a hidrólise enzimática em modo alimentado, isto é, adicionando gradualmente o substrato, mantendo a viscosidade a um nível baixo (HODGE et al., 2009; CHANDER et al., 2010; WANDERLEY et al.,2013).

Zhao et al (2013), utilizando o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com formilina no estudo da hidrólise enzimática com altos teores de sólido (25% m/v), encontraram um valor de rendimento de hidrólise enzimática de 80% na batelada alimentada, 14% maior do que o valor encontrado na batelada simples. Gupta et al. (2012) também observaram um aumento no rendimento de hidrólise enzimática com 20% m/v de madeira de algaroba previamente deslignificada ao empregar batelada alimentada (RHE = 64%) quando comparada a batelada simples (RHE = 40%), o que correspondeu a um aumento de cerca de 57%.

Yang et al. (2015) estudaram diversas estratégias de hidrólise enzimática da palha de milho pré-tratada com ácido diluído (0,8% m/v 158°C por 10 min) em elevados teores de sólido (18% m/v). Os autores observaram que fracionamento dos sólidos (adição inicial de 60% seguido de 20% de sólidos após 12 e 24 h) aumentou em 5% nos valores de RHE na batelada alimentada (70%) em relação à batelada simples. Os autores também constataram que o fracionamento da enzima durante o processo foi menos efetivo do que sua adição total no início da reação. O mesmo foi observado por Cardona et al. (2015), que observaram que a adição inicial de toda enzima resultou em maiores rendimentos de glicose e um processo mais eficiente em termos de energia, devido à liquefação mais rápida e à suplementação de sólidos mais rápidos na batelada alimentada.

2.4 Fermentação alcoólica – Aspectos Gerais

A fermentação alcoólica é um processo metabólico associado a condições anaeróbias ou de hipóxia, onde há liberação de energia na ausência ou em baixas concentrações de oxigênio, respectivamente. Esse processo constitui um conjunto de reações catalisadas por enzimas, na qual ocorre a oxirredução intramolecular, uma reação exotérmica, que pode ser considerada como a oxidação anaeróbia parcial da glicose causada pela ação de leveduras, gerando como produto final etanol e gás carbônico, com liberação de energia química e térmica (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET, 2013).

A fermentação tem início com a glicólise, comum tanto aos processos aeróbios quanto aos anaeróbios, via central do catabolismo da glicose, onde essa molécula será oxidada, gerando duas moléculas de: piruvato, ATP, NADH e água. As duas moléculas de NADH produzidas devem ser oxidadas a NAD^+ de modo que a glicólise possa continuar a degradar outras moléculas de glicose (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; NELSON; COX, 2002).

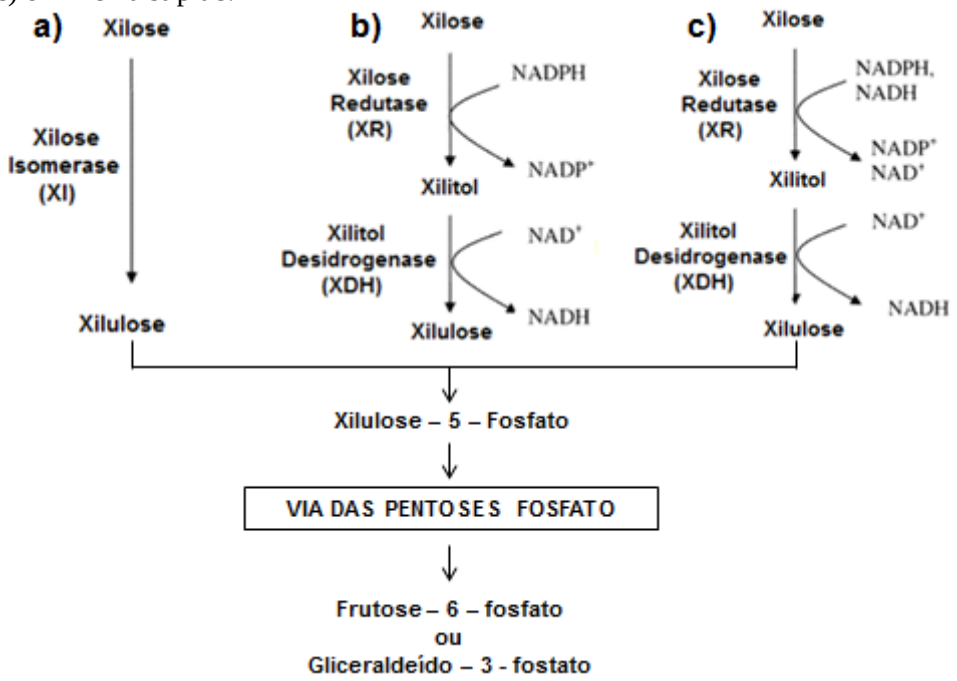
Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível, pela ação da piruvato descarboxilase, formando acetaldeído, que é posteriormente reduzido a etanol pela álcool desidrogenase, com o poder redutor fornecido pelo NADH, que é oxidado a NAD^+ (NELSON; COX, 2002). A quantidade de NADH é limitada, sendo essa molécula necessária na sua forma oxidada (NAD^+) como receptor de elétrons na glicólise e em sua forma reduzida (NADH) para a continuação do processo de produção de energia. A fermentação alcoólica é uma alternativa de recuperação deste cofator, quando há baixas concentrações de oxigênio (NELSON; COX, 2002).

O rendimento teórico em etanol a partir de glicose ou xilose é de 0,511 g/g, considerando que todo substrato é convertido em produto. Entretanto, na prática, esse valor não é comumente observado, devido ao desvio de parte de fonte de carbono na formação de produtos secundários, como glicerol, e na síntese de material celular para manutenção da levedura.

Em relação a bioconversão de xilose a etanol, são necessários sistemas enzimáticos específicos. Na **Figura 9**, estão representadas as vias responsáveis pela entrada da xilose no metabolismo fermentativo de micro-organismos.

A xilose é metabolizada pela via das pentoses. Os produtos dessa via são então direcionados para a glicólise, através da entrada de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato até a produção de etanol.

Figura 9 - Vias para fermentação de xilose, (a) em bactérias, (b) em fungos e leveduras em geral e (c) em Pichia stipitis.



Fonte: Adaptado de Agbogbo e Coward-Kelly (2008).

2.4.1 Fermentação de pentoses

A principal pentose produzida a partir da hidrólise da xilana é a xilose. Entre as leveduras naturalmente fermentadoras de pentoses, *Scheffersomyces stipitis* destaca devido à capacidade de fermentar uma ampla variedade de açúcares, apresentando rendimentos e produtividades de etanol bastante satisfatórios a partir de xilose (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010).

Assim como qualquer processo fermentativo, a produção de etanol a partir de pentoses pode ser influenciada por fatores como temperatura, pH, oxigenação, composição do meio, presença de subprodutos e concentração de inóculo (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010). A definição de condições ótimas do processo é uma importante maneira de se melhorar a eficiência da fermentação alcoólica, especialmente nos hidrolisados de biomassa que apresentam uma composição complexa em termos de açucares e subprodutos.

Garcia (2012), empregando hidrolisado de bagaço de malte, estudou o efeito da suplementação nutricional, pH e nível de inoculo sobre a produção de etanol pela levedura *S. stipitis*. Segundo os autores, a otimização dessas variáveis melhoraram em 234% a

produção de etanol, em relação à fermentação do hidrolisado controle (10 g/L), mostrando a importância da otimização das condições de fermentação para cada hidrolisado.

Vários trabalhos têm relatado o efeito dos principais compostos baseados nos hidrolisados hemicelulósico que possuem potencial efeito inibitório para o metabolismo fermentativo de *S. stipitis*. Dentre esses compostos, encontram-se ácidos acético, compostos derivados da degradação de açúcares (furanos), compostos fenólicos e sulfato de sódio gerado na neutralização de alguns hidrolisados.

Bellido et al. (2011), avaliaram o efeito do acido acético (0,5 g/L a 3,5 g/L) sobre a produção de etanol por *S. stipitis* usando como fonte de carbono 35g/L e 20 g/L de glicose e xilose, respectivamente. Os autores observaram que o ácido acético impactou negativamente a fermentação, reduzindo em 20% a produção de etanol em relação ao controle (22,8 g/L), quando foi adicionado no meio 0,5 g/L de ácido acético.Os autores observaram ainda que o aumento gradativo da concentração inicial de ácido acético aumentou a toxicidade do meio, sendo observada uma inibição completa da produção de etanol com 3,5 g/L de ácido acético.

Zeferino (2013), avaliando o impacto do ácido acético (1,5 a 4,5 g/L) na produção de etanol pela levedura *S. stipitis*, usando como fonte de carbono 50 g/L e 8 g/L de glicose e xilose, respectivamente, notou que a produção de etanol sofreu impacto negativo com adição de ácido acético. A presença do inibidor no menor e no maior nível testado levou a uma produção de etanol de 89,9% e 28,9%, respectivamente em relação ao controle (20,2 g/L), além de diminuir a produtividade volumétrica em etanol.

Com relação ao efeito dos furanos, Bellido et al.(2011)constataram que furfural (0,5 a 2,0 g/L) e HMF (0,1 e 0,5 g/L) não influenciaram a produção final de etanol dentro da faixa avaliada. No entanto, o furfural, nas primeiras 24 horas de fermentação, retardou a produção de etanol.

Zeferino (2013) avaliou a influência de furanos e fenólicos na fermentação alcoólica de *S. stipitis*, em meio contendo glicose e xilose, com 8 e 50 g/L, respectivamente. Para avaliar o efeito do furfural, a autora adicionou ao meio de fermentação esse composto nas concentrações iniciais de 12, 20, 43, 64 e 84 mg/L. De acordo com os resultados, o furfural na menor concentração (12 mg/L) promoveu um aumento de 13% na produção de etanol, em relação ao controle (20,2 g/L), enquanto, em concentrações intermediárias desse inibidor a máxima produção de etanol não foi alterada. No maior nível (84 mg/L) ocorreu um decréscimo de 16% da produção em relação ao controle. Quanto ao HMF, a autora mostrou que a adição desse furano em concentrações de até 424 mg/L tem pouca influência

sobre a produção total de etanol.Por outro lado, com adição de 553 mg/L de HMF a produção máxima de etanol aumentou em 18% em relação ao meio ausente desse subproduto.

Em relação aos ácidos fenólicos (ferúlico e *p*-cumárico), Zeferino (2013) notou que estes ácidos são nocivos ao metabolismo fermentativo da levedura apenas em altas concentrações acima de 290 mg/L reduzindo em mais de 25% a produção de etanol em relação ao controle.

O efeito dos sais de sódio solubilizado no hidrolisado hemicelulósico, durante o ajuste de pH do meio com NaOH foi avaliado sobre a fermentação de *S. stipitis* (AGBOGBO; WENGER, 2006). Nesse estudo, os autores testaram a concentração de 17 g/L deste sal, e observaram que nesta concentração o sulfato de sódio não afetou a produção de etanol e nem a produtividade, obtendo valores semelhantes ao controle.

2.4.2 Fermentação de hexoses

Dentre as leveduras não convencionais (ou "não *Saccharomyces*") com potencial para produção de etanol encontram-se aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces*, em particular a espécie *Kluyveromyces marxianus*. Essa espécie de levedura pode ser encontrada em diversos habitats o que mostra sua ampla diversidade metabólica (LACHANCE, 1998), possuindo a capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares, tais como glicose, xilose, sacarose, rafinose, inulina e lactose, e apresentando elevada capacidade de utilização do substrato para seu crescimento (BELLAVER et al., 2004; FONSECA; STOUTHAMER; WESTERHOFF, 2008). De acordo com Groeneveld et al. (2009), *K. marxianus* apresenta uma das maiores velocidades específicas de crescimento entre os eucariontes. Além disso, essa espécie é certificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos e como QPS (Qualified Presumption of Safety) na União Européia, sendo usada há vários anos tanto na indústria de alimentos como na de bebidas (LANE; MORRISSEY, 2010). Uma breve apresentação de outras aplicações industriais de *K. marxianus* pode ser vista na **Tabela 3**.

Todas essas características mencionadas acima têm impulsionado o interesse da utilização de *K. marxianus* na produção de etanol. Porém, para que o processo fermentativo seja eficiente é necessário definir as condições ambientais e nutricionais.

Tabela 3 - Resumo das principais aplicações industriais de *K. marxianus*.

Aplicação	Referência
Produção de compostos aromáticos:	
Ésteres, Ácidos carboxílicos,	FABRE et al. (1995)
Cetonas, Furanos, Álcoois.	MAGALHÃES et al. (2011)
Produção de enzimas endógenas:	
β-xilosidase	RAJOKA (2007)
β-galactosidase	PINHEIRO et al. (2000)
β-glicosidase	SZCZODRAK et al. (2000)
Inulinase	CRUZGUERRERO et al. (1995)
Produção de proteínas heterólogas:	
Celulase Termo estável	HONG et al, (2007)
Lactato desidrogenase	PECOTA et al. (2007)
Endopoligalacturonase	SIEKSTELE et al. (1999)
α-galactosidase	BERGKAMP et al. (1993)
Biorremediação:	
Tratamento de resíduos de papel	KADAR et al. 2004
Remoção de açúcares de águas residuais	HANG et al. 2003
Bioadsorção de corantes	MEEHAN et al. 2000
Produção de etanol:	
Por sacarificação e fermentação simultânea	PESSANI et al. 2011
	HIDENO et al. 2013
Células em suspensão e Imobilizadas	KOURKOUTAS et al. (2002)
Fermentações: contínuas e descontínuas	OZMIHCI; KARGI (2007)

Fonte: Adaptado de LANE, MORRISSEY, 2010.

Em relação ao oxigênio, a espécie *K. marxianus* apresenta baixo rendimento fermentativo em ambientes aeróbios, com elevadas concentrações de glicose, sendo considerada uma levedura respiro-fermentativa (VAN DIJKEN;WEUSTHUIS; PRONK,1993), preferencialmente classificada como Crabtree-negativa. A produção de etanol por *K. marxianus*está associada à limitação de oxigênio (VISSER et al., 1990).

Com objetivo de otimizar o nível de oxigenação para a produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em frascos Erlenmeyers, Castro (2011) variou a velocidade de agitação e o grau de aeração (V_{frasco}/V_{meio}) a 45 °C, em um meio contendo 50 g/L de glicose. Os resultados mostraram que nas condições de menor agitação e aeração o fator de

conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) foi de 0,44 g/g, enquanto que nas condições onde ocorreu maior transferência de oxigênio, esse fator decresceu para 0,24 g/g. Nessas condições, foi observada uma redução na produtividade volumétrica em etanol (Q_P) passando de 3,63 para 2,09 g/L.h. Nesse trabalho o autor concluiu que a disponibilidade de oxigênio é um fator capaz de interferir significativamente nos parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860 e, portanto, afeta tanto a conversão quanto a produtividade em etanol, pois o nível de oxigenação determina a divisão do fluxo de carbono da glicose entre o crescimento e a formação de produto.

O efeito da temperatura sobre o perfil fermentativo de *K. marxianus* tem sido bastante relatado na literatura. Apesar de ser uma espécie mesófila com temperatura ótima de crescimento entre 25 e 37 °C, *K. marxianus* é capaz de crescer em altas temperaturas, sendo considerada um micro-organismo termotolerante (DUNLAPet al., 2010). De acordo com Laszlo (1988), a termotolerância pode ser definida como a capacidade transitória das células sobreviverem quando expostas a temperaturas elevadas.

Yanase et al. (2010), avaliaram o efeito da temperatura de 30 a 52 °C sobre o desempenho fermentativo da levedura utilizando *K. marxianus* NBRC1777, em meio contendo 100 g/L de glicose como fonte de carbono. Os autores observaram que até 45 °C, a levedura produziu aproximadamente 45 g/L de etanol e consumiu toda glicose em 12 horas, enquanto que nas temperaturas de 48 e 50 °C, a produção de etanol decresceu para 20 g/L no mesmo tempo. Na temperatura de 52 °C, a levedura não consumiu a glicose e consequentemente nenhuma produção de etanol foi verificada. A maior eficiência do processo (92,9%) foi obtida a 40 °C com uma produção máxima de etanol de 47,4 g/L.

Com relação ao pH do cultivo, Kumar et al. (2013),avaliando o efeito desse parâmetro sobre o crescimento e a fermentação da*Klyuveromyces* sp. IIPE453, definiram que a faixa de pH de 5,0 a 6,0, deve ser utilizada na fermentação para se obter um alto fator de conversão de substrato em produto.

Além de todos os fatores acima citados para fermentação de *K. marxianus*, a necessidade nutricional também deve ser suprida, através da formulação de um meio de cultivo adequado. A falta e o excesso de nutrientes podem ocasionar baixos valores de velocidade de crescimento e produtividade, prejudicando o cultivo desta levedura (FERREIRA, 2013).

O efeito da concentração inicial de glicose sobre a fermentação alcoólica de *Klyuveromyces* sp. IIPE453 foi avaliado por Kumar et al. (2013). Os ensaios foram realizados a 50 °C e pH inicial 5,0, variando a concentração inicial da glicose de 200 a 300

g/L. Os resultados mostraram que a produção de etanol não foi afetada pela concentração inicial desta hexose, sendo obtido cerca de 90 g/L de etanol e uma conversão de substrato em produto de0,5 g/g. Porém, foi observado um aumento residual do substrato ao final da fermentação, com aumento da concentração de glicose no meio. Os autores concluíram, portanto, que a *Kluyveromyces sp.* IIPE453 apresenta elevada tolerância para altas concentrações de glicose, a 50 °C, não sendo observada repressão catabólica nas condições testadas.

Para elucidar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura e sulfato de amônio), assim como a interação entre elas sobre o crescimento e a produção de etanol por *K. marxianus* CECT 1123 (100 g/L de lactose a 30 °C), Parrondo, García e Díaz (2009) variaram a concentração de sulfato de amônio de 0 a 4,7 g/L e extrato de levedura de 0 a 6 g/L. Os autores constataram que, ao adicionar apenas sulfato de amônio no meio de fermentação, tanto a velocidade específica de crescimento, quanto a concentração final de biomassa e etanol tiveram um pequeno aumento, em relação ao meio não suplementado. No entanto, ao adicionar apenas extrato de levedura ou a mistura de extrato de levedura e sulfato de amônio, os autores notaram uma redução no tempo de 96 para 24 horas para obtenção da máxima concentração de etanol (50 g/L), triplicando assim o valor de produtividade volumétrica do produto. Nesse trabalho, os autores concluíram que, além da fonte de nitrogênio, as vitaminas presentes no extrato de levedura são de fundamental importância para melhorar os parâmetros da fermentação de *K. marxianus* CECT 1123. Como já reportado por Kurtzman (2003), *K. marxianus* não utiliza o nitrato como fonte de nitrogênio.

Em relação à fonte de nitrogênio, Limtong, Sringiew e Yongmanitchai (2007) avaliaram o desempenho fermentativo da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 em caldo de cana com e sem suplementação de $(NH_4)_2SO_4$. Os autores observaram que suplementação do meio com 0,7 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, proporcionou um aumento na concentração de etanol de 125%, passando de 68,5 para 78 g/L.A eficiência (69,5%) e produtividade em etanol (1,08 g/L.h) no meio suplementado com 0,7 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, foram superiores aos do meio não suplementado (61,0% e 0,95 g/L.h, respectivamente),demonstrando o favorecimento dos parâmetros fermentativos da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 com a suplementação.

O efeito do magnésio sobre a produção de etanol por *K. marxianus var. marxianus* a 45 °C usando melaço como fonte de carbono foi estudado por Flynn e Marchant (1996). Os resultados mostraram que, com adição de 0,567 g/L sulfato de magnésio, tanto a

concentração de etanol, quanto na produtividade foram aumentadas em 15% e 380%, respectivamente, quando comparados ao controle, ou seja, o magnésio tem um efeito positivo na produção de etanol.

Limtong, Sringiew e Yongmanitchai (2007) avaliaram o efeito do potássio sobre o desempenho fermentativo da cepa *K. marxianus* DMKU 3-1042 na produção de etanol a partir de caldo de cana. Os autores suplementaram o caldo de cana com 220 g/L de sacarose, na temperatura de 37 °C, e utilizaram o fosfato monopotássico (KH_2PO_4), como fonte de potássio, em concentrações variando entre 0 e 1,0 g/L. Os autores notaram que o meio suplementado com 0,5 g/L de KH_2PO_4 favoreceu todos os parâmetros avaliados em aproximadamente 10% em relação ao controle, atingindo valores de 76,5 g/L de etanol, produtividade volumétrica em etanol de 1,06 g/L.h e eficiência 68,1%.

3 OBJETIVO

O presente trabalho tem como principal objetivo desenvolver um processo de produção de etanol a partir das frações açucaradas (celulósico+hemicelulósico) da palha de arroz. Para atingir o objetivo do projeto, as seguintes etapas foram cumpridas:

a) Definição de uma condição de tratamento ácido (temperatura, concentração de ácido e tempo) para a palha de arroz previamente tratada com álcali visando eficiente solubilização da hemicelulose e elevada recuperação de celulose;

b) Avaliação do perfil de hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada nas condições previamente estabelecidas empregando elevados teores de sólidos (16, 20 e 24% m/v) em reator MBV (moinho de bolas vertical) em batelada simples;

c) Avaliação do processo de hidrólise enzimática em batelada alimentada empregando o teor de sólidos de 24% m/v;

d) Avaliação do impacto da sequência de tratamentos utilizados no processamento da palha de arroz sobre o rendimento de hidrólise enzimática com alto teor de sólidos (24%) em batelada alimentada;

e) Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado celulósico (obtido através de batelada simples empregando 24% m/v de sólidos) por *Kluyveromyces marxianus*, com ou sem suplementação nutricional e na presença ou ausência de sólidos residuais da hidrólise enzimática.

f) Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado celulósico (24% m/v, obtido através de batelada alimentada) em reator MBV, no metabolismo de *K. marxianus.*

g) Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico com ou sem suplementação nutricional por *Scheffersomyces stipitis*, em frascos Erlenmeyer.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fermentação do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).

4.1 Obtenção da matéria-prima

A palha de arroz foi obtida de plantação na região de Lorena/SP (localizada entre 493939.6 L e 7490759.5 N, relativo às coordenadas UTM), e em seguida, seca ao sol, até umidade de aproximadamente 10%, e moída em moinho de martelo. Foi pesada, ensacada e estocada até a realização dos pré-tratamentos.

4.2 Pré-tratamentos

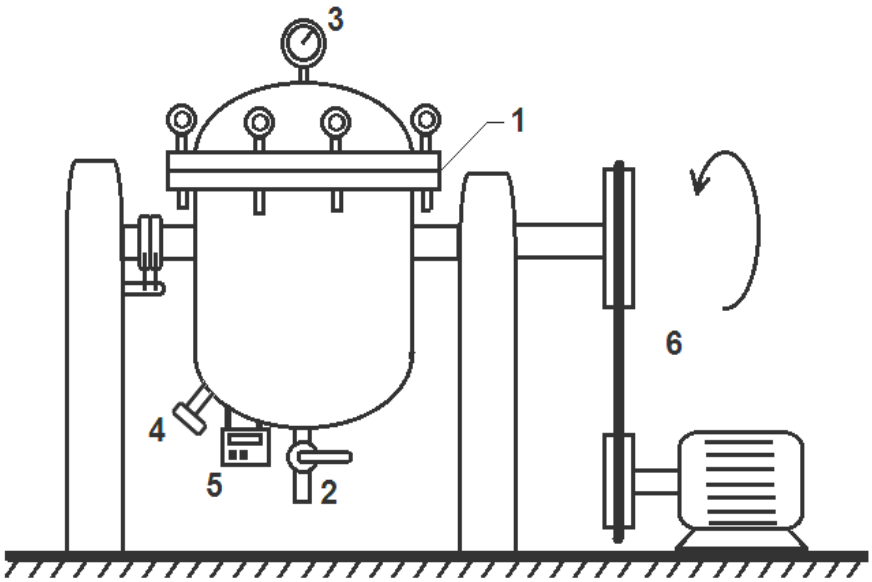
A palha de arroz foi submetida a uma sequência de pré-tratamentos: tratamento alcalino e posterior processo de hidrólise com ácido diluído, conforme detalhado a seguir.

4.2.1 Pré-tratamento alcalino

O tratamento alcalino (desacetilação) visou a remoção dos grupos acetil da palha de arroz. Para isso, o material foi incubado a 70 °C por 45 minutos, empregando uma solução de NaOH 0,8 % (m/v) e uma consistência de 10% m/v (80 mg de NaOH para cada 1 g de biomassa), conforme condições previamente estabelecidas por Cunha et al. 2016.

A reação foi realizada em reator de 50 L com 40 litros de volume útil, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo (**Figura 10**), com agitação de 2 rpm. Após o tempo reacional e resfriamento do reator, a fração sólida pré-tratada foi separada do licor alcalino (fração líquida) por filtração, sendo posteriormente o material sólido lavado com água em abundância até que o pH do filtrado atingisse a neutralidade. Em seguida, secado ao sol, até a umidade de 9,4%, e então armazenada até o momento da análise. Os sólidos foram caracterizados quimicamente e o licor alcalino analisado quanto ao teor de açúcares, acetato e derivados de lignina.

Figura 10 - Reator de aço inoxidável de 50 litros de capacidade, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo. (1) boca de carga; (2) válvula de descarga; (3) manômetro; (4) termopar; (5) controle de temperatura; 6) sistema de agitação.

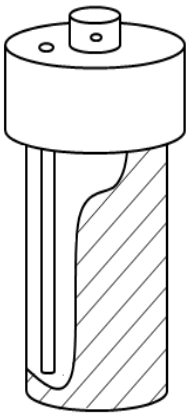


Fonte: Silva (2011).

4.2.2 Tratamento ácido

A fração sólida, obtida após o tratamento alcalino, foi então pré-tratada com ácido diluído para remoção da hemicelulose. Os ensaios foram realizados em reator de aço inox com capacidade de 0,50 litros, como apresentado na **Figura 11**. As reações foram realizadas em um banho de óleo de silicone (Lauda).

Figura 11 - Reator de aço inox com capacidade de 0,50 litros.



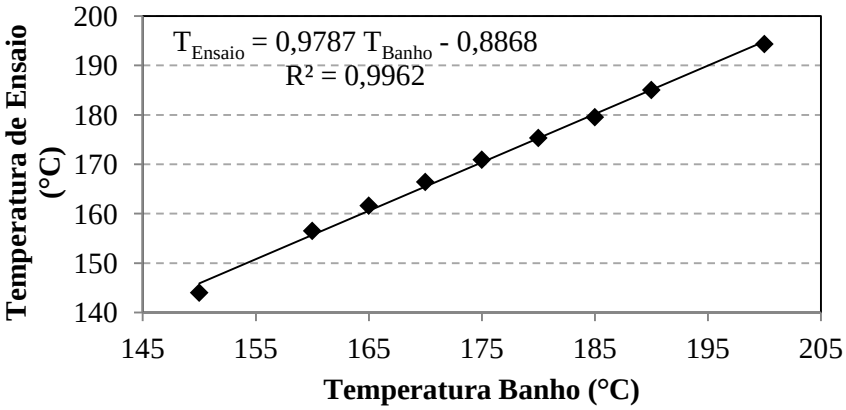
Fonte: Arquivo Pessoal.

4.2.2.1 Calibração do reator nas condições do pré-tratamento ácido

Inicialmente, foi avaliada a temperatura interna do reator comparada com a temperatura do banho, sendo, assim, definido o tempo de ensaio nas diferentes temperaturas avaliadas, utilizando um termopar para calibrar o ensaio.

A calibração determinou a temperatura ideal do banho de óleo para atingir a temperatura desejada nos experimentos. Para isso, o reator (com as mesmas condições da hidrolise ácida: 10% de consistência e um volume final de 500 mL) foi mantido em banho de óleo de silicone em diversas temperaturas por 3 horas (momento no qual não havia nenhuma variação na temperatura); e, após este período, para cada temperatura do banho de óleo de silicone foi medida a temperatura interna do reator (temperatura real), com auxílio de um termopar, de forma a obter uma curva de calibração relacionando os valores das duas temperaturas. Através dos pontos experimentais foi realizada a regressão linear dos dados e a equação correspondente ao ajuste linear dos dados é apresentada na **Figura 12**.

Figura 12 - Curva de calibração da temperatura do banho em função da temperatura de reação.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Em seguida, foram feitos os perfis das temperaturas de dentro do reator (150, 160 e 170 °C) em função do tempo, para definir exatamente a duração do pré-tratamento. Para definir momentos nos quais as temperaturas são constantes, desconsiderando, assim, o tempo de rampa, na qual a variação de temperatura é grande. Para isso foram medidas periodicamente a temperatura dentro do reator, até 20 minutos após atingir a temperatura desejada, considerando uma variação de ± 3 °C, erro do termopar.

4.2.2.2 Hidrólise ácida

Esta etapa objetivou determinar a concentração do catalisador e a temperatura de hidrólise do sólido pré-tratado. Para isso, foi empregado um planejamento composto de face centrada do tipo 2^2, variando a concentração de ácido sulfúrico (0,5 a 1 % m/v) e temperatura de reação (150 a 170 °C), conforme apresentado na **Tabela 4**. A hidrólise foi realizada em reator de aço inox (conforme descrito no item 4.2.2) com uma relação de matéria seca/solução ácida de 1:10 e consistência de 10% de matéria seca, durante 20 minutos. Após a hidrólise ácida, a fração sólida foi separada por filtração, lavada com água até atingir pH neutro e caracterizada quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina, para posterior hidrólise enzimática.

Tabela 4 - Planejamento composto de face centrada do tipo 2^2, para a avaliação do efeito do pré-tratamento ácido variando temperatura/H_2SO_4.

Ensaio	**Variáveis**			
	Níveis codificados		**Valores reais**	
	Tempo	**H_2SO_4**	**Temperatura (°C)**	**H_2SO_4 (%m/v)**
1	-1	-1	150	0,50
2.1	1	-1	170	0,50
2.2	1	-1	170	0,50
3.1	-1	1	150	1,00
3.2	-1	1	150	1,00
4	1	1	170	1,00
5	-1	0	150	0,75
6	1	0	170	0,75
7	0	-1	160	0,50
8	0	1	160	1,00
PC.1	0	0	160	0,75
PC.2	0	0	160	0,75

Fonte: Arquivo Pessoal.

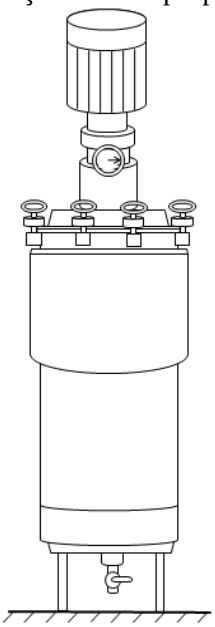
4.2.3 Curva de tempo na condição otimizada de pré-tratamento ácido

Após selecionada a condição otimizada de hidrólise ácida, foram realizados ensaios para avaliar a influência do tempo, desde o momento em que a ampola é imersa no banho de óleo (antes mesmo da estabilização da temperatura), durante todo o tratamento ácido. Para isso foram feitas hidrólises ácidas de 15 a 85 minutos. Os ensaios foram realizados exatamente como descritos no item 4.2.2.

4.2.4 Aumento de escala na condição otimizada de pré-tratamento ácido

Visando a obtenção de um maior quantidade de celulignina para a utilização nas etapas posteriores do trabalho, foi realizado um ensaio de hidrólise ácida em reator de 80 L (**Figura 13**), empregando 3,2 Kg da palha de arroz tratada com álcali e 32 litros de solução ácida de 0,85% (m/v), na temperatura de 150 °C por 10 minutos.

Figura 13 - Reator de aço inoxidável de 80 litros capacidade, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Após término da reação, o hidrolisado hemicelulósico foi separado do sólido por filtração em peneira de 120 mesh, seguido por centrifugação em um extrator centrífugo do tipo cesto (Spencer Scientific) a 3600 rpm. A celulignina foi lavada com água até pH 6,5 e seca naturalmente ao sol até atingir 10% de umidade, sendo em seguida, caracterizada

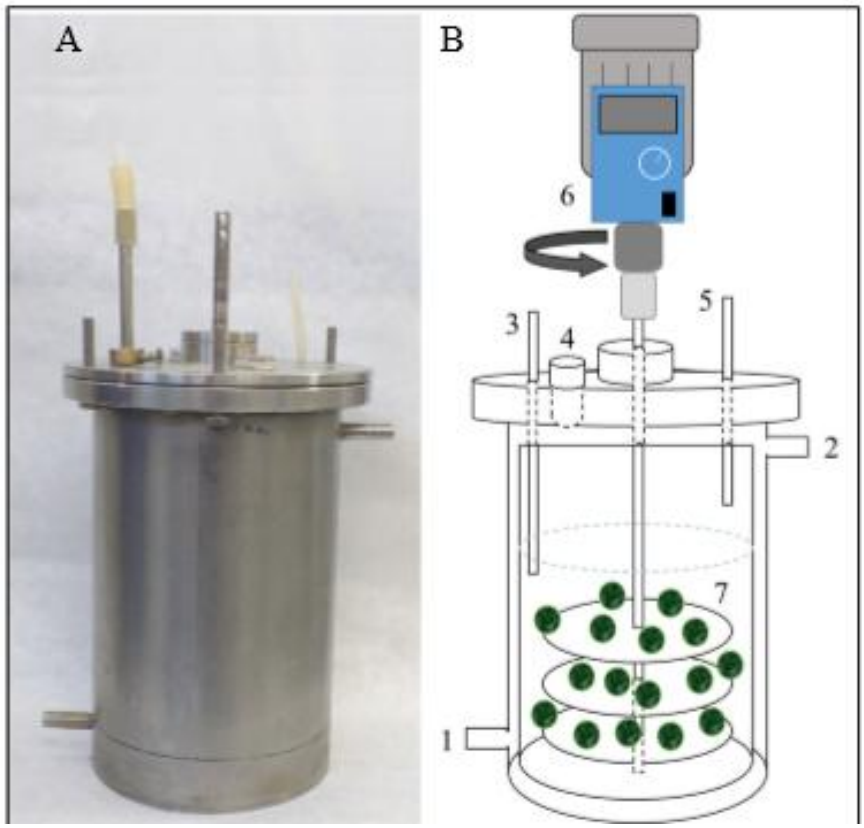
quimicamente. Esse sólido foi denominado de palha de arroz tratada com álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$) e utilizado nas etapas seguintes do presente estudo. O hidrolisado hemicelulósico obtido foi concentrado de forma a atingir uma concentração de xilose de aproximadamente 60g/L.

Para efeito de comparação, nas condições otimizadas de hidrólise ácida do material desacetilado, também foi realizada a hidrólise ácida do material in natura, sendo nomeado de palha de arroz, tratada apenas com ácido (PT_{H2SO4}).

4.3. Hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada

Após determinar as condições de hidrólise ácida, a celuignina tratada com álcali foi submetida à hidrólise enzimática. Os experimentos foram conduzidos em reator do tipo Moinho de Bolas Vertical (MBV), conforme apresentado na **Figura 14**.

Figura 14 - Reator Moinho de Bolas Vertical (MBV) em imagem real (A) e esquemática (B) para mostrar os detalhes internos. (1) entrada e (2) saída de água para o controle da temperatura; (3) duto de amostragem; (4) porta de adição de substrato, enzimas e levedura; (5) porta de saída de gases; (6) motor de agitação; (7) impelidor de pás planas e esferas.



Fonte: Castro et al. (2017).

Os ensaios foram realizados utilizando diferentes teores de sólidos em batelada (16, 20 e 24%). Nessa etapa, foi utilizado como substrato a palha de arroz tratada com álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$) com a carga de enzimas de 29,5 FPU/g de celulose.

Para o preparo do reator, inicialmente adicionou-se a 30 esferas de vidro. Em seguida, o conjunto foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Após a esterilização do reator, o substrato foi adicionado ao reator MBV e o ajuste da temperatura desejada (46 °C) foi previamente realizado, através da circulação de água na camisa do reator, utilizando um banho termostatizado com bomba (Heto). Em seguida foram adicionados 25 mL de tampão citrato de sódio 1 M (de forma a obter uma concentração final de 50 mM, pH 4,8) e água destilada esterilizada. A mistura foi então agitada a 450 rpm por 2 min para homogeneizar o sistema. Após a estabilização da temperatura desejada (46 °C), foi adicionado o extrato enzimático na proporção de 29,5 FPU (44,1 UI) por grama de celulose. O extrato era formado por Cellubrix e Novozyme 188 (0,05 mL de Novozyme 188/mL de Cellubrix). Ao final, foi feita uma lavagem dos recipientes contendo as enzimas com 50 mL de água destilada esterilizada, perfazendo um volume total do meio reacional de 500 mL, considerando o teor de umidade do substrato (5,59%).

Para efeito de comparação da performance do reator do tipo Moinho de Bolas Vertical, as hidrólises enzimáticas com maior teor de sólidos (24% m/v) foram também conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio reacional, sob agitação rotatória de 100 rpm e temperatura de 46 °C. Para isto, adicionou-se 12,0 g (massa seca) da $PT_{NaOH+H2SO4}$ aos frascos Erlenmeyer previamente esterilizados, seguido pela adição de 2,5 mL de tampão citrato de sódio 1M (para concentração final de 50 mM, pH 4,8). Então, o volume apropriado de água e das preparações enzimáticas diluídas foram adicionadas para atingir a carga enzimática desejada em 50 mL de volume final.

A partir dos resultados obtidos em batelada, foram então conduzidos experimentos em batelada alimentada (fed-batch) com 24% m/v de sólidos, adicionando inicialmente toda a enzima (relativa aos 24% de sólidos) e 16% m/v de palha de arroz e 4% após 10 e 24 h. O preparo do reator e volume final de reação seguiu o mesmo protocolo descrito para batelada simples.

Além disso, foi avaliado o impacto dos diferentes tratamentos utilizados durante o processamento da palha de arroz. Foram submetidos à hidrólise enzimática em batelada alimentada os sólidos obtidos em cada etapa (1) alcalino (PT_{NaOH}); 2) ácido (PT_{H2SO4}) e 3) alcalino+ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$), nas condições experimentais previamente estabelecidas em reator MBV.

Para o acompanhamento da reação de hidrólise enzimática, amostras de 2 mL foram retiradas periodicamente até 48 horas. Após centrifugação da amostra a 4000 rpm por 10 minutos (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific), o sobrenadante foi estocado a -20 °C para posterior quantificação de glicose, celobiose e xilose, os quais foram utilizados para a determinação dos parâmetros do processo de hidrólise enzimática.

4.4 Fermentação da fração celulósica

4.4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado no presente estudo foi a estirpe termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860, obtida da Coleção de Culturas ARS, Peoria – IL, EUA. A cultura de levedura foi mantida em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinados e conservada a 4 °C.

4.4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada das células recém-repicadas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquota de 1 mL desta suspensão foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de hidrolisado celulósico com 20% de teor de sólidos. Inicialmente, o hidrolisado foi centrifugado a 1100 x g por 20 minutos e, posteriormente, diluído de forma a obter um meio contendo aproximadamente 30 g/L de glicose. O meio foi suplementado com (em g/L): 1,0 de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 de KH_2PO_4, 0,1 de $MgSO_4.7H_2O$ e 3,0 de extrato de levedura. Para o preparo deste meio foram utilizadas soluções-estoque concentradas de cada componente previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Os meios inoculados foram incubados em agitador rotatório a 43 °C e agitação a 150 rpm, por 16 horas. Após esse tempo as células foram separadas por centrifugação a 1100 x g por 20 minutos e resuspendidas em água destilada de forma a se obter uma suspensão celular densa. A partir dessa suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio de fermentação, com a concentração desejada.

4.4.3 Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico sobre a fermentação alcoólica de *K. marxianus*

Com o objetivo de avaliar a necessidade da suplementação nutricional, no desempenho fermentativo da referida levedura no hidrolisado celulósico, produzido a partir da batelada simples com 24% m/v de sólidos, foram adicionados os seguintes nutrientes (em g/L): 1,0 de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 de KH_2PO_4, 0,1 de $MgSO_4.7H_2O$ e 3,0 de extrato de levedura no hidrolisado celulósico, obtido em regime de batelada com 24% m/v, centrifugado ou não. Para o preparo deste meio foram utilizadas soluções-estoque concentradas de cada componente previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, à temperatura de 43°C, sob agitação de 100 rpm, inoculados com 1 g/L de concentração inicial de células. Durante os experimentos, amostras foram coletadas a cada 3 horas e avaliadas quanto ao crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol.

4.4.4 Estudo cinético da bioprodução de etanol em reator de bancada

Após avaliação do desempenho da fermentação por *K. marxianus* em hidrolisados celulósicos de 24% m/v, em batelada simples com e sem suplementação nutricional, foi selecionado o hidrolisado celulósico com maior concentração de glicose, a partir da hidrólise enzimática do material tratado com alcalino+ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$) para os ensaios em reator de bancada.

Os ensaios foram realizados em reator Moinho de Bolas Vertical (MBV), em regime batelada, a 40 ºC, sem adição de esfera e 200 rpm de agitação, nas condições de fermentação otimizadas por Cunha (2016). O meio de fermentação foi composto pelo hidrolisado celulósico da palha de arroz com e teve seu pH ajustado para 5,5, com hidróxido de sódio10 M.

Para isso, 500 mL meio fermentativo foi inoculado com 3,0 g/L de células e incubadas a 40 ºC por 12 horas. As amostras foram retiradas periodicamente para avaliação do pH, biomassa, concentração de etanol e açúcares.

4.5 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico

4.5.1 Micro-organismo

Foi utilizada a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria, Illinois. A cultura foi mantida em meio de repique em ágar YMDP (3,0 g/L de extrato de levedura, 3,0 g/L de extrato de malte, 5,0 g/L de peptona, 10 g/L de glicose, 20 g/L de ágar). Foram feitas transferências periódicas da cultura e conservação em geladeira. O repique foi sempre preparado com 24 h de antecedência para utilização do inóculo.

4.5.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada das células recém repicadas para tubos de ensaio, contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquota de 1 mL dessa suspensão foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL com hidrolisado hemicelulósico, diluído até uma concentração de 30 g/L de xilose, e, suplementado de, $(NH_4)_2HPO_4$ (3,0 g/L), KH_2PO_4 (19,0 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (1,0 g/L) e extrato de levedura (3,0 g/L). Para o preparo deste meio foram utilizadas soluções-estoque concentradas de cada componente previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 minutos.O meio à base de hidrolisado hemicelulósico foi preparado utilizando o hidrolisado concentrado, e teve seu pH ajustado para 5,5, com hidróxido de sódio10 M e em seguida centrifugado a 1100 x g por 20 min para remoção dos sólidos.

Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório a 30°C, 200 rpm por um período de 24 horas. Decorrido esse tempo, as células foram separadas por centrifugação a 1100 x g por 25 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão celular concentrada. Com base na concentração celular dessa suspensão, foi calculado o volume necessário para fornecer uma concentração celular inicial de 1 g/L no meio de fermentação.

4.5.3 Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico sobre a fermentação alcoólica de *S. stipitis*

Com o hidrolisado hemicelulósico obtido no reator após as etapas de desacetilação e hidrólise ácida (item 4.2.4), foram realizados ensaios de fermentação.

Nessa etapa, para avaliar a necessidade da suplementação nutricional no desempenho fermentativo da *S. stipitis* no processo de bioconversão de D-xilose em etanol, foram adicionados em conjunto os seguintes nutrientes (em g/L): 3,0 de $(NH_4)_2HPO_4$, 19,0 de KH_2PO_4, 1,0 de $MgSO_4.7H_2O$ e 3,0 de extrato de levedura no hidrolisado hemicelulósico obtido quando o meio foi suplementado. Ao não ser suplementado a fermentação se deu apenas no hidrolisado hemicelulósico.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotatório por 61 horas, a temperatura de 30°C, sob agitação de 200 rpm, com 1 g/L de concentração inicial de células. Durante os experimentos, amostras foram coletadas e avaliadas quanto ao consumo de glicose e xilose, além da produção de etanol.

4.6. Acompanhamento analítico dos experimentos

4.6.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz

O teor de umidade da palha de arroz foi determinado através de secagem de amostra da palha em estufa a 105 °C até peso constante. O valor em percentual foi calculado dividindo-se a diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra pelo peso inicial, multiplicando-se o resultado por 100.

4.6.2 Determinação do teor de extrativos

Para determinação do teor de extrativos da palha de arroz in natura, o material foi inicialmente extraído em água e em seguida em etanol (95% v/v) utilizando um aparelho Soxhlet. As amostras (3,0 g em massa seca), em triplicata, foram mantidas em contato com

os solventes (800 mL) durante 24 horas (com substituição do primeiro solvente após 12 horas). Após a extração, as amostras foram secas na temperatura ambiente e então transferidas quantitativamente para pesa-filtros previamente tarados. Os pesa-filtros contendo as amostras foram colocados em estufa a 105 °C, até massa constante. O cálculo da porcentagem de extrativos foi baseado na massa seca inicial do material não extraído, relacionando com a massa seca obtida após a extração.

4.6.4 Determinação dos teores dos açúcares, ácido acético, glicerol, xilitol e etanol

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, glicerol, xilitol e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N; fluxo do eluente 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Para as análises, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em Sep-Pack Cartidge C18 (Waters Associate - MILLIPORE). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

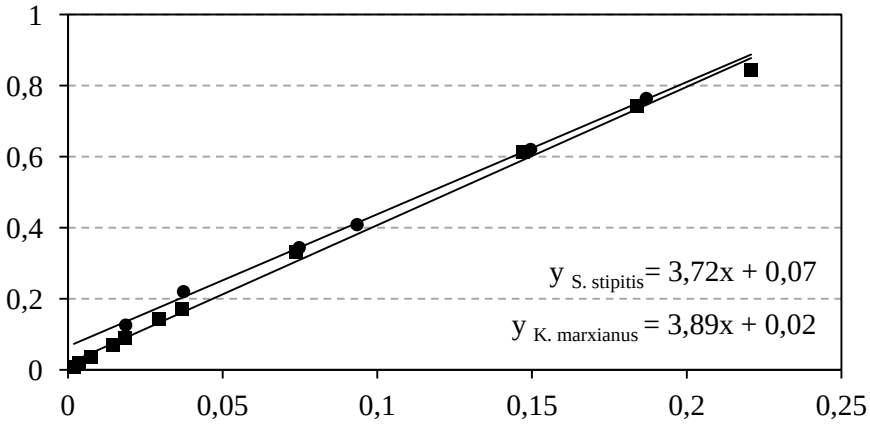
4.6.5 Determinação dos teores de furanos e compostos fenólicos

As concentrações de furanos (furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácido furóico) e fenólicos de baixo peso molecular (ácidos gálico, vanílico, p-cumárico, siríngico e ferúlico; álcool vanilil e vanilina) foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity, utilizando um detector UV (a 276 nm) e coluna Waters Spherisorb C18 5 µm ODS2 4,6 x 100 mm sob as seguintes condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL. As amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate - MILLIPORE). As concentrações desses compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.6.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada em espectrofotômetro (Hitachi 1800) pela medida de absorbância das amostras diluídas, utilizando água destilada como branco. Os valores de concentração foram calculados através da equação das curvas de calibração entre o peso seco e absorbância, a 600 nm, obtidas, separadamente, para os micro-organismos em questão. Foram determinadas curvas em meio sintético que servirão para a conversão de DO_{600} para concentração celular em g/L, necessário para atingir a concentração inicial de inoculo desejada (**Figura 15**).

Figura 15 - Valores de absorbância a 600 nm em função da concentração celular de *K. marxianus* (■) e *S. stipitis* (●).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Para a obtenção das curvas padrão que relaciona a DO_{600} com a concentração de células, cultivou-se separadamente cada levedura *K. marxianus* e *S. stipitis* em três frascos Erlenmeyer de 125 mL, cada um contendo 25 mL de meio semissintético suplementado com os nutrientes descritos anteriormente para cada levedura. Foi então realizado o cultivo por 16 e 30 h, respectivamente para *K. marxianus* e *S. stipitis*. Após esse tempo, todo o volume dos meios de cultivo para cada levedura foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific) para recuperação da massa celular que, em seguida, foi lavada por duas vezes com água destilada. As células lavadas foram ressuspendidas em 15 mL de água destilada, formando uma suspensão celular densa. A partir desta suspensão celular foram retiradas alíquotas para diluição e leitura a 600 nm, de forma que fossem alcançadas leituras entre 0,1 a 0,7 unidades de DO_{600}. Além disso, alíquotas de 3 mL da mesma suspensão celular foram colocadas em cadinhos previamente tarados e incubados em estufa a 105 °C, até peso constante. A partir dos resultados foi

obtida uma equação linear que permitiu a conversão da DO_{600} em concentração celular (g/L).

4.6.3 Fotomicrografias

Amostras foram fixadas sobre uma placa de aço por meio da colagem de uma fita de carbono e aplicada uma fina camada de prata de aproximadamente 20 nm em uma metalizadora MED020 (BAL-TEC /MCS MULTICONTROL SYSTEM). As imagens de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foram obtidas em um equipamento Marca Hitachi modelo TM3000. LTD com aumentos de 50 e 20.000 vezes, empregando um sinal de elétrons secundários e uma voltagem de 20kV, sendo então obtidas as fotomicrografias. Essas análises foram realizadas no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAR) da EEL-USP.

4.6.4 Determinação do índice de cristalinidade (I_C)

As medidas de difração de raios-x para determinação do índice de cristalinidade foram realizadas em um difratômetro D8-Discover da Bruker utilizando tubo de cobre (comprimento de onda de 0,15418 nm). O difratômetro foi configurado com espelho de Goebel, fendas de 1,2 mm e 0,3 graus e detetor linear com 190 elementos (Linxeye). As varreduras teta-2teta (θ-2θ), entre 10 e 40 graus, foram feitas com velocidade de 0,05 graus por segundo. A análise foi efetuada diretamente nas palhas moídas, no equipamento Ultra-Turrax Tube Drive (IKA) e peneirada em malha de 60 mesh,

A determinação do I_C foi obtida pelo método de Segal et al. (1959), com auxílio do software OriginPro 8.5.

Para determinação do I_C da celulose foi calculada a razão entre a intensidade do pico referente ao plano 002 (22º ≤2θ≤23º), definido como celulose, o halo amorfo (18º≤2θ≤19º), como descrito na equação abaixo.

$$I_C(\%) = \frac{(I_{002}+I_A)}{I_{002}} X100 \qquad (1)$$

Essas análises foram realizadas no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

4.7. Metodologia de análise dos resultados

4.7.1 Determinação dos parâmetros fermentativos

Para avaliar o processo fermentativo, foram calculados os seguintes parâmetros: fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em etanol ($Y_{P/S}$), fator de rendimento de etanol em células ($Y_{P/X}$), produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e eficiência do processo (η).

O fator de conversão de substrato em células, $Y_{X/S}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de células em função da concentração de glicose. O $Y_{X/S}$ é o coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

O fator de conversão de substrato em etanol, $Y_{P/S}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de etanol em função da concentração de glicose. O $Y_{P/S}$ correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

O fator de rendimento de etanol por célula, $Y_{P/X}$ (g/g), foi calculado por regressão linear dos dados de concentração de etanol em função da concentração de celular. O $Y_{P/X}$ correspondeu ao coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

No caso dos fatores de conversão, quando não foram obtidos por regressão linear, foram obtidos pela variação de concentração inicial e final, como descritas nas equações a seguir.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$ Fator de conversão de substrato em células (2)

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$ Fator de conversão de substrato em etanol (3)

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$ Fator de rendimento de etanol por célula (4)

A velocidade instantânea máxima de crescimento ($\mu_{máx.}$) foi calculada por regressão linear dos dados de $\ln X/X_o$ em função do tempo. O $\mu_{máx.}$ corresponde ao coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste linear dos dados.

A produtividade volumétrica em células, Q_X (g/L.h), foi calculada dividindo a concentração de células obtida pelo respectivo tempo.

$$Q_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{(X - X_0)}{(t - t_0)} \qquad \text{Produtividade volumétrica em células.} \qquad (5)$$

A produtividade volumétrica em etanol, Q_P (g/L.h), foi calculada dividindo a concentração de etanol obtida pelo respectivo tempo.

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(P - P_0)}{(t - t_0)} \qquad \text{Produtividade volumétrica em etanol.} \qquad (6)$$

A eficiência de conversão η (%) foi calculada pela divisão do valor do $Y_{P/S}$ (obtido) pelo fator teórico (0,51 g/g) multiplicado por 100, como demonstrado na equação.

$$\eta = \frac{Y_{P/S(calculado)}}{Y_{P/S(teórico)}} x100 \qquad \text{Eficiência de conversão.} \qquad (7)$$

Onde:

P = concentração final de etanol (g/L);

P_0= concentração inicial de etanol (g/L);

X= concentração final de célula (g/L);

X_0= concentração inicial de etanol (g/L);

S= concentração final de glicose (g/L);

S_0= concentração inicial de glicose (g/L);

t_0 = tempo inicial da fermentação (h);

t = tempo final da fermentação (h).

4.7.2 Determinação dos parâmetros de hidrólise enzimática

Para a determinação do rendimento de conversão da celulose (RCC), foi considerado o percentual entre a concentração de glicose obtida no experimento e a concentração de glicose potencial presente no substrato, de acordo com a seguinte equação:

$$RCC = \frac{[G_{experimental}]}{[G_{potencial}]} x100 \quad (8)$$

$$[G_{potencial}] = \frac{T_{sólidos} x T_{celulose} x f_D}{f_C} \quad (9)$$

Onde:

P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f = Concentração inicial e final de substrato (glicose);

$G_{potencial}$ = Concentração potencial de glicose presente no material pré-tratado;

$G_{potencial}$= Concentração de glicose obtida no experimento;

$C_{substrato}$ = concentração do material pré-tratado (em % m/v);

Tsubstrato = teor de sólidos na reação de hidrólise enzimática (g/100 mL);

$T_{celulose}$ = Teor de celulose no material pré-tratado (em % g/g);

f_D = Fator de diluição = 0,1;

f_C = Fator de conversão de celulose em glicose = 0,9.

4.7.2.1 Determinação das atividades enzimáticas.

- FPAse

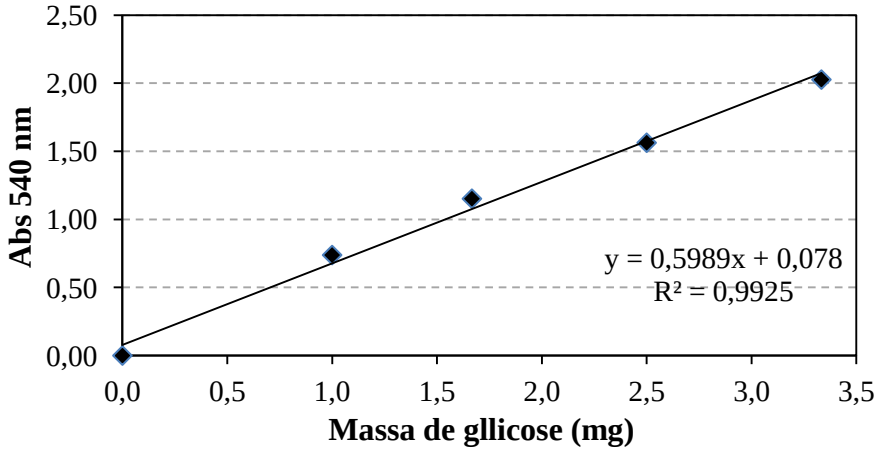
A atividade total das celulases consiste na ação dos três grupos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidases, sobre um substrato celulósico insolúvel, e por isso é denominada FPAse ou FPA (“filter paper activity”).

A atividade de FPAse foi determinada a partir de adaptações da metodologia descrita por Ghose (1987). A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de Whatman N° 1 com tamanho de 1 x 6 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático em cinco diluições (25, 50, 100, 150 e 200 vezes). As misturas foram aquecidas

em banho a 46°C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 3,0 ml de DNS, sendo a mistura posteriormente fervida por 5 minutos (MILLER, 1959). Posteriormente, foram adicionados 20 mL de água destilada a cada tubo, seguido de agitação. Os controles para cada amostra foram feitos adicionando-se o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram lidos a 540 nm, após 20 minutos de repouso, e convertidos à glicose através de uma curva de calibração.

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de glicose de 10 mg/mL, que foi utilizada para o preparo de uma série de diluições (1:1,5; 1:2; 1:3 e 1:5) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8. A curva de calibração de glicose (**Figura 16**) foi construída com 0,5 mL de solução de glicose, 1,0 mL de tampão e 3,0 mL de DNS. A mistura foi fervida e posteriormente diluída com 20 ml de água destilada, e os valores de absorbância lidos a 540 nm.

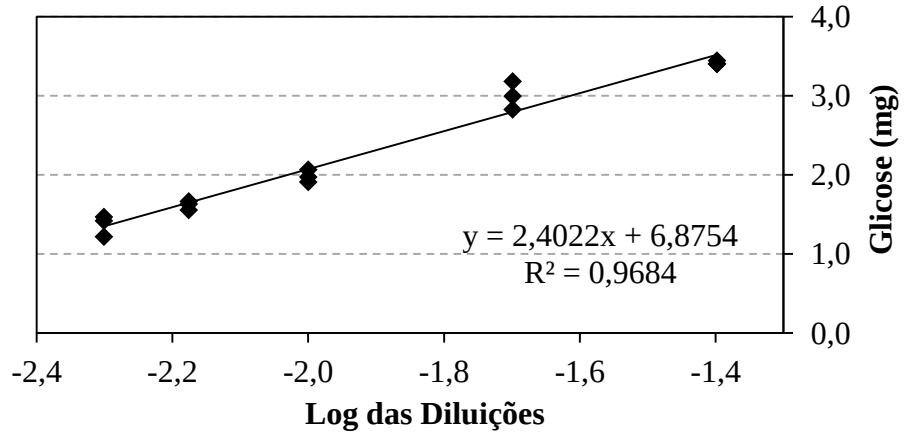
Figura 16 - Curva padrão para converter absorbância em açúcares redutores.



Fonte: Arquivo Pessoal.

A partir da conversão da absorvância a 540 nm em glicose, um gráfico semilog foi construído relacionando as diluições da enzima com a quantidade de glicose liberada (**Figura 17**). Todos os ensaios foram feitos em triplicata, e a equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que corresponde a 2,0 mg de açúcares redutores.

Figura 17 - Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de FPAse para diferentes diluições do extrato enzimático.



Fonte: Arquivo Pessoal.

O valor de 0,37 (sendo: 1 IU igual a 0,18 mg/min quando o produto é glicose e a quantidade de glicose liberada por 0,5 mL de enzima em 60 minutos) foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulases totais da mistura enzimática,

$$FPU = \frac{0{,}37}{concentração\ de\ enzima\ \ para\ liberação\ de\ 2{,}0\ mg\ de\ AR}(UI.mL^{-1}) \quad (10)$$

Obtendo uma atividade de 39,57 ± 1,53 FPU/mL.

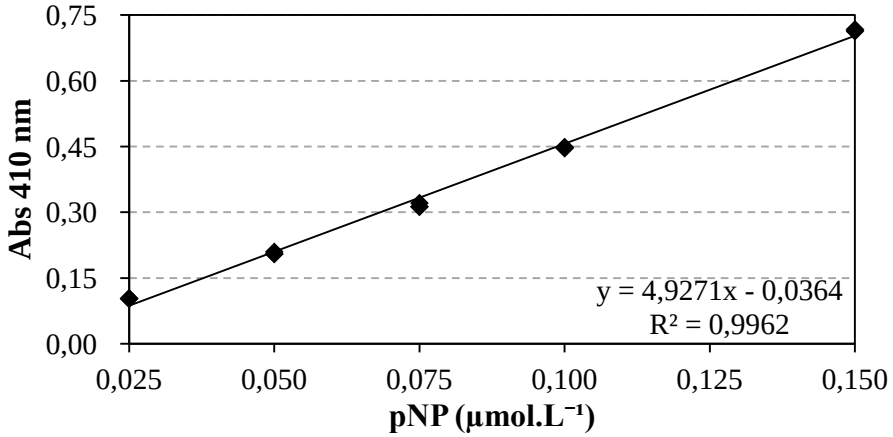
- β-glicosidase

A atividade de β-glicosidases foi determinada de acordo com a cinética de conversão de ρ-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo (ρNPG) em ρ-nitrofenolato (ρNP), seguindo a metodologia descrita por Tan, Mayers e Saddler (1987).

As reações foram conduzidas a 46°C, adicionando-se uma alíquota de 0,4 mL de solução tampão acetato de sódio/ácido acético, 50 mM, pH 4,8 com 0,1% de ρ-Nitrophenyl β-D-Glucopyranoside (Sigma N-7006) e 0,1 mL da mistura de enzimática diluída 10.000 vezes. Uma alíquota de 1,0 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% foi adicionada para a parada da reação em diferentes tempos (2, 5, 10, 15, e 20 minutos) e a absorbância foi medida a 410 nm. O controle de reação foi preparado da mesma forma, adicionando-se, no entanto, a solução de bicarbonato antes do extrato enzimático.

Uma curva de calibração foi feita para converter as absorbâncias medidas em teor de ρ-nitrofenol presente em solução (**Figura 18**).

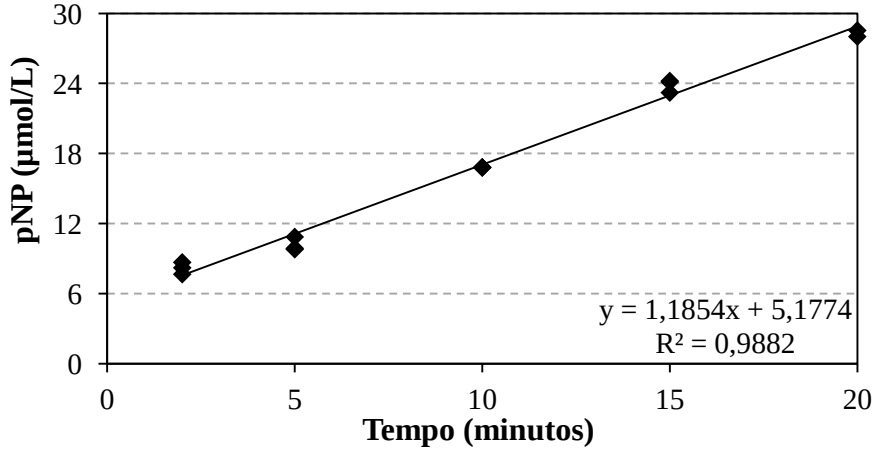
Figura 18 - Curva de calibração para converter absorbância em concentração de pNP.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Um gráfico da cinética da reação foi construído e utilizado para o cálculo a atividade (**Figura 19**). O cálculo da atividade foi realizado multiplicando o coeficiente angular da curva de cinética construídas por 50.000,00 (diluição total =diluição da enzima+diluição da reação). A atividade de β-glicosidases foi determinada segundo a equação, na **Figura 19**.

Figura 19 - Quantificação de açúcares redutores liberados em ensaio de β-glicosidases na diluição de 50.000 vezes para o extrato enzimático obtido.



Fonte: Arquivo Pessoal.

A atividade da mistura enzimática foi de 59,25 ± 1,56 UI/mL.

4.7.3 Determinação dos parâmetros de pré-tratamento

Os pré-tratamentos empregados na palha de arroz foram avaliados primeiramente em relação à caracterização química das frações que a compõem (celulose, hemicelulose, grupos acetil, lignina solúvel e insolúvel, cinzas e extrativos), de acordo com a metodologia padrão do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER et al., 2012). Como o objetivo dos pré-tratamentos é melhorar a hidrólise enzimática da fração celulósica, a principal resposta avaliada ao final de cada pré-tratamento e/ou suas combinações foi o rendimento de hidrólise enzimática, conforme descrito no item anterior. Também foi avaliado o balanço de massa de cada pré-tratamento, no qual foi determinada a porcentagem de massa recuperada, a perda de açúcares e a formação de possíveis subprodutos nos hidrolisados ou licores obtidos em cada etapa.

4.7.3.1 Índice de severidade do processo

O fator de severidade combinada (Sev) foi calculado conforme proposto por Guo et al. (2008). Esse fator permite avaliar o quão severo foi o pré-tratamento empregado na biomassa vegetal através da relação entre a temperatura e tempo reacional, quando a temperatura é constante.

$$Sev = log\left\{t\ x\ exp\left[\left(\frac{T_H - T_R}{14{,}75}\right)\right]\right\} - \ pH \qquad (11)$$

Sendo:

t = tempo de reação (minutos);

T_H = temperatura da tratamento ácido (°C);

T_R = 100°C;

pH = pH da solução ácida antes do tratamento ácido.

4.7.3.1. Índice de seletividade do processo

A seletividade do processo (Sel) é um parâmetro que relaciona as pentoses e a glicose solubilizada no hidrolisado. Em um processo são desejáveis a obtenção de altos valores de seletividade, visto que a hemicelulose deve ser prioritariamente solubilizada no hidrolisado hemicelulósico e a celulose deve ser preservada para posterior hidrólise enzimática.

$$Sel = \frac{Xil+Ara}{Gli} \quad (12)$$

Sendo:

Xil = concentração de xilose no hidrolisado hemicelulósico;

Ara = concentração de arabinose no hidrolisado hemicelulósico;

Gli = concentração de glicose no hidrolisado hemicelulósico.

4.7.4 Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas nos softwares *Statistica* 8.0 e, no qual foram obtidos modelos que descrevam as repostas avaliadas em função das condições experimentais empregadas. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erro-padrão, teste t de *Student*, assim como tabelas de análise de variância (ANOVA) dos efeitos e da regressão do modelo e gráficos de superfície resposta.

Com o objetivo de maximizar o rendimento de hidrólise da hemicelulose (RHH), e ao mesmo tempo obter um hidrolisado hemicelulósico com menor grau de toxicidade (menor concentração de fenólicos e furanos), além de uma maior recuperação de celulose na porção sólida e maior sólidos recuperados, foi então realizada uma análise de otimização numérica empregando o programa Design Expert 6.0, a partir da combinação das respostas para obter uma única condição otimizada.

Para validar o modelo obtido para a hidrólise ácida a partir dos sólidos tratados com álcali, foram realizados novos experimentos de tratamento ácido nas condições otimizadas, em replicata

5 RESULTADOS

5.1 Pré-tratamento da palha de arroz

Para a utilização eficiente das frações açucaradas dos materiais lignocelulósicos é necessário a realização de etapas de pré-tratamento. No presente estudo, foi empregada uma sequência de tratamentos envolvendo uma etapa alcalina seguida por um processo com ácido diluído.

5.1.1 Tratamento alcalino da palha de arroz

O tratamento alcalino sob condições brandas tem sido apontado como uma estratégia promissora para processamento de palha de arroz (CASTRO et al., 2017). Segundo os autores além da remoção efetiva de grupos acetil (desacetilação), esse tratamento removeu parcialmente a fração de lignina e cinzas, com baixa degradação dos polissacarídeos, o que favoreceu a hidrólise enzimática da celulose, e ainda melhorou a qualidade do hidrolisado hemicelulósico, diminuindo a concentração de inibidores ao processo fermentativo. No presente trabalho foram utilizadas as condições previamente estabelecidas por Castro et al. (2017) (70 °C durante 45 minutos e 80 mg de NaOH/g de biomassa).

Os resultados de composição química da palha de arroz antes e após o tratamento alcalino, assim como a recuperação de cada fração nos sólidos estão apresentados na **Tabela 5**. Observa-se que teor de celulose e hemicelulose aumentou de 34,56 para 42,07% e de 22,01 para 23,95% após o tratamento alcalino, o que correspondeu a um aumento de 22 e 9%, respectivamente. No entanto, considerando o rendimento no processo (69% de recuperação de sólidos) constata-se que essas frações foram parcialmente solubilizadas no licor, gerando uma recuperação de 84% para celulose e 75% para hemicelulose.

Ainda na **Tabela 5**, nota-se que o grupo acetil foi a fração que apresentou menor recuperação nos sólidos (11,3%), seguido das cinzas (47,8%) e lignina total (55,5%). De acordo com Castro (2016), a parcial remoção dessas frações no tratamento alcalino apresentam uma correlação positiva com melhoria na hidrólise enzimática, o que pode ser explicado pela ação destas estruturas sobre as celulases.

Pan et al. (2006) relataram que o grupo acetil pode inibir as enzimas interferindo com a ligação produtiva (interação de hidrogênio) entre celulose e o domínio catalítico das celulases ou aumentando o diâmetro da cadeia de celulose. Bin e Hongzhang (2010)

demonstraram que cátions comunmente presentes nas cinzas (K^+, Al^{3+},Mn^{2+},Fe^{3+},Cu^{2+} e Zn^{2+}) apresentaram um efeito inibitório na atividade das celulases (endo-β-1,4-glucanase, exo-β1,4-glucanase e β-glicosidase). A lignina liga-se as celulases, diminuindo a disponibilidade de celulases para catalisar a hidrólise de celulose, chamada de ligação improdutiva, Siqueira al. (2017) concluíram que eliminação ou relocação da lignina resultam em substratos com maior acessibilidade à celulose e, consequentemente, apresentaram maiores rendimentos de hidrólise da celulose. Estes estudos justificam a remoção parcial de grupos acetil, cinzas e lignina, respectivamente, para uma melhor eficiência de hidrólise enzimática.

Tabela 5 - Composição química, massa recuperada e porcentagem de recuperação das frações da palha de arroz antes e após o tratamento alcalino.

Componentes	**Composição (g/100g)**		**Massa recuperada* (g)**	**Recuperação (%)**	
	In natura	**Tratada**		**Neste estudo**	**Castro et al. (2017)**
Celulose	34,56	42,07	29,03	84,0	84,9
Hemicelulose	22,01	23,95	16,53	75,1	83,2
Grupos acetil	2,50	0,41	0,28	11,3	13,5
Lignina total	15,50	12,47	8,60	55,5	66,0
Cinzas	13,92	9,65	6,66	47,8	39,6
Outros	11,52	11,45	7,90	68,6	40,5
Total	100,00	100,00	69,0	69,0	70

* Calculada considerando a recuperação de 69% de sólidos. Condições do tratamento: 70 °C durante 45 minutos e 80 mg de NaOH/g de biomassa.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Ao comparar os valores de recuperação dos componentes obtidos no presente trabalho com os resultados de Castro et al. 2017, nota-se uma variação de no máximo 20%, o que pode ser atribuído as diferenças na composição da biomassa de partida.

A composição química do licor obtido após o tratamento alcalino foi avaliada quanto a solubilização das frações açucaradas e do grupo acetil, e os resultados estão apresentados na **Tabela 6**. Pode-se observar a presença de diversos compostos de degradação, principalmente os relacionados com a degradação da lignina.

Considerando a solubilização dos componentes da biomassa na fração líquida e a recuperação no sólidos, foi possível estabelecer um balanço material da fração açucarada durante o tratamento alcalino. Verificou-se que para a fração celulósica a recuperação total

foi de 94%. Em relação a hemicelulose, nota-se uma menor recuperação (77%, somando a recuperação na fração sólida e líquida), o que pode se explicar pela solubilização desta fração na forma de oligômeros, e que não foram quantificados. Com relação ao balanço material realizado para o grupo acetil, verificou-se uma recuperação de apenas 48%. Essa baixa recuperação pode se justificar pelo fato de que o ácido acético, quantificado no licor alcalino, estava em sua forma livre, podendo estar ligado de forma covalente aos oligômeros de xilose liberados (CHEN et al., 2012b).

Tabela 6 - Composição química do licor alcalino e porcentagem de solubilização das frações da palha de arroz após o tratamento alcalino.

Componentes (g/L)	Licor Alcalino (Solubilização*)
Açúcares e ácido acético	
Glicose**	5,36 (9,8%)
Xilose	0,81 (2,3%)
Arabinose	nd
Ácido Acético	1,43 (36,0%)
Produtos de degradação de açúcares	
HMF	0,009
Furfural	nd
Ácido Furóico	0,100
Produtos de degradação de lignina	
Pirocatecol	0,010
Álcool Vanilil	0,040
Ácido Vanílico	0,034
Vanilina	nd
Siringaldeído	0,009
Ácido p-cumárico	0,044
Ácido Siríngico	0,003
Ácido ferúlico	0,168

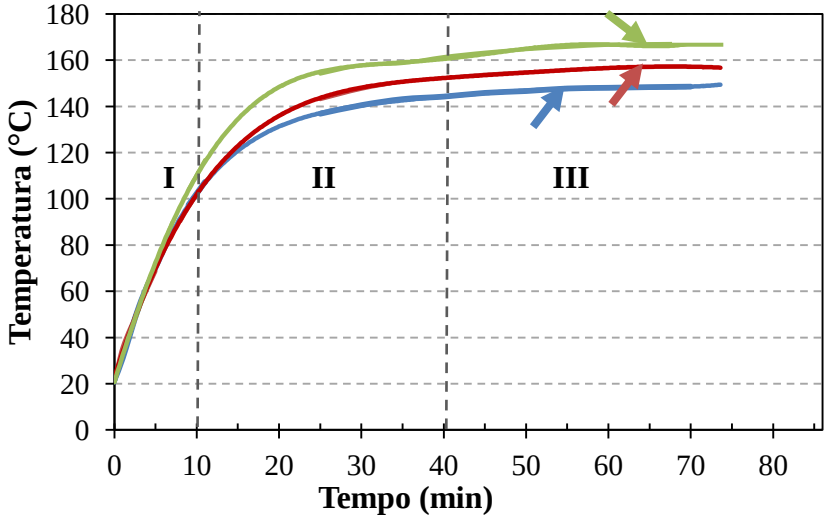
* Solubilização calculada considerando as respectivas frações poliméricas; **Concentração de glicose somada a concentração de celobiose convertida matematicamente em glicose. Volume recuperado foi de 27,4 L
Fonte: Arquivo Pessoal.

5.1.2 Tratamento ácido

Esta etapa teve como objetivo estabelecer uma condição de tratamento ácido para palha de arroz, previamente tratada com álcali, visando eficiente solubilização da hemicelulose, sem contudo, ocasionar grandes perdas no teor de celulose. Com esse intuito, foi realizado um planejamento de experimentos, tendo como variáveis a temperatura de reação e a concentração de ácido sulfúrico, com o tempo de reação fixado (20 minutos). Após otimização da temperatura e concentração do catalisador foram realizados ensaios, variando o tempo de reação hidrolítica, descritos na seção 5.1.2.1.

Na primeira etapa foi avaliado o perfil das temperaturas (150, 160 e 170°C), em reator de 500 mL, com sistema de aquecimento por banho de imersão de óleo de silicone, empregando a palha previamente tratada (70 °C durante 45 minutos e 80 mg de NaOH/g de biomassa) numa relação sólido:líquido de 1:10, mimetizando as condições posteriores de tratamento ácido. A **Figura 20** apresenta a cinética de aquecimento construída para as três temperaturas propostas. Nota-se um perfil com três regiões distintas: I-fase linear (0 a 10 min), II - fase intermediária (10 a 40 min) e III - fase estacionária (40 a 90 min).

Figura 20 - Perfil da cinética de aquecimento nas diferentes temperaturas utilizadas no planejamento de experimentos, sendo 150 °C (—), 160 °C (—) e 170 °C (—), as setas indicam o periodo selecionado para a hidrólise ácida.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Na região I (fase linear) observa-se que ocorreu uma taxa de aquecimento constante (8,61 °C/min) para todas as temperaturas avaliadas. Ao final dessa fase (10 min) a temperatura atingiu aproximadamente 110 °C e a partir desse ponto se inicia a região II.

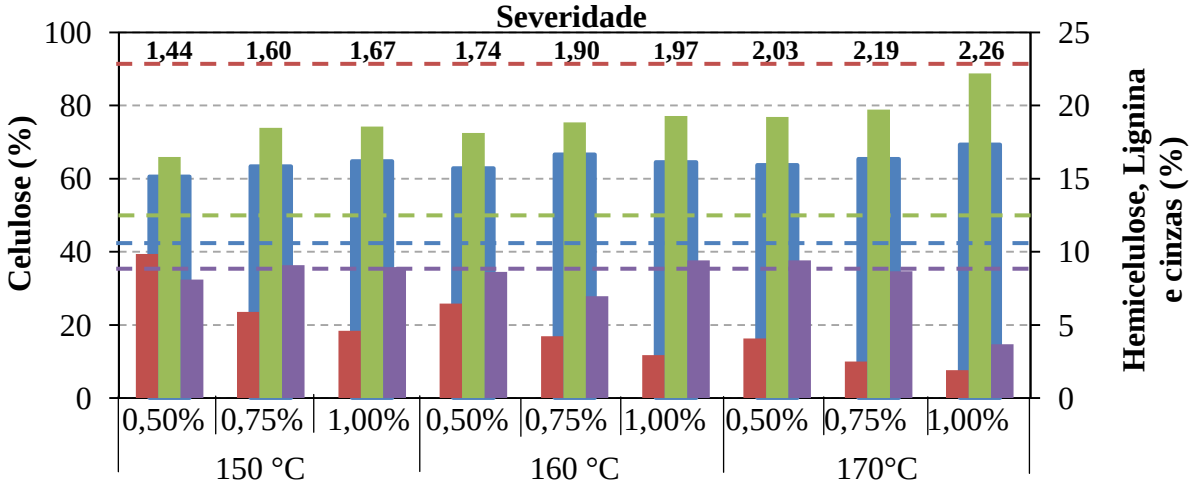
Verifica-se, neste ponto, que a taxa de aquecimento foi reduzida, e a diminuição foi acentuada quanto menor o valor de temperatura final desejada. Após 40 minutos de ensaio (região III), a taxa de aquecimento para as três curvas avaliadas tendeu a zero, atingindo um platô em 55 minutos para temperatura de 150°C e em 65 minutos para as demais temperaturas (160 e 170 °C). Estes tempos foram então utilizadas como ponto de partida para contagem de tempo do tratamento ácido. Vale ressaltar que a definição desse tempo levou em consideração uma variação do termopar de ± 3 °C, conforme destacado por setas em cada curva na **Figura 20**.

5.1.2.1 Avaliação das condições de temperatura e de concentração de ácido

No tratamento com ácido diluído, normalmente, são desejáveis baixas concentrações de catalisador, devido a algumas vantagens, como diminuição da quantidade de reagente para neutralização do hidrolisado na etapa de fermentação e, consequentemente, dos custo de produtos químicos (SHEKIRO et al., 2014). No entanto, para que atinja elevados rendimentos de hidrólise hemicelulose, com a diminuição do ácido é necessário aumento na temperatura de reação. Para este estudo, foi utilizado um planejamento composto de face centrada do tipo 2^2, variando a temperatura de reação de 150 a 170 °C e a concentração de ácido sulfúrico de 0,5 a 1,0% m/v, mantendo a relação sólido:líquido de 1:10. Os ensaios foram realizados em reator de 500 mL, durante 20 minutos em temperatura constante, com 200 mL da solução ácida.

Os sólidos obtidos após as diferentes condições de tratamento, conforme proposto no item 4.2.2.2 dos Materiais e Métodos, foram caracterizados quimicamente e os resultados expostos na **Figura 21**. As condições foram agrupados por temperatura e em ordem crescente da concentração de ácido, ou seja, em ordem crescente de severidade. Verifica-se que o teor de celulose praticamente não variou, apresentando uma média de 64,5 ± 2,5%, enquanto que o teor de hemicelulose apresentou uma variação de 1,9 a 9,8%, diminuindo com o aumento da carga de ácido usada no tratamento, e esse comportamento foi mais acentuado com aumento da temperatura. De acordo com Fengel e Wegener (1989), a hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado que contem grupos acetil como grupos pendentes apresentando uma estrutura amorfa, e , assim, é mais susceptível ao processo de hidrólise ácida.

Figura 21 - Composição química da palha de arroz tratada com álcali após o tratamento ácido, sob diferentes condições operacionais, sendo a celulose (■), hemicelulose (■), lignina (■) e cinzas (■). As linhas tracejadas mostram a composição da palha tratada apenas com álcali, anterior ao tratamento ácido.



Fonte: Arquivo Pessoal.

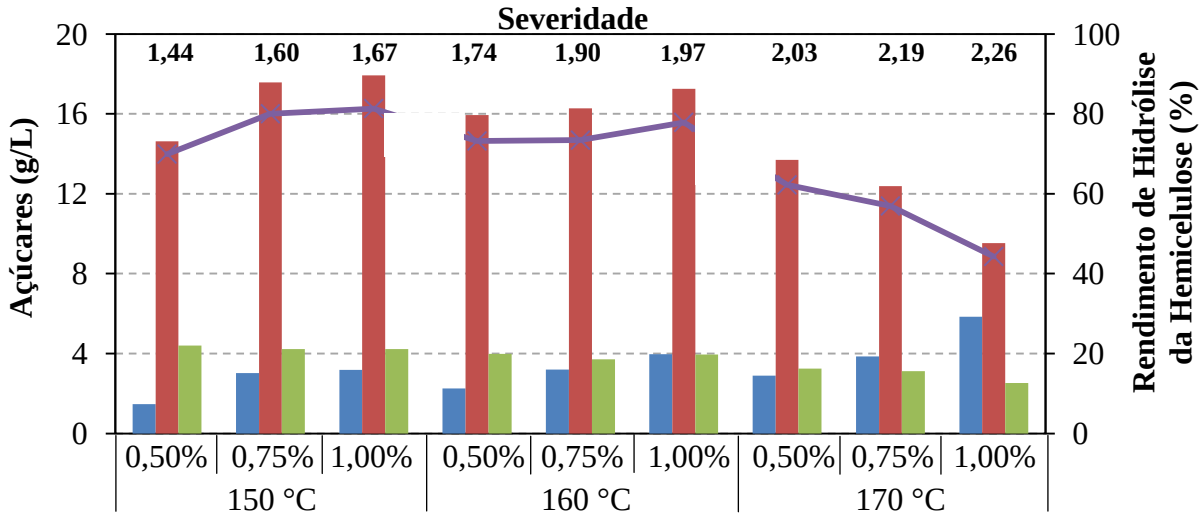
Ainda na **Figura 21**, verifica-se que, de modo geral, uma pequena variação no teor de lignina com as condições de tratamento ácido (de 16,5 a 22,2%), sendo observado um valor médio de 18,9 ± 0,5%, exceto nas condições mais severas e brandas que apresentaram um valor de 22,2 e 16,5% dessa fração, respectivamente. Comportamento semelhante foi observado para o teor de cinzas, que apresentou um valor médio de 8,7 ± 0,8%, apenas na condição mais severa foi verificado um teor de 3,7%.

Ao comparar a composição dos sólidos obtidos após o tratamento sequencial (álcali + ácido) com o sólido resultante do tratamento alcalino (linha tracejada), verifica-se, no geral, uma diminuição nos teores de hemicelulose e um aumento na celulose e lignina, e, desta forma, os sólidos obtidos após o tratamento ácido foram designados "celulignina".

Nesta etapa, foi ainda avaliada a composição química dos hidrolisados hemicelulósicos, obtidos após a etapa de tratamento ácido sob diferentes condições. A **Figura 22** apresenta as concentrações de glicose, xilose e arabinose presente nos hidrolisados hemicelulósicos, bem como o rendimento de hidrólise da hemicelulose (RHH). Com relação às pentoses, nota-se que a concentração de xilose variou de 9,5 a 17,9 g/L, demonstrando uma intensa influência das variáveis avaliadas no planejamento na solubilização da xilana. Teores de xilose maiores que 15,5 g/L foram observados nas temperaturas de 150 e 160 °C e nas concentrações mais elevadas do catalisador (0,75 e 1,00%).

Na condição de temperatura mais severa (170 °C) ocorreu uma redução da concentração de xilose, e esse comportamento foi mais acentuado com a maior concentração de ácido, possivelmente devido à degradação desse açúcar. A concentração de arabinose, no entanto, apresentou variação de 2,5 a 4,4 g/L, sendo os menores valores observados nas condições de maior severidade, indicando também uma maior degradação. Comportamento diferente ao observado por Castro et al. (2017), que observaram que a quantidade de arabinose liberada na presença de ácido não dependeu da severidade do tratamento, obtendo em média 4,6 g/L de arabinose. Os autores realizaram ensaios de hidrólise ácida da palha de arroz tratada com álcali em menor temperatura (121 °C), variando o ácido (de 0,5 a 1,5% m/v) e tempo (30 a 90 min) com severidade próximas ao do presente estudo (de 1,1 a 2,1). Isto indica que a temperatura elevada utilizada no presente estudo acelera a degradação dos açúcares, principalmente arabinose.

Figura 22 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos no planejamento quanto ao teor de glicose (■),xilose (■) e arabinose (■), rendimento de hidrólise da hemicelulose (—) e severidade (indicada na parte superior das barras) nas diferentes condições do planejamento.



Fonte: Arquivo Pessoal.

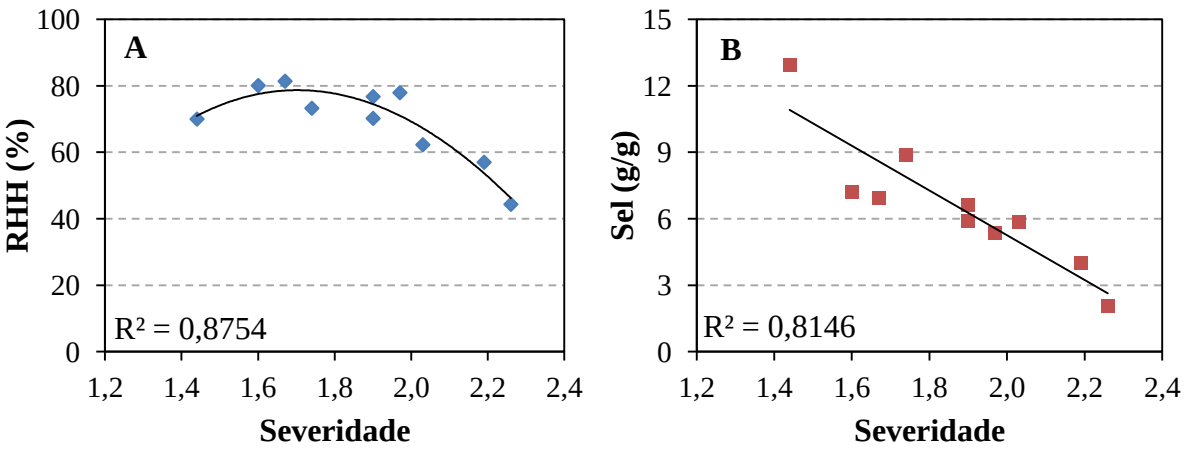
Os rendimentos da hidrólise da hemicelulose (xilana + arabinana), apresentados na **Figura 22**, foram calculados considerando as concentrações das pentoses solubilizadas nos hidrolisados. Nota-se uma grande variabilidade no valor deste parâmetro (44,30 a 81,34%). Os maiores valores de rendimento (superiores a 70%) foram alcançados nas temperaturas abaixo de 170 °C. Na temperatura de 170 °C, o aumento na concentração de ácido promoveu uma diminuição no RHH, sugerindo a ocorrência de degradação de açúcares.

Com relação à liberação de glicose, verifica-se que a concentração desta hexose no hidrolisado hemicelulósico variou de 1,47 a 5,85 g/L. Observou-se que o aumento no teor de glicose foi proporcional ao aumento da concentração de ácido nas três condições de temperatura avaliadas. Esse perfil foi mais pronunciado com o aumento da temperatura. Esse comportamento está associado à maior degradação de celulose, quando condições mais severas de tratamento são utilizadas. Dessa forma, a maior concentração de glicose foi obtida na condição mais severa de tratamento (170 °C e 1% de ácido).

O efeito da severidade do tratamento ácido sobre o rendimento de hidrólise da hemicelulose (RHH) e a seletividade (Sel) estão mostrados na **Figura 23 A** e **B**, respectivamente. Avaliando RHH, constata-se que este parâmetro atinge um máximo (em média 80%) entre a severidade de 1,6 a 1,7, a partir da qual ocorre uma redução (atingindo um valor mínimo de 44%).

Quanto a seletividade (Sel), parâmetro que relaciona a soma das pentoses (xilose e arabinose) dividida pela glicose solubilizada no hidrolisado. É desejável a obtenção de altos valores de seletividade, visto que a hemicelulose deve ser prioritariamente solubilizada no hidrolisado hemicelulósico e a celulose deve ser preservada para posterior hidrólise enzimática. Observou-se que esse parâmetro correlacionou-se linear e negativamente com a severidade. Esses resultados indicam que em maiores severidades, a reação de hidrólise ácida é menos especifica, aumentando a solubilização da glicose e/ou degradação das pentoses.

Figura 23 - Correlação entre rendimento de hidrólise enzimática (**A**) e seletividade (**B**) com a severidade.



Fonte: Arquivo Pessoal

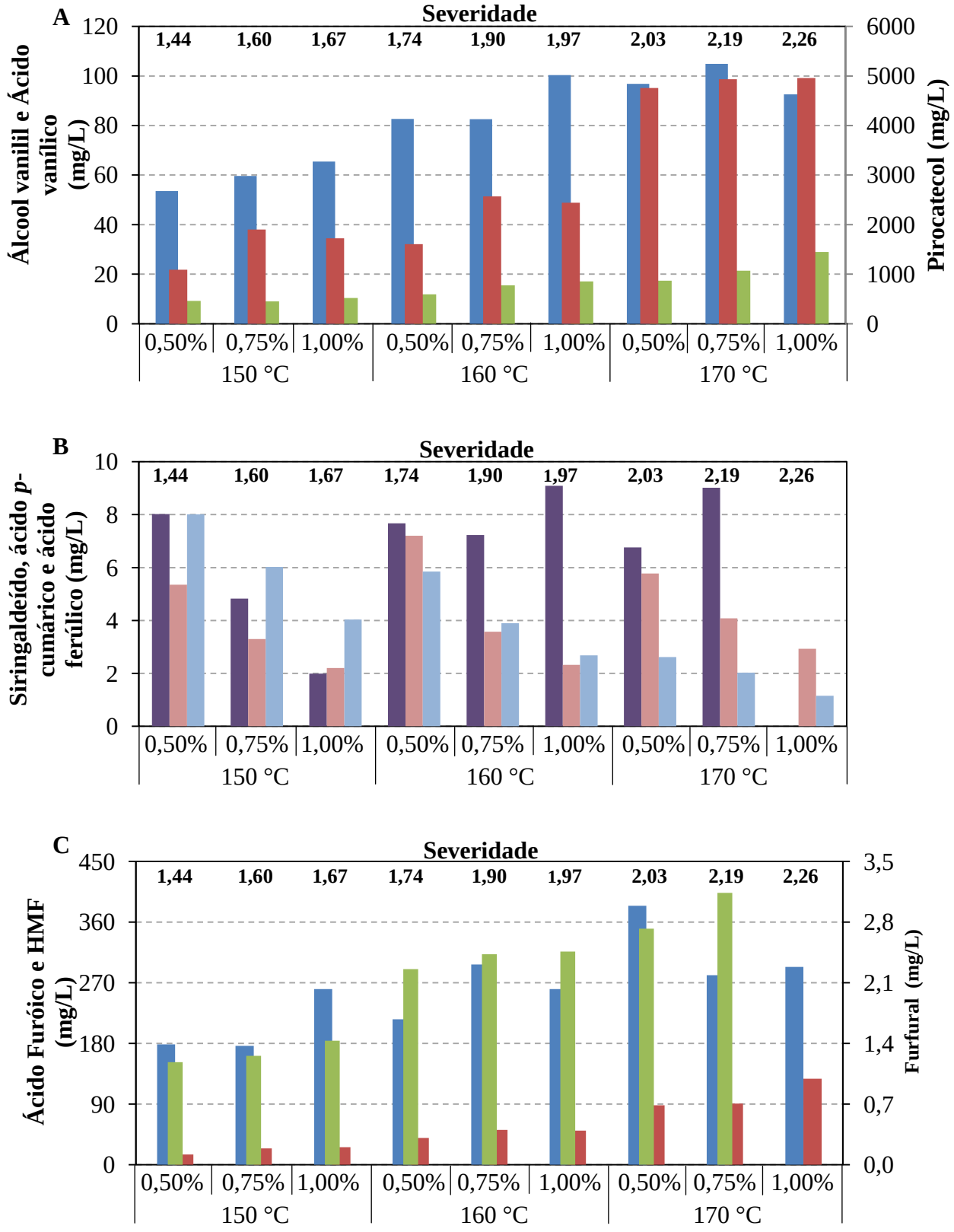
Após análise da solubilização dos açúcares, foi analisada a composição química dos hidrolisados hemicelulósicos em relação à presença ácido acético e aos produtos de degradação de açúcares e da lignina. No que se refere à concentração de ácido acético, verificou-se que seus teores foram inferiores a 0,39 g/L independente das condições hidrolíticas avaliadas. Essa baixa concentração de ácido acético já era esperada, uma vez que a liberação desse ácido é dependente do teor de grupamentos acetil presente no material (FENGEL; WEGENER, 1989). Como a porcentagem de grupos acetil apresentada pelo material tratado com álcali foi de 0,41% (vide **Tabela 5**), a concentração máxima de ácido acético, possível de ser solubilizada no hidrolisado hemicelulósico seria de 0,40 g/L. A diminuição da concentração de ácido acético é de extrema importância para fermentação do hidrolisado hemicelulósico, uma vez que o aumento gradativo deste ácido leva um aumento a toxicidade do meio, inibindo a produção de etanol (BELLIDO et al., 2011).

Os hidrolisados hemicelulósicos foram analisados quanto aos teores de compostos de degradação da lignina comumente presentes em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Os compostos fenólicos foram divididos em dois grupos (**Figura 24 A** e **B**): 1) produtos de degradação que apresentaram um maior concentração no hidrolisado hemicelulósico são eles: ácido vanílico (9 a 29 mg/mL), álcool vanilil (53 a 105 mg/mL) e pirocatecol (1090 a 4960 mg/mL); e 2) compostos que apresentaram um menor teor, como siringaldeído (0 a 9 mg/mL), ácido ferúlico (1 a 8) e ácido *p*-cumárico (20 a70 mg/mL).

Na **Figura 24 A**, verifica-se que, em geral, estes produtos de degradação aumentam com aumento da severidade. O pirocatecol é o composto mais produzido no hidrolisado hemicelulósico, principalmente na temperatura de 170 °C, alcançando em média 4.880 mg/L. Em relação ao grupo 2 (**Figura 24 B**), observou-se que, em geral, uma diminuição na concentração desses subprodutos com o aumento da concentração de ácido nas três condições de temperatura avaliadas.

Avaliando os produtos de degradação dos açúcares (HMF, furfural e ácido furóico), nota-se pequenas quantidades desses subprodutos (< 500 mg/L) **Figura 24 C**. Em geral, estes compostos aumentam com tratamentos mais severos. Dentre eles, o ácido furóico apresentou maiores concentrações (176 a 476 mg/L), vale ressaltar que na condição mais severa este composto não foi detectado, indicando a degradação do posteriores ácido furóico. O HMF variou de 15 a 235 mg/L, aumentando sua concentração com aumento de severidade. Já o furfural (0 a 12 mg/L), apresentou quantidades irrelevantes.

Figura 24 - Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos no planejamento quanto ao teor de subprodutos álcool vanilil (■), ácido vanílico (■) e pirocatecol (■) (**A**); siringaldeído (■), ácido *p*-cumárico (■) e ácido ferúlico (■) (**B**); ácido furóico (■), HMF (■) e furfural (■) (**C**) e severidade (indicada na parte superior das barras) nas diferentes condições do planejamento.

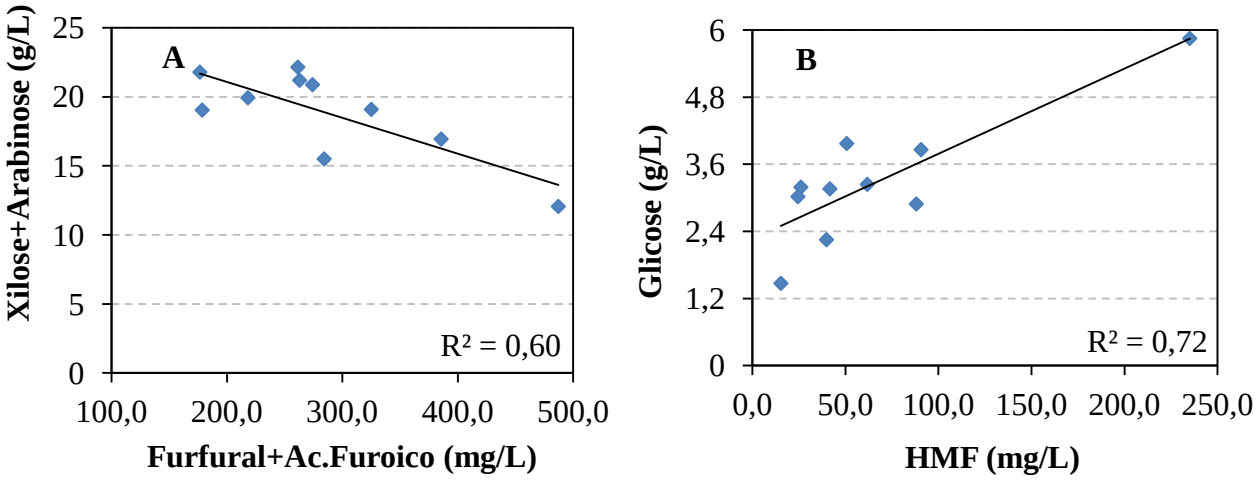


Fonte: Arquivo Pessoal.

Visando avaliar o comportamento da formação de produtos de degradação de açúcares nas diferentes condições, foi examinado o perfil da concentração de pentoses (xilose + arabinose) com seus produtos de degradação (furfural + ácido furóico), assim como o teor de glicose com HMF, apresentados na **Figura 25 A** e **B**, respectivamente. Em relação às pentoses (xilose + arabinose), pode-se verificar que os hidrolisados que apresentaram as maiores concentrações de xilose e arabinose tiveram menores concentrações de furfural e ácido furóico, o que sugere que a redução do teor das pentoses pode estar relacionada com a sua degradação (**Figura 25 A**).

Perfil semelhante ao do presente estudo foi encontrado por Karimi; Kheradmandínia e Taherzadeh (2006) na catálise com ácido diluído (0,5% m/v) da palha de arroz *in natura*, variando a pressão (10 a 30 bar), o tempo (5 a 10 min) e a temperatura (184 a 234 °C). No entanto, Castro et al. (2017), avaliando o tratamento ácido em palha de arroz tratada com álcali variando o tempo (30 a 60 min) e a concentração de ácido (0,5 a 1,5% m/v) a uma temperatura mais baixa de 121 °C, observaram maiores teores dos produtos de degradação de pentoses ao aumentar a liberação das pentoses. Essa diferença de comportamento pode ser atribuída, principalmente a menor temperatura utilizadas pelos autores.

Figura 25 - Correlações entre os teores de açúcares e de seus produtos de degradação nas condiçõespropostas no planejamento.



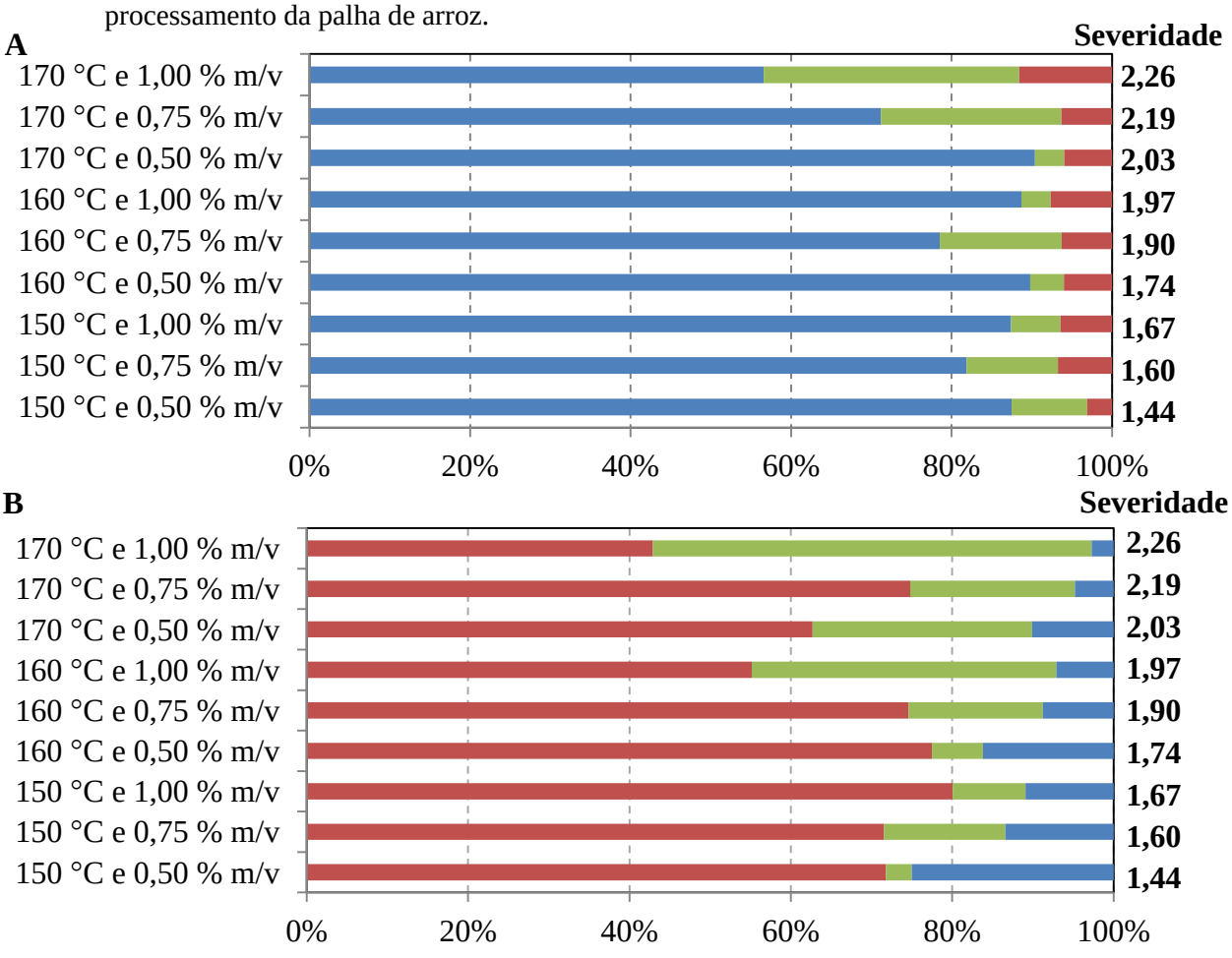
Fonte: Arquivo Pessoal.

O perfil do teor de glicose com seu principal produto de degradação (HMF), **Figura 25 B,** apresentou um comportamento diferente ao apresentado para as pentoses. A concentração de glicose mostra-se diretamente proporcional ao teor do HMF, o que sugere que a medida que essa hexose é liberada a mesma é degradada. Esta correlação foi também observada nos trabalhos de Karimi; Kheradmandínia e Taherzadeh (2006) e Castro et al.

(2017), mostrando que independente das condições de tratamento ácido avaliado, o teor dos produtos de degradação da glicose aumentam com maior solubilização desta hexose, uma vez que a celulose é uma fração de difícil solubilização em ácido diluído.

Tendo em vista a importância da recuperação da porção polissacarídica durante o processo de tratamento ácido da palha de arroz para as subsequentes etapas de utilização desses açúcares, foi, então, realizado um balanço de massa a fim de verificar quais condições experimentais apresentam menor perda de hemicelulose e de celulose. Os balanços de massas de celulose e hemicelulose levaram em consideração os sólidos e os líquidos recuperados, e estão apresentados na **Figura 26 A** e **B**, respectivamente.

Figura 26 - Proporção de recuperação de celulose (A) e hemicelulose (B) na celulignina (■), no hidrolisado hemicelulósico (■) e a perda da fração açúcarada (■), durante o processamento da palha de arroz.



Fonte: Arquivo Pessoal

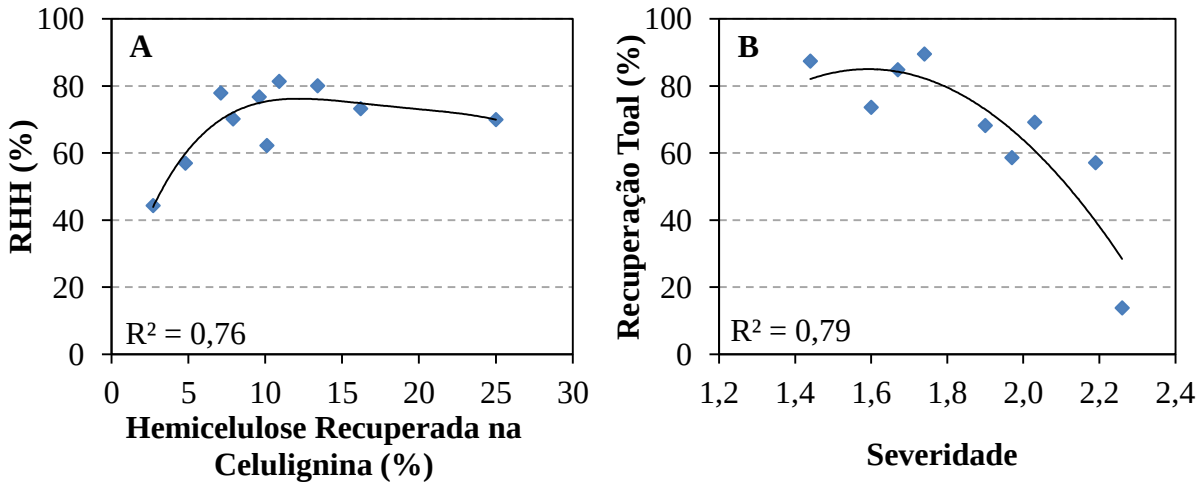
A condição ideal de hidrólise ácida, avaliando apenas o balanço de massa, é a que proporcione uma maior a recuperação de celulose na fração sólida (celulignina) e de hemicelulose na fração líquida (hidrolisado hemicelulósico). A **Figura 26 A** mostra a recuperação de celulose nas diferentes frações e a perda para cada tratamento. Ressalta-se

que a maior parte da celulose foi recuperada na celulignina a qual variou de 56,6 a 90,4%, enquanto apenas uma pequena fração de celulose foi solubilizada no hidrolisado hemicelulósico (3,1 até 11,6%). Vale destacar que apenas os tratamentos mais severos (2,19 e 2,26) apresentaram uma recuperação menor que 72% de celulose na fração sólida (celulignina).

Em relação à fração hemicelulósica (**Figura 26 B**), maior parte desta fração foi recuperada no hidrolisado (de 42,9 até 80,1%) independente das condições de tratamento ácido, enquanto que menores teores desse polissacarídeo ficaram retidas na fração de celulignina (2,7 a 25,0%). Ressalta-se que o tratamento com severidade de 1,67 foi o que obteve maior valor de recuperação de hemicelulose na fração líquida.

Ainda avaliando o balanço de massa, foi possível analisar o comportamento do RHH com a recuperação de hemicelulose na celulignina, assim como avaliar o efeito da severidade sobre a recuperação das frações açucaradas. Os resultados estão indicados na **Figura 27**.

Figura 27 - Correlação entre rendimento de hidrólise enzimática e a hemicelulose recuperada na celulignina (**A**) e a severidade com a recuperação total das frações açucaradas (**B**).



Fonte: Arquivo Pessoal

Avaliando o perfil do RHH em relação a recuperação de hemicelulose na celulignina (**Figura 27 A**), verifica-se que o valor máximo de RHH (~ 70%) foi obtido com a recuperação da hemicelulose variando de 10 a 25%. Nota-se, ainda, uma diminuição no RHH, para até 40%, com a menor recuperação de hemicelulose na celulignina, indicando que, além de solubilização, grande parte dos açúcares (xilose + arabinose) foram degradados.

No perfil da recuperação total das frações açúcares, na celulignina e no hidrolisado hemicelulósico, em relação à severidade (**Figura 27 B**) nota-se que a recuperação das frações açucaradas apresentou valores em torno de 80% em tratamentos com severidade menor que 1,8. Com aumento da a severidade, verifica-se um decréscimo expressivo da recuperação, atingindo um valor mínimo de 14%.

5.1.2.3 Análise Estatística

Para melhor avaliar esses dados expostos anteriormente, foi usado o planejamento experimental. Como variáveis resposta foram utilizados o rendimento de hemicelulose, a concentração de furanos e fenólicos, os sólidos recuperados e a celulose recuperada, conforme apresentado na **Tabela 7**.

As estimativas dos efeitos, os erros-padrão, o teste *t* de Student e os níveis de significância para os modelos em função da temperatura (X_1) e concentração de H_2SO_4 (X_2) estão mostrados na **Tabela 8**, além disso, os gráficos de Pareto são apresentados na **Figura 28**.

Em relação ao rendimento de hemicelulose solubilizada no hidrolisado hemicelulósico (**Figura 28 A**), o efeito principal da temperatura é significativo ao nível de 95% de confiança ($p<0,05$), e foi negativo, o que mostra que o pré-tratamento da palha de arroz em baixos valores desta variável resultou em uma melhor solubilização de xilose no hidrolisado celulósico.

Além disso, a variável quadrática da temperatura (X_1^2) também foi significativa com efeito negativo, indicando a curvatura dentro do modelo. Vale ressaltar que, embora o efeito da concentração do ácido (principal) não tenha sido significativo ($p<0,05$), a interação entre temperatura e concentração de H_2SO_4 ($X_1.X_2$) foi significativa ao processo, ou seja, o efeito da concentração de H_2SO_4 depende da temperatura utilizada no tratamento. A interação tem efeito negativo, isto é, as respostas devem ser contrárias, e já que o efeito da temperatura é negativo, a combinação de 150 °C e 1,0% m/v de ácido, a qual o ácido está em seu maior nível, apresenta o maior rendimento de hidrólise da hemicelulose.

Tabela 7 - O rendimento de hemicelulose, concentração de furanos e fenólicos, perda de celulose e massa recuperada, respectivamente, nas diferentes condições avaliadas de acordo com planejamento fatorial.

	Variáveis		**Respostas**				
	Tempo (°C)	**H_2SO_4 (%m/v)**	**RH_{HEMI} (%)**	**[Furanos] (g/L)**	**[Fenólicos] (g/L)**	**SR (% m/m)**	**Celulose Recuperada (% m/m)**
1	150	0,50	69,94	0,20	1,17	60,78	87,49
2	170	0,50	63,24	0,48	6,11	59,91	90,24
2.2	170	0,50	61,20	0,47	3,67	59,38	90,59
3	150	1,00	80,14	0,27	2,60	57,78	87,92
3.2	150	1,00	82,53	0,31	1,01	55,76	86,85
4	170	1,00	44,30	0,42	5,09	34,35	56,62
5	150	0,75	80,03	0,20	1,99	54,36	81,93
6	170	0,75	56,94	0,37	5,08	45,79	71,23
7	160	0,50	73,20	0,26	1,72	60,10	89,76
8	160	1,00	77,87	0,31	2,58	57,83	88,70
PC.1	160	0,75	70,14	0,39	3,45	47,48	75,95
PC.2	160	0,75	76,70	0,32	1,91	51,78	81,10

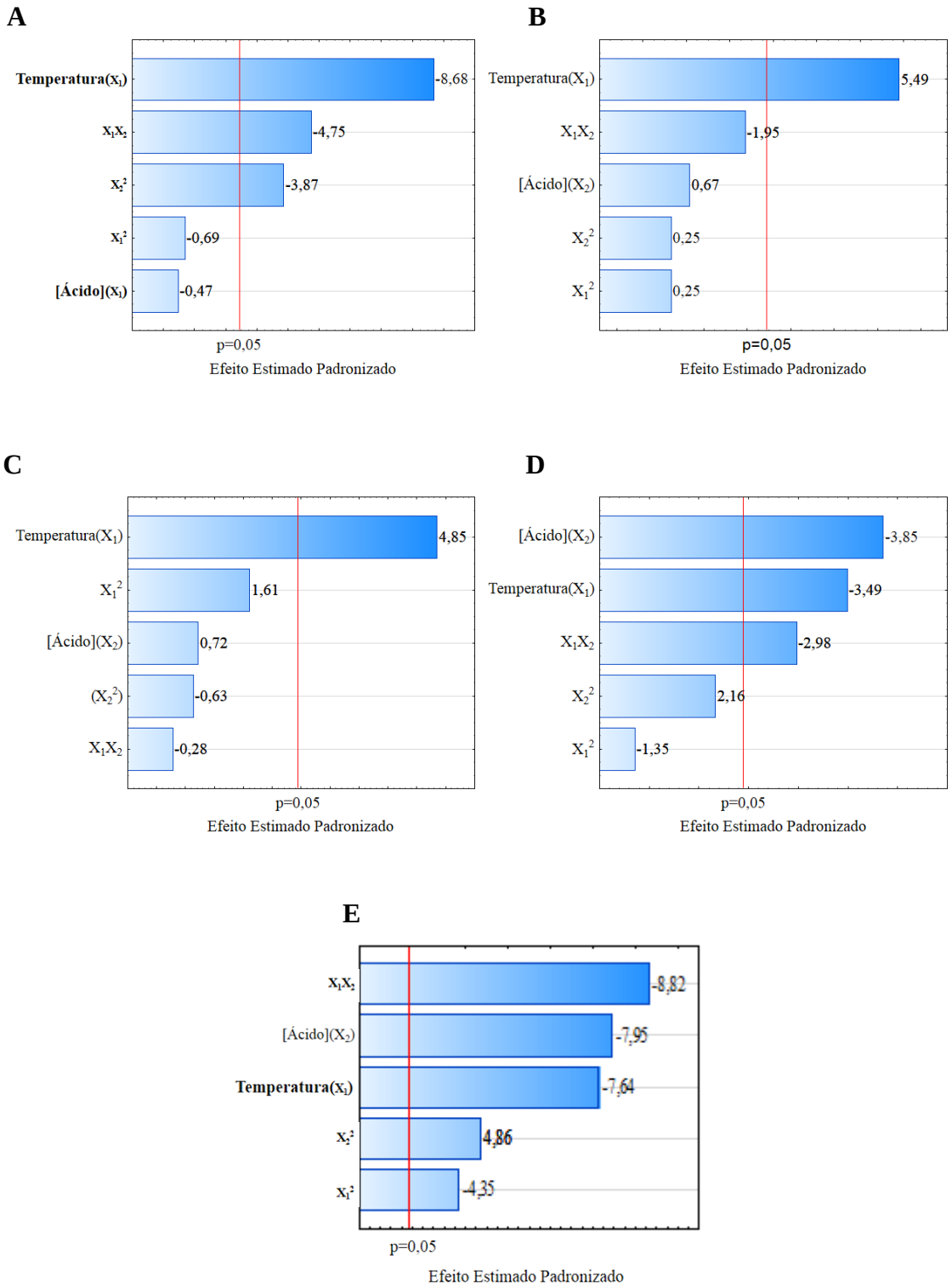
Fonte: Arquivo Pessoal.

Na **Figura 28 B,** avaliando a formação dos furanos (produtos de degradação de açúcares), nota-se que o efeito principal da temperatura (X_1) é positivo e significativo, mostrando que o aumento da temperatura aumenta a formação destes subprodutos. Além deste efeito principal, apenas a interação entre as variáveis temperatura e concentração de ácido ($X_1.X_2$) foi significativa ao processo com efeito negativo. Para os compostos fenólicos (produtos de degradação da lignina), constata-se que apenas a temperatura apresenta efeito principal significativo e positivo, mostrando que o aumento dos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico pode ser relacionado ao aumento da temperatura (**Figura 28 C**).

Em relação à recuperação da celulose (**Figura 28 D**), verifica-se que todas as variáveis foram significativas. O efeito da interação entre temperatura e concentração de H_2SO_4 ($X_1.X_2$) foi o mais pronunciado e com sinal negativo, mostrando que as variáveis independentes devem ter níveis contrários. Ademais, a variável quadrática do ácido (X_1^2) e

da temperatura (X_1^2) também foram significativas, com efeito positivo e negativo, respectivamente, indicando a curvatura dentro do modelo.

Figura 28 - Gráfico de Pareto para o rendimento de hidrólise da hemicelulose (A), furanos (B), fenólicos (C), celulose recuperada (D) e sólidos recuperados (E) de acordo com planejamento fatorial proposto.



*Significativo a 95% de confiança. X_1 (Temperatura, °C) e X_2 (Concentração de H_2SO_4, % m/v). Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 8 - Efeitos estimados das variáveis no nível de 95% de confiança para o rendimento de recuperação de hemicelulose, concentração de furanos e fenólicos, recuperação de celulose e massa recuperada de acordo com planejamento fatorial proposto.

Variável Resposta	Fatores	Coeficiente de regressão	Erro-padrão	$t_{estatístico}$	*p*-valor
RH_{HEMI} (%)	**Média**	74,478	1,590	46,831	0,00000
	X_1	-10,870	1,125	-9,666	0,00001
	X_1^2	-8,928	1,977	-4,516	0,00196
	X_1X_2	-6,962	1,356	-5,133	0,00089
		$R^2 = 0,94$			
Furanos (g/L)	**Média**	0,326	0,012	26,193	0,000000
	X_1	0,095	0,015	6,409	0,000124
	X_1X_2	-0,043	0,018	-2,438	0,037469
		$R^2 = 0,84$			
Fenólicos (g/L)	**Média**	3,032	0,388	7,808485	0,00437
	X_1	1,648	0,476	3,464696	0,04050
		$R^2 = 0,71$			
Celulose Recuperada (%)	**Média**	80,542	1,277	63,092	0,00001
	X_1	-6,001	0,786	-7,636	0,00466
	X_1^2	-5,979	1,374	-4,353	0,02240
	X_2	-6,249	0,786	-7,952	0,00415
	X_2^2	6,671	1,374	4,856	0,01667
	X_1X_2	-8,170	0,926	-8,822	0,00307
		$R^2 = 0,88$			
Sólidos Recuperados (%)	**Média**	49,853	0,976	51,090	0,00002
	X_1	-5,048	0,713	-7,084	0,00578
	X_2	-5,568	0,713	-7,814	0,00436
	X_2^2	4,692	1,213	3,868	0,03058
	X_1X_2	-4,769	0,832	-5,731	0,01055
		$R^2 = 0,82$			

*Significativo a 95% de confiança. X_1 (Temperatura, °C) e X_2 (Concentração de H_2SO_4, % m/v).
Fonte: Arquivo Pessoal.

Quanto a massa de sólidos recuperada (**Figura 28 E**), verifica-se que a concentração de ácido tem o maior efeito, e apresenta sinal negativo, mostrando que o pré-tratamento da palha de arroz em baixas concentrações de ácido resulta em uma maior recuperação de sólidos; seguida do efeito principal da temperatura, que também apresenta sinal negativo. Destaca-se que, a interação entre temperatura e concentração de H_2SO_4 ($X_1.X_2$) também foi significativa, com efeito negativo, indicando que as variáveis independentes devem possuir

níveis contrários. Além disso, a variável quadrática da concentração de ácido (X_2^2) também foi significativa com efeito positivo, indicando a curvatura dentro do modelo.

A análise de variância (**Tabela 8**) mostra que os modelos apresentaram um elevado coeficiente de determinação (R^2) e também não houve falta de ajuste significativo nos modelos. Isto significa que os dados experimentais se ajustam e, portanto o efeito das variáveis temperatura e concentração de H_2SO_4 sobre as respostas avaliadas, descrevendo-as pode ser descrito pela seguintes Equações.

$$\mathrm{RHH} = 74{,}48 - 10{,}87\,X_1 - 8{,}93\,\mathrm{X_1}^2 - 6{,}96\,\mathrm{X_1X_2} \quad (13)$$

$$\mathrm{Fur} = 0{,}326 + 0{,}095\,X_1 - 0{,}043\,\mathrm{X_1X_2} \quad (14)$$

$$\mathrm{Fen} = 3{,}032 + 1{,}648\,X_1 \quad (15)$$

$$\mathrm{CR} = 80{,}54 - 6{,}00X_1 - 5{,}98\,\mathrm{X_1}^2 - 6{,}25\,\mathrm{X_2} + 6{,}67\,\mathrm{X_2}^2 - 8{,}17\,\mathrm{X_1X_2} \quad (16)$$

$$\mathrm{SR} = 49{,}85 - 5{,}05\,X_1 - 5{,}57\,\mathrm{X_2} + 4{,}69\,\mathrm{X_2}^2 - 4{,}77\,\mathrm{X_1X_2} \quad (17)$$

Onde:

RHH = Rendimento de hidrólise da hemicelulose (%),

Fur = Soma dos furanos (g/L),

Fen = Soma dos fenólicos (g/L),

CR = Celulose recuperada (%),

SR = Sólidos recuperados (%),

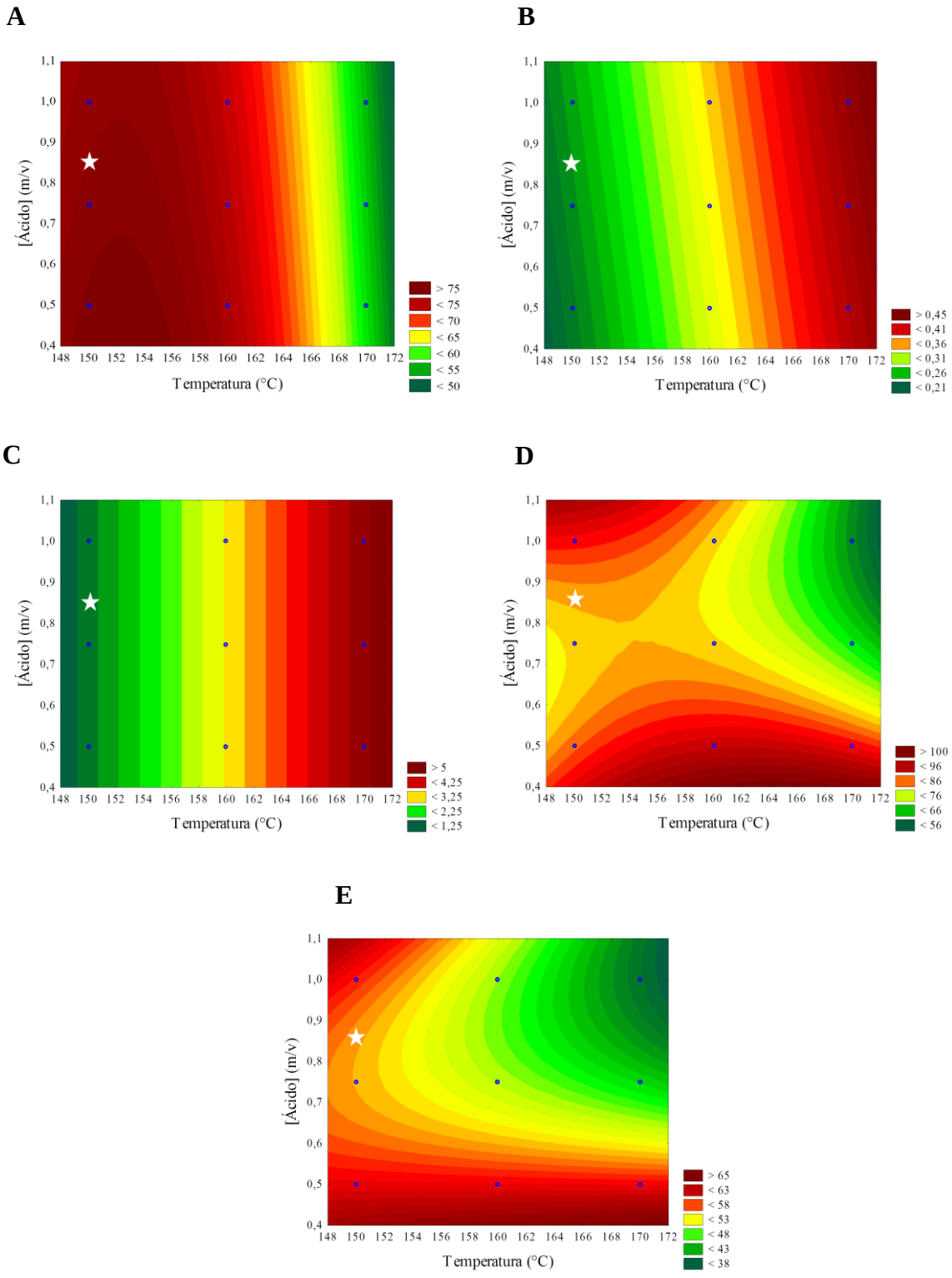
X_1 = Temperatura (°C)

X_2 = Concentração de H_2SO_4 (m/v).

As superfícies de respostas para os modelos representados acima estão apresentadas na **Figura 29**.

Com o objetivo de maximizar o rendimento de hidrólise da hemicelulose (RHH), e ao mesmo tempo obter um hidrolisado hemicelulósico com menor grau de toxicidade (menor concentração de fenólicos e furanos), além de uma maior recuperação de celulose na porção sólida e maior sólidos recuperados, foi então realizada uma análise de otimização numérica empregando o programa Design Expert 6.0, a partir da combinação das respostas para obter uma única condição otimizada. Um resumo do nível ótimo de cada fator (variável dependente) para maximizar o desempenho do pré-tratamento com ácido diluído é mostrado na **Tabela 9**.

Figura 29 - Superfície de resposta do rendimento de hidrólise da hemicelulose (A), furanos (B), fenólicos (C), celulose recuperada (D) e sólidos recuperados (E) no planejamento fatorial proposto.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 9 - Resumo do nível ótimo de cada variável dependente para maximizar o desempenho do pré-tratamento com ácido diluído.

Variável Dependente	Critério de Otimização	Efeito	
		Temperatura	Concentração de H_2SO_4
Rendimento de hidrólise da hemicelulose	Maximizar	↓	↑
Soma dos furanos	Minimizar	↓	↑
Soma dos fenólicos	Minimizar	↓	•
Celulose recuperada	Maximizar	↓	↓
Sólidos recuperados	Maximizar	↓	↓

(↑) Alto nível, (↓) Baixo nível, (•) Sem significância significativa (•) Sem significância significativa, mas a interação apresenta significância.
Fonte: Arquivo Pessoal

De acordo com esta análise da **Tabela 9**, foi definida a condição otimizada, utilizando 0,85% m/v de H_2SO_4 e 150 °C. Em seguida, com o objetivo de validar o modelo obtido para a hidrólise ácida a partir dos sólidos tratados com álcali, foram realizados novos experimentos de tratamento ácido nas seguintes condições otimizadas. As respostas previstas pelo modelo, assim como a confirmação do modelo, estão apresentadas na **Tabela 10**. Este resultado mostra que o modelo descreve bem a região em estudo, uma vez que os valores experimentais estão dentro da faixa de variação, prevista por este mesmo modelo

Tabela 10 - Condição otimizada as respostas previstas pelo modelo assim como a confirmação do modelo estão apresentadas

Variável Independente	Condições Otimizada	
Concentração de Ácido Sulfúrico (% m/v)	0,85	
Temperatura (°C)	150	
Variável Dependente	**Valor**	
	Otimizado	**Experimental**
Rendimento de hidrólise da hemicelulose (%)	79,1±10,11	78,7±3,2
Soma dos furanos (g/L)	0,248±0,022	0,263±0,030
Soma dos fenólicos (g/L)	1,384±0,878	1,119±0,056
Celulose recuperada (% m/m)	76,3±22,4	93,0±5,7
Sólidos recuperados (% m/m)	55,3±7,3	62,6±4,3

Fonte: Arquivo Pessoal

5.1.2.4 Curva de tempo na condição otimizada de tratamento ácido

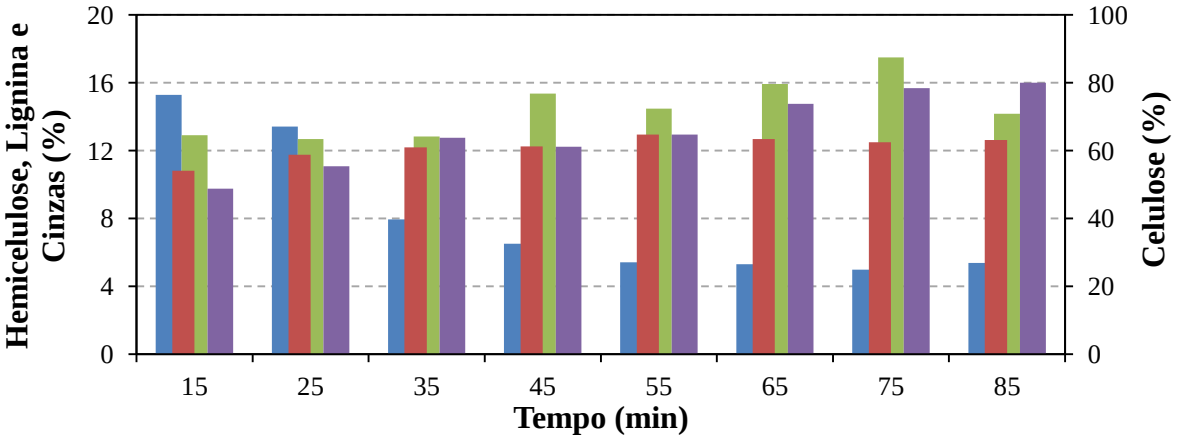
Considerando que o tempo de tratamento ácido nos ensaios do planejamento foi fixado em 20 min, foram realizados experimentos na condição experimental de tratamento ácido otimizada (150 °C e 85 mg de H_2SO_4/g de biomassa) para acompanhamento dos parâmetros de hidrólise ácida durante a rampa de aquecimento (55 min) e um tempo de até 30 min em temperatura constante, totalizando 85 min.

A **Figura 30** mostra o perfil da composição química da palha de arroz tratada com álcali, após o tratamento ácido na condição otimizada em diferentes tempos. O teor de celulose presente nos sólidos variou pouco entre 35 e 55 minutos e atingiu seu máximo (uma média 63,4±0,9%) após 55 minutos. Ao avaliar o teor de hemicelulose, nota-se que sua composição diminuiu com o tempo, chegando no valor médio mínimo de 5,3±0,2%, após 55 minutos de reação. Em relação à lignina, a variação foi de apenas 5% nos diferentes tempos (de 12,8 a 17,5%, um valor médio de 14,5%). Quanto ao teor de cinzas nota-se um aumento linear com o tempo (taxa de 0,9% por minuto), atingindo o máximo de 16% após 85 min de reação.

O perfil de liberação de açúcares no hidrolisado hemicelulósico e o rendimento de hidrólise da hemicelulose (RHH) estão mostrados na **Figura 31**. Nota-se que a maior concentração de xilose (19,1 g/L) foi atingida após 65 min de reação e decrescendo para 17,2 g/L com 85 min. Esses resultados indicam que após 65 min, não há solubilização de xilana, ocorrendo apenas a degradação da xilose já liberada. Verifica-se, também, que a quantidade de arabinose liberada nos diferentes tempos de hidrólise mostrou pouca variação, sendo observada uma concentração média de 4,0 g/L durante todo o tempo de reação. O fato de altas concentrações de arabinose terem sido detectadas nos tempos iniciais de hidrólise ácida pode ser explicado por essa pentose ser um grupo pendente ligado à cadeia de xilose, uma vez que a hemicelulose na palha de arroz pode ser representada majoritariamente pela arabinoxilana (BINOD et al., 2010).

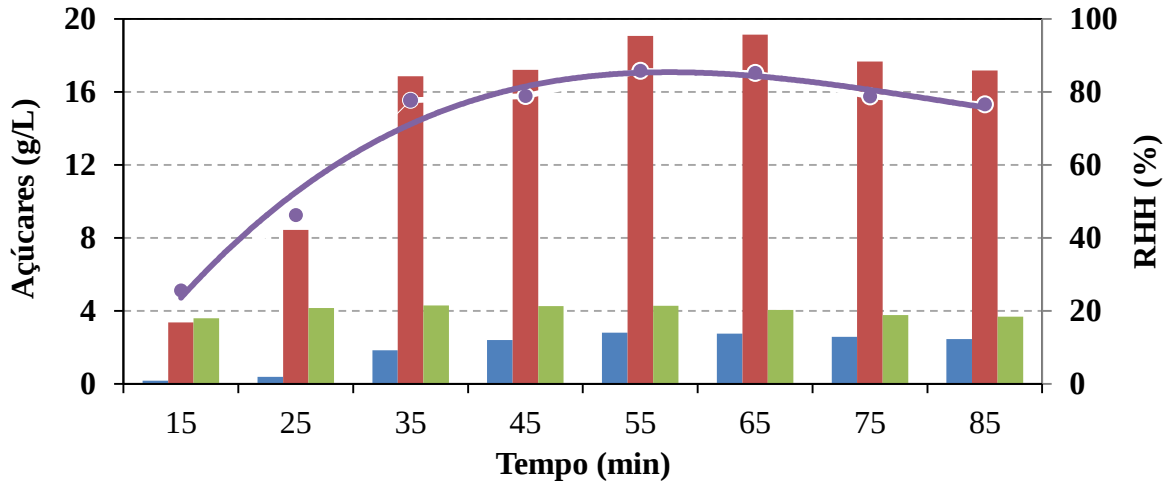
Ainda na **Figura 31**, nota-se que os maiores valores de rendimento de hidrólise da hemicelulose foram alcançados entre 55 e 65 minutos com valores de aproximadamente 85%. Este parâmetro, após 65 min, decresceu a 77% no tempo de 85 min. Já em relação à solubilização da glicose, observa-se uma crescente liberação desta hexose até 55 minutos de reação onde atinge um máximo de 2,8 g/L. A partir deste momento, a concentração diminuiu até 2,5 g/L, sugerindo degradação.

Figura 30 - Composição química da palha de arroz tratada com álcali após o tratamento ácido, hemicelulose (■), lignina (■), cinzas (■) e celulose (■).



Fonte: Arquivo Pessoal.

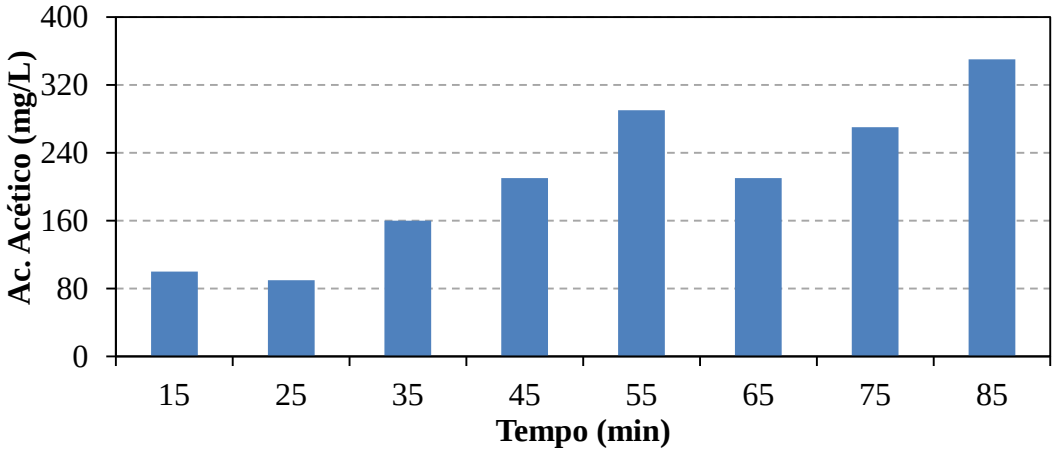
Figura 31 - Teor de glicose (■), xilose (■) e arabinose (■) e rendimento de hidrólise da hemicelulose (● e linha de tendência —) presentes no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C.



Fonte: Arquivo Pessoal.

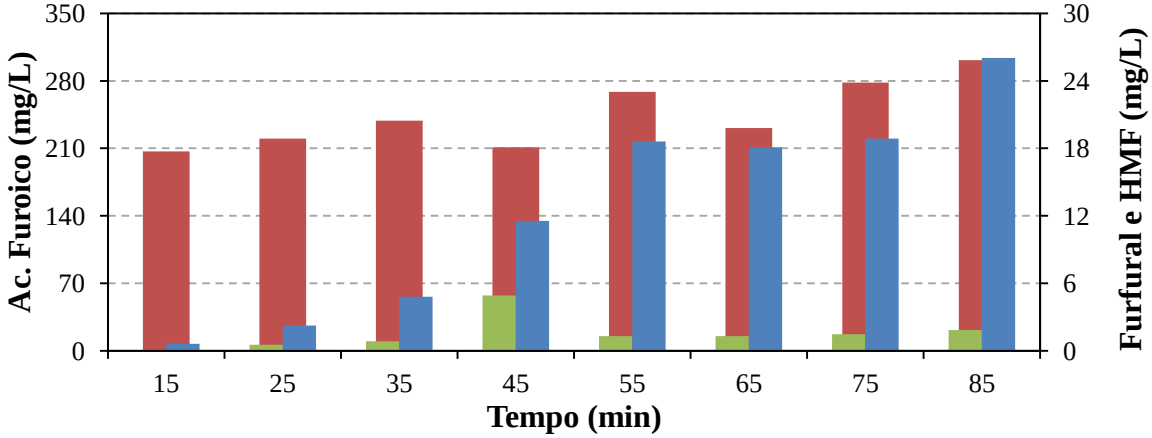
Os hidrolisados obtidos também foram analisados quanto aos teores de subprodutos sendo os maiores níveis destes compostos observados nos hidrolisados obtidos com maior tempo de reação. Para o ácido acético (**Figura 32**) nota-se uma crescente concentração com o tempo, com uma máxima concentração de 0,35 g/L, o que correspondeu a 88%de solubilização do grupo acetil presente na biomassa.

Figura 32 - Liberação de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C.



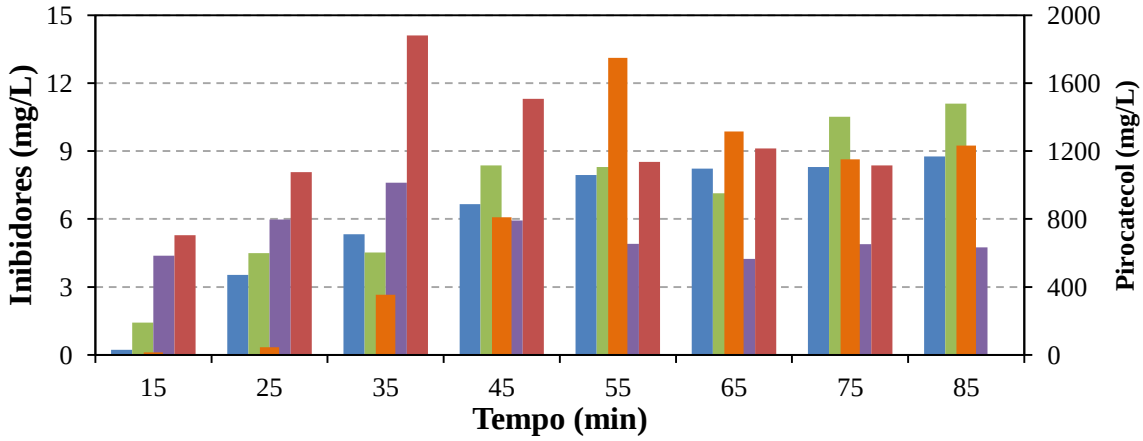
Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 33 - Liberação de furanos no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C, sendo ácido furóico (■), furfural (■) e HMF (■).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 34 - Liberação de fenólicos no hidrolisado hemicelulósico após tratamento ácido utilizando 0,85% m/v de ácido e 150 °C, sendo siringaldeido (■), ácido vanílico (■), ácido *p*-cumárico(■), ácido ferúlico (■) e pirocatecol (■).



Fonte: Arquivo Pessoal.

O perfil de formação de furanos (ácido furóico, HMF e furfural) é mostrado na **Figura 33**. Em todos os tempos avaliados ocorreu uma baixa concentração desses subprodutos e a soma destes não ultrapassou a 330 mg/L no hidrolisado hemicelulósico. A baixa concentração de furfural (< 5 mg/L) pode ser justificada pela sua degradação em ácido furóico, o qual que apresentou a maior concentração em todos os tempos avaliados (de 206 a 301 mg/L). Já o HMF, produzido a partir da degradação da glicose, apresentou um aumento linear com o tempo, com uma taxa de 3,9 mg/L por minuto (R^2 = 0,90), atingindo um valor de 26 mg/L.

A formação de fenólicos (siringaldeído, ácido vanílico, *p*-cumárico, ferúlico, e pirocatecol), **Figura 34**, mostra um aumento linear com o tempo em uma taxa de 0,12 mg/mL (R^2 = 0,84) e 0,14 mg/mL (R^2 = 0,86) para siringaldeido e o ácido vanílico, respectivamente. No entanto, o ácido *p*-cumárico e ferúlico atingem um máximo a 35 minutos, decrescendo após este tempo. Com relação ao pirocatecol, que foi o composto de degradação com maior concentração nessas condições de hidrólise ácida, apresenta um aumento até 55 minutos, atingindo uma concentração máxima de 1,7 g/L, decrescendo para1,2 g/L em 85 minutos.

Com base nos resultados obtidos considerando a alta e eficiente solubilização da hemicelulose no hidrolisado hemicelulósico, assim como um elevado teor de celulose na celulignina foi, então, estabelecido o tempo de 10 minutos como o ótimo para o tratamento ácido (85 mg de H_2SO_4 /g de biomassa e temperatura de 150 °C), o que representou uma severidade de 1,25. Vale ressaltar que a partir do acompanhamento do tempo de reação, o tempo de tratamento ácido foi reduzido em 10 min, comparado ao do planejamento inicialmente estudado.

5.1.2.5 Condição de tratamento ácido em maior escala

Visando a obtenção de uma maior quantidade de celulignina para a utilização nas etapas posteriores do trabalho, foi realizado um ensaio de hidrólise ácida em reator de 80 L nas condições previamente otimizadas (85 mg de H_2SO_4/g de palha tratada com álcali, com 10 minutos a temperatura constante de 150 °C) empregando 3,2 Kg da palha de arroz tratada com álcali (PD) e 32 litros de solução ácida de 0,85% (m/v). Após lavagem com água até pH 6,5 e secagem natural ao sol até atingir 10% de umidade, esse sólido foi caracterizado quimicamente e denominado de palha de arroz tratada com álcali e ácido

($PT_{NaOH+H2SO4}$), sendo utilizado nas etapas seguintes do trabalho. A composição química durante o processamento da biomassa e o balanço de massa dos tratamentos estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção de cada fração durante o processamento da palha de arroz tratada com álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$).

Componentes	**Composição (g/100g)**			**Recuperação***	**Recuperação Total****
	In natura	PT_{NaOH}	**$PT_{NaOH+H2SO4}$**	**(%)**	**(%)**
Celulose	**34,56**	**42,07**	**58,24**	**82,4**	**69,3**
Hemicelulose	**22,01**	**23,95**	**5,89**	**14,6**	**11,0**
Xilana	19,29	20,52	5,89	17,1	12,5
Arabinana	2,72	3,44	0,00	0,00	0,00
Grupos acetil	**2,50**	**0,41**	**0,00**	**0,00**	**0,00**
Lignina total	**15,50**	**12,47**	**19,37**	**92,4**	**51,4**
Lignina insolúvel	12,90	10,94	18,28	99,4	58,2
Lignina solúvel	2,60	1,53	1,09	42,4	17,2
Cinzas	**13,92**	**9,65**	**9,67**	**59,6**	**28,6**
Outros	**11,52**	**11,45**	**6,83**	**35,5**	**24,4**
Total	100,00	100,00	100,00	59,5	41,1

PT_{NaOH} = palha de arroz tratada com álcali; $PT_{NaOH+H2SO4}$ = palha de arroz tratada com álcali e ácido;
* Recuperação da etapa de desacetilação, calculada considerando 59,5% de sólidos a recuperados nesta única etapa. ** Recuperação do pré-tratamento, todas as etapas de tratamento, calculada considerando 41,1% de sólidos recuperados.
Fonte: Arquivo Pessoal

O mesmo procedimento de hidrólise ácida foi realizado com palha de arroz *in natura* e o sólido obtido foi caracterizado quimicamente e denominado de palha de arroz tratada apenas com ácido (PT_{H2SO4}). A composição química durante o processamento da biomassa e o balanço de massa dos tratamentos estão apresentados na **Tabela 12**.

Nota-se que a maior composição da fração celulósica foi na $PT_{NaOH+H2SO4}$, cujo aumento foi de aproximadamente 25% quando comparados a PT_{H2SO4}. Ademais, a $PT_{NaOH+H2SO4}$ apresentou uma diminuição na composição dos grupos acetil, lignina e cinzas, a redução foi de 100, 30 e 40%, respectivamente, quando comparada a PT_{H2SO4}.

Avaliando a recuperação de cada componente, nota-se que mesmo passando por dois tratamentos, a recuperação da celulose na $PT_{NaOH+H2SO4}$ (69%) foi maior em relação à palha de arroz tratada apenas com ácido (53%), o que permitiu aumento do açúcar disponível nas etapas posteriores.

Tabela 12 - Composição química, massa recuperada e porcentagem de remoção de cada fração durante o preocessamento palha de arroz tratada apenas com ácido (PT_{H2SO4}).

Componentes	**Composição (g/100g)**		**Recuperação***
	In natura	**PT_{H2SO4}**	**(%)**
Celulose	**34,56**	**46,75**	**53,40**
Hemicelulose	**22,01**	**3,21**	**5,76**
Xilana	19,29	3,21	6,57
Arabinana	2,72	0,00	0,00
Grupos acetil	**2,50**	**0,98**	**15,48**
Lignina total	**15,50**	**28,12**	**71,66**
Lignina insolúvel	12,90	26,88	82,31
Lignina solúvel	2,60	1,24	18,84
Cinzas	**13,92**	**16,21**	**46,00**
Outros	**11,52**	**4,73**	**16,22**
Total	100,00	100,00	**-**

PT_{H2SO4} = palha de arroz tratada apenas com ácido; * Recuperação da hidrólise ácida controle, calculada considerando 39,5% de sólidos a recuperados nesta única etapa.
Fonte: Arquivo Pessoal

A composição dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir da palha de arroz tratada com álcali (PT_{NaOH}) e da palha de arroz *in natura* estão apresentados na **Tabela 13**. Em relação às frações açucaradas, nota-se apenas uma pequena variação, especialmente nos teores de xilose, que é principal açúcar liberado na hidrólise ácida, o que resultou em similares rendimento de hidrólise hemicelulose (94%). Chen et al. (2012c) e Castro et al. (2017) não observaram esse mesmo comportamento na severidades utilizada no presente estudo (1,25). Segundo os autores, os resultados podem ser explicados pelo fato de que, sob as condições de maior severidade, a fração esterificada da xilana, que pode atingir até 4 % da biomassa, é facilmente hidrolisada e, portanto, o efeito do tratamento alcalino torna-se atenuado. Dessa forma, sugere-se que esse fenômeno também é observado em altas temperaturas, mesmo em tratamentos ácidos com baixa severidade. Mostrando também que a severidade combinada não é um parâmetro ideal para comparar tratamentos com temperaturas muito variadas.

Quanto ao ácido acético, o hidrolisado obtido pelo tratamento da palha de arroz tratada com álcali e ácido ($HH_{NaOH+H2SO4}$) apresenta um teor de apenas 0,3 g/L. No entanto, nos hidrolisados obtidos a partir da palha *in natura* (HH_{H2SO4})o nível deste ácido foi de 1,4 g/L. Pode-se observar uma redução significativa (78,6%) quando comparamos os dados.

Os resultados já eram esperados, uma vez que o tratamento alcalino removeu os grupos acetil, e a concentração de ácido acético liberada depende do tipo de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989).

Tabela 13 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico após o tratamento ácido, na condição otimizada em diferentes tempos.

Componentes (g/L)	**Composição do Hidrolisado Hemicelulósico**	
	Álcali + Ácido	**Ácido**
Açúcares e ácido acético		
Glicose	3,1±0,2	3,6±0,2
Xilose	20,9±0,3	19,5±1,8
Arabinose	4,8±0,2	3,3±0,4
Ácido Acético	0,3±0,2	1,4±0,1
Produtos de degradação de açúcares		
HMF	0,019±0,002	0,055±0,003
Ácido Furóico	0,285±0,047	0,199±0,033
Furfural	nd	0,003±0,000
Produtos de degradação de lignina		
Pirocatecol	0,663±0,106	1,285±0,051
Ácido Vanílico	0,014±0,002	0,037±0,003
Álcool vanilil	0,095±0,005	0,098±0,008
Vanilina	nd	0,017±0,002
Ácido *p*-cumárico	0,003±0,001	0,020±0,001
Ácido ferúlico	0,016±0,002	0,012±0,004
RHH (%)	94,19±1,6	94,24±2,1

RHH = rendimento de hidrólise da hemicelulose
Fonte: Arquivo Pessoal

Analisando o teor de furanos, em geral, ocorreu maior degradação dos açúcares no HH_{H2SO4}. Observou-se que o furfural não está presente no hidrolisado $HH_{NaOH+H2SO4}$, no entanto, o teor de ácido furóico está em maior concentração (285,2 mg/L) quando comparado ao hidrolisado ácido (198,7 mg/L). O HMF apresentou concentração três vezes menor no $HH_{NaOH+H2SO4}$ quando comparados ao HH_{H2SO4}.

Em relação aos fenólicos, nota-se que o HH_{H2SO4} apresenta uma maior degradação da lignina. Verifica-se que o pirocatecol, ácido vanílico e *p*-cumárico apresentaram maior teor no HH_{H2SO4} quando comparado ao no $HH_{NaOH+H2SO4}$, duas, três e seis vezes maior,

respectivamente. A vanilina não foi detectada no hidrolisado produzido no processo álcali + ácido, enquanto a concentração no HH_{H2SO4} foi de 17,2 mg/L. O teor do álcool vanilil e ácido ferúlico não apresentaram diferença entre os dois hidrolisados.

5.1.2.6 Análise das mudanças estruturais da palha de arroz

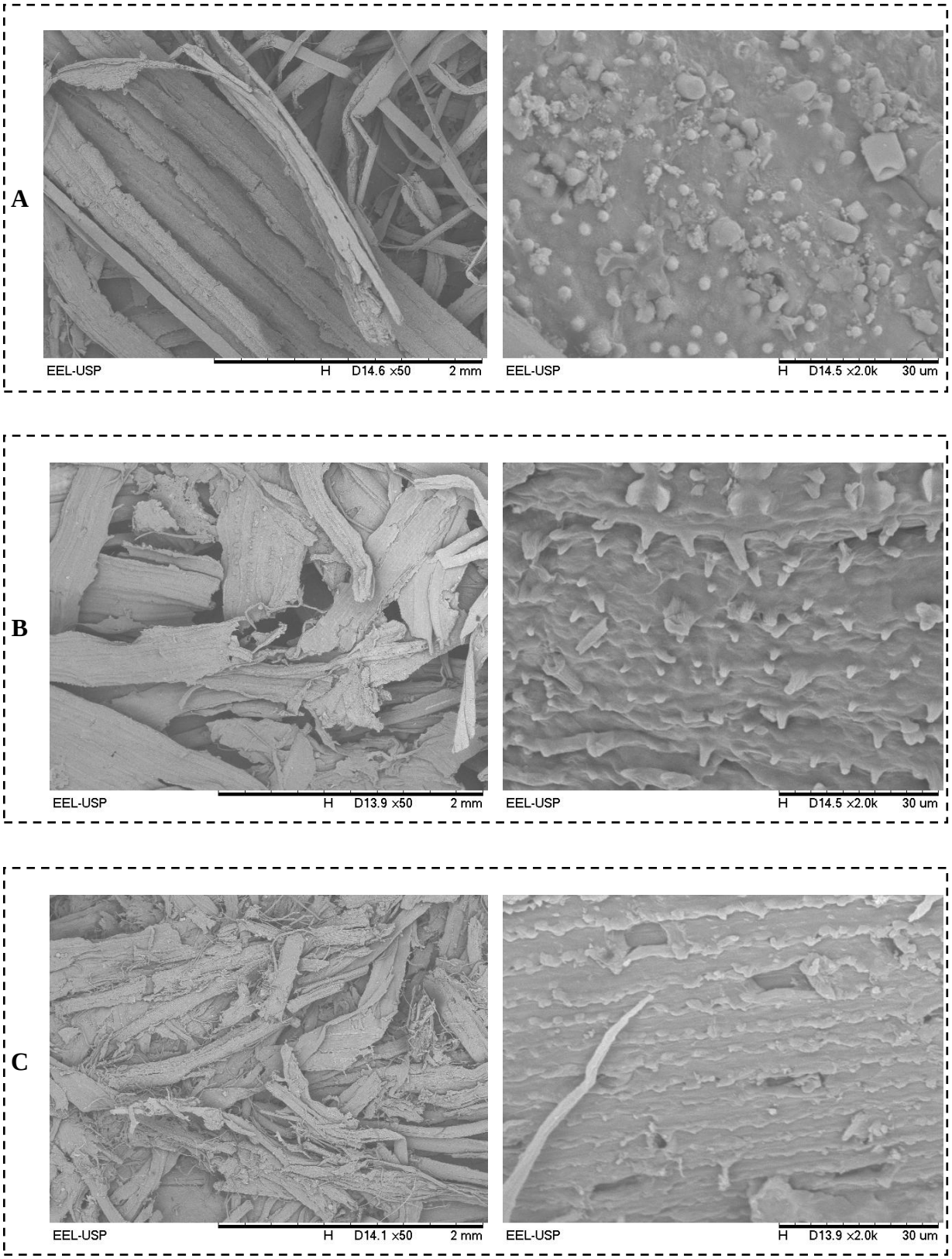
Como discutido nas etapas anteriores desste trabalho, durante o processamento da palha de arroz ocorre uma série de modificações nos teores de cada fração, em função do tratamento realizado. No entanto, além das modificações químicas, o processamento também é capaz de causar mudanças estruturais na fibra (LANGAN et al., 2014). Buscando avaliar estas modificações estruturais foram analisadas as fotomicrografias, em microscópio eletrônico de varredura, e o índice de cristalinidade (I_C) da celulose, utilizando a técnica de difração de raios-X, para a palha de arroz *in natura*, palha de arroz tratada com álcali e palha de arroz tratada com álcali e ácido. Os resultados destas análises são mostrados na **Figura 35** e **Figura 36**, para as fotomicrografias e índice de cristalinidade, respectivamente.

As fotomicrografias em MEV foram realizadas com o objetivo de se verificar as mudanças estruturais ocorridas no material durante os processos alcalino e alcalino + ácido. A **Figura 35** mostra as características morfológicas da palha de arroz *in natura* (**Figura 35 A**), submetida ao tratamento álcali (**Figura 35 B**) e ao tratamento álcali e ácido combinados material (**Figura 35 C**), obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com ampliação de 50 e 2000 vezes.

Na ampliação de 50 vezes, verifica-se que o tratamento alcalino na palha de arroz promoveu a uma redução do tamanho das fibras, mostrando uma leve desorganização, mas sem rompimento da estrutura principal (**Figura 35 A** e **B)**. No entanto, a palha tratada com álcali e ácido exibiu uma estrutura mais desorganizada, com maior exposição das fibras, o que aumentou a área superficial e a porosidade do material (**Figura 35 C**). Apesar de ambos os tratamentos se mostrarem eficazes aumentando a exposição da superfície nas amostras de palha, a morfologia da PT_{NaOH} está mais conservada do que a na $PT_{NaOH+H2SO4}$.

Este resultado está diretamente relacionado com as características de cada etapa do pré-tratamento empregado. O tratamento álcali desfaz a estrutura lignocelulósica principalmente pela remoção dos grupos acetil e redução parcial da lignina e cinzas, permanecendo a celulose e hemicelulose (CHEN et al., 2012; CASTRO et al., 2017). Por outro lado o tratamento com ácido sulfúrico diluído eficaz, além de solubilizar a maioria

Figura 35 - Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras de palha de arroz: *in natura* (A), tratada com álcali (B) e tratada com álcali e ácido (C). Ampliação: 50 vezes (lado esquerdo) e 2000 vezes (lado direito).



Fonte: Arquivo Pessoal.

dos açúcares hemicelulósicos no processo, é capaz de diminuir o tamanho médio das partículas, levando a uma maior digestibilidade da celulose (LEU; ZHU, 2013).

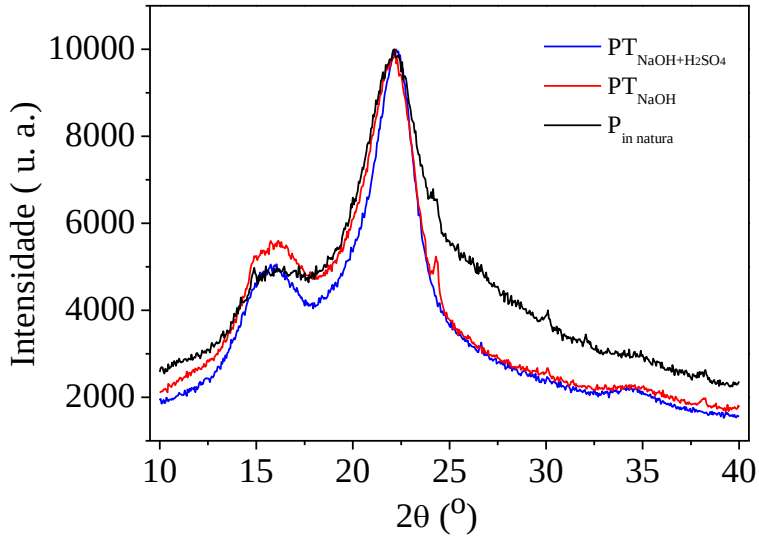
Em relação à ampliação de 2000 vezes, as micrografias do MEV sugerem que o tratamento alcalino aumentou a rugosidade das fibras, provavelmente devido à retirada de parte da lignina, deixando expostos os tricomas (pêlos) desenvolvidos através de células silificadas, formadas por sílica (HUSTON, 1972), estruturas cilíndricas presentes na fotomicrografia da **Figura 35 B**. Pode-se observar um maior desgaste causado após tratamento ácido, **Figura 35 C**, pela retirada da cinzas (ausência de tricomas) e hemicelulose.

A análise por MEV também mostrou diferença significativa entre a palha *in natura* e a palha submetida a diferentes tratamentos. Ambos os tratamentos, álcali e álcali + ácido, foram eficazes no que diz respeito às mudanças estruturais, aumentando a exposição da área superficial nas amostras de palha. No entanto, a morfologia da $PT_{NaOH+H2SO4}$ mostra que esse tratamento levou a uma maior exposição das fibras que a PT_{NaOH}.

Amostras de celulose são rotineiramente analisadas para determinar seu arranjo cristalino e cristalinidade (LIANG et al, 2014; HUANG et al, 2017; XU et al, 2017). Dessa forma, com o objetivo de avaliar a estrutura cristalina da celulose da palha de arroz antes e após os tratamentos químicos empregados, foi utilizada a técnica de difração de raio-X. Os difratogramas das amostras de palha de arroz *in natura*, tratada com álcali e tratada com álcali e ácido estão apresentados na **Figura 36**. Observa-se com clareza a presença de dois picos no difratograma em 2θ próximo a 16° e 23°. Nos difratogramas das palhas que passaram por tratamentos químicos verifica-se ainda um pico perto de 35°. Esses picos são característicos da celulose do tipo I, estrutura encontrada na celulose nativa (FRENCH, 2014), mostrando que está estrutura se mantém durante os tratamentos.

No difratograma foram medidas as intensidades de um dos picos de difração característicos de celulose I (plano 002, próximo a 2θ 22,5º) e o vale próximo a 18º, que representa o material amorfo das amostras. A partir desses valores de intensidade, foram calculados os índices de cristalinidade das amostras conforme proposto por Segal et al. (1962), e os resultados estão apresentados na **Tabela 14**. Segal et al. (1962) criou um método rápido para a calcular a medida empírica da cristalinidade relativa da celulose, a partir do índice de cristalinidade (I_C). Para determinação do I_C da celulose foi calculada a razão entre a intensidade do pico referente ao plano 002 ($22º \leq 2\theta \leq 23º$) e amorfa ($18º \leq 2\theta \leq 19º$).

Figura 36 - Difratograma de raios-X das amostras de palha de arroz: *in natura* (preta), tratada com álcali (vermelha) e tratada com álcali e ácido (azul).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 14 - Intensidade do pico de difração que representa o material cristalino e o vale mínimo do halo que representa o material amorfo e índice de cristalinidade das amostras de palha de arroz: *in natura*, tratada com álcali e tratada com álcali e ácido.

Palha de arroz	**$I_{(002)}$**	**$I_{(a)}$**	**I_C (%)**
In natura	9994,913	4642,312	53
PT_{NaOH}	9994,913	4715,382	53
$PT_{NaOH+H2SO4}$	9994,912	4042,950	58

$I_{(002)}$ = Intensidade do pico de difração que representa o material cristalino; $I_{(a)}$ = Intensidade vale mínimo do halo que representa o material amorfo; I_C = índice de cristalinidade
Fonte: Arquivo Pessoal

Conforme demonstrado por Park et al. (2010), o índice de cristalinidade obtido pelo método de Segal não é adequado para realizar comparações entre dados da literatura, uma vez que várias variáveis da análise podem afetar a medida. No entanto, como todos os difratogramas foram gerados nas mesmas condições de análise, foi possível realizar a comparação entre as amostras, já que tratamentos químicos na biomassa lignocelulósica podem afetar a cristalinidade da celulose.

Pode-se perceber que conforme os tratamentos químicos foram aplicados, ocorreu a diminuição da intensidade em 2θ, referente à região amorfa e os picos ficaram mais resolvidos.

Os resultados obtidos mostraram que o índice de cristalinidade da palha de arroz *in natura* foi 53%, valor semelhante ao da palha tratada apenas com álcali, enquanto que na palha de arroz tratada com álcali e ácido o índice de cristalinidade foi 58%. Aparentemente, o tratamento álcali + ácido aumentou o índice de cristalinidade da fibra em 5%. Esse aumento da cristalinidade se deve provavelmente à remoção dos componentes não celulósicos durante o processamento da biomassa, principalmente hemicelulose.

5.2 Hidrólise Enzimática

Esta etapa teve como objetivo avaliar o perfil de hidrólise enzimática (sacarificação) da palha de arroz pré-tratada (alcalino + ácido) empregando elevados teores de sólidos (16, 20 e 24% m/v). Nesta etapa, foi também avaliada a forma de condução do processo de hidrólise enzimática (batelada simples e batelada alimentada) empregando o teor de sólidos de 24% m/v. Os ensaios foram conduzidos em reator não-convencional do tipo Moinho de Bolas Vertical (MBV) empregando condições operacionais previamente estabelecidas por Castro, 2016 (carga enzimática de 29,5 FPU por grama de celulose, 30 esferas de vidro, temperatura de 46 °C e agitação de 100 rpm).

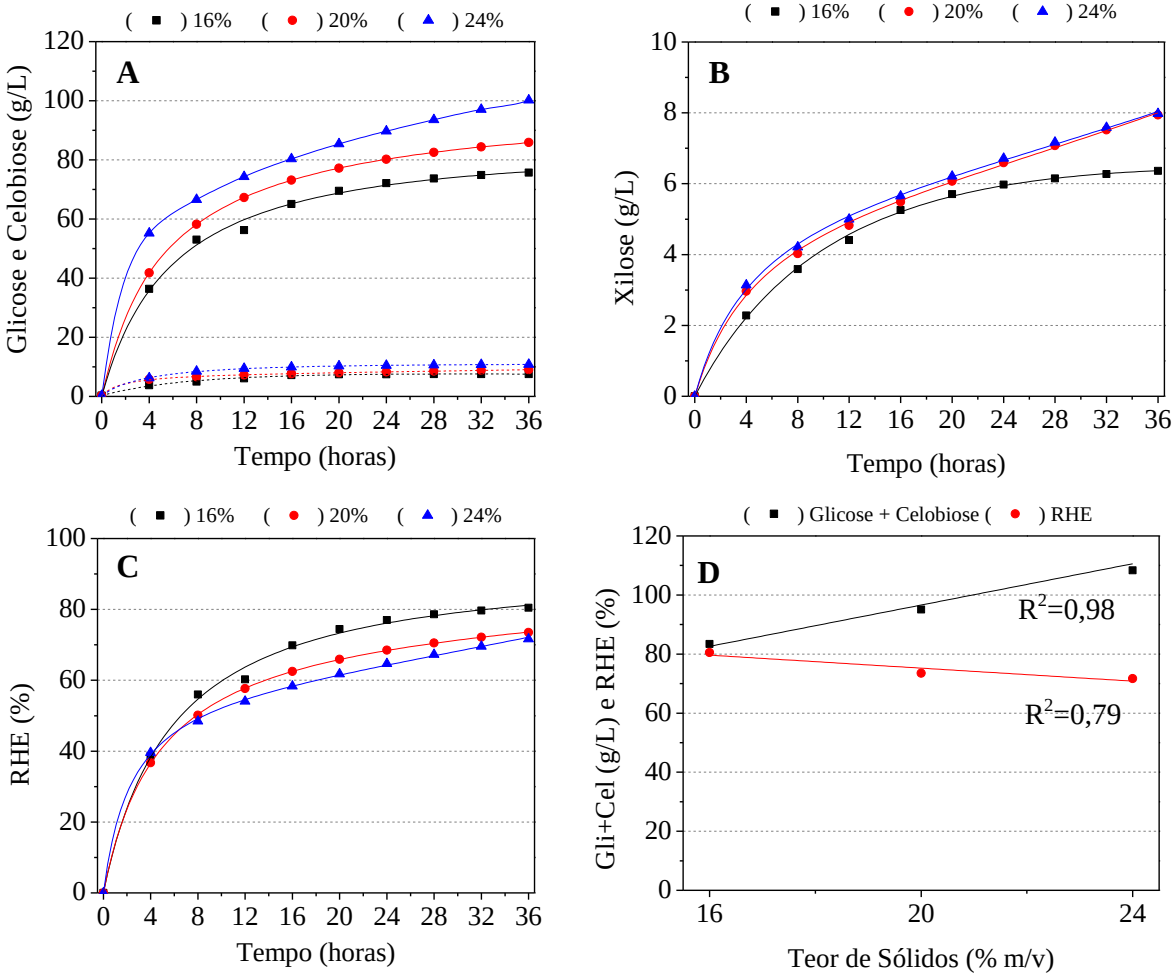
Os ensaios foram nomeados de acordo com a forma de condução da hidrólise e teor de sólidos empregados, conforme se segue: BS16 (batelada simples com 16% m/v), BS20 (batelada simples com 20% m/v), BS24 (batelada simples com 24% m/v) e BA16+4+4 (batelada alimentada em reator inicialmente com 16% m/v, e adição de 4% m/v após 10 h e 24 h, totalizando 24% m/v).

A **Figura 37** apresenta o perfil de liberação de açúcares (glicose, celobiose e xilose), o rendimento de hidrólise enzimática (RHE) da palha de arroz pré-tratada nos diferentes teores de sólidos avaliados em batelada simples, assim como a correlação entre a liberação de glicose e celobiose e rendimento de hidrólise enzimática com o teor de sólidos.

Nota-se, na **Figura 37 A**, que o aumento no teor de sólidos favoreceu a liberação de glicose e celobiose apresentando valores máximos de 76 e 7 g/L para 16% m/v; de 85 e 8 g/L para 20% m/v e de 100 e 10 g/L para 24% m/v, respectivamente, o que se justifica pelo maior conteúdo de celulose disponível na reação de hidrólise enzimática. Esse mesmo comportamento não foi verificado para a xilose (**Figura 37 B**), uma vez que a liberação desta pentose foi favorecida apenas com o aumento de sólidos de 16 para 20% m/v, sendo que nos ensaios com 20% m/v, a concentração de xilose obtida foi similar ao observado

com 24% m/v, durante 36 h de reação. A concentração máxima de xilose obtida foi de 6,4 g/L para 16% m/v e de 7,9 g/L para 20 e 24% m/v de sólidos.

Figura 37 - Perfil de liberação da glicose (linha sólida) e celobiose (linha tracejada) (**A**), xilose (**B**), rendimento de hidrólise da celulose (**C**) empregado na hidrólise enzimática de palha de arroz tratada com álcali e ácido: batelada contendo 16% m/v (■), batelada contendo 20% m/v (●) e batelada contendo 24% m/v (▲). E a correlação da liberação de glicose e celobiose (■) e rendimento de hidrólise enzimática (●) com o teor de sólidos (**D**).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Para uma melhor análise destes dados, foi então analisado o perfil do rendimento de hidrólise enzimática (RHE) nas diferentes condições avaliadas conforme mostrado na **Figura 37 C**. Este parâmetro relaciona o teor de glicose e celobiose com a quantidade de glicose teórica que pode ser obtida da fração celulósica em cada tratamento. Verifica-se que o maior valor de rendimento de hidrólise (80%) foi alcançado após 36 h com 16% m/v de sólidos (BS16), sendo reduzido para 72% (cerca de 10%) nos ensaios conduzidos com 20 ou 24% m/v, o que pode ser atribuído a diversos ao aumento da viscosidade da reação, dificultando a mistura e transferência de massa. O impacto do aumento dos sólidos sobre o

RHE da celulose tem sido amplamente reportado na literatura, porém os resultados variam de acordo com o tipo de biomassa, pré-tratamento empregado, condições de sacarificação, condução do processo, configuração do reator, dentre outros. Por exemplo, Gupta et al. (2012), avaliando a hidrólise enzimática da madeira de algaroba previamente deslignificada (clorito de sódio a 120 °C por 30 minutos), observaram uma redução do rendimento de hidrólise em 33%, quando o teor de sólidos foi elevado de 15 para 20% m/v, o que correspondeu a um valor de RHE de 60 e 40%, respectivamente, após 48 h. Estes autores realizaram os experimentos em biorreator convencional (STR) empregando 9 FPU/g de celulose.

Já no estudo realizado por Lu et al. (2010), os resultados de rendimento da hidrólise enzimática foram similares (≅73%), empregando 17, 25 e 33% m/v do resíduo da colheita do milho pré-tratado por explosão a vapor. Neste estudo, as reações foram conduzidas em frascos de 250 mL, com uma carga enzimática de 47 FPU/g de celulose, a 50 °C por 96 h. Utilizando palha de arroz pré-tratada com ácido (0,65% m/v de ácido sulfúrico a 152 °C por 10 min), Kapoor el al. (2016) constataram que o aumento do teor de sólidos de 16 para 20% m/v promoveu uma redução no rendimento de hidrolise enzimática de 77 e 55%, o que representou uma redução de 25% neste parâmetro. Estes ensaios foram realizados em biorreator convencional (STR) de 5 L, com uma carga de celulase de 19 FPU/g de celulose a 50 °C por 48 h.

Comparando os resultados de Kapoor el al. (2016) aos obtidos no presente estudo, ambos com 20% m/v de palha de arroz pre-tratada, nota-se um maior valor de RHE (cerca de 31% superior) com um menor tempo de hidrólise (12 horas a menos) para as condições do presente estudo. Os melhores resultados de RHE observados no presente estudo com 20% m/v de sólidos em relação ao trabalho de Kapoor el al. (2016) podem ser atribuídos a três fatores: 1) a utilização do tratamento alcalino anterior a hidrólise ácida, 2) maior carga enzimática e 3) configuração do reator.

Analisando **Figura 37 D**, nota-se que uma correlação positiva para a solubilização da celulose (liberação de glicose e celobiose) e negativa para o rendimento de hidrólise enzimática com o teor de sólidos. Nota-se ainda que ambos os comportamentos foram lineares com coeficientes de determinação (R^2) acima de 0,79. Esses resultados mostram que, mesmo aumentando o teor de sólido na reação, a digestibilidade da celulose não é proporcional. Esse comportamento foi também obtido por Cara et al. (2007) na hidrólise enzimática da poda de oliveira pré-tratada (explosão à vapor seguida de deslignificação com hidróxido de sódio) numa faixa de variação de sólidos de 2 a 33% m/v. Empregando

papel de filtro (de 5 a 33% m/v), Kristen, Felby e Jorgensen (2009) observaram uma diminuição tanto no rendimento de hidrólise enzimática quanto na adsorção de enzimas com o aumento do teor de sólidos, concluindo que o efeito dos sólidos pode ser explicado pela inibição da ligação das celulases ao substrato. O efeito dos sólidos sobre o rendimento de hidrólise enzimática tem sido reportado na literatura não apenas na reação de sacarificação de biomassas lignocelulósicas, mas também no processo que combina sacarificação e fermentação simultânea (JORGENSEN; KRISTEN; FELBY, 2007; VARGA et al. 2004).

Ainda na **Figura 37**, verifica-se que a maior concentração de glicose liberada (100 g/L) na hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada foi obtida com o maior teor de sólidos avaliados (24% m/v) correspondendo a 72% de RHE. Mesmo apresentando um rendimento de hidrólise inferior aos observados com 16 e 20% m/v, esse resultado tem se mostrado similar aos observados na literatura por diversos autores. Por exemplo, Lu et al. (2010), utilizando resíduo da colheita do milho pré-tratado por explosão a vapor, contendo 42,8% de celulose, obtiveram 74,2% de RHE, após 96 h, com 25% m/v.

Em outro estudo, Zhao et al (2013), empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com formilina (86,2% de celulose), alcançaram 70% de RHE, após 144 h, com 25% m/v de sólidos. Ludwig et. al (2014), usando a palha de trigo pré-tratada com álcali diluído (73% de celulose), alcançaram 133 g/L de glicose, o que equivale a 76% de RHE após 48 h de hidrólise enzimática. Esses estudos sugerem que, mesmo utilizando diferentes tipos de biomassas, formas de pré-tratamentos e condições operacionais variáveis, o uso de alto teor de sólidos (≅25% m/v) na etapa de hidrólise enzimática por batelada simples parece limitar o valor de RHE. Essa limitação pode ser atribuída à alta viscosidade do sistema, uma vez que o emprego de alto teor de sólidos dificulta seriamente a mistura e a transferência de massa da reação (CARDONA et al.2015).

A literatura tem mostrado que uma forma de contornar estes problemas relacionados a mistura, é o emprego da batelada alimentada, já que o rendimento de hidrólise enzimática, principalmente empregando elevados teores de sólidos, é influenciado tanto pela configuração do reator quanto pela forma de condução do processo(HODGE et al., 2009; GUPTA et al., 2012 e CARDONA et al.2015).

Com o objetivo de aumentar o rendimento de hidrólise enzimática da palha de arroz, e, consequentemente, obter uma maior concentração de glicose para fermentação, foi avaliado o processo de hidrólise enzimática por batelada alimentada em reator MBV com 24 % m/v de sólidos totais.

A **Tabela 15** apresenta os parâmetros obtidos nas diferentes formas de condução do processo de hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada, empregando o teor de sólidos de 24% m/v. Nota-se que em batelada simples, com exceção da concentração de xilose, o reator MBV mostrou um desempenho muito superior em relação ao frasco, sendo observado um aumento de 40 e 80% nos níveis de glicose e celobiose, respectivamente, o que correspondeu a um aumento de 44% no RHE.

Com relação a batelada alimentada, que foi avaliada apenas no reator MBV, verificou-se que os parâmetros de hidrólise enzimática foram levemente superiores ao da batelada simples, apresentando um aumento no valor de RHE, em cerca de 10%. Esses resultados são superiores aos obtidos por Yang et al. (2010) que também empregaram um reator cilíndrico contendo esferas de aço, para facilitar a mistura reacional. Os autores utilizaram o resíduo da plantação de milho pré-tratado com ácido diluído (0,8% m/v 158°C por 10 min) com 18% m/v de sólidos totais e observaram um aumento máximo de 5% nos valores de RHE na batelada alimentada (adição inicial de sólidos de 60% e 20% após 12 e 24 h) em relação à batelada simples. Neste trabalho, foi também constatado que o fracionamento da enzima durante o processo foi menos efetivo do que sua adição total no início da reação, corroborando o modelo proposto por Cardona et al. (2015). Esses autores observaram que a adição inicial de toda enzima resultou em maiores rendimentos de glicose e um processo mais eficiente em termos de energia devido à liquefação mais rápida e à suplementação de sólidos mais rápidas na batelada alimentada.

Tabela 15 - Parâmetros obtidos nas diferentes formas de condução do processo de hidrólise enzimática empregando o teor de sólidos de 24% (m/v).

Parâmetros	Batelada		
	Simples		Alimentada**
	Erlenmeyer	Reator MBV	Reator MBV
Glicose (g/L)	70,99±4,32	100,19±0,39	108,51±7,53
Celobiose (g/L)	5,84±0,04	10,55±0,42	12,93±0,70
Glicose* (g/L)	77,14±4,36	111,29±0,84	122,02±8,27
Xilose (g/L)	7,15±0,56	7,98±0,33	7,85±0,86
RHE (%)	49,66±2,81	71,65±0,54	78,56±5,32

******Batelada alimentada em reator MBV = inicialmente com 16% m/v, e adição de 4% m/v após 10 h e 24 h, totalizando 24% m/v, durante 48 h.
Fonte: Arquivo Pessoal.

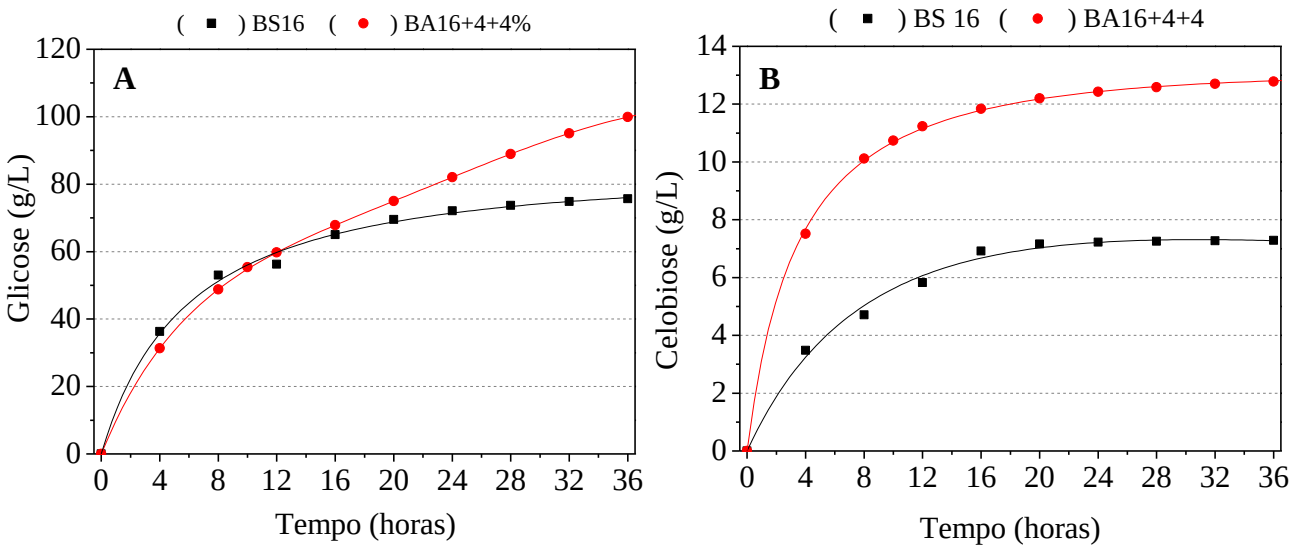
Resultados de rendimento de hidrólise enzimática semelhantes ao do presente estudo foi obtido por Zhao et al (2013) utilizando o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com formilina. Os autores empregaram frascos Elenmeyers com 25% m/v de sólidos e encontraram um valor de RHE ≅ 80% na batelada alimentada e de ≅ 70% em batelada simples. Gupta et al. (2012) também observaram um aumento no rendimento de hidrólise enzimática com 20% m/v de madeira de algaroba, previamente deslignificada ao empregar batelada alimentada (RHE = 64%) quando comparada à batelada simples (RHE = 40%), o que correspondeu a um aumento de cerca de 57%. Porém, os valores de RHE obtidos pelos autores são inferiores aos observados no presente estudo. Essas variações nos resultados podem ser atribuídas ao tipo de biomassa e condições de processo.

De acordo com Chandra et al. (2010), a utilização da batelada alimentada diminui os problemas de mistura e de transferência de massa/calor, já que a adição gradual de sólidos, reduz a viscosidade do sistema. Com base nos resultados obtidos no presente estudo ficou demonstrado que a batelada alimentada favoreceu a sacarificação, indicando que a estratégia empregada reduziu o grau de viscosidade da palha pré-tradada com 24% m/v.

Conforme já mostrado anteriormente, o rendimento de hidrólise enzimática da batelada alimentada com 24% m/v da palha de arroz (BA16+4+4), foi similar ao obtido em batelada simples com 16 m/v (RHE ≅ 80%). É importante ressaltar que, até às 10 horas de reação, ambos os ensaios (BS16 e BA16+4+4) apresentaram o mesmo teor de sólidos (16% m/v), porém a carga enzimática empregada no ensaio BA16+4+4 foi cerca de 50% maior do que a carga utilizada no ensaio BS16 (44,3 FPU/g de celulose e 29,5 FPU/g de celulose, respectivamente). Estes ensaios foram então comparados e o perfil de liberação da glicose e celobiose estão mostrados na **Figura 38 A** e **B**, respectivamente.

Nota-se na **Figura 38 A,** que apesar da diferença na carga de enzimas, a concentração de glicose produzida foi similar até 10 h, atingindo um valor de 55 g/L. Dessa maneira, pode-se inferir que a utilização da maior carga enzimática não favoreceu a liberação de glicose para o teor de sólidos inicial de 16% m/v. No entanto, nesse mesmo período de tempo (10 h), a liberação de celobiose (**Figura 38 B**) apresentou um aumento de 77% na maior carga enzimática (ensaio BA16+4+4), indicando que a quantidade de β-glicosidase foi insuficiente para a clivagem da celobiose em glicose, o que resultou em seu maior acúmulo. Estes resultados sugerem a necessidade de otimização da carga enzimática para o processo de sacarificação com altos teores de sólidos, especialmente no que se refere à quantidade de β-glicosidase no extrato enzimático.

Figura 38 - Perfil de liberação da glicose (**A**) e celobiose (**B**) durante a hidrólise enzimática de palha de arroz tratada com álcali e ácido: batelada simples em reator contendo 16% m/v (■) e batelada alimentada em reator contendo inicialmente 16% m/v, e adição de 4% m/v após 10 h e 24 h, totalizando 24% m/v (●).



Fonte: Arquivo Pessoal.

5.3 Impacto da sequencia de pré-tratamento na hidrólise enzimática

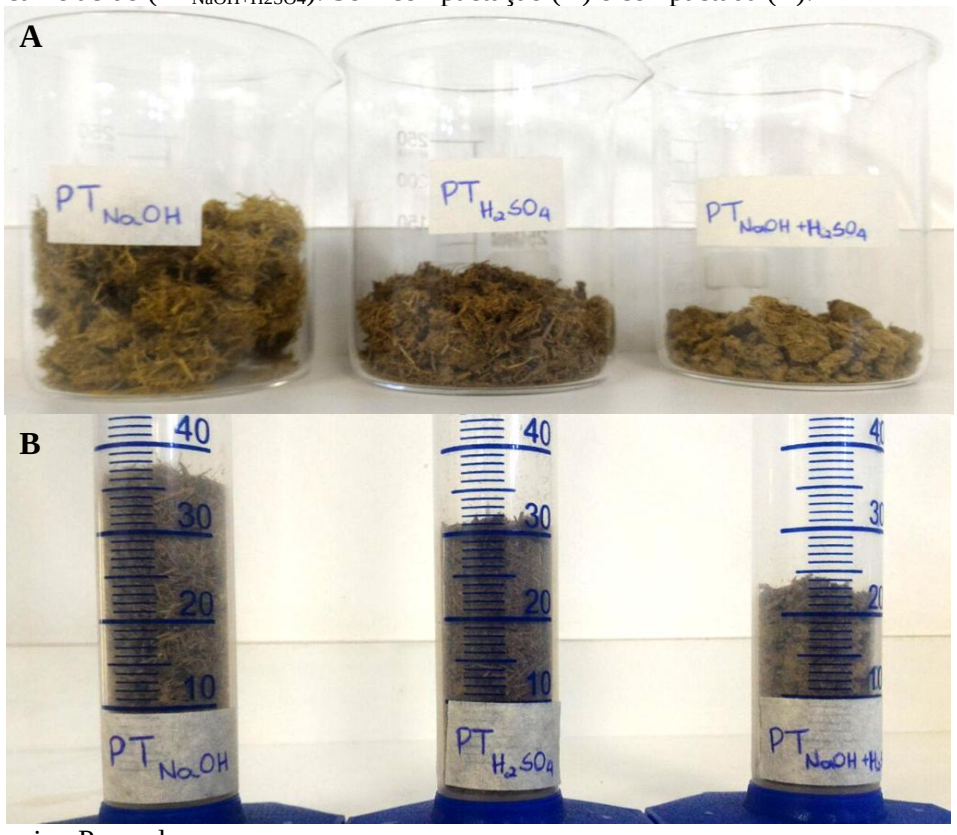
Com objetivo de verificar o impacto da sequencia de pré-tratamento utilizado durante no processamento da palha de arroz sobre o rendimento de hidrólise enzimática, os sólidos obtidos em cada etapa (1) alcalino (PT_{NaOH}); 2) ácido (PT_{H2SO4}) e 3) alcalino+ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$) foram submetidos ao processo de sacarificação por batelada alimentada, nas condições experimentais previamente estabelecidas, em reator MBV. Inicialmente, foram avaliadas algumas características físicas aparentes importantes de cada material na hidrólise , como: densidade aparente e absorção de água apresentados na **Figura 39** e **Figura 40**, respectivamente. Em relação a densidade aparente (**Figura 39 B**), fica evidente que a palha tratada com álcali apresenta uma densidade muito inferior as outras palhas avaliadas. Nota-se que a densidade aumentou com a realização do tratamento ácido, sendo a $PT_{NaOH+H2SO4}$ mais densa que a PT_{H2SO4}.

A densidade aparente foi de 0,14; 0,16 e 021 g/cm^3 para PT_{NaOH}, PT_{H2SO4} e $PT_{NaOH+H2SO4}$, calculada a partir da **Figura 39 B**. Confirmando, o que a **Figura 39 A** já indicava.

Para avaliar a absorção de água, foi preparada uma mistura de palha + água, na proporção de 16% de sólidos, foi tirada uma foto antes e após 10 min da adição de água (**Figura 40 A** e **B**, respectivamente). Esta propriedade seguiu o mesmo comportamento da

densidade aparente, mostrando que quanto maior a densidade, mais água é adsorvida. Observa-se que imediatamente após a adição de água (**Figura 40 A**), as palhas tratadas com ácido adsorveram a água rapidamente e, após os 10 min, todo a palha fica umidificada, apresentando pouca ou nenhuma água residual (**Figura 40 B**). Enquanto, na PT_{NaOH}, a absorção foi mais lenta e, mesmo após 10 min, verifica-se uma parcela da palha seca, sem adsorver água. Essa propriedade é de extrema importância, uma vez que água é um pré requisito para atividade das enzimas hidrolíticas, além de ser crucial para o mecanismo de transporte durante a hidrólise, possibilitando a transferência de massa no processo (FELBY et al., 2008).

Figura 39 - Densidade aparente da palha de arroz tratada com álcali (PT_{NaOH} ácido (PT_{H2SO4}) e na álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$). Sem compactação (A) e compactada (B).

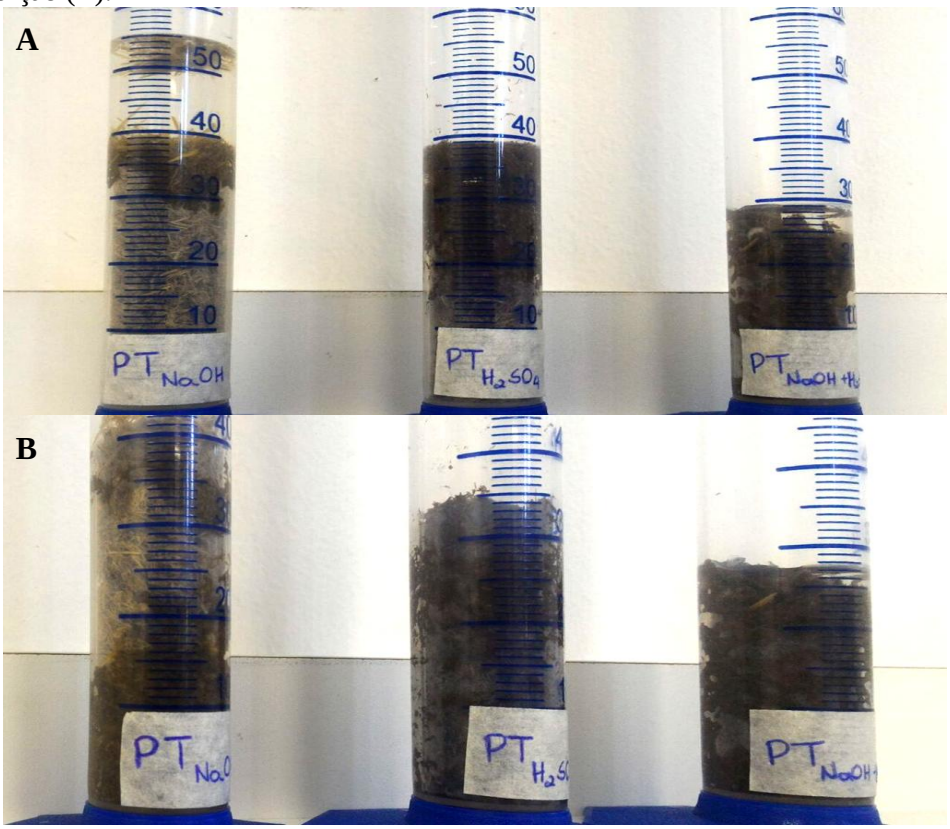


Fonte: Arquivo Pessoal.

Foram então avaliados os perfis de solubilização dos açúcares e rendimento de hidrólise enzimática para cada material, a **Figura 41**. A solubilização da celulose foi muito dificultada, e praticamente não se observou a liquefação da biomassa durante o ensaio. Isso já era esperado uma vez que a baixa a absorção de água no material limita a etapa de sacarificação. Nota-se que a hidrólise enzimática empregando 24% m/v da palha de arroz

tratada com álcali apresentou um teor de 18,9 e 1,8 g/L para glicose e celobiose, respectivamente, o que correspondeu a um rendimento de hidrólise de 20%.

Figura 40 - Absorção de água no teor de 16% m/v na palha de arroz tratada com álcali (PT_{NaOH}), ácido (PT_{H2SO4}) e álcali e ácido ($PT_{NaOH+H2SO4}$). Ao adicionar a água (A) e 10 min após a adição (B).



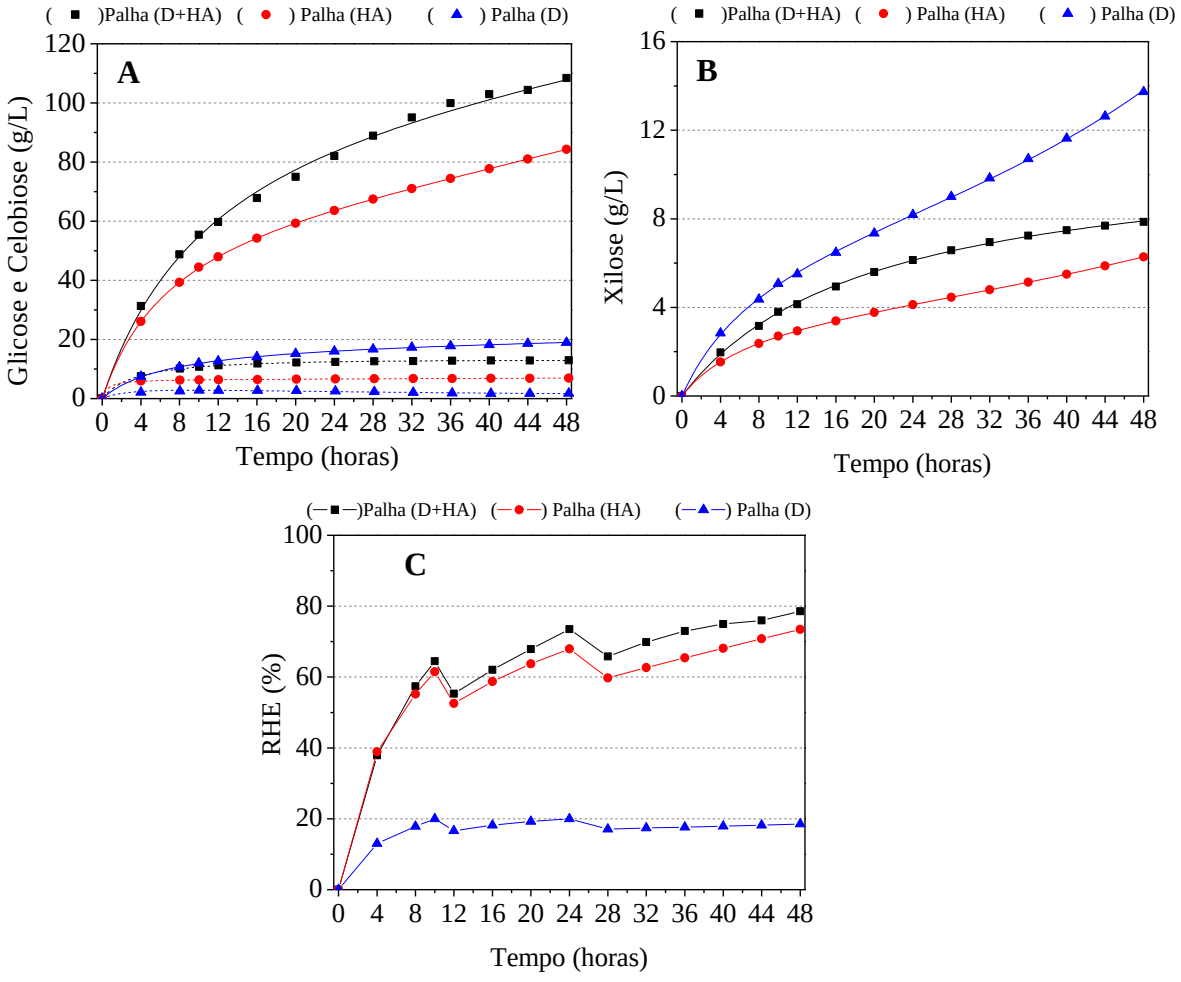
Fonte: Arquivo Pessoal.

Quanto aos demais tratamentos, foi possível observar que o tratamento alcalino + ácido (108,4 g/L) promoveu um aumento de 25%, quando comparado aos resultados obtidos com o material tratado apenas com ácido (84,3 g/L). Isso pode ser explicado pela diferença no conteúdo de celulose presente nos materiais avaliados (PT_{H2SO4} = 46,8 e $PT_{NaOH+H2SO4}$ = 58,2%), uma vez que o teor desta fração foi proporcional ao aumento observado. Ao avaliar a celobiose, foi verificado um aumento de 85% na concentração deste dissacarídeo na hidrólise da palha arroz tratada com álcali e ácido (12,9 g/L) em relação aos valores obtidos apenas com a PT_{H2SO4} (**Figura 41 B**). Observou-se, ainda, que a concentração de celobiose permaneceu praticamente constante após 20 horas de ensaio.

O perfil de solubilização da xilana, expresso em função da concentração de xilose, está mostrado na **Figura 41 B**. A maior concentração desta pentose foi observada na hidrólise enzimática utilizando a palha tratada com álcali (13,7 g/L), seguida da palha tratada com álcali + ácido (7,9 g/L) e da palha tratada apenas com ácido (6,3 g/L).

Considerando a composição de xilana em cada palha de arroz tratada PT_{NaOH} (20,5%), PT_{H2SO4} (3,2%) e $PT_{NaOH+H2SO4}$ (5,9%), vide **Tabela 11** e **Tabela 12**, e o teor de máximo de xilose liberada durante a hidrólise enzimática foi feita uma correlação dessas variáveis (gráfico não exposto). Observou-se que a concentração de xilose liberada se correlaciona linear e positivamente com teor de xilana do material, ou seja, a solubilização da xilana depende diretamente da composição desta fração no material submetido a hidrólise enzimática.

Figura 41 - Perfil de liberação da glicose (linha sólida) e celobiose (linha tracejada) (**A**), xilose (**B**) e rendimento de hidrólise da celulose (**C**) na hidrólise enzimática da palha de arroz tratada com álcali e ácido (■), tratada apenas com ácido (●) e tratada apenas com álcali (▲).



Fonte: Arquivo Pessoal.

A **Figura 41 C** apresenta o rendimento de hidrólise enzimática obtidos pela solubilização da celulose da $PT_{NaOH+H2SO4}$, PT_{H2SO4} e PT_{NaOH}. Ambas as palhas que passaram pelo tratamento ácido, apresentaram perfil de rendimento de hidrólise enzimática semelhante, até 10 h de ensaio e, com aumento do teor de sólidos através da alimentação,

passaram a exibir uma diferença de 5%. A PT_{H2SO4} e $PT_{NaOH+H2SO4}$ apresentaram 73 e 78% de RHE, respectivamente. No entanto, Chen *et al.* (2012), realizando a hidrólise enzimática de resíduos da plantação de milho (2% m/v, 16FPU/g de celulose a 50 °C em frascos Erlenmeyer por 168 h), observaram um incremento de 15% no rendimento de hidrólise enzimática no tratamento álcali + ácido, quando comparado a apenas uma única etapa de pré-tratamento por hidrólise ácida.

Semelhante aos trabalhos de Chen et al. (2012), Castro et al. (2017), observaram que a palha de arroz tratada com álcali + ácido era mais suscetível à hidrólise enzimática do que a palha de arroz tratada apenas com ácido, uma vez que apresentaram um RHE de 89 e 73% , respectivamente, o que correspondeu a um aumento de 22%. Os autores realizaram a hidrólise enzimática com 8% m/v, com uma carga enzimática de 20 FPU/g celulose a 43 °C em frascos Erlenmeyer por 48 h. Os trabalhos observaram diferenças significativas quando realizaram as hidrólises enzimáticas em baixos teores de sólidos. Dessa forma a pequena diferença no RHE na hidrólise enzimática da PT_{H2SO4} e $PT_{NaOH+H2SO4}$, além do valor tão baixo para PT_{NaOH} pode ser possivelmente explicada pelo elevado teor de sólidos.

De acordo com literatura, a principal vantagem do emprego de altos teores de sólidos na etapa de hidrólise enzimática é a possibilidade de obtenção de elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, podendo assim alcançar títulos de etanol compatíveis com os custos de destilação (KRISTENSEN et al., 2009; MODENBACH; NOKES 2013). Então, mesmo com a pequena diferença no RHE, apresentada para alto teor de sólidos da hidrólise enzimática das PT_{H2SO4} e $PT_{NaOH+H2SO4}$, um maior teor de glicose foi liberada ao utilizar a $PT_{NaOH+H2SO4}$. Isso ressalta a importância do tratamento sequencial (álcali + ácido), uma vez que exibe uma maior concentração de glicose após a hidrólise enzimática, podendo ser utilizado para obter uma alta concentração de etanol,

Para a maioria das principais tecnologias de pré-tratamento, o teor de celulose nos substratos é relativamente baixo e/ou a hidrólise enzimática apresenta baixos rendimentos de hidrólise, impossibilitando a obtenção de etanol em concentrações maiores que 40 g/L (CARDONA et al., 2015).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, a batelada alimentada (BA16+4+4) utilizando a palha de arroz tratada com álcali + ácido foi selecionada, e empregada nos estudos posteriores.

5.3.1 Balanço de massa

Após obtenção dos monômeros de glicose e xilose nos hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos, respectivamente, foi feito um balanço de massa sob as condições otimizadas para os pré-tratamentos, álcali + ácido (**Figura 42**), e após uma única etapa de tratamento alcalino ou ácido (**Figura 43**), seguidos pela hidrólise enzimática. O objetivo desta etapa é melhor avaliar o processamento da palha de arroz, apenas comparando os tratamentos neste trabalho, dessa forma, foram consideradas todas as recuperações mássicas e líquidas, mesmo sabendo que as operações unitárias de separação sólido/líquido em escala laboratorial não foram otimizadas. Além disso, foi considerado uma massa inicial da palha *in natura* de 100 g.

Conforme pode ser calculado, a partir da **Figura 42** para o tratamento sequencial (álcali + ácido), a eficiência de recuperação da hemicelulose no hidrolisado hemicelulósico (HH) foi 10 vezes maior do que na celulignina. Um comportamento contrário e de mesma magnitude (~10 vezes) foi observado pra celulose, que apresentou uma maior recuperação no hidrolisado celulósico (HC), mostrando uma grande separação das frações açucaradas quando o tratamento sequencial é empregado.

Avaliando apenas o tratamento ácido da palha de arroz *in natura* (**Figura 43**), verifica-se que apesar de apresentar um alto valor de recuperação de hemicelulose no HH, 23 vezes maior do que na celulignina, nota-se que, para a celulose, a diferença foi de apenas 3 vezes maior no HC. Mostrando que em relação ao fracionamento da celulose e hemicelulose o tratamento sequencial foi mais efetivo.

Em relação ao tratamento alcalino, ainda na **Figura 43**, nota-se que apesar das mudanças químicas que favorecem a hidrólise enzimática, este tratamento não foi eficiente na recuperação de açúcares no hidrolisado celulósico com altos teores de sólidos.

Com os dados de recuperação de cada fração açucarada em relação a palha *in natura*, foram compilados na **Tabela 16**, permitindo a comparação entre os tratamentos.

Nota-se que o tratamento que recuperou maior fração celulose foi o sequencial, que foi o duas e cinco vezes maior que apenas o tratamento acido e alcalino, respectivamente. Avaliando a recuperação da hemicelulose, o tratamento ácido apresentou maior recuperação total dessa fração, mas apenas 17% maior quando comparado ao tratamento sequencial.

Tabela 16 - Eficiência de recuperação em cada fração obtida em cada tratamento.

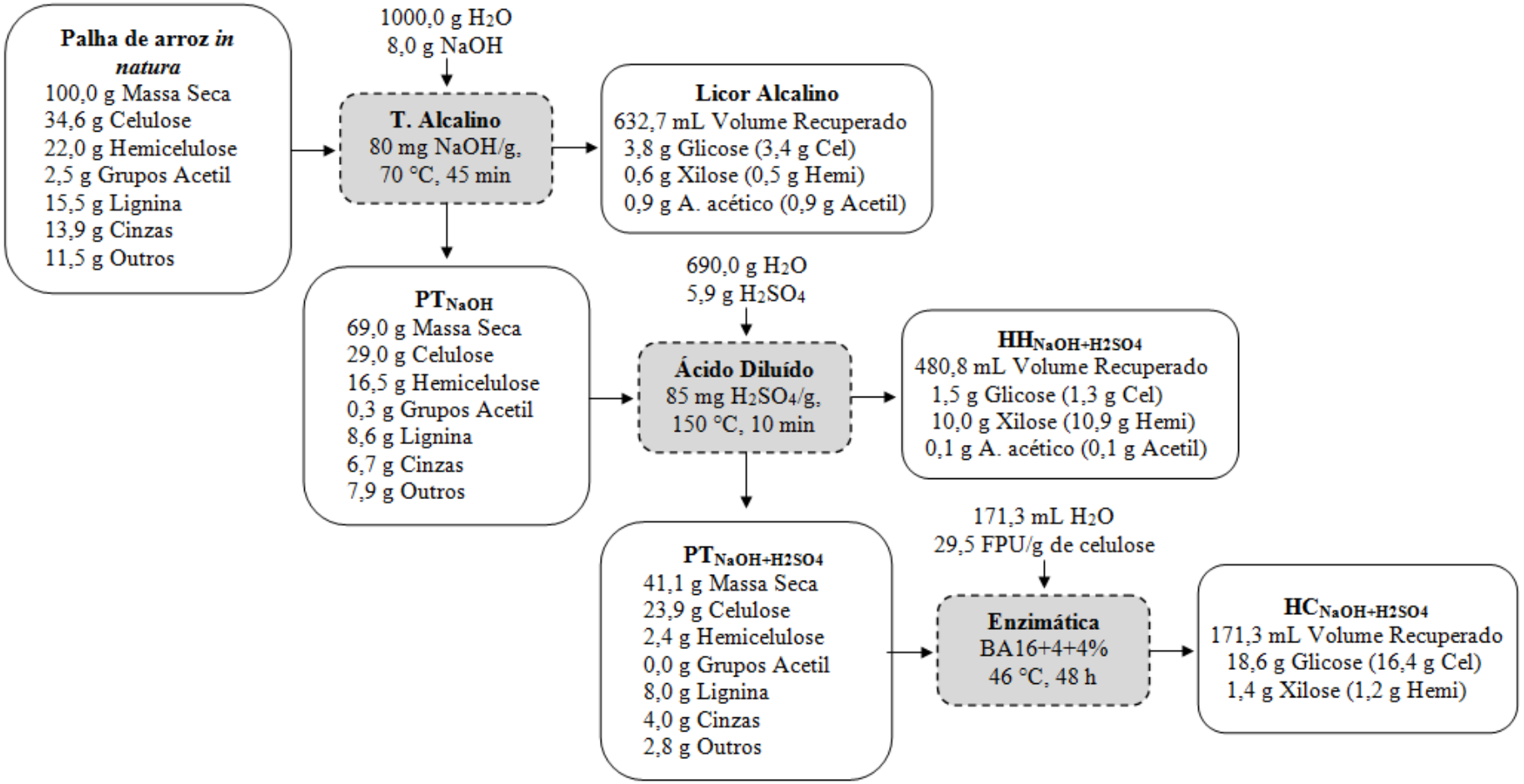
REC (%)	Tratamento Alcalino			Tratamento Ácido			Tratamento Sequencial			
	Licor	**HC**	**Total**	**HH**	**HC**	**Total**	**Licor**	**HH**	**HC**	**Total**
Cel	11	-	11	7	23	30	11	4	47	61
Hemi	2	-	2	64	3	67	2	50	5	57
Acetil	36	-	36	40	-	40	36	4	-	40

REC = recuperação; Cel = celulose; Hemi = hemicelulose; Acetil = grupos acetil; Licor = licor alcalino; HC = hidrolisado celulósico obtido após hidrólise enzimática; HH = hidrolisado hemicelúlósico.
Fonte: Arquivo Pessoal.

Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que a sequência de tratamento proposta no presente trabalho proporcionou um efetivo fracionamento da palha de arroz em duas correntes separadas de carboidratos, hidrolisado hemicelulósico rico em xilose e hidrolisado celulósico rico em glicose, permitindo assim o uso destas correntes para a produção de etanol com vantagens adicionais, como a redução da toxicidade da fração de hidrolisado hemicelulósico, uma vez que grande parte do acetato (potencial inibidor microbiano) foi solubilizado no licor alcalino.

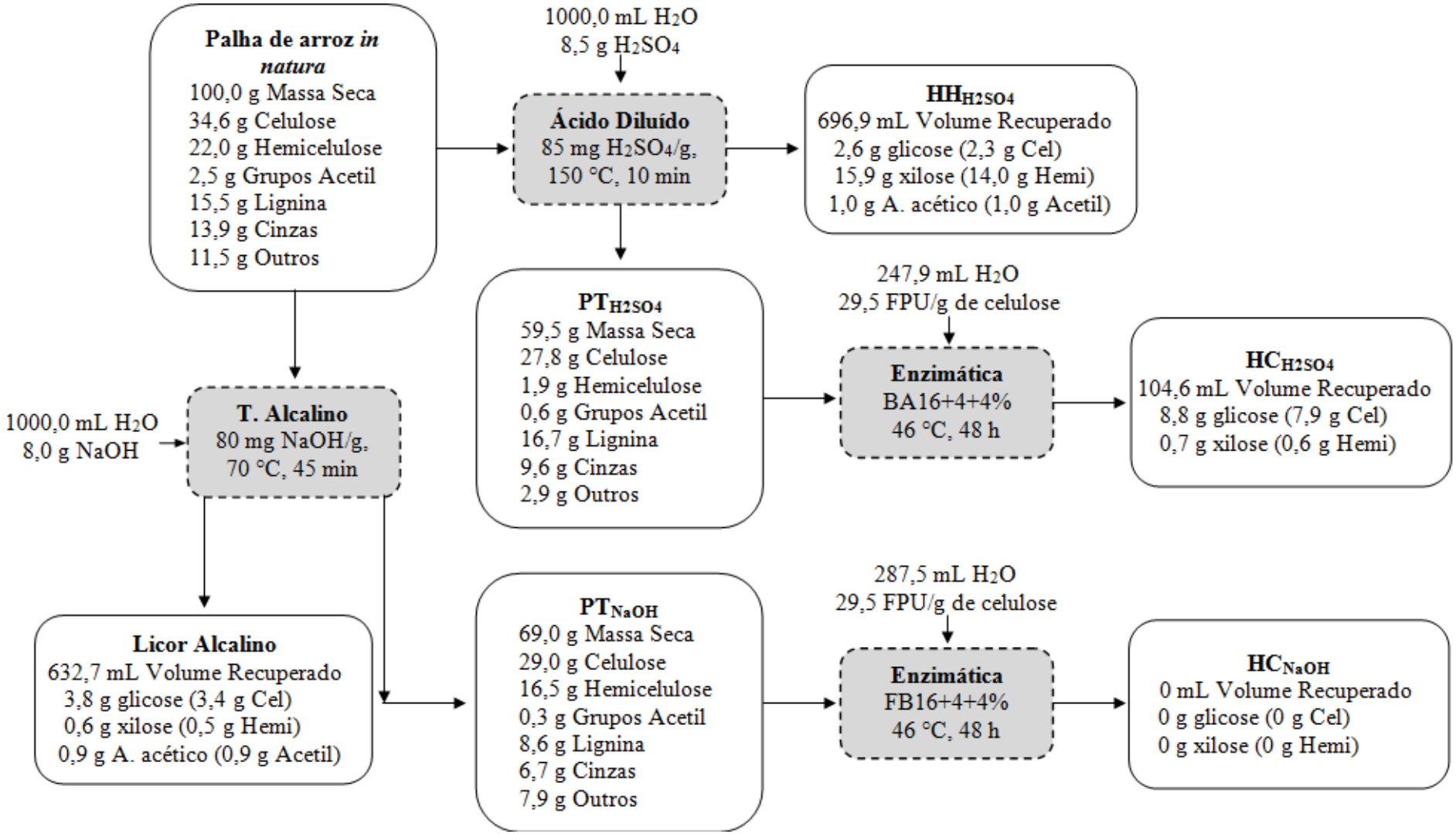
Com o aumento da produção de etanol por via bioquímica a partir de matérias-primas lignocelulósicas, é interessante encontrar um destino para este resíduo rico em acetato e lignina, corroborando assim, com o conceito atual de biorrefinarias integradas (NREL, 2009). Por exemplo, a lignina presente neste licor pode ser recuperada e empregada como uma fonte natural de antioxidantes, tendo grande potencial na produção de compostos de alto valor agregado nos campos químico, alimentar, farmacêutico, têxtil e cosmético (CASTRO, 2016; MUSSATTO, DRAGONE, ROBERTO, 2007).

Figura 42 - Diagrama do balanço de massa para as condições otimizadas do processamento sequencial (álcali + ácido) da palha de arroz.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 43 - Diagrama do balanço de massa na condição otimizada do processamento da palha de arroz, que passou apenas por uma etapa.



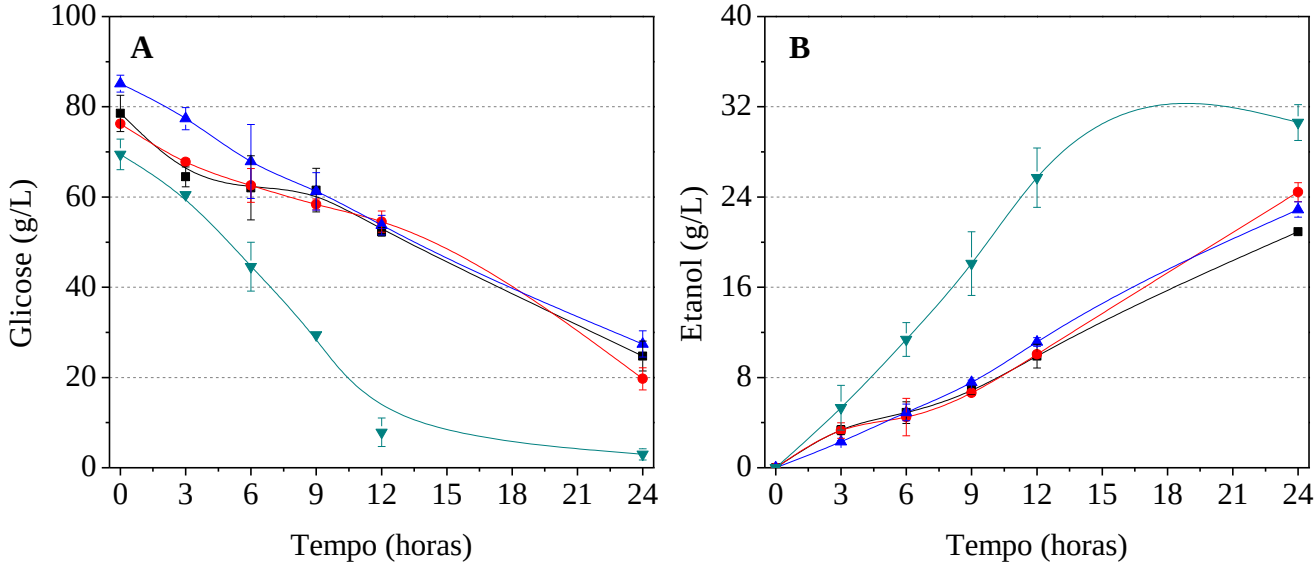
Fonte: Arquivo Pessoal..

5.4 Fermentação do hidrolisado celulósico

Nesta etapa, foram utilizados, como substrato da fermentação, os hidrolisados celulósicos obtidos por batelada simples (HCBS) e batelada alimentada (HCBA) em reator MBV, ambos processados com 24% m/v da $PT_{NaOH+H2SO4}$. Inicialmente, foram realizados ensaios com o hidrolisado celulósico da batelada simples para avaliação da necessidade de centrifugação dos sólidos residuais, assim como sua suplementação nutricional. Para isto, foram preparados dois tipos de meios de fermentação: 1) *Slurry* celulósico (SC) composto pela mistura (líquido e sólido residual); e 2) Hidrolisado celulósico (HC) composto apenas pela fração líquida. Para o estudo nutricional, os meios foram fermentados na presença ou ausência dos seguintes componentes, em g/L: 1,0 de $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 de KH_2PO_4, 0,1 de $MgSO_4.7H_2O$ e 3,0 de extrato de levedura. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer na temperatura de 43 °C, sob agitação de 100 rpm com a levedura *Kluyveromyces marxianus* Y - 6860.

A **Figura 44** apresenta o perfil de consumo de glicose e produção de etanol da fermentação por *K. marxianus* empregando os meios SC e HC na presença e ausência de nutrientes.

Figura 44 - Consumo de glicose (**A**) e formação de etanol (**B**) por *K. marxianus* empregando o s*lurry* celulósico (SC) sem nutriente (■) e com nutriente (●) e o hidrolisado celulósico (HC) sem nutriente (▲) e com nutriente (▼) obtidos a partir da hidrólise enzimática com 24% m/v da palha de arroz pre-tratada.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Conforme pode ser visto na **Figura 44 A**, a levedura foi capaz de utilizar a glicose em todos os meios avaliados, porém o consumo quase que total desta hexose foi observado apenas no HC com suplementação de nutrientes, após 18 h. Nos demais meios, os perfis de assimilação de glicose foram similares, sendo ainda constatado um residual de glicose (aproximadamente 30%), após 24 h. Com relação ao etanol (**Figura 44 B**), nota-se que a maior produção foi obtida no HC com suplementação nutricional atingindo um valor de 32,0 g/L, após 17 h. Nos demais meios, a concentração de etanol foi similar (cerca de 22 g/L), o que correspondeu a um decréscimo de 31% quando comparado ao HC com suplementação nutricional.

A partir destes resultados, foram calculados os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* nos diferentes meios avaliados, apresentados na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Parâmetros fermentativos da produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 nos diferentes meios avaliados.

Parâmetros	**Meios de Fermentação**			
	SC		**HC**	
	SN	**CN**	**SN**	**CN**
Etanol (g/L)	20,9	24,4	22,9	30,6
GC(%)	68,4	75,1	67,7	95,7
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,39	0,44	0,40	0,44
Q_P (g/L h)	0,87	1,02	0,95	2,04
η(%)	76,5	86,3	78,4	86,3

SC = *slurry* celulósico; HC = hidrolisado celulósico; SN (sem suplementação nutricional); CN (com suplementação nutricional), GC (glicose consumida), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de glicose em etanol), Q_P (produtividade volumétrica em etanol) e η (eficiência do bioprocesso).
Fonte: Arquivo Pessoal.

Analisando a **Tabela 17**, verifica-se que nas condições experimentais avaliadas a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foi o parâmetro que apresentou a maior variação (de 0,87 a 1,88 g/L.h), enquanto que o fator de conversão em etanol variou de 0,39 a 0,46 g/g. Nota-se ainda, que todos os parâmetros foram favorecidos, tanto na ausência de sólidos quanto com suplementação de nutrientes, indicando um efeito sinérgico destas variáveis, ou seja, os maiores valores foram observados no hidrolisado celulósico (ausente de sólidos) com suplementação nutricional. Estes resultados sugerem que: 1) o hidrolisado celulósico obtido nas condições deste estudo não apresenta uma constituição nutricional adequada para o bioprocesso, sendo, portanto, necessária a sua suplementação e 2) os

sólidos residuais da hidrólise enzimática afetam a transferência de massa do sistema, levando a uma menor eficiência do processo fermentativo.

Baseando-se nos resultados obtidos, foi então selecionado o meio a base de hidrolisado celulósico (ausência de sólidos) com suplementação de nutrientes para a condução dos ensaios de fermentação em reator do tipo Moinho de Bolas Vertical (MBV). As condições experimentais (40 °C e 200 rpm de agitação) foram selecionadas de acordo com os dados de Cunha et al. (2017). Todos os ensaios foram conduzidos com o hidrolisado celulósico obtido por batelada alimentada (HCBA) contendo 110 g/L de glicose, o qual foi suplementada com os mesmos nutrientes utilizados nos ensaios anteriores realizados em frascos. A concentração inicial de inóculo (*K. marxianus*) foi de 3,0 g/L. Para efeito de comparação, foram realizados ensaios adicionais, empregando um meio semidefinido composto por glicose e nutrientes.

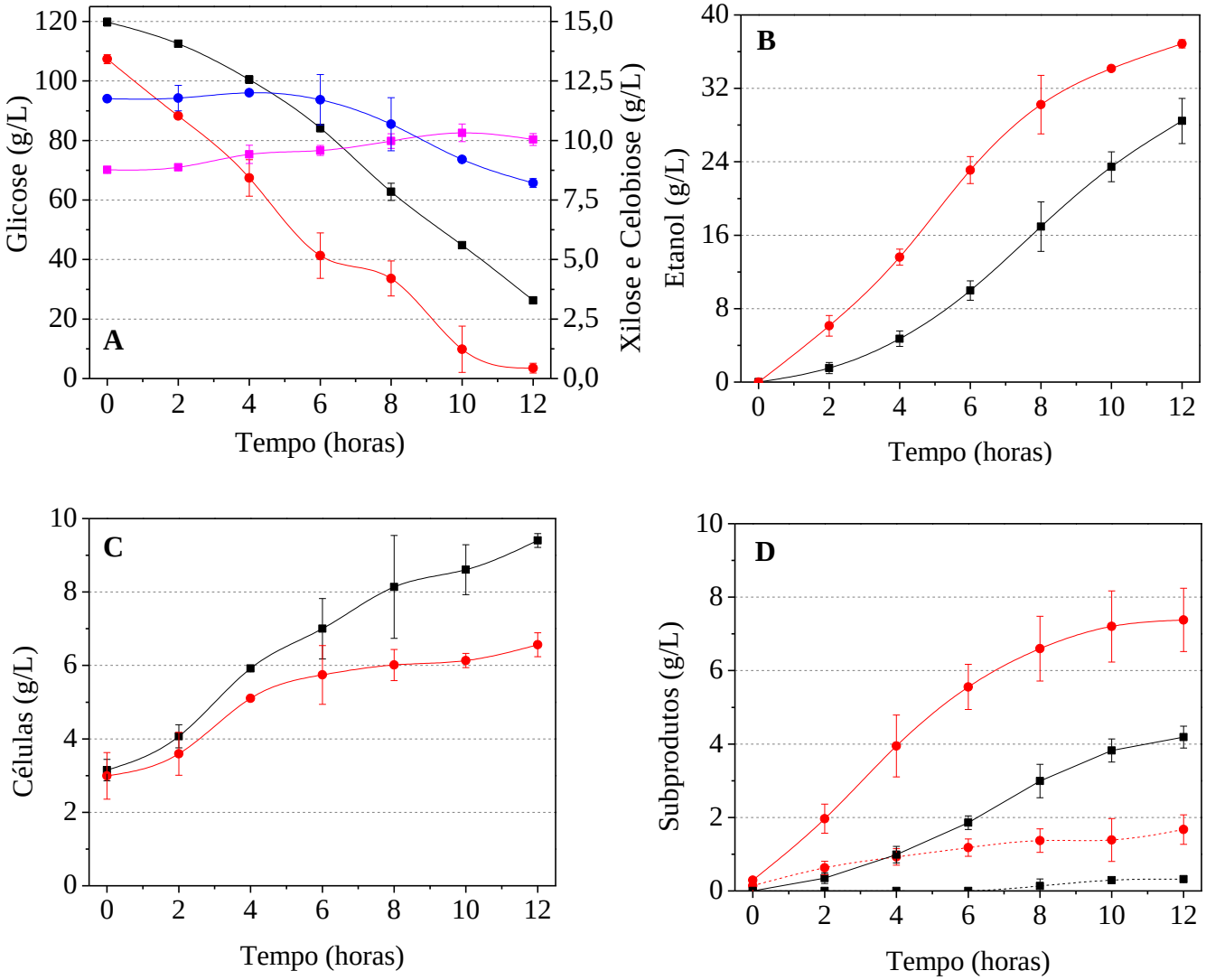
Os perfis de consumo de glicose celobiose e xilose, assim como de produção de etanol, ácido acético, glicerol, biomassa e variação do pH por *K. marxianus* estão apresentados na **Figura 45**. Como pode ser observado nessa figura, a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose no HCBA nas primeiras 12 h de fermentação, enquanto, no meio semidefinido, o consumo desta hexose foi incompleto, mostrando um residual de 22% neste mesmo tempo. Estes resultados podem ser explicados pela presença do extrato enzimático no hidrolisado celulósico, o qual representa uma fonte de nitrogênio adicional para células. O efeito positivo da presença de celulases no consumo de glicose foi observado por Szczodrak e Targonski (1987) ao utilizar a levedura *Fabospora fragilis* em meio semidefinido.

Nota-se ainda, na **Figura 45 A**, que o consumo de glicose, no HCBA, mostrou um perfil linear até 6 h com uma velocidade de 12 g/L.h e que entre 6 e 8 h, o consumo dessa hexose foi praticamente paralisado, momento no qual a levedura iniciou o consumo da celobiose. Após este período, verifica-se uma retomada no consumo de glicose (na mesma velocidade inicial), concomitante a assimilação da celobiose. Fonseca, Carvalho e Gombert (2013), avaliando o consumo de diferentes carboidratos (glicose, frutose, sacarose, lactose e galactose) por *K. marxianus*, observaram que esta levedura foi capaz de metabolizar todos os açúcares testados, sejam monômeros ou dímeros. Verificaram ainda que a levedura consome concomitantemente glicose e frutose, comportamento semelhante ao obsevado no presentes estudo, com glicose e celobiose.

Em relação à xilose no hidrolisado celulósico, nota-se que esta pentose não foi consumida pela levedura *K. marxianus* durante as 12 h de fermentação. De acordo com

Rouhollah et. al (2007) o consumo de xilose por *K. marxianus* ocorre apenas com o esgotamento da glicose. Como no presente estudo, a glicose acaba para o meio HC ao final do tempo de fermentação, não foi possível observar o consumo de xilose.

Figura 45 - Consumo de glicose, celobiose (■) e xilose (▶) (**A**), produção de etanol (**B**), crescimento celular (**C**), formação de ácido acético (linha sólida) e glicerol (linha tracejada) (**D**) por *Kluyveromyces marxianus* empregando hidrolisado celulósico de palha de arroz (●) e meio semidefinido (■).



Fonte: Arquivo Pessoal

Quanto à produção de etanol (**Figura 45 C**), nota-se, para ambos os meios avaliados, que o valor máximo foi atingido após 12 h e que a formação deste produto foi favorecida no meio a base de hidrolisado celulósico, apresentando uma produção 30% maior (36,8 g/L), quando comparado ao meio semidefinido (28,4 g/L). Já com relação à formação de células (**Figura 45 C**), verifica-se um comportamento diferente, uma vez que produção de

biomassa foi favorecida no meio semidefinido, com menor produção de etanol. Esses resultados revelam que o HC suplementado com nutrientes apresenta uma composição mais adequada ao metabolismo fermentativo de *K. marxianu,* quando comparado ao meio semidefinido. Isso reforça a importância da composição do meio para direcionamento do fluxo metabólico para produção de etanol. Vale ressaltar que as células se mantiveram viáveis durante todo processo fermentativo.

A **Figura 45 D** apresenta o perfil do ácido acético e glicerol, que são os principais subprodutos da fermentação. Nota-se que, no HC, o ácido acético foi produzido desde o inicio do processo, enquanto no MS a produção deste ácido foi iniciada somente após 6 h de fermentação. A maior concentração de ácido acético foi de 1,67 e 0,32 g/L no HC e no MS, respectivamente, após 12 h de fermentação.

Segundo Pentjuss et al. (2017) o acúmulo de acetato citoplasmático por *K. marxianus* ocorre quando há necessidade de NADH extra ou de acetil CoA citoplasmática, que esta relacionada com a produção de biomassa. Então a maior concentração de ácido acético obtida no HC, poderia explicar a menor concentração celular neste meio (**Figura 45 C**), causada pela falta de acetil CoA. Assim, a produção de ácido acético seria uma resposta metabólica de *K. marxianus* para atenuar esse problema.

Similar ao observado para o ácido acético, a produção de glicerol por *K. marxianus* foi superior em meio HC quando comparado ao MS. Observou-se, ao final de 12 h um aumento de 76% na concentração deste metabólito (**Figura 45 D**). De acordo com Pentjuss et al., (2017), o glicerol é um dos principais metabólitos secundários produzidos no metabolismo de *K. marxianus.* Uma de suas funções é manter equilibrada a oxidação do NADH citoplasmático, principalmente, quando há fornecimento limitado de oxigênio impossibilitando sua regeneração pela cadeia de transportadora de elétrons.

Dessa forma, pode-se inferir que a maior quantidade de glicerol excretada no meio HC está intimamente relacionada com a produção de ácido acético, devido à necessidade de manter o equilíbrio redox citoplasmático pelo excesso de NADH, produzido juntamente com o acetato. Isso corrobora o trabalho de Pentjuss et al. (2017), onde relatou que o ácido acético é produzido juntamente com NADH e que o acúmulo deste ácido pode gerar um desequilíbrio redox citoplasmático.

Na **Tabela 18** estão apresentados os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico de palha de arroz suplementado com nutrientes (HC) e meio semidefinido (MS). Pode-se observar que o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) apresentou pouca variação nos meios avaliados (0,30 e 0,34 g/g), no entanto, o fator

Tabela 18 - Parâmetros fermentativos da produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 nos diferentes meios avaliados.

Parâmetros	HC	MD
Tempo de fermentação (h)	12	12
Xilose inicial (g/L)	8,7±0,0	-
Xilose final (g/L)	10,0±0,2	-
Xilose consumida (%)	0	-
Celobiose inicial (g/L)	11,8±0,0	-
Celobiose final (g/L)	8,2±0,2	-
Celobiose consumida (%)	30,1±1,8	-
Glicose inicial (g/L)	107,4±1,5	119,8±1,4
Glicose final (g/L)	3,5±1,6	26,2±0,8
Glicose consumida (%)	96,7±1,5	78,1±0,9
Biomassa inicial (g/L)	3,0±0,6	3,1±0,3
Biomassa final (g/L)	6,6±0,3	9,4±0,2
Etanol final (g/L)	36,8±0,4	28,4±2,5
Ácido acético inicial (g/L)	0,0±0,0	0,0±0,0
Àcido acético final (g/L)	1,7±0,4	0,3±0,1
Glicerol inicial (g/L)	0,3±0,1	0,0±0,0
Glicerol final (g/L)	7,4±1,9	4,2±0,3
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,035±0,010	0,067±0,003
$Y_{X/S}^{*}$ (g/g)	0,033±0,009	0,067±0,003
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,35±0,02	0,30±0,03
$Y_{P/S}^{*}$ (g/g)	0,34±0,01	0,30±0,03
$Y_{P/X}$ (g/g)	10,69±2,75	4,58±0,74
Q_X (g/L,h)	0,30±0,08	0,52±0,04
Q_P (g/L h)	3,07±0,04	2,37±0,21
η (%)	69,61±2,96	59,69±6,52
η^{*} (%)	67,20±2,93	59,69±6,52

$Y_{X/S}$ (fator de conversão de glicose em células), $Y_{X/S}$ *(fator de conversão de glicose e celobiose em células), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de glicose em etanol), $Y_{P/S}$* (fator de conversão de glicose e celobiose em etanol), $Y_{P/X}$ (fator de conversão de substrato em etanol), Q_S (produtividade volumétrica em células) Q_P (produtividade volumétrica em etanol), η (eficiência do bioprocesso considerando consumo de glicose) e η* (eficiência do bioprocesso considerando consumo de glicose e celobiose).
Fonte: Arquivo Pessoal.

de conversão em células no meio semidefinido ($Y_{X/S}$ = 0,067 g/g) foi praticamente o dobro do observado no HC ($Y_{X/S}$ = 0,035 g/g), indicando que a produção de etanol por *K. marxianus* foi mais eficiente no HC, o que confirmado pelo maior valor de $Y_{P/X}$.

Nota-se ainda que a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), foi também favorecida no meio a base de hidrolisado celulósico sendo encontrado um valor de 3,07 g/L.h ao final da fermentação. Esses resultados demonstram que o hidrolisado celulósico de palha de arroz obtido no presente estudo apresenta características favoráveis para produção de etanol por *K. marxianus*. No entanto, estudos posteriores são ainda necessários para avaliar o efeito individual de cada nutriente sobre o bioprocesso, assim como seus níveis ótimos.

De uma forma geral, a produção de etanol celulósico utilizando a levedura *K. marxianus* tem sido focada no processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) sendo o processo de sacarificação e fermentação em separado (SHF) normalmente avaliado com *S. cerevisae*. Dessa forma, os resultados foram comparados com outros trabalhos com *S. cerevisae* em hidrolisado celulósico.

Dahnum et al (2015), po exemplo, avaliando a fermentabilidade do hidrolisado celulósico de resíduos de frutas (com glicose inicial de 107 g/L) por *S. cerevisae* comercial a 10 g/L, obtiveram uma eficiência do bioprocesso de 87%, e uma produtividade de 1,98 g/L.h. Utilizando hidrolisado celulósico de bagaço de cana contendo 117,2 g/L de glicose, Suttiku et al (2016) avaliaram a fermentação de *S. cerevisiae* TISTR 5596 e obtiveram 48,2 g/L de etanol, com uma eficiência de 99%,. No entanto, a produtividade foi de 0,5 g/L.h. Rana et al (2014), a partir de hidrolisado celulósico de resíduos da plantação de milho (contendo 128 g/L glicose), realizaram ensaios fermentativos contendo 2 g/L de *S. cerevisae* comercial e obtiveram 26,83 g/L de etanol e uma produtividade de 0,28 g/L.h com uma eficiencia de 63%.

A **Tabela 19** mostra os parâmtros fermentativos da produção de etanol a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas empregando diferentes configurações de processo para produção de etanol.Verifica-se que a produtividade volumétrica em etanol obtida foi extremamente promissora, mesmo considerando a etapa de hidrólise enzimática no tempo de processamento quando comparada a SHF e ao SSF. Vale ressaltar que a menor eficiência do processo observada no presente trabalho (70%) sugere a necessidade de estudos adicionais, como otimização da suplementação nutricional, aeração, concentração de inóculo, pH inicial, entre outros.

Tabela 19 - Parâmetros fermentativos da produção de etanol a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas empregando diferentes configurações de processo para produção de etanol.

Micro-organismo	Materia Prima	Hidrólise enzimática	Fermentação	η (η^P) (%)	Q_P (Q_P^*) (g/L.h)	Referência
K. marxianus	Palha de arroz	BA16+4+4%	SHF	67 (52)	3,07 (0,61)	Presente Trabalho
S. cerevisiae	Polpa de mandioca	BA12+4+4%	SHF	86 (54)	0,75 (0,25)	Zhu et al. (2014)
			SSF	77	0,36	
S. cerevisiae	Bagaço de cana	BS20%	SHF	99 (58)	0,50 (0,19)	Suttikul et al. (2016)
			SSF	70	0,60	
S. cerevisiae	Palha de trigo	BS10%	SHF	81 (nc)	0,86 (0,22)	Alfani et al. (2000)
			SSF	68	0,75	
S. cerevisiae	Palha de milho	BS10%	SHF	89 (65)	0,28 (0,16)	Rana et al. (2014)
			SSF	69	0,30	
S. cerevisiae	Palha de trigo	BS10%	SHF	90 (68)	0,19 (0,09)	Tomás-Pejo et al. (2008)
			SSF	79	0,34	

η^P = eficiência de processo calculado pelo etanol produzido a partir do teor de celulose dos sólidos pré- tratados, ou seja, simulando o processo simultâneo (SSF); Q_P^* = produtividade considerando tempo:de hidrólise enzimática + tempo de fermentação; nc = não calculado
Fonte: Arquivo Pessoal.

.

5.5 Fermentação da fração hemicelulósica

Na etapa de tratamento ácido da palha de arroz (item 5.1.2.5) foi também recuperada a fração líquida (hemicelulose), composta majoritariamente por xilose, a qual pode ser eficientemente convertida em etanol. De acordo com Joelsson, 2016, dentro de um contexto de biorefinarias, o aproveitamento desta fração em processos de bioconversão é de fundamental importância para a viabilidade econômica do processo. Dessa forma, essa etapa teve como objetivo avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico empregando a levedura *S. stipitis*, a qual tem sido apontada como uma das mais promissoras para esta bioconversão, apresentando características únicas que permitem minimizar a produção de xilitol, favorecendo desta forma a produção de etanol (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

Para a realização destes ensaios, o hidrolisado original foi submetido a uma etapa de concentração para aumentar o teor de xilose em aproximadamente 3X (≅ 60 g/L). A composição química do hidrolisado hemicelulósico antes e após concentração está mostrada na **Tabela 20**. Pode-se observar, que após a concentração do hidrolisado o teor dos açúcares foi aumentado proporcionalmente ao fator de concentração utilizado (cerca de 3 vezes), mostrando que não houve degradação destes componentes durante esta etapa. Nota-se ainda que há uma baixa concentração dos produtos de degradação de açúcares e lignina (ambos < 1,0 g/L) na composição do hidrolisado hemicelulósico concentrado e, principalmente, a ausência de ácido acético, o que é vantajoso, uma vez que estes compostos podem afetar o metabolismo fermentativo de leveduras.

O ácido acético, por exemplo, tem sido apontado na literatura como um dos principais inibidores do processo fermentativo empregando a fração hemicelulósica. Bellido et al. (2011) constataram que o ácido acético mesmo em baixas concentrações (0,5 g/L) no meio fermentativo, contendo xilose como fonte de carbono, reduziu a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* em cerca de 20%.

A conversão de xilose em etanol é fortemente influenciada pelo meio fermentativo, como presença de inibidores, fatores ambientais e nutricionais, os quais impactam fortemente a produtividade dos processos de bioconversão. Dessa forma foi avaliado o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico sobre os parâmetros do processo.

Tabela 20 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico após o tratamento ácido, na condição otimizada em diferentes tempos.

Componentes	Composição do Hidrolisado Hemicelulósico (g/L)		FC
	Original	Concentrado	
Açúcares e ácido acético			
Glicose	3,1±0,2	10,4±0,3	3
Xilose	20,9±0,3	66,5±0,5	3
Arabinose	4,8±0,2	15,3±0,6	3
Ácido Acético	0,3±0,2	nd	↓
Produtos de degradação de açúcares			
HMF	0,196±0,002	0,068±0,005	↓
Ácido Furóico	0,285±0,047	0,582±0,018	2
Furfural	nd	nd	-
Produtos de degradação de lignina			
Pirocatecol	0,663±0,106	0,337±0,004	↓
Ácido Vanílico	0,014±0,002	0,044±0,005	3
Álcool vanilil	0,095±0,005	0,133±0,015	=
Vanilina	nd	nd	-
Ácido p-cumárico	0,003±0,001	0,013±0,004	4
Ácido ferúlico	0,016±0,002	0,012±0,002	=

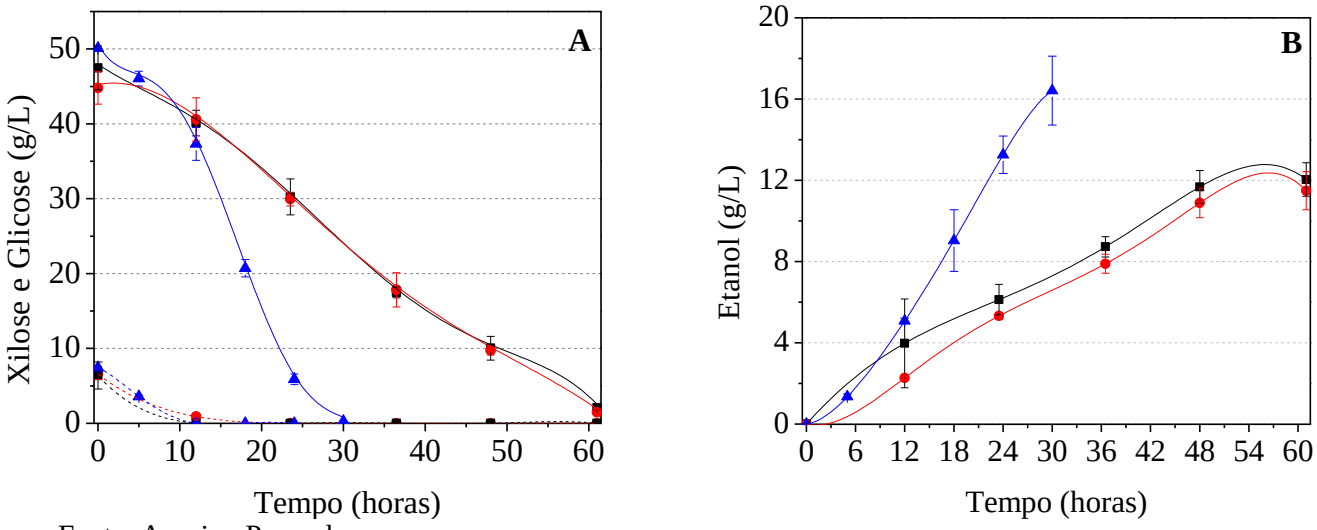
FC = fator de concentração; ↓ = diminuição da concentração; = = manteve a concentração original.
Fonte: Arquivo Pessoal.

A **Figura 46** mostra o perfil fermentativo *Scheffersomyces stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado com e sem suplementação nutricional. Para comparação foram também realizados ensaios em meio semidefinido.

Nota-se na **Figura 46 A** que a glicose foi totalmente consumida, após 12 h, independentemente dos meios avaliados, enquanto que a xilose mostrou uma assimilação mais lenta nos meios à base de hidrolisado hemicelulósico (60 h) do que em meio semidefinido (30 h). Com relação ao etanol (**Figura 46 B**), nota-se que concentração máxima deste produto coincidiu com o esgotamento da xilose nos meios avaliados, porém o valor obtido no hidrolisado hemicelulósico, independentemente da suplementação nutricional, foi cerca de 30% inferior ao observado no meio semidefinido (16,4 g/L). Estes resultados revelam que: 1) a suplementação nutricional ao hidrolisado hemicelulósico

obtido nas condições deste estudo é desnecessária, e 2) a composição química do hidrolisado afeta o desempenho fermentativo de *S. stipitis*.

Figura 46 - Consumo de glicose (linha tracejada) e xilose (linha sólida) (**A**) e produção de etanol (**B**) por *S. stipitis* empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz suplementado (■), não suplementado (●) e meio semidefinido (▲).



Fonte: Arquivo Pessoal.

O teor de etanol produzido no hidrolisado hemicelulósico (com ou sem suplementação nutricional) foi semelhante a obtida por Nigam (2001) também usando *S. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo destoxificado e com suplementação nutricional (xilose = 50 g/L e ácido acético = 8 g/L), obtido por hidrólise ácida.. No entanto, no hidrolisado sem destoxificação (6,9 g/L de ácido acético), a produção de etanol foi de apenas 1,8 g/L, mostrando que a composição do hidrolisado contém altas concentrações de ácido acético que inibem a produção por etanol, sendo necessário a destoxificação. Com isso demonstramos a importância do hidrolisado hemicelulósico obtido no presente trabalho, que mesmo sem nenhum tipo de tratamento de destoxificação e suplementação nutricional, possibilitou a fermentação por *S. stipitis*.

Cabe ressaltar que o crescimento celular não foi acompanhado devido a floculação das células durante a fermentação, e que a arabinose não foi assimilada durante as fermentações dos hidrolisados sem e com suplementação, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos, foram determinados os parâmetros fermentativos de *S. stipitis* nos diferentes meios avaliados, **Tabela 21**.

Pode-se notar que não houve diferença significativa no etanol produzido no hidrolisados hemicelulósicos com e sem suplementação nutricional, e ocorreu uma redução

de aproximadamente 30% ao comparar esses valores com meio semidefinido. A diferença se mostra mais acentuada ao avaliar a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) (~65%), devido à utilização mais lenta de xilose nos hidrolisados.

É possível observar também que o maior fator de conversão de substrato em etanol (~ 0,28 g/g) foi obtido no meio semidefinido. Ao comparar esse valor aos fatores de conversão obtidos nas fermentações dos hidrolisados houve uma redução de aproximadamente 18%. Nigam (2001) fermentando hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo detoxificado obteve menor valor de produtividade (0,17 g/L.h), mas apresentou maior $Y_{P/S}$ (0,36 g/g), pois mesmo apresentando a mesma quantidade de açúcar inicial, não houve total consumo.

Tabela 21 - Parâmetros fermentativos de *S. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (com e sem suplementação nutricional) e em meio semi sintético contendo xilose e glicose como fonte de carbono.

Parâmetros	HS	HnS	MD
Etanol produzido (g/L)	12,0±0,8	11,5±0,9	16,4±1,7
Tempo de fermentação (h)	61	61	30
Q_P (g/L h)	0,20±0,01	0,19±0,01	0,55±0,06
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,23±0,00	0,23±0,00	0,28±0,03
η(%)	45,2±0,1	45,4±0,2	55,9±5,6

*Calculados ao final do cultivo. HS (hidrolisado hemicelulósico suplementado nutricionalmente), HnS (hidrolisado hemicelulósico sem suplementação nutricional), MD (meio semidefinido), $Y_{P/S}$ (fator de conversão de substrato em etanol), Q_P (produtividade volumétrica em etanol) e η (eficiência do bioprocesso).
Fonte: Arquivo Pessoal.

Verifica-se que a suplementação nutricional não promoveu melhorias nos parâmetros do processo. Diferente do constatado por Silva (2007) que observou que a suplementação nutricional favoreceu a produção de etanol, melhorando a produtividade do etanol (0,24 g/L.h), comparáveis . A produção de etanol a partir de xilose depende de fatores nutricionais e do hidrolisado hemicelulósico obtido, no entanto, a necessidade de alguns nutrientes varia de acordo com o gênero, a espécie e até mesmo estirpe de Micro-organismos utilizados (PRIOR; KILIAN; PREEZ, 1989). Uma vez que foi avaliada a mesma estirpe que Silva (2007) (*Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124), os resultados desse estudo demonstraram que, a utilização do hidrolisado de hemicelulose de palha de arroz tratado com álcali e ácido, é vantajosa.

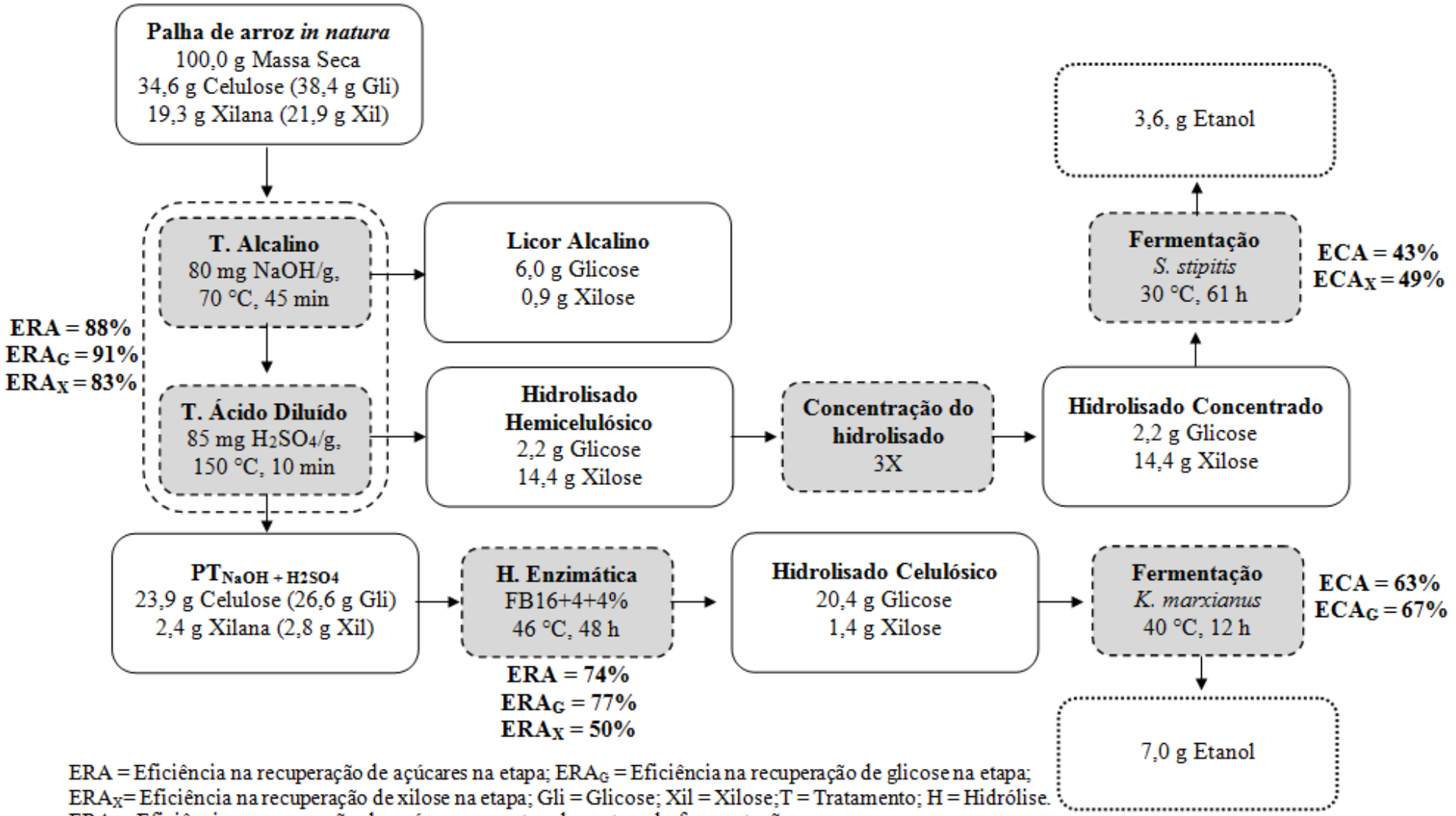
Os parâmetros fermentativos de *S. stipitis* nesses hidrolisados foram inferiores aos valores observados para o meio semidefinido. Diferenças importantes foram observadas nos fatores de conversão e produtividade volumétrica em etanol. Dessa forma, estudos adicionais são ainda necessários para melhorar a fermentabilidade destes hidrolisados por *Scheffersomyces stipitis*.

5.6 Análise do aproveitamento global da palha de arroz

A partir dos resultados obtidos em todas as etapas deste trabalho, foi realizado um balanço material para a avaliação do potencial da palha de arroz pré-tratada para a produção de etanol e para a determinação do rendimento em etanol a partir das frações açucaradas (celulose e hemicelulose). Este balanço (**Figura 47**) possibilitou uma avaliação de cada etapa calculando a eficiência de recuperação das frações açucaradas em cada processo. Para os cálculos foram considerados apenas as recuperações mássicas. Para as frações líquidas foram consideradas a quantidade total de líquido recuperado, uma vez que a operação unitária para separar a fração sólida da líquida em escala laboratorial não foi otimizada.

Em geral, nota-se que a xilana apresentou maior perda em todas as etapas quando comparada com a celulose. Verificou-se ainda que a etapa de pré-tratamento (álcali+ácido) obteve a maior recuperação de açúcares (88%) considerando todas as correntes do processo (licor alcalino, hidrolisado hemicelulósico e $PT_{NaOH+H2SO4}$). Estes dados de recuperação são superiores aos encontrados por Sun e Tao (2013) utilizando maiores concentrações de reagentes nos tratamento. Os autores empregaram o tratamento ácido (1,5% m/v de H_2SO_4 a 121 °C por 60 minutos) seguido do tratamento alcalino (12,5% NaOH, 121 °C por 30 minutos) para o processamento da palha de arroz e recuperaram 72% das frações açucardas. Estes resultados mostram a importância do pré-tratamento empregado no presente estudo, uma vez que permitui uma recuperação total de açúcares acima de 80%.

Figura 47 - Diagrama do balanço de massa em função dos açúcares monoméricos disponíveis em cada fração para as condições otimizadas do processamento da palha de arroz tratada com álcali e ácido até etanol.



ERA = Eficiência na recuperação de açúcares na etapa; ERA$_G$ = Eficiência na recuperação de glicose na etapa;
ERA$_X$= Eficiência na recuperação de xilose na etapa; Gli = Glicose; Xil = Xilose;T = Tratamento; H = Hidrólise.
ERA = Eficiência na conversão de açúcares em etanol na etapade fermentação

Ainda na **Figura 47**, nota-se que depois do pré-tratamento, a hidrólise enzimática foi a etapa de maior eficiência de recuperação de açúcares (74%). Este valor de eficiência pode ainda ser aumentado para 77% quando se avaliou apenas a recuperação de glicose.

Sanchez et al. (2015) empregando palha de trigo tratada com álcali seguido de ácido (380 mg de NaOH/g de biomassa por 60 minutos e 176 mg H_2SO_4/g de biomassa por 32,5 minutos, ambos a 121 °C, respectivamente) reportaram uma eficiência de recuperação de glicose na etapa de sacarificação de 61%, realizando a hidrólise enzimatica com um teor de sólidos de 4% m/v com uma carga enzimática de14 FPU/g de celulose a 50 °C por 48 h.

Em outro estudo a partir de palha de arroz tratada com amônia aquosa (21% NH3 a 69 °C por 10 h), Ko et al. (2009) obtiveram 72% de recuperação de glicose na hidrólise enzimática com um teor de sólidos de 26% m/v, carga enzimática de15 FPU/g de celulose a 50 °C por 72 h.

Yang et al. (2010), empregando resíduo da plantação de milho pré-tratado com ácido diluído (0,8% m/v 158 °C por 10 min) obtiveram uma eficiência de 60% de recuperação de glicose realizando a hidrólise enzimática em batelada alimentada com teor de sólidos total de 30% m/v, carga enzimática de 27 FPU/g de celulose a 50 °C por 140 h.

No que se se refere a fermentação (**Figura 47**), verifica-se que esta etapa de foi a que apresentou menor eficiência de processo, considerando a conversão teórica de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$ = 0,51 g/g). Ao comparar os resultados da produção de etanol nos diferentes hidrolisados (celulósico e hemicelulósico), nota-se que a fermentação de pentoses foi a que apresentou a menor eficiência (43%).

Com base na quantidade de xilana (19,3 g) e celulose (34,6 g) na palha *in natura* foi calculado o potencial teórico de etanol de 11,2 e 19,6 g, respectivamente, totalizando 30,8 g deste álcool.

Analisando a fermentação do hidrolisado hemicelulósico, que foi a única etapa que produziu etanol a partir de xilose (3,6 g de etanol), a eficiência total da xilana para produzir etanol foi de 32%. Em relação à fermentação do hidrolisado celulósico, a eficiência total da celulose foi de 36%. Sun e Tao (2013), empregando palha de arroz pré-tratada (ácido + alcalino) e hidrólise enzimática, reportaram valores de 42 e 48% de eficiência para ambas as frações açucaradas (hemicelulose e celulose, respectivamente) produzirem etanol. Um valor ainda maior de eficiência em relação à capacidade da fração celulósica em produzir etanol (77%) foi encontrado por Salehi et al. (2012) empregando palha de arroz tratada com carbonato de sódio e hidrolizada enzimaticamente. Destacando que no presente estudo, a eficiência de produção de etanol a partir das frações açucaradas apresentou um valor

inferior ao encontrado na literatura, o que sugere a necessidade de melhorias na etapa de fermentação, com vista a maior eficiência.

O processamento total mostrou que a partir de 100 g de palha de arroz são obtidas 10,6 g de etanol, o que corresponde a uma eficiência de 34%. Considerada a densidade do etanol igual a 0,789 g/mL, calcula-se que a partir de uma tonelada de palha de arroz pode-se obter 84 L de etanol. Resultado semelhante foi obtido pelo BNDS e CGEE (2008), que obteve 80 L de etanol a partir de uma tonelada de colmos de cana-de-açúcar.

Vale destacar que, o balanço de massa para produção de etanol a partir da palha de arroz é de extrema importância para uma avaliação econômica global do processo. Neste sentido, a **Tabela 22** apresenta alguns resultados da literatura científica considerando a produção de etanol a partir de hidrolisado celulósico de palha de arroz e a quantidade de etanol produzida a partir de 100 g desse material.

De uma forma geral, os resultados obtidos neste estudo, são bastante promissores e indicam a potencialidade do uso da palha de arroz como matéria-prima em biorefinarias.

Tabela 22 - Processamento da palha de arroz empregando diferentes configurações de processo.

Pré-tratamento	Hidrólise Enzimática	Fermentação de Hexose	Etanol Celulósico (g/100 g)	Referência
Alcalino + Ácido (80 mg NaOH/g biomassa, 70 °C, 45 min) (85 mg H_2SO_4/g biomassa, 150 °C, 10 min)	BA 16+4+4% 48 h, 46 °C 29,5 FPU g/celulose	*K. marxianus* Com nutrientes 12 h, 40 °C	7	Presente Trabalho
Ácido + Alcalino (150 mg H_2SO_4/g biomassa, 121 °C, 60 min) (160 mg NaOH/g biomassa, 121 °C, 12 h)	SSF 10% 43 FPU g/celulose	*S. cerevisiae* Com nutrientes 120 h, 40 °C	12,5	Sun e Tao (2013)
Carbonato de Sódio (1060 mg Na_2CO_3/g biomassa, 180 °C, 120 min)	SSF 5% 40 FPU g/celulose	*S. cerevisiae* Com nutrientes 72 h, 38 °C	17,5	Salehiet al. (2012)
Carbonato de Sódio (100 mg $C_4H_4O_4$/g biomassa, 190 °C, 3 min)	SSF 6% 15 FPU g/celulose	*S. cerevisiae* Com nutrientes 60 h, 38 °C	11,8	Jung, Park e Kim (2015)
Tratamento com amônia (1260 mg NH_3/g biomassa, 69 °C, 10h)	SSF 7% 15 FPU g/celulose	*S. cerevisiae* Com nutrientes 168 h, 38 °C	12,1	Ko et al. (2009)

Fonte: Arquivo Pessoal.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi desenvolvido um processo para produção de etanol a partir da palha de arroz, por sacarificação e fermentação em separado (SHF) empregando a levedura *K. marxianus*. Na etapa de pré-tratamento da biomassa, foram otimizadas as condições de temperatura, concentração ácida e tempo de reação, com vistas a uma maior recuperação da fração hemicelulósica e preservação da fração celulósica no sólido obtido. Em seguida, foi avaliado o emprego de altos teores de sólidos no processo de sacarificação enzimática da biomassa pré-tratada, em reator não-convencional, sendo selecionado o processo em batelada alimentada como a forma de condução mais adequada para produção do hidrolisado celulósico a partir de 24% m/v de sólidos. Por fim, avaliou-se a fermentabilidade do hidrolisado celulósico por *K. marxianus*, bem como do hidrolisado hemicelulósico por *S. stipitis*. Com estes resultados e a partir dos rendimentos obtidos em cada etapa do processamento da palha de arroz, foi desenvolvido um balanço de massa para produção de etanol. A partir do presente estudo, pode-se concluir que:

a) A utilização de altas temperaturas no processo de hidrólise ácida da palha de arroz previamente tratada com NaOH, permitiu reduzir tanto a carga ácida quanto o tempo de residência da reação. Os melhores resultados foram obtidos quando o processo foi conduzido a uma temperatura de 150ºC por 10 minutos, 85 mg de H_2SO_4/g de material e relação sólido:líquido de 1:10 g:g. Nestas condições, o rendimento de hidrólise da hemicelulose atingiu 94%.

b) A eficiência de solubilização da hemicelulose não foi influenciada pelo prévio tratamento alcalino da palha de arroz, porém, a sequência de tratamento (álcali + ácido) permitiu a obtenção de uma fração sólida (celulignina) e de uma corrente líquida (hidrolisado hemicelulósico) com características químicas mais favoráveis ao processo de sacarificação enzimática e fermentação, respectivamente. Especificamente, a palha pré-tratada apresentou maior teor de celulose e menor de lignina e cinzas (58, 19 e 10% m/m, respectivamente) quando comparado a palha tratada apenas com ácido (47, 28 e 16% m/m), o que contribui para redução da recalcitrância da biomassa. Da mesma forma, o hidrolisado hemicelulósico apresentou uma composição com menor concentração de compostos tóxicos ao metabolismos microbiano, o que favorece o processo fermentativo

c) A configuração do reator MBV se mostrou adequada ao processo de sacarificação da palha pre-tratada, por batelada simples, empregando altos teores de sólidos (> 16 m/v). Porém, o aumento da carga de sólidos, de 16 para 24% m/v, reduziu em 10% o rendimento de hidrólise enzimática (RHE).

d) Nas condições padronizadas de sacarificação (29,5 FPU/g, 100 rpm, 46ºC), o maior rendimento de hidrólise enzimática (RHE), em batelada simples, foi de 80%, após 36 h, com 16% de sólidos. Porém, a condução do processo em batelada alimentada foi capaz de contornar os problemas de mistura causados pelo efeito dos sólidos, o que possibilitou atingir um valor de RHE de 78% a partir de 24% m/v de substrato.

e) A fermentabilidade do hidrolisado celulósico por *K marxianus* foi influenciada tanto pela presença dos sólidos residuais no meio, assim como pela suplementação nutricional. Os melhores resultados de produção de etanol foram observados em hidrolisado celulósico ausente de sólidos e com suplementação de nutrientes. Nestas condições, a concentração de etanol atingiu 32 g/L, a partir de 110 g/L de glicose, o que correspondeu a uma eficiência de 67% e produtividade volumétrica de 3,1 g/L.h.

f) A fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico por *S stipitis* não foi influenciada pela adição de nutrientes. A concentração de etanol atingiu 12 g/L, a partir de 50 g/L de xilose, o que correspondeu a uma eficiência de 45% e produtividade volumétrica de 0,2 g/L.h.

g) Com base nos rendimentos de cada etapa do processamento da palha de arroz, foi desenvolvido um balanço de massa para produção de etanol por *K. marxianus* a partir da fração celulósica (C6) e por *S. stipitis* a partir da fração hemicelulósica (C5), sendo calculado uma produção total de 10,6 g de etanol a partir de 100 g de palha de arroz.

h) De uma forma geral, os resultados obtidos neste estudo, são bastante promissores e indicam a potencialidade do uso da palha de arroz como matéria-prima em biorefinarias. Além disso, a alta produtividade volumétrica em etanol obtida por *K. marxianus*, é uma vantagem adicional para a viabilização do processo de etanol celulósico.

REFERÊNCIAS

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia stipitis. **Biotechnology Letters,** v. 30, n. 9, p. 1515-1524, Sep 2008.

AGBOGBO, F.K.; WENGER, Æ.K.S. Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by Pichia stipitis. **Biotechnology letters**, v. 28(24), p. 2065–2069, 2006.

ALRIKSON,B.; HORVÁH, I.S.;SJÖEDE, A.; NILVEBRANT, N.O.; JÖNSSON; L.J. Ammonium hydroxide detoxification of spruce acid hydrolysates. **Appl. Biochem Bitechnol**, v.121-124, p. 911-922, 2005.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, p. 3, jan. 2011.

ARSLAN, Y.; EKEN-SARAÇOĜLU, N. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with Pichia Stipitis to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8664–8670, 2010.

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, fev. 2011.

BELLAVER, L.H.; CARVALHO, N.M.de; ABRAHAO-NETO, J.; GOMBERT A.K. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6- phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. **FEMS Yeast Res**, v. 4, p. 691–698, 2004.

BELLIDO, C. et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by Pichia stipitis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868–10874, 2011.

BERGKAMP, R.J.; BOOTSMAN, T.C. TOSCHKA, H.Y.; MOOREN, A.T. KOX, L.; VERBAKEL, J.M.; GEERSE, R.H., PLANTA, R.J. Expression of an alpha-galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in Kluyveromyces marxianus. ***Appl Microbiol Biotechnol*** , v. 40, n. 2-3, p. 309, 1993.

BERGKAMP, R.J.; GEERSE, R.H.; VERBAKEL, J.M.; PLANTA, R.J. Cloning and sequencing of the URA3 gene of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Yeast**, v. 9, p. 677–681, 1993.

BEZERRA, R.M.F.; DIAS, A.A: Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis – Inhibition by ethanol and cellobiose. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 126, p. 49-59, 2005.

BIN, Y., HONGZHANG, C., Effect of the ash on enzymatic hydrolysis of steam-exploded rice straw**. Biosource Technology**, v. 101, n 23, p. 9114-9119, 2010.

BINOD, P. et al., Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, Jul 2010.

BNDS e CGEE - Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. **Bioetanol de Cana de Açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável.** Rio de Janeiro: BNDES, 316 p, Nov. 2008.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.R.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **J Ind Microbiol Biotechnol,** v. 38, p. 1467–1475, 2011.

CARA, C.; MOYA, M.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry,** v. 42, Issue 6, p. 1003-1009, June 2007.

CARDONA, M.J.; TOZZI, E.J.; KARUNA, N.; JEOH, T.; POWELL, R.L.; MCCARTHY, M.J. A process for energy-efficient high-solids fed-batch enzymaticliquefaction of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 488–496, 2015.

CASTRO, R.C.A. et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 65 – 73, nov 2017. Doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.053.

CASTRO, R.C.A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CASTRO, R.C.A. **Produção de etanol a partir da palha de arroz por sacarificação e fermentação simultânea empregando um reator agitado não convencional**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

CASTRO, R.C.A.; ROBERTO, I.N. Selection of a Thermotolerant Kluyveromyces marxianus Strain with Potential Application for Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation, **App Biochem Biotechnol**, v. 172, p.1553-64, 2014.

CASTRO, R.A.; MUSSATTO, S.; ROBERTO, I.C. A vertical ball mill as a new reactor design for biomass hydrolysis and fermentation process. **Renewable Energy,** v. 114, p.775-780, July 2017.

CHANDRA, R. P., AU-YEUNG, K.; CHANIS, C.; ROOS, A.A.; MABEE, W.; CHUNG, P.A.; GHATORA, S.; SADDLER, J.N. The Influence of Pretreatment and Enzyme Loading on the Effectiveness of Batch and Fed-Batch Hydrolysis of Corn Stover. **Biotechnology Prog**., v. 27, n. 1, p. 77-85, 2011

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus Penicillium. **Journal of Biotechnology,** v. 123, n.4, p. 413-433, 2006.

CHEN, W.-H.; PEN, B.-L.; YU, C.-T.; HWANG, W.-S. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology,** v.102, p. 2916–2924, 2011.

CHEN, X., SHEKIRO, J., FRANDEN, M.A., WANG, W., ZHANG, M., KUHN, E., JOHSON, D., TUCKER, P.M. The Impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for Biofuels,** v.5, p° 8, 2012 a.

CHEN, X.; SHEKIRO, J.; ELANDER, R.; TUCKER, M. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** v. 51, p. 70-76, 2012 b.

CHEN, X.; TAO, L, SHEKIRO, J.; MOHAGHAGHI, A.; DECKER, S., WANG, W., SMITH, H., PARK, S.; HIMMEL, M.; TUCKER, M. Improved ethanol yield and reduced Minimum Ethanol Selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental **Biotechnology for Biofuels**, v.5, n° 60, 2012 c.

CHENG, K.K.; GE, J.P.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; YANG, M.D.; XU, J.M. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1051–1055, 2007.

CHENG, Y.-S.; ZHENG, Y.; YU, C.W.; DOOLEY, T.M.; JENKINS, B.M.; VANDERGHEYNSI, J.S. Evalution of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1758-1784, 2010.

CHOU, C.S.; LIN, S.H.; LU, W.C. Preparation and characterization of solid biomass fuel made from rice straw and rice bran, **Fuel Processing and Technology**, v. 90, p. 980-987, 2009.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTACIMENTO – CONAB. Relatório técnico: **Levantamento de safra**. Disponível em: http://www.conab.gov.br. Acesso em: 15 jan. 2018.

COUGHLAN, M.P., LJUNGDAHL, L.G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**, v. 11, p. 30, 1988.

CRUZGUERRERO, A., GARCIAPENA, I., BARZANA, E., GARCIAGARIBAY, M., GOMEZRUIZ, L. *Kluyveromyces marxianus* cdbb-l-278- a wild inulinase hyperproducing strain. **J. Ferment. Bioeng**, v. 80, p. 159–163, 1995.

DAHNUMA, D.; TASUMB, S.O.; TRIWAHYUNIA, E.; NURDINB, M.; ABIMANYUA, H. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. **Energy Procedia**, v. 68, p. 107 – 116, 2015.

DOSSOU-YOVO, E. R.; BRÜGGEMANN, N.; JESSE, N.; HUAT, J.; EVARISTE, E.; KOSSI, E. Reducing soil CO_2 emission and improving upland rice yield with no-tillage , straw mulch and nitrogen fertilization in northern Benin. **Soil & Tillage Research**, v. 156, p. 44–53, 2016.

DUNLAP, P. V. et al. **Microbiologia de Brock**. 12ª. ed., São Paulo, Artmed, p. 1160, 2010

EBRINGEROVA, A. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. **Macromol. Symp**, v. 232, p. 1–12, 2006.

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1 Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromol. Rapid Commun**, v. 21, p. 542–556, 2000.

FABRE, C.E.; BLANC, P.J.; GOMA, G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 1207-1212, 1995.

FELBY, C; THYGEEN, L.G.; KRISTENSEN, J.B.; JORGENSEN, H. ELDER, T. Cellulose-water interactions during enzymatic hydrolusis as studied by time domain NMR. **Cellulose**, v.15, p. 703-710, 2008.

FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood: chemistry**, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, p. 610, 1989.

FERREIRA, I.S. **Estudo da produção de etanol a partir de glucose empregando a levedura termotolerante Kluyveromyces marxianus NRRL Y-6860**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

FLYNN, S.G.O.; MARCHANT, C.J.H.R. Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast , *Kluyveromyces marxianus* IMB3 : simplex optimization of media supplements. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 46, p. 187-190, 1996.

FONSECA, B.G.; PUENTES, J.G.; MATEO, S.; SÁNCHEZ, S.; ALBERTO J.; MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C. Detoxification of Rice Straw and Olive Tree Pruning Hemicellulosic Hydrolysates Employing Saccharomyces cerevisiae and Its Effect on the Ethanol Production by Pichia stipites. **J. Agric. Food Chem**, v. 61, p. 9658−9665, 2013.

FONSECA, G.G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-54, jun. 2008.

FONSECA, G.G.; CARVALHO, N.M.B. de; GOMBERT, A.K. Growth of the yeast Kluyveromyces marxianus CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source **Appl Microbiol Biotechnol,** v. 97, p. 5055–5067, 2013.

FRENCH, A.D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 21, p. 885–896, 2014.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv Biochem Eng Biotechnol,** v. 108, p. 41-65, 2007.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

GÍRIO, F. M. *et al.*, Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-800, jul. 2010.

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

GROENEVELD, P.; STOUTHAMER, A.H.; WESTERHOFF, H.V. Super life – how and why " cell selection " leads to the fastest-growing eukaryote. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 254-270, 2009.

GUO, G.-L.; CHEN, W.-H.; CHEN, W.-H.; MEN, L.-C.; HWANG, W.-S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology,** v.99, p. 6046–6053, 2008.

GUPTA, R.; KUMAR, S.; GOMES, J.; KUHAD, R.C. Kinetic study of batch and fed-batch enzymatic saccharification of pretreated substrate and subsequent fermentation to ethanol. **Biotechnol Biofuels**, v. 20, p. 5:16, 2012.

HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E.; HANG, L.E. Utilization of corn silage juice by *Klyuveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol.**, v. 86, p. 305–307. 2003.

HERNÁNDEZ, E. et al. Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of Moringa oleifera empty pods. **Industrial Crops & Products**, v. 44, p. 227–231, 2013.

HIDENO, A.; KAWASHIMA, A.; ENDO, T.; HONDA, K.; MORITA, M. Ethanol-based organosolv treatment with trace hydrochloric acid improves the enzymatic digestibility of Japanese cypress (Chamaecyparis obtusa) by exposing nanofibers on the surface. **Bioresource Technology**. v.132, p. 64-70, 2013.

HODGE, D.B.; KARIM, M.N.; SCHELL, D.J. Model-Based Fed-Batch for High-Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 152, p. 88. 07, 2009.

HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H.; Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. **J. Biotechnol**., v. 130, p. 114–123, 2007.

HORN, S. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HSU, T. C. et al., Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4907-13, jul. 2010.

HUANG, Z.; YIN, Q.; WANG, Q.; WANG, P.; LIU, T.; QIAN, L. Mechanical properties and crystallization behavior of three kinds of straws/nylon 6 composites. **Int J Biol Macromol**, v. 103, p. 663-668, Oct. 2017.

HOUSTON, D.F. **Rice: Chemistry and Technology**. 3 ed,.St. Paul,MN, AACC, 1972.

JOELSSON, E. et al. Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1, 2016.

JØRGENSEN, H.; VIBE-PEDERSEN, J.; LARSEN, J.; FELBY, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnol. Bioeng**,v. 96, p. 862– 870, 2007.

KADAR, Z.; SZENGYEL, Z.; RECZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Ind. Crops Prod**., v. 20, p. 103–110. 2004.

KANG, S.; WANAPAT, M. Effect of protein level and urea in concentrate mixture on feed intake and rumen fermentation in swamp buffaloes fed rice straw-based diet. **Trop Anim Health Prod.,** v. 47, p. 671–679, 2015.

KAPOOR, M.; SOAM, S.; AGRAWAL, R.; GUPTA, R.P.; TULI, D.K.; KUMAR, R. Pilot scale dilute acid pretreatment of rice straw and fermentable sugar recovery at high solid loadings, **Bioresource Technology**, v. 224, p. 688-693, jan. 2016.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M.J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 247–253, 2006.

KIM, S.; DALE, B.E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361-375, abr. 2004.

KO, J.K.; BAK, J.S.; JUNG, M.W.; LEE, H.J.;CHOI, I.-G.; KIM, T.H. Ethanol production from ice straw using optimized aqueous- amnonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. **Bioresource Technology**, v. 100, 4374-4380, 2009.

KOURKOUTAS, Y.; PSARIANOS, C.; KOTINAS, A.A.; KANELLAKI, M.; BANAT, I.M.; MARCHANT, T. Continuos whey fermentation using kefir yeast immobilized on delignified cellulosic material. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(9), 2543-2547, 2002.

KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in highsolids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 11, p. 10, 2009.

KUMAR, S. et al. Kinetic studies of ethanol fermentation using Kluyveromyces sp . IIPE453: Kinetic studies of ethanol fermentation. **Journal of Chemical Technology& Biotechnology**, v. 88, p. 1874-1884, 2013.

KURTZMAN, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces , Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae* , and the proposal of the new genera *Lachancea , Nakaseomyces , Naumovia , Vanderwaltozyma* and *Zygotorulaspora*. **FEMS Yeast**, v. 4, p. 233-245, 2003.

LACHANCE, M.A. Descriptions of teleomorphic ascomycetous genera and species. **Kluyveromyces van der Walt emend, van der Walt**, v. 1, p. 236-238. 1998.

LANE, M.M.; MORRISSEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17-26, fev. 2010.

LASZLO, A. Evidence for two states of thermotolerance in mammalian cells. **Int. J. Hyperther**., v. 4, n. 5, p. 513-526, 1988.

LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered athenologenic *Escherichia coli.* **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 39, p. 301-322, 1993.

LEE, C.; ZHENG, Y.; VANDERGHEYNST, J.S. Effects of pretreatment conditions and post–pretreatment washing on ethanol production from dilute acid pretreated rice straw. **Biosystems Engineering**, v. 137, p. 36–42, 2015.

LEE, D; OWENS, V.N.; BOE, A.; JERANYAMA, P. Composition of herbaceous biomass feedstocks. **South Dakota State University Publication,** SGINC1-07, Brookings, SD; June 2007.

LEE, J.M.; VENDITTI, R.A.; JAMEEL, H.; KENEALY, W.R. Detoxification of wood hydrolyzates with activated carbono for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 626-636, 2011.

LEU, S.-Y.; ZHU, J.Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. **BioEnergy Res,** v. 6, p. 405–415, 2013.

LI, Y.; Qi, B.; LUO, J.; KHAN, R.; WAN, Y. Separation and concentration of ydroxycinnamic acids in alkaline hydrolyzate from rice straw by nanofiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 149, p. 315–321, 2015.

LIANG, Y.-G.; CHENG, B.; SI, Y.-B.; CAO, D.-J.; NIE, E.; TANG, J.; LIU, X.-H.; ZHENG, Z.; LUO, X.-Z. Physicochemical changes of rice straw after lime pretreatment and mesophilic dry digestion. **Biomass and Bioenergy**, v. 71, p. 106-112, 2014.

LIANHUA, L.; DONG, L.; YONGMING, S. et al. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. **International Journal of Hydrogen Energy,** v. 35, p. 7261-7266, 2010.

LIMTONG, S., SRINGIEW, C. ; YONGMANITCHAI, W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated Kluyveromyces marxianus. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 3367-3374, 2007.

LU, Y.; WANG, Y.; XU, G.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. **Appl Biochem Biotechnol** v. 160, p. 360–369, 2010.

LUDWIG, D.; BUCHMANN, M.; HIRTH, T.; RUPP, S., ZIBEK, S. High Solids Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Materials with a Powerful Stirrer Concept. **Appl Biochem Biotechnol,** v. 172, p. 1699–1713, 2014.

MAGALHÃES, K.T.; MELO PEREIRA, G.V.;CAMPOS, C.R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition**.** ***Braz J Microbiol,*** v. 42, n. 2, p. 693-702, 2011.

MATEO, S.; ROBERTO, I. C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A. J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196– 203, 2013

MEEHAN, C.;BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SMYTH, F.; MARCHANT, R. Decolorization of Remazol Black B using a thermotolerant yeast, Kluyveromyces marxianus IMB3. US National Library of MedicineNational Institutes of Health, v. 26, n. 1-2, p. 75-9, 2000.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, Issue 4, p. 522-550, 2012.

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

MILLS, T.Y.; SANDOVAL, N.R.; GILL. R.T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnol Biofuels**, v. 2, p. 26, 2015.

MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M.; GROHMANN, K.; WYMAN, C. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 33, Issue 2, p. 67-81, 1992.

MODENBACH, A.A.; NOKES, S.E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1430-1442, 2012.

MOOD, S. H.; HAGHIGHI, S.; GOLFESHAN, A. S.; HOSSEIN, A.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MORAES, C. A.M.;, FERNANDES,I.J ; CALHEIRO, D.; KIELING, A.G.; BREHM, F.A.;RIGON, M.R.; BENWANGER FILHO, J.;SCHNEIDER, I.A.H.; OSORIO, E. Review of the rice production cycle: By-products and the main applications focusing on rice husk combustion and ash recycling. **Waste Management & Research**, v. 32, Issue 11, 2014.

MORENO, A.D.; TOMÁS-PEJÓ, E.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF

processes at high dry matter consistencies. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 337-343, 2013.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** , v. 96, p. 673–686, 2005.

MUKATAKA, S.; TADA, M; TAKAHASHI,J. Effects of agitation on enzymatic hydrolysis of cellulose in a stirred tank reactor. **J Ferment Technol**, v. 61, p. 615–621, 1983.

MUSSATTO , S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alcaline hydrolysis of brewer's spent grain. **Industrial Crops and Products,** v. 25, p. 231–237, 2007.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 817-30, jul. 2010.

MUSSATTO, S.I. et al., The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, n. 5, p. 711-721, abr. 2008.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 85, p. 14, 2005.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G. **Biomass Fractionation Technologies For a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, Ed. Elsevier Inc., Waltham, MA, pp. 1-22, 2016.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, p. 711, 2008.

MUSSATTO, S.I.; SANTOS, J.C.; ROBERTO, I.C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xilitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 590-596, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5.ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed., São Paulo: Sarvier Editora Livros Médicos, 2002.

NIGAN, J.N. Ethanol production fom wheat staw henicellulose hydrolysate by Pichia stipitis. **Journal of Biotechnology**, v.87, 17-22, 2001

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY – NREL. Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/birefinery.html>. Acessado em: 27 mai. 2015.

OLSSON, L.; HAHNHAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme Microb. Technol**. v. 41, p. 876–880. 2007.

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

PAN, X. ; KADLA, J.F; EHARA, K.; GILKES, N.; SADDLER, J.N. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5806–5813, ago. 2006.

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 96, n. 2, p. 250–258, 2007.

PARK, J.; JONES, B.; KOO, B.; CHEN, X.; TUCKER, M. YU, H.Y.; PSCHORN, T.; VENDITTI, R.; PARK, S. Use of mechanical refining to improve the production of low-cost sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p.59-67, 2015.

PARK, J.; BAKER, O; HIMMEL, M.E.; PARILLA, P.A.; JOHNSON, D.K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance Sunkyu. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 10, 2010.

PARRONDO, J.; GARCÍA, L.A.; DÍAZ, M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 03, p. 445-456, 2009.

PAULY, M.; GILLE, S.; LIU, L.; MANSOORI, N.; SOUZA, A. de; SCHULTINK, A.; XIONG, G. Hemicellulose biosynthesis. **Planta**, v. 238, n. 4, p. 627-642, 2013.

PECOTA, D.C.; RAJGARHIA, V.; SILVA, N.A. da. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. **J. Biotechnol**. v. 127, p. 408–416. 2007.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**: **conceitos e aplicações**. 2. ed., São Paulo, Makron Books, 1997.

PENG, F.; PENG, P.; FENG X.; SUN, F.R.C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances,** v. 30, p. 879–903, 2012.

PENTJUSS, A.; STALIDZANS, E.; LIEPINS, J.; KOKINA, A.; MARTYNOVA, J.; ZIKMANIS, P.; MOZGA, I.; SCHERBAKA, R.; HARTMAN, H.; POOLMAN, M.G.; FELL, D.A.; VIGANTS, A. Model-based biotechnological potential analysis of Kluyveromyces marxianus central metabolism. **J. Ind Microbiol Biotechnol,** v. 44, p. 1177–1190. 2017.

PESSANI, N.K. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10618-24, nov. 2011.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 756-762, 2000.

PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G.; PREEZ, J.C. du. Fermentation of D-xylose by the yeasts Candida shehatae and Pichia stipitis: prospects and problems. **Process Biochem,** v. 24, p. 21e32, 1989.

RADOYKOVA, T.; NENKOVA, S.; VALCHEV, I. Black liquor lignin products, isolation and characterization. **Journal of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 48, n. 5, p. 524– 529, 2013.

RAJOKA, M.I. Kinetic parameters and thermodynamic values of b-xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2212-2219, 2007.

RANA, V.; ECKARD, A.D; AHRING, B.K. Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from T. reesei RUT C30 and A. saccharolyticus. **SpringerPlus**, v. 3, p. 516, 2014.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H.R.; MEYER, A.S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydr Res**., v.385, p. 45-57, 2013.

ROBERTO, I.C.; MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, R. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor**. Industrial Crops and Products**, v.17, p. 171-176, 2003.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature,** v 454, n 7206, p.841-845, Jun 2008.

SALEHI, S.M.A.; KARIMI, K.; BEHZAD, T.; POORNEJAD, N. Efficient Conversion of Rice Straw to Bioethanol Using Sodium Carbonate Pretreatment. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 12, p. 7354-7361, 2012.

SANCHEZ, A. et al. Sequential pretreatment strategies under mild conditions for efficient enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1127–1141, 2015.

SCOTT, C.T.; SAMANIUK, J.R.; KLINGENBERG, D.J. Rheology and extrusion of high-solids biomass. **Biorefinery – Sugar - Tappi Journal**, p. 47-53, may 2011.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN; A.E. Jr.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. **Tex Res J.**, v. 29, p. 786-794, 1962.

SHEKIRO III, J.; KUHN, E.M.; NAGLE, N.J.; TUCKER, M.P.; ELANDER, R.T.; SCHELL, D.J. Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 23, 2014.

SHIN, S.K.; HYEON, J.E.; KIM, Y.I. Enhanced hydrolysus os lignocellulosic biomass: Bifunctional enzyme complexes expressed on Pichia pastoris improve bioethanol production from Miscanthus sinensis. **Biotechnol J**., v. 10, p, 1912,1919, 2015.

SIEKSTELE, R.; BARTKEVICIUTE, D.; SASNAUSKAS, K., Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (EPG1). **Yeast**, v. 15, p. 311–322. 1999.

SILVA, J.P.A. **Aplicação de Processos Oxidativos Avançados como uma nova estratégia para a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico visando à produção de etanol**. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SILVA, J.P.A. **Estudo da produção de etanol por Pichia stipitis empregando hidrolisado de palha de arroz**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena,, 2007.

SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 23, jan. 2013.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. The Influence of Initial Xylose Concentration, Agitation, and Aeration on Ethanol Production by *Pichia stipitis*from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate .**Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, p. 1306-1315, 2010.

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N., FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnol Biofuels**, v. 11, p. 176, Jul 2017.

SLUITER, A. et al. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**, relatório técnico, NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis, 2008.

SONG, W.-Y.; SEUNG, H.-A.; SHIN, S.-J. Impact of sodium or potassium cations in culture medium to ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry**, v. 47, p.17-23, Issue 1, 2015

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Tecnhology**, v. 199, p. 49-58, 2015.

SUN, W.-L.; TAO, W.-Y. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Rice Straw Pretreated by a Sequence of Dilute Acid and Dilute Alkali at High Dry Matter Content,

Energy Sources, Part A. **Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 35, p. 741-752, 2013.

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

SUTTIKUL, S.; SRINORAKUTARA, T.; BUTIVATE, E.; ORASOON, K. Comparison of SHF and SSF Processes for Ethanol Production from Alkali-Acid Pretreated Sugarcane trash. **KKU Res.j**., v. 22, n. 1, p. 229-235, 2016.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Mol. Catal. B-Enzym**, v. 10, p. 631–637, 2000.

SZCZODRAK, J.; TARGOŃSKI, Z. Selection of Thermotolerant Yeast Strains for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 300-303, 1987.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707–738, 2015.

TAN, L.U.; MAYERS, P.; ILLING, M.; SADDLER, J.N. The copurification of beta-glucosidase, beta-xylosidase, and 1,3-beta-glucanase in two separate enzyme complexes isolated from Trichoderma harzianum E58. **Biochem Cell Biol**., v. 65, n. 9, p. 822-32, 1987.

UNITED STATES DEPARTAMET OF AGRICULTURE – USDA, Agricultural Projections to 2018**,** Disponível em: http:// https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=37796. Acesso em: 15 jan. 2018.

VAN DIJKEN, J.P.; WEUSTHUIS, R.A.; PRONK, J.T. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek,** v. 63, p. 343– 352. 1993.

VARGA, E.; KLINKE, H.B.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A.B. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnol Bioeng**, v. 88, n.5, p. 567-74, 2004.

VILLARREAL, M.L.M.; PRATA, A.M.R.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucaliptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Techology**, v. 40, p. 17-24, 2006.

VISSER, W.; SCHEFFERS W.A.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W.H.; VAN DIJKEN, J.P. Oxygen requirements of yeasts. **Appl Environ Microbiol** v. 56, n. 12, p. 3785–3792. 1990.

VOET, D.; VOET J.G **Bioquímica**. 4. ed , São Paulo: Pearson Education do Brasil, .ARTMED, 2013.

WANDERLEY, M.C.A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G.J.M.; GOUVEIA, E.R. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 128, p. 448-453, 2013.

XIAO, Z.Z., ZHANG, X., GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 113, n. 16, p. 1115-1126, 2004.

XU, X.; XU, Z.; SHI, S.; LIN, M. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by Inonotus obliquus on straw biomass under submerged fermentation. **Bioresour Technol**., v. 241, p. 415-423, 2017.

YANASE, S. et al. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 381-8, set. 2010.

YANG, M; LI, W.; LUI, B.; LI, Q.; KING, J. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 4884-4888, 2010

YANG, X.; LINGXI, B.; DAFENG, S.; ZHIPING, L.; SHIJIE, L., JIANXIN, J. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis and fermentation of furfural residues by addition of Gleditsia saponin. **Fuel**, v. 177, p. 132-147, 2016.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26-40, 2008.

YU, Z. et al., The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 102, n. 19, p. 9083-9, out. 2011.

ZEFERINO, I.A.M. **Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

ZHANG, L.; HU, Y. Novel lignocellulosic hybrid particleboard composites made from rice straws and coir fibers. **Materials and design**, v. 55, p. 19-26, 2014.

ZHAO, A.; LEI, D.; LIANG, C.; DEHUA, L. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers Xuebing. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 350–356, 2013.