



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA  
CASCA DE ARROZ**

**Aluno:** Filipe dos Santos Alves

**Orientador:** Emerson Adriano Guarda

**PALMAS – TO  
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA  
CASCA DE ARROZ**

**Aluno:** Filipe dos Santos Alves

**Orientador:** Emerson Adriano Guarda

**Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Agroenergia (Processos de obtenção de biocombustíveis e avaliação de aproveitamento de seus resíduos).**

**PALMAS – TO  
2017**



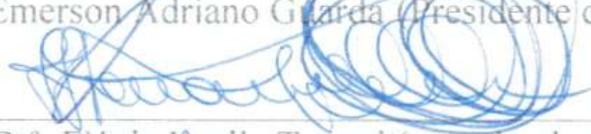
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA CASCA DE  
ARROZ**

**ALUNO: Filipe dos Santos Alves**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (Presidente da comissão)

  
Prof.ª Dr.ª Flávia Lucila Tonani (examinadora interna)

  
Prof. Dr. Donizete Xavier da Silva (examinador externo)

**Data da Defesa: 30/06/2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP)**

**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do  
Tocantins**

---

A474o Alves, Filipe dos Santos.  
OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DA CASCA DE ARROZ. / Filipe dos Santos Alves. -  
Palmas, TO, 2017.  
88 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do  
Tocantins - Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-  
Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2017.

Orientador: Emerson Adriano Guarda

1. Casca de arroz. 2. Hidrólise enzimática. 3. Otimização. 4.  
Delineamento de composto central rotacional. I. Título

**CDD 333.7**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS - A reprodução total ou parcial, de  
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado  
desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº  
9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha  
catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a).**

## DEDICATÓRIA

Dedico ao meu Pai, Antonio Ubiracy,  
Minha Mãe Waldelice, e as  
Minhas Irmãs, Isabela e Ana Clara  
Por todo apoio durante este Mestrado.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado, dando força e coragem nos momentos mais difíceis e saúde para chegar até aqui.

A minha família, em especial meus pais Antonio Ubiracy e Waldelice que são meus exemplos e minha base, e as minhas irmãs Isabela e Ana Clara pelo companheirismo. Obrigado a minha irmã Isabela por ter me mostrado através da sua luta contra o câncer que não devemos desistir jamais.

A Universidade Federal do Tocantins pela oportunidade de qualificação.

Ao Prof.<sup>o</sup> DSc Emerson Adriano Guarda e a Prof.<sup>a</sup> MSc Patrícia Martins Guarda, pela orientação, correções, amizade, confiança e incentivo, que possibilitaram a realização deste trabalho.

A equipe do Laboratório de Pesquisas em Química Ambiental e de Biocombustíveis (LaPeQ) o técnico Álvaro pelo auxílio e esforço durante análises, ao Fabrícia, Mayana e também aos doutorandos Danylo e Áurea e ao Mestrando Dener nos momentos de descontração, conversas e lanches durante a semana e finais de semana. A co orientação da doutora Fabrícia Vieira por toda ajuda e orientação e a Larissa Gualberto por todo auxílio, disponibilidade e paciência durante as análises no CLAE que foram dia e noite.

A todos meus amigos que estiveram comigo durante esse mestrado e compreenderam minha falta em muitos momentos.

A Capes pela bolsa de estudos.

Meus sinceros agradecimentos.

ALVES, F. D. S. **Otimização e Avaliação do Processo de Hidrólise Enzimática da Casca de Arroz**. 2017, 88p. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO.

## RESUMO

No cenário mundial e no Brasil, a busca por combustíveis a partir de tecnologias sustentáveis tem se tornado cada vez maior. Neste contexto, diversos resíduos/materiais são investigados como matérias-primas para a produção do bioetanol ou etanol de segunda geração que é considerado um biocombustível com grande potencial para aumentar a produção de etanol. O presente trabalho teve por objetivo avaliar e otimizar o potencial da casca de arroz (material lignocelulósico) em produzir açúcares durante a etapa de hidrólise enzimática. Para isso, inicialmente foi feita uma caracterização química da casca de arroz *in natura* e foi aplicado um pré – tratamento físico/químico a fim de remover a lignina do material lignocelulósico e facilitar a conversão de celulose em glicose. Um planejamento experimental por delineamento de composto central rotacional (DCCR) foi estabelecido com intuito de otimizar as variáveis, quantidade de material lignocelulósico e coquetel enzimático, verificando sua influência na etapa de hidrólise, para obtenção de bons rendimentos. Foi quantificado a atividade enzimática das enzimas comerciais Cellic® CTec 2 e Cellic® HTec 2. Por meio da validação do modelo estatístico determinou-se a condição otimizada para realizar a hidrólise enzimática de 0,32g de casca de arroz em 0,372mL do Coquetel Enzimático com rendimento de 80,07%.

**Palavras-chave:** casca de arroz, hidrólise enzimática, otimização, delineamento de composto central rotacional, bioetanol.

ALVES, F. D. S. **Evaluation and Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process from Rice Husk**. 2017, 88p. Thesis (Master in Agroenergy) Federal University of Tocantins, Palmas, TO.

### ABSTRACT

The research for fuels from sustainable technologies has become increasingly in the world and Brazil scenario. In this context, several wastes materials are investigated as raw materials for production of bioethanol or second-generation ethanol which is considered a biofuel with great potential to increase the production of ethanol. The aim of this present work was to evaluate and optimize rice husk (lignocellulosic material) potential in sugars production during of enzymatic hydrolysis. For this, a chemical characterization from rice husk *in natura* it was initially done and a physico-chemical pretreatment was applied to remove lignin from lignocellulosic material and support conversion of cellulose into glucose. An experimental design was established to optimize the variables, amount of lignocellulosic material and enzymatic cocktail, checking its influence in hydrolysis by central composite design (CCD). The enzymatic activity of commercial enzymes Cellic® CTec 2 and Cellic® HTec 2 was measured. Through the validation of statistical model, optimized condition has determined to carry out enzymatic hydrolysis 0.32g of rice husk in 0.372mL enzymatic cocktail with yield of 80.07%.

**Keywords:** rice husk, enzymatic hydrolysis, optimization, central composite design, bioethanol.

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Composição química de Materiais Lignocelulósicos. ....	27
Tabela 2 – Composição química dos produtos da indústria de arroz.....	28
Tabela 3 – Tipos de pré-tratamentos.....	34
Tabela 4 - Hidrólise Ácida versus. Enzimática .....	37
Tabela 5 – Descrição das características da Cellic® CTec2 e HTec2. ....	41
Tabela 6 – Composição Química da Casca de Arroz.....	52
Tabela 7 – Bandas do Infravermelho. ....	54
Tabela 8 – Atividade Enzimática das enzimas comerciais Cellic® CTec e HTec2. ....	58
Tabela 9 – Valores utilizados no DCCR para Concentração e Rendimento de glicose.....	60
Tabela 10 – Planejamento Experimental utilizando duas variáveis para Concentração e Rendimento de glicose na etapa de hidrólise enzimática .....	60
Tabela 11 – Coeficientes de Regressão do rendimento em 72 horas (%). ....	61
Tabela 12 – ANOVA do modelo reparametrizado do rendimento em 72 horas (%). ....	63
Tabela 13 – Valores utilizados no DCCR para concentração e rendimento de glicose no segundo planejamento experimental.....	68
Tabela 14 – Planejamento Experimental utilizando duas variáveis para concentração e rendimento de glicose na etapa de hidrólise enzimática .....	68
Tabela 15 – Coeficientes de Regressão do rendimento em 72 horas (%) do segundo planejamento experimental.....	69
Tabela 16 – ANOVA do modelo reparametrizado do rendimento em 72 horas (%). ....	71
Tabela 17 – Valores do Rendimento observadas e previstas pelo modelo e os desvios para o DCCR.....	74

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1- Mapa da produção agrícola de Arroz.....	23
Figura 2 - Mapeamento do arroz irrigado em Tocantins - Safra 2014/15.....	24
Figura 3 – Estrutura química de material lignocelulósico.....	26
Figura 4 – Representação das moléculas de glicose, celobiose e do polímero de celulose. 28	
Figura 5 - Componentes da fração hemicelulose.....	30
Figura 6 – Representação da estrutura de lignina .....	31
Figura 7 – Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré tratamento. ....	34
Figura 8 – Mecanismo de ação da celulase .....	39
Figura 9 – Pontos de experimentos de um delineamento composto central. ....	45

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 – Espectros do Infravermelho da casca de arroz in natura e pré-tratada.....	56
Gráfico 2 – Curva Padrão de Glicose em função da absorbância em 540nm .....	57
Gráfico 3 – Determinação de glicose liberada por 0,5 mL de Cellic® CTec 2 em função das diferentes diluições. ....	57
Gráfico 4 – Determinação de glicose liberada por 0,5 mL de Cellic® HTec 2 em função das diferentes diluições. ....	58
Gráfico 5 – Acompanhamento da liberação de glicose em função do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) para cada ensaio do DCCR.....	59
Gráfico 6 – Representação das variáveis significativas dos efeitos padronizados. ....	62
Gráfico 7 – Superfície de resposta para o rendimento em 72 horas de reação na hidrólise enzimática.....	64
Gráfico 8 –Curvas de Contorno para o rendimento em 72 horas de reação na hidrólise enzimática.....	65
Gráfico 9 – Acompanhamento da liberação de glicose em função do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) para cada ensaio do DCCR no segundo planejamento experimental. ....	67
Gráfico 10 – Representação das variáveis significativas dos efeitos padronizados. ....	70
Gráfico 11 – Superfície de resposta do segundo planejamento experimental.....	72
Gráfico 12 – Curvas de Contorno para o segundo planejamento experimental. ....	72
Gráfico 13 – Valores observados versus preditos pelo modelo para o rendimento.....	75
Gráfico 14 – Estudo dos resíduos para validação do modelo experimental proposto. ....	75

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES**

ANOVA – Análise de Variância

CLAE – Cromatografia de Alta Eficiência

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

DOE – *Design of Experiments*

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

$R^2$  – Coeficiente de Determinação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 GERAL .....	19
2.2 ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>20</b>
3.1 CADEIA PRODUTIVA AGROENERGÉTICA .....	20
3.2 ARROZ .....	22
3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	25
3.4 CASCA DE ARROZ .....	27
3.5 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	28
3.5.1 Celulose .....	28
3.5.2 Hemicelulose .....	29
3.5.3 Lignina .....	30
3.5.4 Outros Compostos .....	32
3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	32
3.7 PRÉ – TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	33
3.7.1 Pré – Tratamento Hidrotérmico .....	35
3.7.2 Pré-Tratamento Básico/Alcalino .....	35
3.8 ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO .....	36
3.9 HIDRÓLISE .....	36
3.9.1 Hidrólise Enzimática .....	37
3.9.2 Enzimas Comerciais .....	40
3.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA .....	41
3.11 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....	42
3.11.1 Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) .....	44
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	46
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE ARROZ .....	46
4.2.1 Determinação do Teor de Umidade .....	46
4.2.2 Determinação do Teor de Cinzas .....	46
4.2.3 Determinação do Teor de Extrativos .....	47
4.2.4 Determinação do Teor de Lignina .....	47

4.2.5 Determinação do Teor de Holocelulose .....	48
4.2.6 Determinação do Teor de Alfacelulose .....	49
4.3 PRÉ – TRATAMENTO DA CASCA DE ARROZ.....	49
4.4 ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO .....	50
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	50
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	50
4.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA .....	51
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE ARROZ....	52
5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	54
5.3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CELLIC® CTEC E HTEC	
2 56	
5.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MASSAS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO EM	
DIFERENTES QUANTIDADES DE COQUETEL ENZIMÁTICO.....	59
5.4.1 Análise do Planejamento Experimental .....	59
5.4.2 Análise do Segundo Planejamento Experimental.....	67
5.4.3 Validação Experimental do Modelo para o Rendimento .....	74
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	78
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Grande parte da energia consumida no planeta é proveniente da queima de combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão). Esses compostos, mais especificamente o petróleo e o carvão, são responsáveis por grande parte das emissões de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para a atmosfera, o que é considerada a principal causa do aquecimento global. Além deste, outros gases poluentes tem origem nesse processo, como o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), precursor do trióxido de enxofre ( $\text{SO}_3$ ) e do ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), causadores da chuva ácida; do monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ) e dos óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ), que são gases tóxicos e que formam o chamado “*smog* fotoquímico” (BRAGA et al., 2005). A liberação destes gases poluentes, a própria escassez das reservas de petróleo e carvão, juntamente com as preocupações com a preservação do meio ambiente, são motivos que levaram governos e pesquisadores a buscar estratégias para uma produção mais limpa e sustentável, utilizando fontes renováveis como os biocombustíveis.

O uso dos biocombustíveis visa substituir os combustíveis fósseis, diminuir a dependência por essas fontes não renováveis e assim reduzir os gases nocivos na atmosfera. Neste contexto, os biocombustíveis, tais como o etanol e bioetanol, também conhecidos como etanol de primeira e segunda geração, são parte dessas fontes que podem vir a diminuir o uso de combustíveis fósseis. As diferenças básicas entre etanol e bioetanol são as fontes de matérias primas utilizadas na sua obtenção. No caso do etanol, são utilizadas as matérias primas como a cana de açúcar, a beterraba e o milho, e o bioetanol por sua vez, a utilização dos resíduos agrícolas e agroindustriais, como a casca, a palha, o bagaço, dentre outros.

O Brasil por ter uma distribuição geográfica privilegiada, que encerra diversos climas e tipos de solos, permite a produção de diversas culturas agrícolas em quase todo o seu território e durante quase todo o ano. Com a grande variedade de matérias primas agrícolas e naturais cultivadas no país, os seus respectivos resíduos gerados podem auxiliar no aumento de produtividade do produto final, caso seja ele, etanol/bioetanol, por tais razões, agregam mais rentabilidade a produção no Brasil por biocombustível (ARREDONDO, 2009).

De maneira geral os resíduos agroindustriais provenientes da produção agrícola são acumulados no meio ambiente sem nenhum controle ou monitoramento, esta prática acarreta

em sérios problemas ambientais, por exemplo, alteração das características físicas, químicas e biológicas, do ambiente na qual estão dispostos, decorrentes da sua decomposição descontrolada. O Brasil dispõe, então, de uma grande variedade destes resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento agrega potencial econômico, ambiental e social. Logo, é importante demonstrar as vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias para se obter ganho energético a partir dos recursos renováveis e seus respectivos resíduos, que são produzidos em grande quantidade no país (BRINGHENTI e CABELLO, 2005).

Os materiais lignocelulósicos, principais constituintes dos resíduos agrícolas e agroindustriais, são um abundante material natural formado por biopolímeros, tais como celulose, hemicelulose e lignina, que podem ser transformados através da conversão microbiana em bioetanol (PEREIRA et al., 2012). As vantagens em se utilizar os materiais lignocelulósicos para produção de bioetanol são seu baixo custo, fácil disponibilidade, a não existência de conflito com uso alimentar e o potencial para produção de biocombustíveis. No entanto, a heterogeneidade e a estrutura complexa deste biopolímero fazem com que suas frações imponham algumas dificuldades para sua utilização (LIU et al., 2012; ROMANÍ et al., 2014).

A casa de arroz, material lignocelulósico, é um resíduo agroindustrial bastante abundante no Brasil proveniente da produção e beneficiamento do arroz. A produção agrícola do arroz é uma das principais fontes alimentícias em vários países como China, Índia, Indonésia e Bangladesh, sendo a produção mundial no ano de 2014 em torno de 750 milhões de toneladas. O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz e na safra de 2014/2015 a produção girou em torno de 12 milhões de toneladas, sendo 8,7 milhões produzidas no Rio Grande do Sul. Os resíduos gerados durante o processamento do arroz são da casca 20-33% e 5-8% do farelo (DIEP et al., 2015).

O processo de produção do bioetanol a partir de fontes lignocelulósicas compreende, principalmente, um pré tratamento (físico, químico ou físico-químico) do material a fim de remover a lignina, a hidrólise (ácida ou enzimática) das frações de celulose e hemicelulose, a fermentação por leveduras dos açúcares produzidos nas etapas anteriores e por último a separação/purificação do bioetanol produzido.

As características estruturais e composicionais da fonte de lignocelulose tornam imprescindível um processo prévio de tratamento, a fim de disponibilizar adequadamente a fração de celulose para a etapa posterior de hidrólise enzimática. Esta etapa, denominada de pré

tratamento, ainda é, contudo, uma atividade complexa, sendo necessário quebrar a estrutura da lignina, removendo-a, e destruir a estrutura cristalina da celulose, de modo a disponibilizar maior área possível desta fração para as enzimas agirem de forma eficaz (ALVIRA et al., 2010).

Após o pré tratamento, uma das formas para produção de bioetanol é a utilização de uma via biológica, que consiste na transformação dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) em monossacarídeos (glicose, pentoses e hexoses), por meio de enzimas, as quais apresentam características notáveis, em relação a via química (ácida), devido à sua especificidade por determinado substrato, assim como a promoção de apenas uma reação bioquímica, permitindo a síntese de um produto específico, sem formação de contaminantes ou subprodutos (PENGILLY et al., 2015).

O uso de enzimas comerciais para a conversão na hidrólise é uma forma que visa o aproveitamento e aumento do rendimento durante a etapa enzimática. As celulasas e as hemicelulasas são enzimas que quebram as ligações de celulose e hemicelulose, respectivamente. Os tipos de celulasas envolvidas são as endo e exoglicanase e  $\beta$ -glicosidase. As enzimas de hemicelulose são mais complexas, uma mistura de pelo menos oito enzimas. A celulose é hidrolisada, então, em glicose e a hemicelulose dá origem a várias pentoses e hexoses. Por fim, encaminha-se o material obtido para fermentação por leveduras, promovendo a quebra das moléculas de glicose, liberando etanol e gás carbônico (ERDEI et al., 2013; SARKAR et al., 2012).

Em suma, faz necessário uma crescente busca para produção de energia por fontes limpas e sustentáveis, incentivando assim a produção de bioetanol através de fontes residuais das culturas agrícolas, causas de impactos no meio ambiente, reduzindo estes problemas ambientais, além de agregar valor econômico e dá um destino útil aos resíduos.

O grande desafio da produção economicamente viável do bioetanol consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose. Além disso, visa-se uma sinergia energética do processo, com aproveitamento tanto da celulose quanto da hemicelulose. Sendo assim, a busca pela hidrólise efetiva dos materiais lignocelulósicos se tornou alvo de inúmeras pesquisas no Brasil e no mundo. Contudo, a utilização de enzimas na etapa de hidrólise possui um custo elevado, principalmente quando se refere ao emprego de enzimas comerciais. O complexo enzimático utilizado para este fim (Cellic® CTec2/HTec2) desenvolvido pela *Novozymes*, apresenta, vantagens importantes frente a este viés e aos complexos enzimáticos já existentes no mercado, tais como o uso em

menor dosagem, menor custo e maior estabilidade frente aos inibidores auxiliando num melhor rendimento da produção.

O trabalho visa com isso aumentar a disponibilidade de açúcares por hidrólise enzimática utilizando casca de arroz (material lignocelulósico) da indústria de beneficiamento de arroz, e assim otimizar as variáveis do processo de hidrólise enzimática, a fim de maximizar rendimentos e reduzir custos operacionais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Otimizar as condições de hidrólise enzimática em substrato celulósico da indústria de beneficiamento de arroz, empregando enzimas comerciais para produção de etanol de segunda geração.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a casca de arroz *in natura* avaliando os teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose e alfacelulose.
- Determinar a atividade enzimática das enzimas comerciais.
- Comparar o efeito do pré – tratado da casca de arroz por espectrofotometria no infravermelho.
- Otimizar o processo de hidrólise enzimática empregando delineamento experimental variando a quantidade de material lignocelulósico e quantidade de enzima.
- Alcançar as melhores condições de hidrólise com maior liberação de açúcares.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 CADEIA PRODUTIVA AGROENERGÉTICA

No mundo, os Estados Unidos é o maior produtor em biocombustíveis, com uma produção de 30.983 toneladas. O Brasil, por sua vez, está em segundo lugar no ranking, com uma produção de 17.636 toneladas (PETROLEUM, 2016).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, tendo uma área plantada em 2012 em torno de 8,4 milhões de hectares, com aumento da demanda mundial por etanol oriundo de fontes renováveis, o país possui grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana de açúcar sendo promissor para a exportação dessa *commodity* (CONAB, 2016).

Dentro da visão de mercado interno, o relatório da CONAB (2016) mostra que a produção de cana de açúcar na safra 2016/17 alcançou 694,54 milhões de toneladas, representando aumento de 4,4% em comparação com o período anterior. A área colhida foi estimada em 9,1 milhões hectares, aumento de 5,3% se comparado com a safra 2015/2016, que foi de 8,6 milhões de hectares. No caso do etanol anidro, utilizado na mistura com a gasolina, a produção teve um aumento de 1,5%, alcançando 11,4 bilhões de litros, na safra anterior, esse volume foi de 11,2 bilhões de litros. O etanol hidratado atingiu a produção de 16,5 bilhões de litros, redução de 14,3% ou 2,8 bilhões de litros, comparado à safra passada, que foi de 19,2 bilhões de litros, resultado do menor consumo deste combustível.

A Região Norte, ainda de acordo com o relatório da CONAB (2016), foi responsável por menos de 1% da produção nacional, a área cultivada aumentou, apesar disso, a produtividade teve redução nesta safra 2016/17, em virtude das más condições climáticas para o desenvolvimento dos canaviais. Por tais razões, no Tocantins, a área colhida cresceu 1,8 mil hectares em relação à safra passada, o que representa um acréscimo de 5,8%, contudo a produtividade bastante inferior à da safra passada, quando se alcançou cerca de 78.274 kg/ha, contra apenas 65.240 kg/ha nesta safra.

Neste contexto, uma cadeia produtiva pode ser definida como a integração de atividades necessárias para transformar uma matéria prima em produto final, formado por produtores de

insumos e matérias prima, indústria que processa a matéria prima, distribuição e logística, e por último o consumidor final. Todas as etapas em cada nexo da cadeia dão a sua respectiva contribuição no valor do produto final (BATALHA; SILVA, 2001).

O conceito de agronegócio é definido com como todos os atores envolvidos na produção, processamento e distribuição do produto final. Dentro deste sistema incluem os insumos, estocagem, processos, produtores, varejistas, atacadistas, envolvendo desde o início da produção até o consumidor final (DAVIS e GOLDBERG, 1957).

No âmbito das cadeias produtivas agroenergéticas destacam-se, a importância da atenção contínua com a gestão e a dinâmica produtiva visando ganhos de competitividade. Os autores Batalha e Silva (2001), estruturam a cadeia agroenergética da seguinte forma:

- 1) Organizacional (política setoriais privadas e atuação das organizações).
- 2) Institucional (regulamentações e políticas econômicas, juntamente com a relação entre os agentes da cadeia).
- 3) Tecnológica (investimento tecnológica na cadeia),
- 4) Competitivo (estrutura da indústria, padrões de concorrência, características do consumo).

O objetivo das cadeias é a hierarquização e o poder de mercado. Sendo assim, as cadeias têm a responsabilidade por analisar as dependências do sistema com base na estrutura de mercado e fontes externas. As fontes externas seriam as ações estratégicas de uma empresa para melhorar o desempenho de competitividade relacionadas a um ponto específico da empresa. Como já dito, uma cadeia produtiva é definida como uma sequência de relações que iniciam com a produção dos insumos, obtenção da matéria prima, industrialização, distribuição e o consumo do produto final. Dentro deste elo é possível analisar a função dos atores envolvidos, assim também como a área de atuação das organizações envolvidos no processo. Todos estes elementos estão inseridos em um ambiente institucional, regidos por normas e leis, constituídos por empresas públicas e privadas. Cada etapa da cadeia é constituída por um conjunto de atores que interagem entre si através dos elos existentes entre eles. O termo ator, referencia, a empresa ou instituição, pública ou privada que estiver envolvida na cadeia. Os elos são as trocas ou transações de bens, serviços e informações ao longo da cadeia (BERNARDES et al., 2012).

Um exemplo para uma cadeia produtiva agroenergética foi proposta por Farina (2000), considerando os segmentos da cadeia e o ambiente dos quais as cadeias são inseridas. A estrutura foi estabelecida da seguinte forma:

- **Ambiente Institucional e Organizacional:** São as leis, normas e costumes que regem a sociedade. As instituições são as organizações públicas e privadas, locais, regionais, nacionais e internacionais, que possuem a responsabilidade em promover as condições de atuação e modificação na cadeia.
- **Consumo:** São os consumidores por estabelecer o que o mercado produz, provenientes das suas características de renda, preferencias, expectativas e faixa etárias, por exemplo.
- **Distribuição:** São o transporte (ferroviário e/ou rodoviário), armazenamento e comercialização.
- **Industrialização:** São os processos dentro da indústria em produzir o produto final.
- **Insumos e Matérias Prima:** Referem-se, aos defensivos agrícolas, maquinários, fertilizantes até a produção da matéria prima utilizada pela indústria.

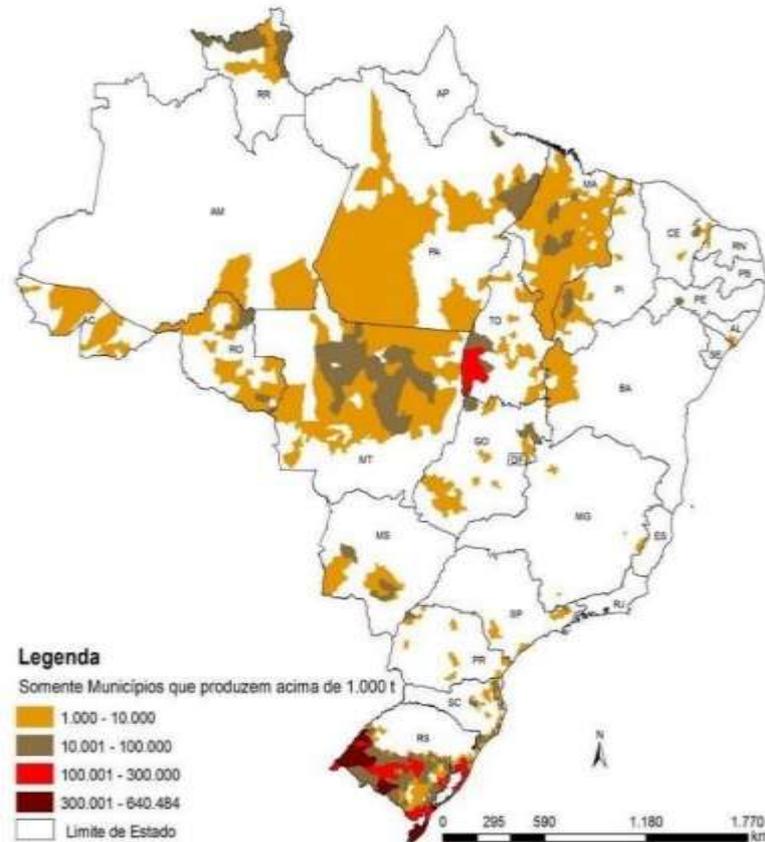
É importante ressaltar que o valor do produto final até ao consumidor, é determinado pela soma dos valores de cada um dos elos ao longo da cadeia agroenergética, resultado da ação dos agentes e da coordenação entre eles. Por isso, as condições em que o produto chega ao consumidor depende tanto das atividades internas à organização, quanto do equilíbrio com as demais partes da cadeia produtiva.

### **3.2 ARROZ**

O arroz está entre os cereais mais utilizados no mundo. O Brasil é um dos grandes produtores mundiais, a estimativa é uma colheita de cerca 11,95 milhões de toneladas na safra de 2016/2017, uma redução na área plantada de 2,3% em relação à safra passada 2015/2016, sendo influenciada pela redução das áreas no sistema de sequeiro. Em contrapartida, observa-se o aumento do plantio em área irrigada, o que ajuda a explicar uma estimativa de aumento de produtividade em 15,5%. A produção deve chegar a 11.968,1 mil toneladas, um aumento de 12,8% em relação à safra passada. A Figura 1 demonstra o mapeamento da produção de arroz no Brasil. A cadeia produtiva agroindustrial do arroz pode influenciar o desenvolvimento regional à medida que gera empregos, renda e comércio de produtos do arroz para a localidade, promovendo consequentemente, melhores condições de vida para a população. Com este objetivo, deve-se sedimentar uma base tecnológica para a produção de arroz que tenha como

intuito a execução de ações que levem à inovação. Essa estratégia, aliada a demandas do mercado, permitirá a criação de um ambiente de negócio com solidez econômica (CONAB, 2017; FRAGOSO et al., 2013).

**Figura 1-** Mapa da produção agrícola de Arroz.



Fonte: (CONAB, 2017).

Na Região Norte os dados indicam que a safra de arroz ficará com área estável ou com uma leve queda, variando entre 0,5% na sua área plantada em relação à safra anterior. Com uma produtividade estimada em 4.064 kg/ha um aumento de 6% da safra anterior, a produção total da região ficará entre 1.073,4 mil toneladas de arroz um aumento de 5,5%, o cultivo de lavouras de soca ou rebrota, a ocorrência de vendavais junto com a chegada do frio prejudicando o desenvolvimento dessas lavouras, impossibilitando o aumento da produtividade (CONAB, 2017).

No Tocantins, o arroz é cultivado em dois sistemas, sequeiro e irrigado. Na safra 2016/2017 houve um decréscimo de 0,8% da área plantada. A cultura está próxima do fechamento do seu ciclo, apresentando 76,3% da área cultivada já colhida e o restante praticamente todo já em maturação. Apesar do registro de ocorrência de Brusone, causada pelo

fungo *Pyricularia oryzae* esta doença se manifesta desde os estádios iniciais de desenvolvimento até a fase final de produção de grãos, em janeiro, a expectativa é de que não haja redução significativa na produtividade, graças também ao bom comportamento do clima em fevereiro e março. Com uma produtividade estimada em 5.117 kg/ha, apresentará um aumento de 10,5% em relação à safra anterior, caracterizando uma produção total de 673,9 mil toneladas. A Figura 2 demonstra o mapeamento da produção de arroz no Tocantins (CONAB, 2017).

**Figura 2** - Mapeamento do arroz irrigado em Tocantins - Safra 2014/15.



Fonte: (CONAB, 2015).

O volume da produção de arroz no Tocantins é suficiente para abastecer a demanda do estado e gerar excedentes. Somado a isso, o estado recebe arroz produzido por outras regiões próximas. Em contrapartida, um fator leva à importação de arroz pelas indústrias no estado, a redução de oferta em meses após a colheita. A redução de oferta se justifica pela baixa capacidade de armazenamento. Essa oscilação de oferta é um dos fatores que explica a

ociosidade da capacidade instalada para beneficiamento. Ressalta-se, que nos últimos anos a qualidade do arroz, em geral, produzido no Tocantins melhorou, porém, para ser mais competitivo em mercados mais exigentes, ainda melhorias na cadeia produtiva devem ser feitas.

### 3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS

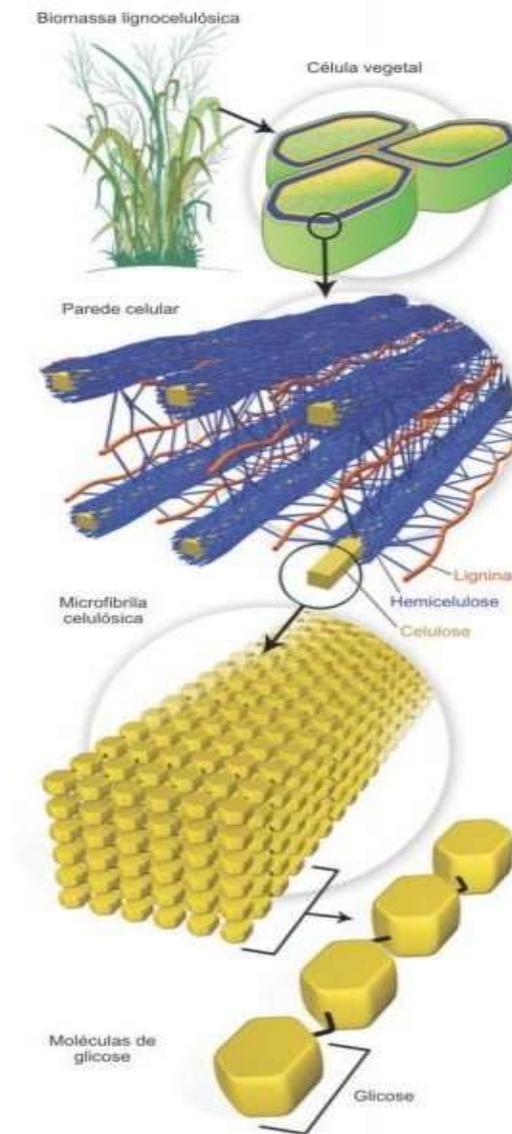
A agroindústria é um dos principais segmentos da economia brasileira, com importância tanto no abastecimento interno como no externo. Na década de 70, a agroindústria chegou a contribuir com 70% das vendas externas brasileiras. Atualmente, essa participação está em torno de 40%, não só pela diversificação da pauta de exportações, mas também pela tendência à queda dos preços das *commodities* agrícolas nos últimos 20 anos (BARROS, 2014).

De acordo com Ferreira-Leitão et al. (2010), utilizar materiais lignocelulósicos provenientes de resíduos agroindustriais para produção de energia, contribuem para solucionar problemas de acúmulo de resíduos e evita a poluição no solo e na água.

O Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo bioprocessamento representa um processo de interesse econômico e social. Neste contexto, os resíduos de usinas de açúcar e álcool e unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas de cereais, de milho, de trigo, cascas de arroz e de aveia, dentre outros, são potenciais fontes de matéria-prima para fermentação.

Os materiais lignocelulósicos constituem como uma biomassa bastante abundante neste planeta, sendo assim, de interesse comercial para produzir biocombustíveis. São compostos basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (RABELO, 2010). A Figura 3, demonstra a estrutura química de matérias lignocelulósicas.

**Figura 3** – Estrutura química de material lignocelulósico.



Fonte:(SANTOS et al., 2012).

Diversos processos são desenvolvidos para o aproveitamento desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como as enzimas, os ácidos orgânicos, os aminoácidos, entre outros (MENEZES et al., 2009). A Tabela 1, mostra alguns materiais lignocelulósicos com potenciais para produção de etanol de segunda geração.

**Tabela 1** – Composição química de Materiais Lignocelulósicos.

<b>Material Lignocelulósico</b>	<b>%Celulose</b>	<b>%Hemicelulose</b>	<b>%Lignina</b>
Palha de Cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de Cana	32-48	19-24	23-32
Madeira	43-47	25-35	16-24
Espiga de Milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de Trigo	30	50	15
Fibra de babaneira	60-65	6-8	5-10
Palha de Cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: (SANTOS et al., 2012).

A produção de etanol proveniente de materiais lignocelulósicos é referido como etanol de segunda geração ou bioetanol, cujo o bioprocessamento é umas das promissoras tecnologias em desenvolvimento na produção dos biocombustíveis (BASTOS, 2007).

### 3.4 CASCA DE ARROZ

Dentre os mais diversos resíduos agroindustriais lignocelulósicos, a casca do arroz é um dos mais abundantes, com baixo valor comercial e disponível para utilização na produção de biocombustíveis (MONTIPÓ et al., 2013).

Na indústria de beneficiamento do arroz, a casca corresponde em média a 20-33% do peso total do grão. Estima-se, uma geração de 123,69 milhões de toneladas anual em todo o planeta. A casca apresenta alta dureza, fibrosidade e é abrasiva, tem baixo teor nutritiva, alta resistência ao desgaste e muitas cinzas. Por tais consequências, nos últimos anos tem se direcionado pesquisas utilizando a casca de arroz já que existe em grande quantidade e é livre de utilização (DELLA et al., 2001; DIEP et al., 2015; JOHAR et al., 2012; SAHA e COTTA, 2008).

A composição da casca de arroz apresenta um intervalo no teor de cinzas entre 13 - 21%, dentre essa faixa 80 - 90% correspondem de sílica e o restante por outros compostos inorgânicos, a concentração de celulose varia entre 40 - 60%. Este material lignocelulósico é amplamente disponível e possui um custo baixo (HUANG et al., 2013; PINTO e CALLONI, 2013; SHI et al., 2013). A variação da composição química Tabela 2 depende de alguns fatores, como as condições de solo e clima durante o cultivo e da variedade de arroz.

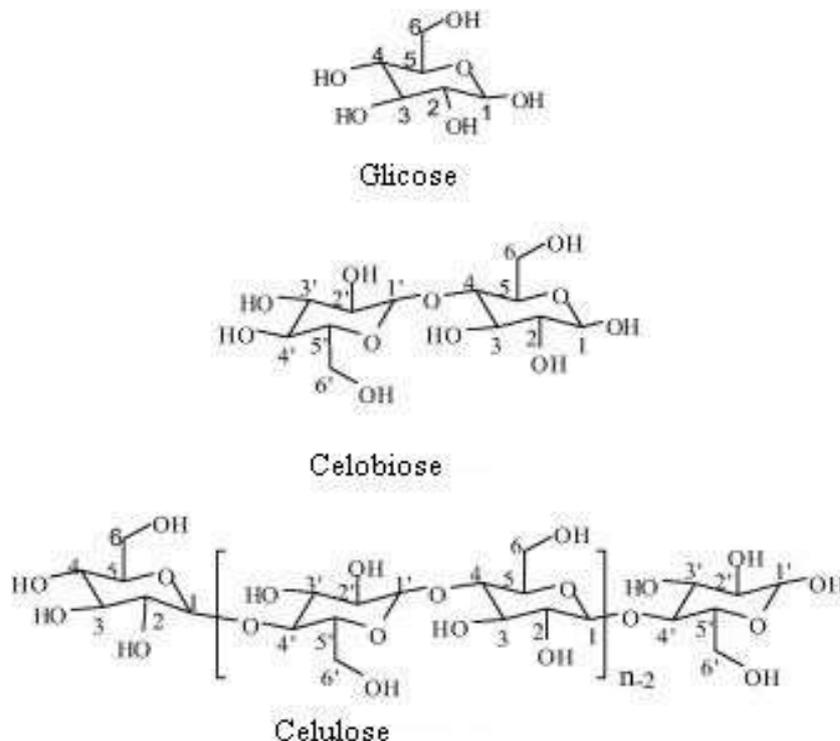
**Tabela 2** – Composição química dos produtos da indústria de arroz.

Componentes	Casca de arroz (REYES et al., 1998)	Casca do Arroz (SAHA e COTTA, 2008)	Casca de arroz (HICKERT, 2010)	Casca de Arroz(JOHAR, 2012)
Celulose (%)	38,4	35	35	35
Hemicelulose (%)	23,7	12	13	33
Lignina Total (%)	29,4	15	29	23
Cinzas (%)	8,5	6	16,9	25

### 3.5 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

#### 3.5.1 Celulose

A principal estrutura presente em materiais lignocelulósicos é a celulose. A Figura 4, demonstra quimicamente este homopolissacarídeo como sendo um polímero linear e cristalino, unidos por várias moléculas de glicose unidas por ligações  $\beta$ -D-1-4 glicosídicas com uma unidade básica de celobiose que se repete (ARANTES e SADDLER, 2010).

**Figura 4** – Representação das moléculas de glicose, celobiose e do polímero de celulose.

Fonte: Adaptado de (SUHAS et al., 2016).

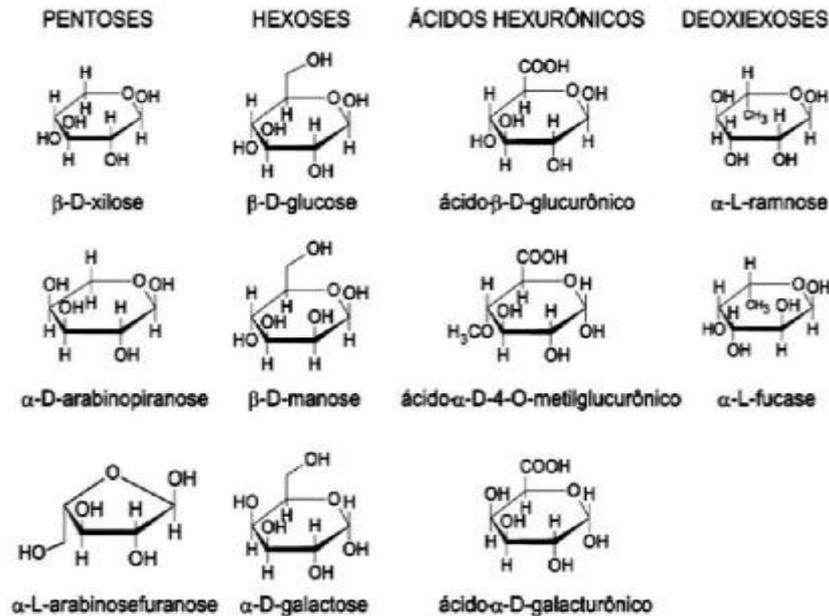
Em relação as estruturas da cadeia de celulose, as mesmas se ligam por interações intermoleculares de hidrogênio entre o oxigênio do anel e o grupamento hidroxila na posição 3, entre as hidroxilas dos carbonos 2 e 6 e entre as hidroxilas dos carbonos 3 e 6. A formação dessas ligações tem um importante efeito na reatividade que apresentam as fibras celulósicas. Sendo assim, esta macromolécula apresenta regiões cristalinas ordenadas e menos ordenadas ou simplesmente amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (aleatória). As zonas que apresentam elevada cristalinidade conferem proteção à célula e constituem uma barreira tornando difícil a inserção por solventes e reagentes, por um outro lado, as zonas amorfas são acessíveis e mais susceptíveis à degradação através dos pré tratamentos (FARINAS, 2011; FUENTES, 2009).

Por fim, a celulose em si, apresenta uma simplicidade química, além disso existe uma complexa gama de formas físicas de celulose principalmente no que diz respeito a diversidade de origem e aos processamentos tecnológicos subsequentes que o material celulósico seja sujeito. A caracterização da celulose inclui o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e a cristalinidade, sendo todos relevantes para o processo de hidrólise (RABELO, 2010).

### **3.5.2 Hemicelulose**

A hemicelulose é composta por cadeias ramificadas de açúcares de pentoses, como xilose e arabinose, e hexoses, como glicose, manose e galactose. Estes diferentes açúcares agregam complexidade à parede celular e assim necessita de enzimas específicas para auxiliar no processo de hidrólise. Além disso, contém ainda, ácidos hexurônicos e deoxiexoses como mostra a Figura 5 (KOOTSTRA et al., 2009; LIMAYEM e RICKE, 2012).

**Figura 5** - Componentes da fração hemicelulose



Fonte: (MORAIS *et al.*, 2005).

Também conhecida como heteropolissacarídeos, são estruturalmente mais semelhantes à celulose do que à lignina. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado, formando ligações de hidrogênio com celulose, ligações covalentes com a lignina e ligações éster com unidades de acetil e ácidos hexurônicos. Em materiais lignocelulósicos, a quantidade de hemicelulose encontrada nos tecidos vegetais pode variar em função da espécie, do estágio de crescimento e das condições ambientais. As fórmulas gerais são  $(C_5H_8O_4)_n$  e  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , que são as pentoses e hexoses, respectivamente. Comparadas com a celulose, são relativamente mais fáceis de hidrolisar devido à sua estrutura amorfa, e ramificada, bem como o seu menor peso molecular (LIMAYEM e RICKE, 2012; SANTOS *et al.*, 2012).

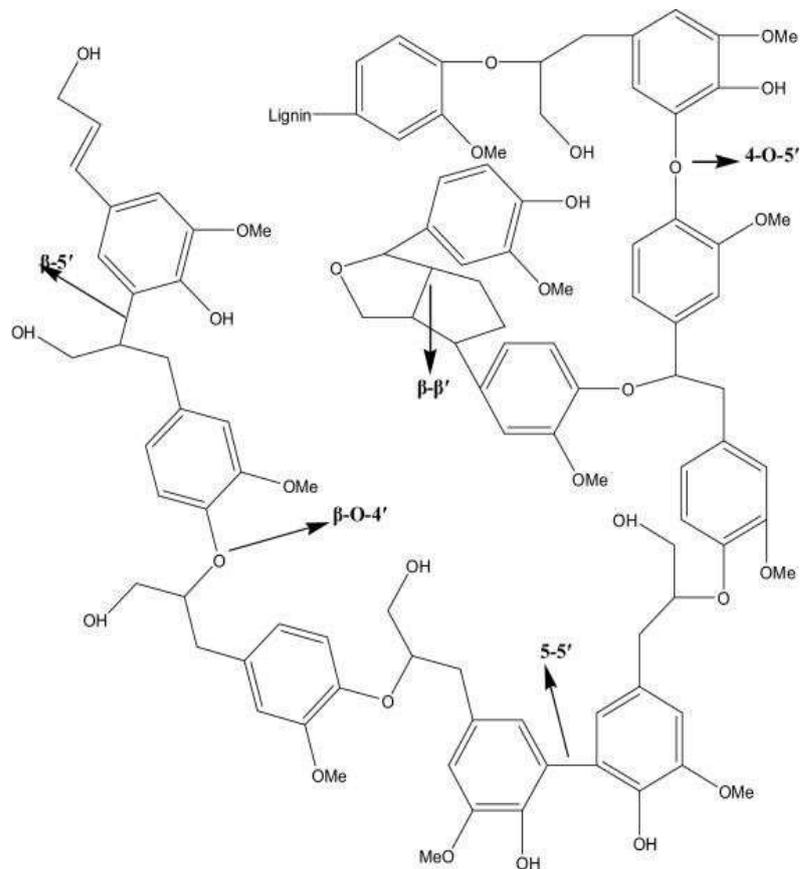
As hemiceluloses são relativamente sensíveis às condições de operação/tratamento, por conseguinte, variáveis como a temperatura e tempo têm de ser controlados para evitar a formação de co-produtos, potencialmente formadores de inibidores, tais como furfural, ácido acético e hidroximetilfurfural e quando não controlados diminuem a eficiência das demais etapas, como hidrólise e fermentação (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013).

### 3.5.3 Lignina

A lignina, Figura 6, é um dos polímeros orgânicos mais abundantes e importantes da natureza forma ligações covalentes com unidades monossacarídicas da hemicelulose, age no

enrijecimento e como barreira contra a degradação microbiana da parede celular. É uma macromolécula polifenólica amorfa com estrutura heterógena tridimensional, baseada em álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico. Possui um importante papel biológico em reter a hidrólise enzimática e impedir contaminação por patógenos, em suma, quanto maior a proporção de lignina na biomassa, sua resistência à degradação química e enzimática serão maiores (FORSYTHE et al., 2013; YUNPU et al., 2015; TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

**Figura 6** – Representação da estrutura de lignina.



Fonte: Adaptado de (YUNPU et al., 2015).

A interação entre a lignina, celulose e hemicelulose determinam a estrutura completa da parede celular dos materiais lignocelulósicos. Um outro fator importante é o que diz a respeito da composição e a organização dos constituintes da lignina que variam de uma espécie para outra, dependendo também da matriz de celulose e hemicelulose. Como já dito, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas e, conseqüentemente, para produção de bioetanol, influenciam na quantidade de enzimas requerida para a hidrólise, somado a isso, dificultam na recuperação das enzimas após a hidrólise. Por isso, um pré tratamento eficiente deve ser realizado a fim de remover a lignina e manter a eficiência dos demais processos (SANTOS et al., 2012).

#### **3.5.4 Outros Compostos**

Existem outras substâncias presentes nos materiais lignocelulósicos que não são parte da parede celular. Incluem uma diversidade de compostos como os terpenos, que são polímeros de isopreno, as resinas, que incluem grande variedade de compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, álcoois, resinas ácidas, fitosterol, e os fenóis, que apresentam como representante principal os taninos. Dentro desta fração de extraíveis, podem-se incluir carboidratos de baixo peso molecular, alcalóides e lignina solúvel. Essas frações extraíveis são compostos que proporcionam reserva energética e proteção as plantas contra o ataque de microrganismos e possíveis insetos, porém têm um efeito inibitório nos processos de conversão do material (KLINKE et al., 2004; SILVA, 2009).

Outros compostos presentes também são as frações não extraíveis, como cinzas, resíduos inorgânicos, principalmente carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos, que permanecem depois da queima do substrato a elevadas temperaturas (PEREIRA RAMOS, 2003).

### **3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO**

A umidade é representada como o teor de água presente no material lignocelulósico. As formas mais comuns de determinação envolvem o aquecimento do material em uma estufa, por um tempo suficiente para ocorrer a total evaporação. Medindo-se, a massa do material antes e depois da secagem, pode-se determinar o teor percentual de água na amostra, ou seja, a umidade. A determinação do teor de cinzas é feita com o intuito de ser um indicador da quantidade de minerais e possíveis adulterações do material lignocelulósico com compostos inorgânicos, que possam ter sido ocasionados através de contato do material lignocelulósico

com algum possível contaminante ou até mesmo adicionados propositalmente durante alguma etapa de processamento do material lignocelulósico (ANTUNES et al., 2006).

Os extrativos podem ser extraídos de materiais lignocelulósicos, tanto por solventes polares quanto por apolares, que não são componentes estruturais da parede celular, incluem-se vários compostos de baixa ou de média massa molecular, como, alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água), ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas, esteroides, glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) e compostos fenólicos (PINO et al., 2007; SILVÉRIO et al., 2006).

O termo holocelulose é usado para determinar o teor dos carboidratos totais presentes em um material lignocelulósico, ou seja, engloba os valores da celulose e dos demais carboidratos, notadamente as pentoses, denominados em conjunto como hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

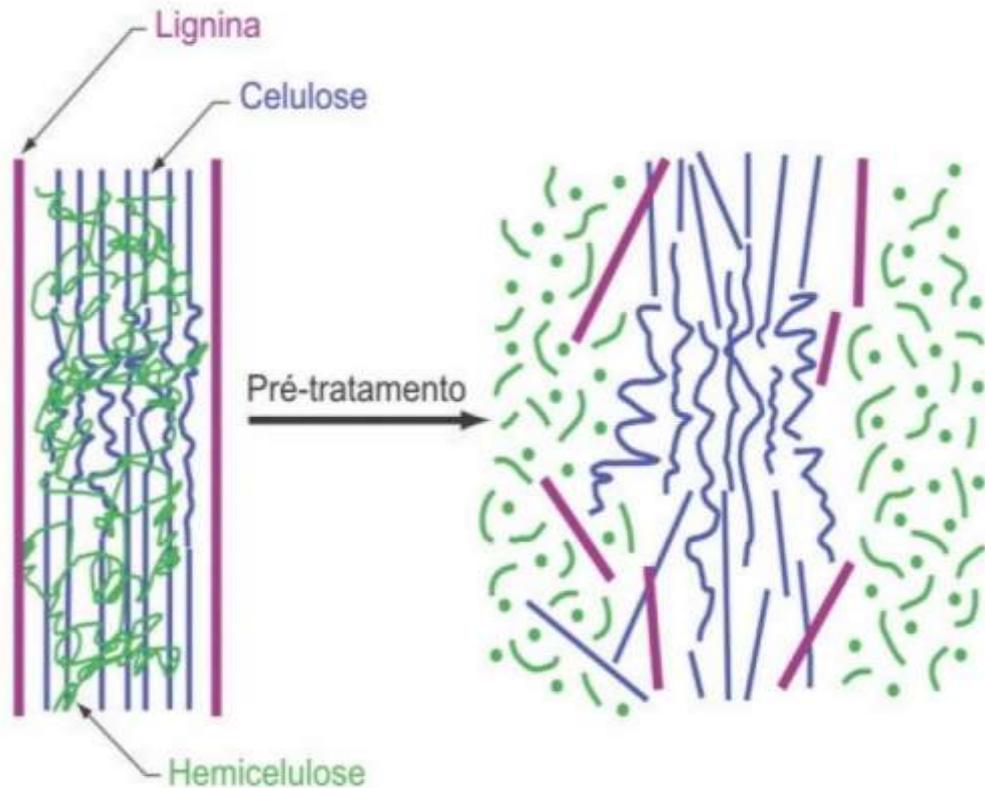
Segundo a definição da norma TAPPI T 203 cm-99 (2009), alfacelulose é a celulose não degradada, betacelulose é a celulose degradada, e gamacelulose é, principalmente, hemicelulose. Comumente, em vez de se determinar, também, o valor da betacelulose, para então se calcular o valor da hemicelulose, considera-se apenas a diferença entre os valores de holocelulose e de alfacelulose.

### **3.7 PRÉ – TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO**

Um dos gargalos para utilização dos materiais lignocelulósicos está na barreira formada pela lignina, uma vez que esta etapa unitária auxilia no fracionamento da lignina facilitando assim a atividade enzimática (GRAY et al., 2006).

As técnicas para o pré-tratamento são feitas por processos mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou a combinação dos mesmos. Estas técnicas tem a obrigação em solubilizar e separar um ou mais componentes do material lignocelulósico, ou seja, separar a lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade da celulose, favorecendo as etapas seguintes para produção de etanol. O esquema de remoção é mostrado na Figura 7 (LIMAYEM e RICKE, 2012; YANG e WYMAN, 2008).

**Figura 7** – Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré tratamento.



Fonte:(SANTOS et al., 2012).

Segundo os autores Limayem e Ricke (2012), os pré-tratamentos dependem de suas biomassas para escolha do método mais adequado, por exemplo, resíduos agrícolas requerem menos ações termoquímicas devido a sua composição menos densa do que resíduos lenhosos. Para isso um efetivo pré-tratamento deve primordialmente deslignificar (remover a lignina) a biomassa, liberar açúcares fermentescíveis, evitar a degradação dos carboidratos, não formar subprodutos tóxicos e ser de baixo custo (MARIA et al., 2011).

Dentre os tipos de pré-tratamentos mais empregados, estão os químicos, principalmente utilizando ácido sulfúrico. Este processo, hidrolisa os polissacarídeos a monossacarídeos, facilitando a acessibilidade das enzimas à celulose. Contudo, sua toxicidade, corrosão de equipamentos, formação de inibidores (ácido acético, hidroximetilfurfural, dentre outros) e a degradação da glicose são alguns dos problemas que podem inviabilizar a aplicação deste processo. A explosão a vapor é também muito utilizada, este processo é rápido e envolve a separação dos componentes estruturais da biomassa pelo vapor quente, devido à descompressão e evaporação da umidade, causa assim, a ruptura da estrutura física da biomassa, favorecendo a etapa de hidrólise enzimática (MOOD et al., 2013).

De acordo com a literatura, o pré-tratamentos físicos e químicos combinados tem sido apontado com um dos mais eficientes, principalmente com a utilização de hidróxido de sódio na etapa química. É um processo utilizado a bastante tempo, principalmente nas indústrias de papel e celulose (PITARELO, 2007; ADEL et al., 2011). Na Tabela 3, observa-se alguns dos principais pré-tratamentos consolidados na literatura.

Tabela 3 – Tipos de pré-tratamentos.

Tecnologia de Pré-tratamento	Tipos de Pré-Tratamento	Características			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moagem	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução da Cristalinidade	Alto consumo de Energia
	Ácido	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produções de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
Químico	Básico	Inchaço significativo	Considerável solubilidade	Considerável solubilidade	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	Organosolvente	Inchaço significativo	Quase completa remoção	Quase completa remoção	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Baixa solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Reagente caro
Físico-Químico	Explosão à vapor	Baixa despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	Explosão de amônia	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina
Biológico	Fungos	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	Próximo de 40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise

Fontes: (MOOD et al., 2013; HAMELINCK; VAN HOOIJDONK e FAAIJ, 2005; IBRAHIM, 2012; MOSIER et al., 2005; RABELO et al., 2009; ROCHA et al., 2011; WAN; LI, 2012).

### 3.7.1 Pré – Tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico consiste na utilização da água sob alta temperatura (em torno de 180 °C a 240 °C) e pressão. As combinações desses fatores provocam um aumento da força iônica da água. Sendo assim, a água sob elevada pressão consegue penetrar na estrutura celular do material lignocelulósico, hidratar a celulose e remover a hemicelulose (ROGALINSKI et al., 2008).

A utilização da água sob elevadas temperaturas e pressão favorece com que o pré-tratamento hidrotérmico promova a clivagem das ligações das estruturas da parede celular, lignina, celulose e hemicelulose, causando a ruptura das ligações glicosídicas da celulose e hemicelulose, principalmente das hemiceluloses. O ácido acético é então formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica e atuará como catalisador da reação da hidrólise do material lignocelulósico promovendo a despolimerização da hemicelulose. Por tais razões, é considerado como um dos métodos mais promissores e eficientes de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.

### 3.7.2 Pré-Tratamento Básico/Alcalino

A presença da lignina reduz a eficiência da hidrólise enzimática, além também, de obrigar o aumento da carga enzimática para efeitos melhores de hidrólise o que encarece o processo. A lignina em si, atua como uma barreira física impedindo o acesso a celulose. Por tais razões, torna-se importante um pré-tratamento que remova a parte da lignina do material lignocelulósico (PAN et al., 2005).

Este pré-tratamento, assim como os demais, atua no processo de remoção da lignina nos materiais lignocelulósicos. Um outro fator é que, os pré-tratamentos básicos, removem também grupos acetil e ácido urônico da cadeia da xilana, favorecendo a susceptibilidade da xilose ao ataque enzimático. O pré-tratamento alcalino não hidrolisa a hemicelulose mas causam um inchaço, aumentam a área de superfície interna, diminuem a cristalinidade e estimulam a quebra das ligações estruturais que ligam a lignina e os carboidratos, o que traz um aumento na digestibilidade enzimática do material (BALAT, 2008; HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

Este tipo de método, utiliza valores baixos de pressão e temperatura se comparado com outras tecnologias de pré-tratamentos. Uma outra aplicabilidade é que pode também ser processado em condições ambientes, porém é exigido um longo período. O pré-tratamento alcalino, como desvantagem, tem o custo com reagentes, pois dependendo do material lignocelulósico pode ser necessário uma elevada quantidade de reagente, o que exige uma etapa

de recuperação. Porém, um estudo recente mostrou que o hidróxido de sódio pode ser reutilizado em novos pré-tratamentos, e assim contribuir para que o processo se torne mais econômico e viável (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; MOSIER et al., 2005; PALLAPOLU et al., 2011; ROCHA et al., 2014).

### 3.8 ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia na região do infravermelho (também chamada de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) fundamenta-se, na absorção de radiação infravermelha por moléculas do material. Trata-se de uma ferramenta importante para a investigação de grupos funcionais, elucidação estrutural e identificação de um dado material, que pode ser orgânico (material lignocelulósico) ou até mesmo inorgânico. Esta técnica é possível devido ao fato dos átomos que formam a molécula interagirem entre si proporcionando vibrações intramoleculares, o que variam de acordo com a estrutura, composição e os diferentes modos de vibração. Para varrer essa gama de frequência das vibrações, utiliza-se o infravermelho. Por tais razões, a espectroscopia na região do infravermelho tem sido apresentada na literatura como uma ferramenta poderosa na análise de materiais lignocelulósicos (ALVES, 2011).

Dentro desta avaliação é possível plotar um gráfico de intensidade de radiação *versus* frequência do espectro de infravermelho e caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido proporcionando uma investigação das mudanças estruturais da casca de arroz em função do pré-tratamento escolhido para este trabalho.

### 3.9 HIDRÓLISE

Após a etapa de pré-tratamento responsável por remover a lignina do processo e deixar acessível a celulose, ocorrerá o processo de hidrólise. Nesta etapa haverá a liberação de açúcares através do uso de ácido (concentrado ou diluído) ou por enzimas. A hidrólise enzimática, quando comparada com a hidrólise ácida, é compatível com uma diversidade de variedades de biomassas. As celulasas são a chave para produção do etanol lignocelulósico. Devido à sua maior produção de açúcar e sua magnitude ser de menor impacto ambiental, a hidrólise enzimática é mais atrativa do que a ácida (PEREIRA, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). A diferença entre a hidrólise ácida e enzimática se encontra na Tabela 4.

**Tabela 4** - Hidrólise Ácida versus. Enzimática.

<b>Parâmetros</b>	<b>Hidrólise Ácida</b>	<b>Hidrólise Enzimática</b>
Tempo	Rápida (minutos)	Lenta (horas)
Temperatura	Alta (200° C)	Baixa (45°)
Pressão	Alta	Atmosférica
Rendimento	50-90%	75-95%
Subprodutos	Possível formação	Não há formação

Fontes: (CANILHA et al., 2012; HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; HARI KRISHNA et al., 2000).

No processo de hidrólise enzimática, as enzimas, celulasas, são utilizadas como catalisadores para hidrolisar as cadeias de celulose até o produto final de interesse, a glicose. Ao contrário dos catalisadores comuns, a conversão da celulose em glicose por via enzimática apresenta uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação. Estes fatores justificam o fato deste processo ter se tornado cada vez mais popular como integrante da tecnologia de conversão de biomassa em biocombustível (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

### 3.9.1 Hidrólise Enzimática

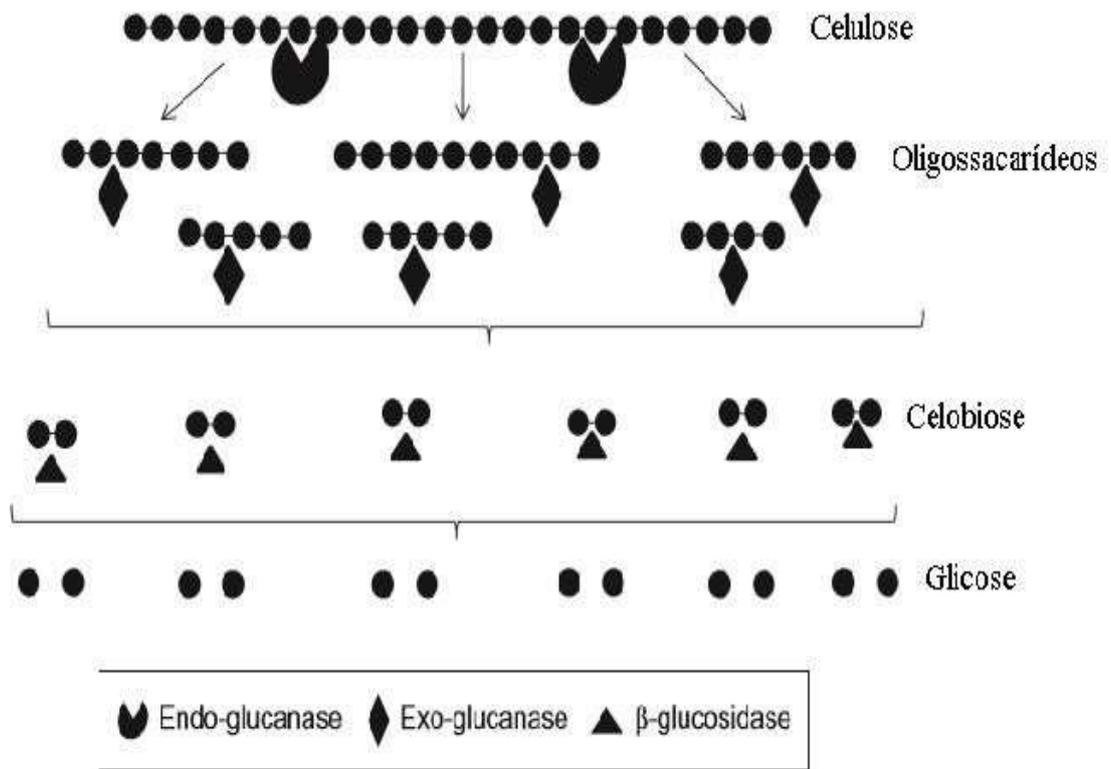
As enzimas celulasas são produzidas tanto por fungos quanto por bactérias, apesar de produzirem celulasas de alta atividade, as bactérias possuem uma taxa de crescimento baixa com condições especiais de crescimento, por isso que as pesquisas para produção comercial das enzimas têm sido com a utilização de fungos. Os principais gêneros são *Trichoderma* e *Aspergillus*. O *Trichoderma reesei*, é o mais importante, sendo um fungo filamentosos e mesofílico, responsável na ação de hidrólise em três principais classes de conversão da celulose em glicose que são a endo- $\beta$ -(1,4)-glucanases, exo- $\beta$ -(1,4)-glucanases e  $\beta$ -(1,4)-glucosidades (COUGHLAN, 1985; SINGH et al., 2014; SUN e CHENG, 2002).

As celulasas não hidrolisam a celulose de modo muito harmônico, para que isso ocorra, é necessária uma atuação sinérgica, onde o rendimento da etapa hidrolítica seja eficaz. Sendo assim, tem-se o conhecimento de três formas do processo hidrolítico sinérgicos: 1) ocorre a adsorção das celulasas na superfície da celulose, 2) a conversão por biodegradação da celulose em açúcares simples (pentoses e hexoses), 3) dessorção da celulase (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; SILVA, 2010).

Há diversos fatores que influenciam a eficiência da hidrólise enzimática, mas os principais fatores que afetam estão na enzima ou substrato, ou uma associação de ambos. Com o objetivo de solucionar este problema, vários estudos estão sendo traçados a fim de aumentar a eficiência enzimática (ALVIRA et al., 2010).

No processo da hidrólise enzimática a celulose é atacada por sistemas de enzimas extracelulares, que resulta primeiramente da interação sinérgica entre a endo- $\beta$ -(1,4)-glucanases e exo- $\beta$ -(1,4)-glucanases (celobiohidrolases) para o rendimento da celobiose que é posteriormente clivada para glicose pela  $\beta$ -(1,4)-glucosidades. As endoglucanases atuam randomicamente para hidrolisar a celulose amorfa e solubilizar derivados deste homopolissacarídeo. Essa reação envolve a clivagem das ligações  $\beta$ -(1,4)-glucosidades com uma pequena liberação de açúcares redutores. Por sua vez, celobiohidrolases, atacam a celulose por ambos os finais, redutor e não redutor, da cadeia de celulose. Finalmente, as  $\beta$ -glucosidases completam o processo de hidrólise catalisando a hidrólise de resíduos de celobiose em glicose, ou removendo resíduos glicosil do final não redutor de celooligossacarídeos solúveis, oligômeros, Figura 8 (WATANABE e TOKUDA, 2010).

**Figura 8** – Mecanismo de ação da celulase.



Fonte adaptada de (BINOD et al., 2011).

As hemicelulases são enzimas importantes na degradação das hemiceluloses, permitindo que as fibras de celulose se tornem mais acessíveis. Por ter uma alta complexidade estrutural, várias enzimas são requeridas para a degradação da hemicelulose, dentre elas, algumas como  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glucuronidase,  $\alpha$ -D-galactosidase e acetil-xilano-esterase atuam nas cadeias laterais. Após a liberação, das cadeias laterais, a cadeia principal composta por xilana pode ser clivada por xilanasas e  $\beta$ -xilosidases. As xilanasas são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da xilose. A endo-1,4- $\beta$ -xilanasase despolimeriza a xilose pela hidrólise aleatória, enquanto a  $\beta$ -xilosidase hidrolisa pequenos oligossacarídeos em xilose livre. Dessa forma, a ação conjunta de celulases e hemicelulases torna a hidrólise de materiais lignocelulósicos mais eficaz com maior rendimento em monossacarídeos livres (FARINAS, 2011; GÍRIO et al., 2010; RYABOVA et al., 2009).

### 3.9.2 Enzimas Comerciais

O desenvolvimento na produção enzimática comercial, intensifica-se cada dia mais e busca melhorar a produção e a qualidade de enzimas celulósicas comerciais, seja pela seleção de melhores cepas, pelo aperfeiçoamento de linhagens comerciais por engenharia genética, ou pelo desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes. Grandes empresas em biotecnologia têm investido no melhoramento de linhagens produtoras de celulasas com o objetivo de reduzir os custos dessas enzimas, dentre elas, se destaca a Novozymes. Com o melhoramento das linhagens o custo foi reduzido de aproximadamente US\$ 5,40 para US\$ 0,20 / galão de etanol (MOREIRA, 2005).

As características dos complexos enzimáticos Cellic® CTec2/HTec2. A Cellic® CTec2/HTec2 são um *blend* de enzimas de alto nível de conversão, tolerantes a inibidores, compatíveis com diversas biomassas lignocelulósicas. Sua maior característica é, utilizar dosagens pequenas de enzima, viabilizando a produção de etanol e otimizando o processo industrial (NOVOZYMES, 2012).

As enzimas dependem de parâmetros específicos para atuarem de forma otimizada, tais parâmetros como, intensidade e tipo de agitação, relação Enzima *versus*. Substrato, fator de diluição, carga enzimática, temperatura e pH da reação. Algumas variáveis já são otimizadas pelo próprio fabricante. Contudo, as demais necessitam de estudos mais profundos a fim de buscar um ótimo do processo. A Tabela 5, descreve as características da Cellic® Ctec2/HTec2.

**Tabela 5** – Descrição das características da Cellic® CTec2 e HTec2.

<b>Produto</b>	<b>Cellic® CTec2</b>	<b>Cellic® HTec2</b>
Especificações técnicas	Complexo de celulase para degradação da celulose em açúcares fermentescíveis	Endoxilanase com alta especificidade para hemicelulose solúvel
	Um <i>blend</i> de celulases agressivas, alto nível de $\beta$ -glicosidades, hemicelulases	Percentual de celulase
Características	<u>Alta eficiência de conversão</u>	Pode melhorar a hidrólise da celulose quando combinada com CTec2
	Eficiente para alta concentração de sólidos	
	Tolerante a inibidores	Utilizável para substratos com pré - tratamento ácido/básico
	Compatível com vários tipos de biomassa e pré-tratamento	
	Alta concentração e estabilidade	Converte hemicelulose em açúcares fermentescíveis
Benefícios	Até menos de 50% de dosagem de enzimas	Até menos de 20% de dosagem de enzimas
	Baixas operações e custo de capital	Aumenta os rendimentos de etanol
	Altos carregamentos de sólidos e aumenta os rendimentos de etanol	Proporciona o aumento e a flexibilidade dos processos de pré - tratamento

Fonte: Adaptada de (NOVOZYMES, 2012).

### 3.10 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A Cromatografia é um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, a fase móvel e a estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna esta técnica extremamente versátil e de grande aplicação. Os avanços na instrumentação para cromatografia têm permitido análises mais rápidas e precisas, culminando com o aumento da produtividade dessa técnica e a sua aplicação em problemas mais complexo (GUILLARME et al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica instrumental que pode ser utilizada para a separação de carboidratos em uma mistura complexa. Sabe-se que carboidratos exibem uma fraca absorbância na região do espectro eletromagnético, mesmo na região do ultravioleta e medições com detector de índice de refração podem ser feitas para

quantificação de açúcares. O sistema de CLAE, na sigla em inglês `HPLC` é composto por um conjunto de equipamentos especiais: reservatório e sistema de bombeamento de fase móvel, amostrador (injetor manual ou automático), sistema analítico/forno (coluna cromatográfica – fase estacionária), sistema de detecção, sistema de registro e tratamento de dados. O objetivo principal da cromatografia é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Possui a vantagem por ser uma técnica simples porém com um custo elevado, rapidez nos resultados de análises e utiliza quantidades pequenas de amostra para avaliação (DA SILVA, 2012).

### 3.11 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

As utilizações de planejamento de experimentos vêm sendo aplicada como uma ferramenta para verificar o funcionamento de sistemas ou processos, permitindo a melhorias destes, como a redução na variabilidade e conformidade próximas do resultado desejado, além de diminuição no tempo de processo e, conseqüentemente, nos custos operacionais. A utilização de planejamentos experimentais que estejam embasados em fundamentos estatísticos proporciona aos pesquisadores a obtenção de um número máximo de informações do sistema em estudo, a partir de um número mínimo de experimentos.

O DOE (*Desing of Experiments*) foi desenvolvido na década de 1920 pelo Sir R. A. Fisher, na *Rothamsted Agricultural Field Research Station*, em Londres, Reino Unido. A partir do desenvolvimento de Fisher a técnica passou a ser introduzido e aplicada na agricultura, por tais razões, muitas pesquisas e desenvolvimento do DOE foram realizados, principalmente, na indústria química. O Fisher sistematicamente introduziu pensamentos e princípios estatísticos dentro da investigação do planejamento de experimentos, incluindo o conceito de planejamento fatorial e a análise da variância. Apesar de as aplicações de planejamento estatístico na indústria terem começado em 1930, essa metodologia se tornou mais conhecida na década de 50, através do estudo sobre superfície de resposta, desenvolvido por Box e Wilson (CALADO e MONTGOMERY, 2003; ROWLANDS e ANTONY, 2003).

Para Rodrigues e Iemma (2014), o planejamento experimental, baseado nos fundamentos estatísticos, é sem dúvida alguma uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolvimento da formulação de produtos dentro das

especificações desejadas ou simplesmente para avaliar efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas.

Para usar a metodologia de planejamento de experimentos, é necessário que todos os envolvidos no experimento tenham compreensão de como os dados serão analisados. Para tanto, deve-se elaborar um procedimento, podendo utilizar as diretrizes descritas a seguir, propostas por Calado e Montgomery (2003).

- Análise do processo no todo.
- Escolha dos fatores (variáveis independentes) e dos níveis (mínimos e máximos) que serão avaliados.
- Seleção das variáveis resposta (variáveis dependentes).
- Escolha do planejamento experimental mais adequado (Delineamento Composto Central Rotacional, Delineamento Fatorial Completo/Fracionado, Delineamento de Plackett-Burman, Delineamento de Box - Behnken).
- Realização dos ensaios conforme indicado pelo delineamento experimental.
- Análise dos dados (Modelo Obtido, Análise de Variância/ANOVA, Superfície de Respostas e Curvas de Contorno).
- Conclusões e Recomendações.

A técnica também apresenta algumas limitações que devem ser consideradas:

- Grandes variações dos fatores podem resultar em falsos resultados.
- Os fatores críticos não foram especificados corretamente.
- A região de ótimo pode não ser determinada devido ao uso de uma faixa muito estreita ou ampla.
- Como em qualquer experimento, resultados distorcidos podem ser obtidos se os princípios clássicos da experimentação não forem seguidos (casualização, repetição e controle local, os dois primeiros de forma obrigatória).
- Superestimar a computação, o pesquisador deve utilizar de bom senso, das suas revisões bibliográficas e de seu conhecimento sobre o processo para chegar a conclusões apropriadas a seus dados.

Um dos métodos de avaliação do planejamento experimental é a análise e otimização de superfícies de resposta. Obtêm-se, assim, relações entre uma ou mais respostas de interesse, que são medidas analíticas, e um determinado número de fatores, que são controlados e

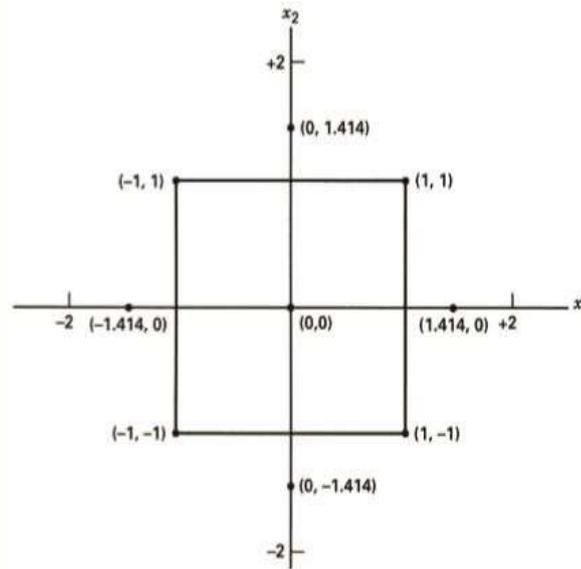
influenciam a resposta do processo. Desta forma, este estudo permite que se verifique, quantifique e otimize esta influência, sendo possível a obtenção das melhores condições para realização de determinado processo e/ou para a obtenção de um produto com as características desejadas (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Com os resultados obtidos no planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, especificar os efeitos mais significativos e ajustar um modelo linear, de primeira ordem, ou um modelo quadrático, de segunda ordem, correlacionando as variáveis de entrada e as respostas. Dentre as vantagens da metodologia de superfície de resposta, a principal é que seus resultados são resistentes aos impactos de condições não ideais, como erros aleatórios e pontos influentes, isso se dá devido a metodologia ser robusta. Outra vantagem é a simplicidade analítica da superfície de resposta obtida, pois a metodologia gera polinômios. Após o ajuste do modelo aos dados, é possível estimar a sensibilidade da resposta aos fatores, além de determinar os níveis dos fatores nos quais a resposta apresenta valor de máximo ou mínimo (XU et al., 2003).

### **3.11.1 Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR)**

O experimento composto central rotacional é o mais popular dentre os planejamentos de experimentos de segunda ordem. Basicamente, estes experimentos são compostos de um ponto central, que será executado com réplicas e de pontos axiais. Este delineamento pode ser utilizado quando se deseja verificar a curvatura de um plano, ou seja, verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão. É utilizado para experimentos onde  $k$  (fatores/variáveis independentes)  $\geq 2$ . Este delineamento contém pontos da parte cúbica codificados para  $(\pm 1)$ , pontos axiais codificados para  $(\pm \alpha, \text{onde } \alpha = (2^k)^{1/4})$  para testar o modelo de segunda ordem e o ponto central que geralmente possui 3 até 6 repetições. Assim, número de tratamentos passaria a ser: fatorial  $2^k +$  ponto central  $+ 2*k$  pontos axiais. Por exemplo, para 2 fatores,  $2^2 + 2*2 + 4$  pontos centrais, totalizando, 12 ensaios. A Figura 9 representa os pontos experimentais para o caso de 2 variáveis independentes (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

**Figura 9** – Pontos de experimentos de um delineamento composto central.



Fonte: (MONTGOMERY, 2017).

De acordo com Calado e Montgomery (2003), em um DCCR, quatro diferentes modelos podem ser testados:

- Somente termos lineares dos efeitos principais.
- Termos lineares e quadráticos dos efeitos principais.
- Termos lineares dos efeitos principais e interações de segunda ordem.
- Termos lineares e quadráticos dos efeitos principais e interações de segunda ordem.

Neste delineamento para tornar possível a execução, ao menos aproximada, da inferência estatística, é usual que sejam feitas repetições nos pontos centrais, tal procedimento, fornece a viabilidade do cálculo de resíduos e, conseqüentemente, do erro padrão, atendendo o princípio básico e obrigatório da estatística que é a repetibilidade. Os pontos axiais também conhecido por pontos de rotabilidade são importantes para o modelo de segundo ordem, pois fornecem previsões através da região de interesse das variáveis independentes. A rotabilidade é uma propriedade esférica, no entanto não é importante ter uma rotabilidade exata para se ter um bom planejamento (CALADO e MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES e IEMMA, 2014).

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho, utilizou-se a casca de arroz, como fonte de material lignocelulósico, que foi doada gentilmente por uma empresa beneficiadora de arroz na cidade de Gurupi, Tocantins (215 km da Capital Palmas).

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE ARROZ

As análises para a caracterização química da casca de arroz foram utilizadas como referência foram, teor de umidade, cinza, extrativos, lignina, holocelulose e alfacelulose. A metodologia empregada foi desenvolvida por Saraiva Morais e Colaboradores (2010). Toda vidraria e materiais, utilizados nesta etapa foram previamente lavados, autoclavados e secos. A casca de arroz *in natura* foi moída previamente para facilitar os procedimentos metodológicos.

#### 4.2.1 Determinação do Teor de Umidade

Foi pesado uma quantidade de aproximadamente 2,0g da casca de arroz no cadinho de porcelana. Em seguida, foi levado à estufa e permaneceu a  $105 \pm 2$  °C, por três horas. Após este tempo, pesou-se após o resfriamento até a temperatura ambiente. Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra úmida (MAU), da massa do conjunto recipiente/amostra úmida (MRAU) e da massa do conjunto recipiente/amostra seca (MRAS), é possível a determinação do teor de umidade (TU%), de acordo com a Equação 1 a seguir:

$$\frac{(MRAU - MRAS) \times 100\%}{MAU} = TU\% \quad (1)$$

#### 4.2.2 Determinação do Teor de Cinzas

Assim como na determinação do teor de umidade, pesou 2,0g da casca de arroz, levou-se a mufla com programação no aparelho para uma rampa com 9,6°C/min até que a temperatura de 600°C. Após o decorrer de três horas, a temperatura foi reduzida para 200°C por mais uma hora. Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra (MA) e da massa do conjunto recipiente/amostra calcinada (MRAC), foi possível o cálculo da determinação do teor de cinzas totais (TC%), de acordo com a Equação 2 a seguir:

$$\frac{MRAC - MR}{MA} \times 100\% = TC\% \quad (2)$$

#### 4.2.3 Determinação do Teor de Extrativos

A extração foi feita por Soxhlet, colocou-se um cartucho feito com papel filtro contendo 4,0g de casca de arroz. Ao balão de vidro, adicionou 150 mL de acetona pura. O conjunto balão-extrator foi colocado em uma manta aquecedora conectada ao condensador em um período de cinco horas de extração. O extrato foi transferido para uma placa de porcelana com a massa determinada. A placa de porcelana foi posta em uma estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  permanecendo por uma hora. Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra (MA), da massa do conjunto recipiente/extrativos (MRE) e da massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente (MRRS), foi possível o cálculo da determinação do teor de extrativos (TE%), de acordo com a Equação 3 a seguir:

$$\frac{MRE - MRRS}{MA} \times 100\% = TE\% \quad (3)$$

#### 4.2.4 Determinação do Teor de Lignina

Na determinação de lignina de Klason, segundo a norma adaptada TAPPI T 222 om-22 (2002c), utilizou cerca de 1,0 g de casca de arroz, colocado em um almofariz, com 17mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Após, 15 minutos de agitação vigorosa e cuidadosa com o pistilo, deixou em repouso por 24 horas. Depois de decorrido o tempo de digestão, adicionou-se água destilada até um volume de 323mL ao almofariz a fim de obter uma diluição do ácido sulfúrico até 4%, transferiu-se quantitativamente o conteúdo para um balão de 1.000mL. O balão foi colocado em uma manta aquecedora, conectado a um condensador, e mantido sob refluxo por 4 horas, contadas a partir do início da fervura. Ao final do tempo de refluxo, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente. A massa do funil de vidro sinterizado foi medida e conectada a um sistema de filtração à vácuo. Na metade da filtração, desligou-se a bomba e o filtrado foi recolhido para a determinação de lignina solúvel. O funil foi levado para uma estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  e secado. Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra (MA); na

massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa (MFL); e na massa do funil com cinzas, após calcinação em mufla (MFC), pode-se calcular o teor de lignina insolúvel (TLI%), conforme a Equação 4 a seguir:

$$\left(\frac{MFL - MF}{MA} \times 100\%\right) - TC\% = TLI\% \quad (4)$$

Para a determinação da lignina solúvel foi realizada uma varredura da absorbância de 280nm a 215nm. Com base nesses valores, empregou a Equação 5, na qual CLS representa a concentração de lignina solúvel, em gL<sup>-1</sup>, A<sub>215</sub> representa a absorbância a 215nm, e A<sub>280</sub> representa a absorbância a 280nm:

$$CLS = \frac{4,53 \times A_{215} - A_{280}}{300} \quad (5)$$

Como a amostra tinha um volume de 323mL, multiplicando-se a CLS por 0,323L (323 mL), foi obtida a massa de lignina solúvel (MLS). Por fim, a obtenção do teor de lignina solúvel (TLS%) a Equação 6 foi utilizada:

$$\left(\frac{MLS}{MA}\right) \times 100 = TLS\% \quad (6)$$

#### 4.2.5 Determinação do Teor de Holocelulose

Em um erlenmeyer de 500mL, adicionou-se cerca de 3,0g da casca de arroz em 120mL de água destilada. Um banho-maria com temperatura constante a 70 ± 2°C foi preparado. Ao erlenmeyer, foi acrescido 2,5g de clorito de sódio e 1mL de ácido acético sob agitação durante uma hora. Após esse tempo, foi realizada uma nova adição de 2,5g de clorito de sódio e 1mL de ácido acético, por mais uma hora. Ao final desse tempo, adicionou -se, mais uma vez, 2,5g de clorito de sódio e 1mL de ácido acético, por mais três horas. Após um total de cinco horas de reação, resfriou-se o conjunto em banho de gelo durante 30 minutos. Com água destilada, lavou o erlenmeyer e assim transferiu o conteúdo para o sistema de filtração à vácuo com pesos medidos. O funil foi levado para uma estufa a 105 ± 2°C por 18 horas. Após a estufa, o conjunto

funil-holocelulose foi seco a temperatura ambiente por 30 minutos, e por fim mediu a massa do funil com holocelulose. Com base na massa do funil limpo e seco (MF); a massa da amostra (MA); e a massa do funil somada à massa de holocelulose (MFH), pode-se calcular o teor de holocelulose (TH%), conforme a Equação 7:

$$\frac{MFH - MF}{MA} \times 100\% = TH\% \quad (7)$$

#### 4.2.6 Determinação do Teor de Alfacelulose

Cerca de 1,0g da holocelulose obtida anteriormente foi pesada e colocada em um almofariz à temperatura ambiente. Adicionou-se, 15mL de uma solução de NaOH a 17,5% (m/v), aguardou-se dois minutos de contato entre a solução e a celulose, e, então, começou-se a triturar o material por oito minutos. Terminado esse tempo, adicionou-se 40mL de água destilada ao almofariz, e transferindo o conteúdo, quantitativamente, para o funil de vidro. O conteúdo do almofariz foi cuidadosamente transferido para o funil com uma agitação constante, para evitar qualquer possível perda de precipitado no interior. Após a filtração à vácuo, o funil foi levado para uma estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas. Após a etapa de estufa, o conjunto funil-holocelulose foi seco durante 30 minutos a temperatura ambiente, por fim, mediu a massa do funil somada à massa de alfacelulose. Com base na massa do funil (MF); a massa da amostra de holocelulose (MAH); e a massa do funil somada à massa de alfacelulose (MFA), pode-se calcular o teor de alfacelulose (TA%), conforme a Equação 8 a seguir:

$$\frac{MFA - MF}{MAH} \times 100\% = TA\% \quad (8)$$

### 4.3 PRÉ – TRATAMENTO DA CASCA DE ARROZ

A casca de arroz foi pré-tratada usando uma solução de hidróxido de sódio 4%, em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. As condições de reação foram com 100g da casca de arroz em 2000mL da solução de hidróxido de sódio a 4%, 1:20 (m/v). O conjunto obtido, foi ajustado a um pH 2,0 durante 30 minutos com ácido fosfórico e logo neutralizado com hidróxido de sódio até pH 7,0. O material recuperado foi filtrado à vácuo. Logo, um volume proporcional de água destilada foi adicionado ao volume do material sólido da casca de arroz recuperada por

filtração e essa mistura foi autoclavada a 121°C por 15 minutos, a suspensão foi filtrada e o material sólido passou por desidratação em estufa a 105± 2°C por 24 horas.

#### 4.4 ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO

A avaliação do impacto do pré-tratamento de forma qualitativa foi realizada por espectrometria no infravermelho (FTIR). Devido ao fato da casca de arroz não ser translúcida, utilizou-se a detecção por reflectância total atenuada (ATR), programada para 04 *scans* por leitura, nas faixas de 600 a 2000 cm<sup>-1</sup>. Utilizou-se aparelho Agilent FT-IR Cary-630.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A metodologia utilizada foi a mesma proposta por Ghose (1987). Em tubos de ensaios de 25mL, adicionou-se tiras de 1x6 cm (50 mg) de papel filtro Whatman nº 1 e 1,0mL de tampão citrato 50mM (pH 4,8). Iniciou-se, a reação, adicionando 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas. Os respectivos brancos (enzima e substrato) e diferentes diluições do padrão de glicose (10 mg mL<sup>-1</sup>) foram submetidos às mesmas condições de calibração para curva padrão de glicose. Após o tempo de 60 minutos as reações tiveram a adição de 3mL do reagente de DNS, usadas por Miller (1959), e fervidas por 5 minutos. Logo após, foi adicionado 20mL de água destilada em cada tubo, realiza-se assim as leituras de absorbância no espectrofotômetro à 540nm. Para o cálculo da atividade de celulasas totais (FPU), foi estimado a concentração enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose. Após encontrar a diluição enzimática por esta liberação de 2mg de glicose (uma diluição enzimática de 1/200 equivale a 0,005), a atividade enzimática foi determinada pela Equação 9:

$$FPU = \frac{0.37}{\text{Concentração de enzima para liberar 2.0mg de glicose}} \text{ unidades ml}^{-1} \quad (9)$$

#### 4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após a determinação da atividade enzimática da enzima comercial doada gentilmente pela empresa Novozymes, realizou-se a hidrólise com a casca do arroz previamente pré-tratada em solução tampão citrato de sódio na incubadora, sob as condições de 150 rpm, a 50 °C e pH 5,0. Após a hidrólise as amostras foram colocadas em banho-maria a 100 °C para inativar as enzimas e conservadas em freezer. Para análise de rendimento da hidrólise enzimática ao longo do período, utilizou a Equação 10 adaptada de (CHEN et. al, 2007), onde a CLAE é a

concentração de açúcares estimada no cromatógrafo (g/L), FT é o fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (glicose = 0,9), Branco são os valores de glicose da hidrólise exatamente no tempo 0h, CML é a concentração do material lignocelulósico (g/L) e o Teor de Celulose é o valor percentual da celulose do material lignocelulósico.

$$\eta = \frac{CLAE * FT - Branco}{CML * Teor de Celulose} \quad (10)$$

#### 4.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

As concentrações de glicose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) adaptadas do método de BALL et al., (2011), nas seguintes condições: coluna Agilent Hi-Plex Ca, 7.7 × 300 mm, 8 μm (PL1170-6810), temperatura de 85 °C, água deionizada como fase móvel em um fluxo de 0,6 mL/minuto, com volume de injeção de 20μL em um detector de índice de refração com corridas de 20 minutos. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, filtradas e desgaseificadas. As concentrações foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas com soluções padrão.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de verificar a influência das variáveis independentes concentração enzimática (mL) e massa da casca de arroz pré tratada / material lignocelulósico (g), foi realizado um planejamento experimental por delineamento de composto central rotacional (DCCR), 2<sup>2</sup> + 4 pontos axiais + 4 pontos centrais totalizando 12 ensaios em resposta de 24, 48 e 72 horas de reação. O software *Statistica*® v.12.0 foi utilizado para as análises gráficas e de regressão. A análise estatística do modelo foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). A análise incluiu o teste F de Fisher (significância do modelo total) e coeficiente de determinação R<sup>2</sup>, que mede o ajuste do modelo de regressão. A análise também incluiu o valor t de *Student* para os coeficientes estimados e suas probabilidades associadas. Para cada variável, os modelos quadráticos foram representados por meio de gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE ARROZ

A caracterização da composição química do material lignocelulósico é fundamental para a eficiência das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. O tipo de pré-tratamento empregado é um fator importante e sua escolha irá depender das características e dos componentes químicos do material lignocelulósico, tendo como finalidade evitar a formação de coprodutos inibidores da hidrólise e assim otimizar o rendimento na produção de açúcares (CHANDRA et. al, 2012). A Tabela 6 apresenta a composição química da casca de arroz empregada no presente trabalho. Esta composição pode variar conforme o processamento e condições de crescimento da cultura no campo.

**Tabela 6** – Composição Química da Casca de Arroz.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%)</b>
Holocelulose	64,23
Alfacelulose	35,65
Hemicelulose	28,58
Lignina Insolúvel	23,70
Lignina Solúvel	5,90
Umidade	8,13
Extrativos	4,65
Cinzas	7,41

Fonte: Do autor (2017).

Conforme observado na Tabela 6, a quantidade de holocelulose encontrada no trabalho foi de 64,23%, similar à de Horst (2013) com 65,99% e superior ao de César et al. (2017) com 56,06%, Paula (2010) com 52,61% e Macedo et al. (2014) com 55,83%. A holocelulose é usada para determinar o teor dos carboidratos totais presentes na casca de arroz, englobando os valores da celulose, pentoses, hexoses e hemicelulose. Outros materiais que são empregados com sucesso em processos na etapa de hidrólise são o bagaço de cana, a palha de cana, o capim elefante e a serragem que possuem cada um, em torno de 70,31%, 65,65%, 61,87% e 57,71%, respectivamente (CÉSAR et al., 2017; HORST, 2013; MACEDO et. al, 2014; PAULA, 2010).

A celulose é o composto natural mais abundante nos materiais lignocelulósicos. É um polímero linear constituído de várias ligações de glicose. A alfacelulose é propriamente a

celulose não degradada pelo processo de análise. O teor encontrado no trabalho foi de 35,65%, semelhante ao de Hickert (2010) com 35,00%, Saha e Cotta (2008) de 35,00% e Johar et al. (2012) também com 35,00%, outros materiais lignocelulósicos como bagaço de cana, palha da cana e palha de arroz apresentam teores de 45,68%, 36,70% e 28,00-36,00%, respectivamente (GRASEL et al., 2017; PRATTO et al., 2014; REDDY; YANG, 2005).

A hemicelulose é estruturalmente semelhante a celulose sendo composta por cadeias ramificadas de açúcares de pentoses, como xilose e arabinose, e hexoses, como glicose, manose e galactose. O teor de hemicelulose calculado foi realizado pela diferença entre holocelulose e alfacelulose, sendo de 28,58%, próximo ao encontrado na literatura, tal como Johar et al. (2012) que obtiveram 33,00% de teor na casca de arroz. Em relação a outros materiais lignocelulósicos, a casca de arroz estudada apresentou teores de hemicelulose similares, como a espiga de milho entre 32,00-35,00%, a palha de cevada entre 27,00-38,00% e bem superior à fibra de bananeira entre 6,00-8,00%. Com a determinação dos teores de celulose e hemicelulose, estima-se melhor as quantidades de enzimas necessárias na etapa de hidrólise (SANTOS et al., 2012b).

A lignina é uma estrutura complexa, compõe a parede celular, fornece suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao acesso da celulose e hemicelulose da casca de arroz e dos materiais lignocelulósicos. O teor de lignina obtido foi de 23,70%, um pouco abaixo dos teores encontrados por Hickert (2010) de 29,00% e de Marchesini et al. (2016) de 30,63%.

A importância em se determinar o teor de lignina está relacionado a escolha do melhor pré-tratamento do material lignocelulósico empregado no processo, por tais consequências, através de um método apropriado para o pré-tratamento, ocorre a diminuição do aparecimento de compostos fenólicos inibidores das enzimas na etapa de hidrólise enzimática (RODRIGUES, 2016).

Pode-se observar, pelos dados da Tabela 6 para os demais teores, que a casca de arroz apresentou teor de extrativos de 4,65%, de cinzas de 7,41% e umidade de 8,13%. Os extrativos, incluem-se vários compostos, como, alguns sais, açúcares e polissacarídeos ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa e compostos fenólicos. As cinzas representam a matéria mineral da casca de arroz, o alto teor de cinzas presentes neste material lignocelulósico, deve-se exclusivamente à sua grande quantidade de sílica, do total de cinzas calculados, aproximadamente 72,00% é devido a sílica. A umidade caracteriza a quantidade de água presente na casca de arroz. As diferenças entre os teores avaliados e comparados da casca de arroz deste trabalho com os da literatura pode estar associada à origem da casca de arroz,

constituição do solo, clima, época da colheita, infecções e pragas, método de plantio, e também de diferenças nas técnicas de caracterização (DELLA et al., 2006; PINO et al., 2007; SILVÉRIO et al., 2006).

## 5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Neste trabalho, foram obtidos espectros de absorção no infravermelho da casca de arroz antes e após o pré-tratamento. Esta análise foi realizada com intuito de verificar de forma qualitativa a influência do pré tratamento proposto no material lignocelulósico. A Tabela 7, foi utilizada para identificação das bandas nos espectros da casca de arroz *in natura* e pré-tratada.

**Tabela 7** – Bandas do Infravermelho.

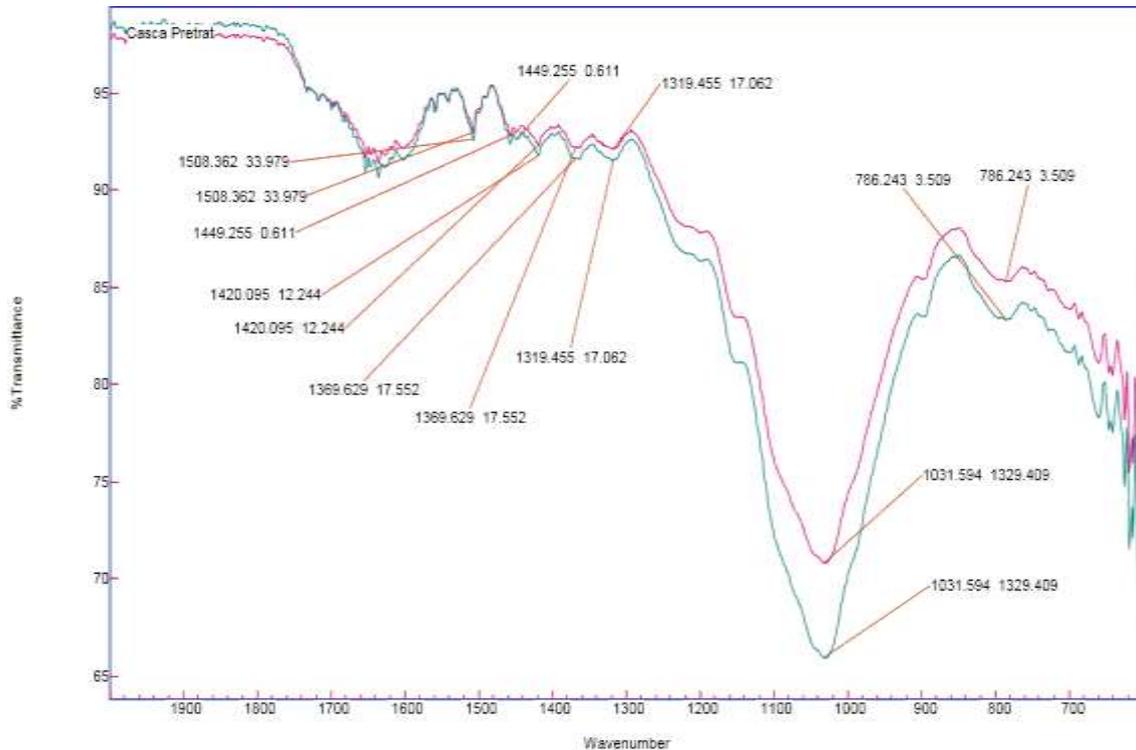
Comprimento de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Origem da Banda
1675-1660	Estiramento C=O em anel aromático conjugado
1605-1600	Vibração do anel aromático
1515-1505	Vibração do anel aromático
1470-1460	Deformações C-H
1430-1425	Vibração do anel aromático
1370-1365	Deformações C-H
1330-1325	Anel sirigil
1275-1270	Anel guaiacil
1230-1220	Estiramento C-C, C-O
1030-1172	Estiramento C-O de grupos éster conjugados de ligninas
700-1030	Deformações C-H, C-O
700<	C-H fora de plano de unidades p-hidroxifenil

Fonte: Adaptada de (HOAREAU et al., 2004).

O Gráfico 1, representa os espectros da casca de arroz *in natura* na cor verde, e da casca pré-tratada, na cor rosa. As bandas associadas à celulose estão entre 786-1030 cm<sup>-1</sup>, característica de regiões amorfa da celulose, resultado da vibração de estiramento no plano do anel sacarídeo e deformação C-H. Nessa faixa é possível relacionar as possíveis alterações na estrutura química da celulose durante o pré – tratamento. As ligações β(1- 4) entre unidades de glicose são encontradas próximas a região de 900 cm<sup>-1</sup>, após a banda de 786-830 cm<sup>-1</sup>, encontra-se a p-hidroxifenil, que é um dos precursores da lignina e nota-se influência do pré - tratamento utilizado no trabalho nessa região. Pode-se ainda verificar que houve diferenças de intensidade do sinal entre a casca *in natura* e a casca pré - tratada na banda próxima de 900 cm<sup>-1</sup>, à flexão

C-H, característica de éteres alifáticos e aromáticos, no entanto, não é característica de ligninas. A região entre 1030-1172  $\text{cm}^{-1}$  é a região proveniente do estiramento do grupo C-O e C-O-C de ligações glicosídicas em anéis de piranoses e estiramento de C=O em grupo alifático em unidade de guaiacila, características da lignina. As bandas de 1030-1319  $\text{cm}^{-1}$ , estão associadas à flexão de OH no plano de celulose cristalina, correspondente a vibrações de C-O e flexão de C-H também no plano da celulose cristalina, devido aos anéis aromáticos combinados com estiramento e deformação no plano de C-H. As modificações na estrutura da casca com o uso do pré - tratamento com hidróxido de sódio, causam substituições eletrolíticas dos anéis aromáticos da lignina que facilitam a sua solubilização conforme observado na banda 1420  $\text{cm}^{-1}$ . O grande diferencial do pré - tratamento é observado na diminuição da intensidade do sinal na região do 1030  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas às ligações glicosídicas. O relaxamento das ligações nesta região pode ter contribuído substancialmente para o acesso do coquetel enzimático utilizado no presente trabalho aumentando sua eficiência (ADEBAJO; FROST, 2004; COSTA; MANSUR, 2008; ERNESTO et al., 2009; HUANG et al., 2011; LABAT, 2008; SHEN et al., 2010; XU; SUN; LU, 2006; ZHANG et al., 2011).

**Gráfico 1** – Espectros do Infravermelho da casca de arroz *in natura* e pré-tratada.



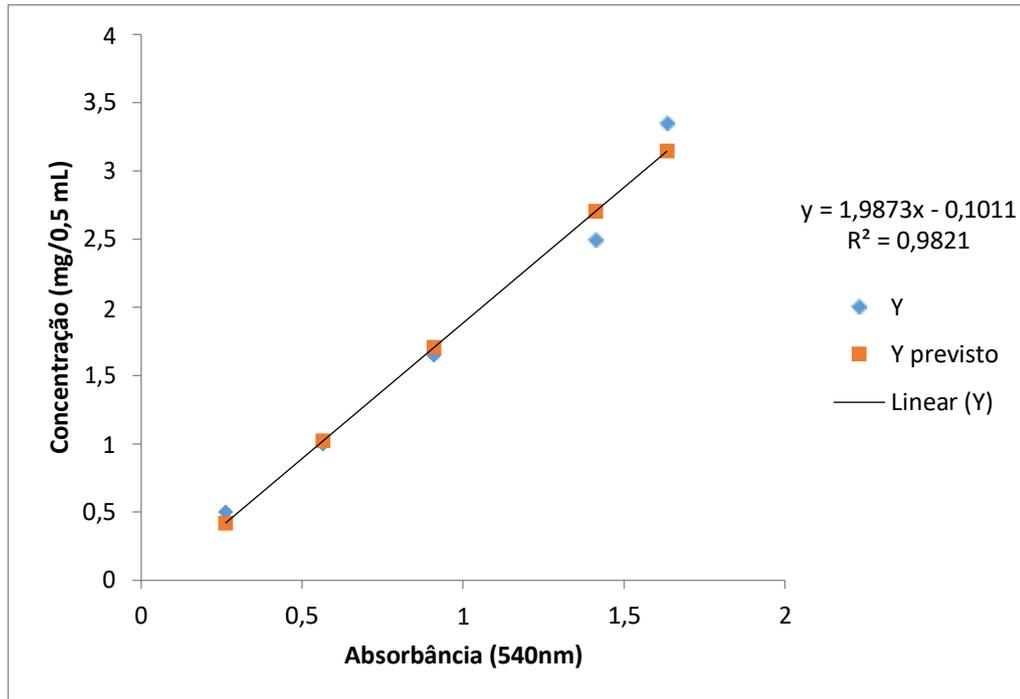
Name
Casca Pura
Casca Prétrat

Fonte: Do autor (2017).

### 5.3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DA CELLIC® CTEC E HTEC 2

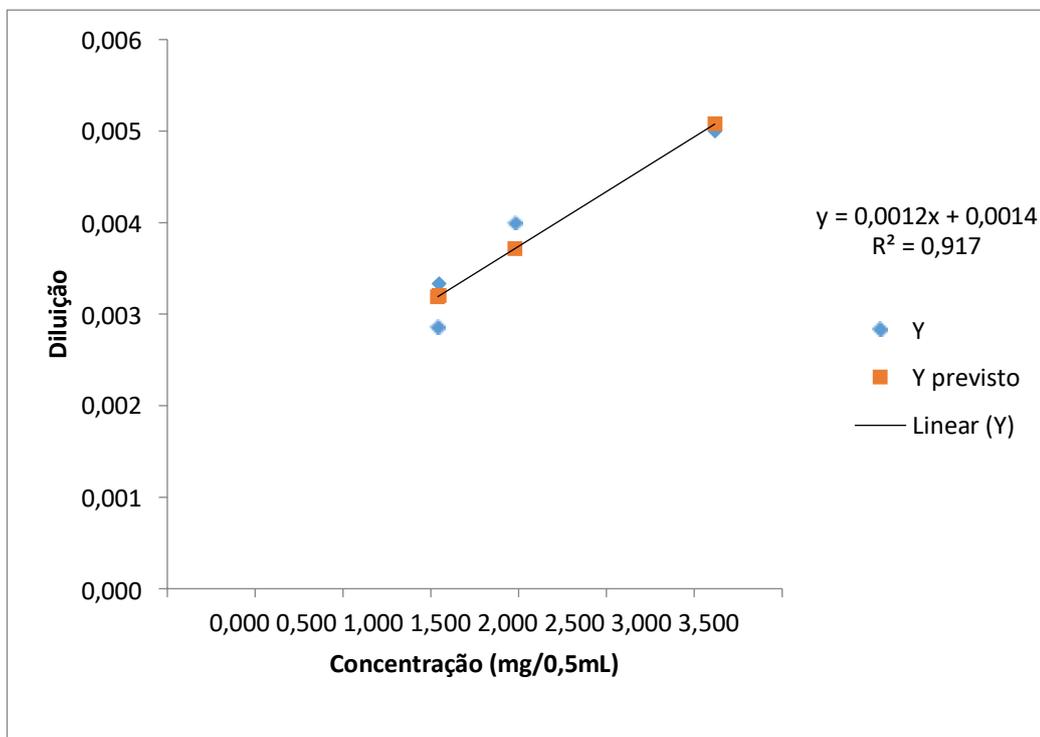
A hidrólise da celulose em celobiose, glicose e outros açúcares é feita por um complexo enzimático de celulases (endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidades) que agem de forma sinérgica atacando a estrutura da celulose (GHOSE, 1987). Antes de iniciar os experimentos de hidrólise, foi realizada a determinação da atividade enzimática do complexo enzimático Cellic® CTec e HTec 2 para melhor estimar a quantidade de Coquetel Enzimático utilizado no processo de hidrólise. Inicialmente de acordo com a metodologia proposta por Ghose (1987), foi plotada uma curva padrão de glicose, Gráfico 2, para estimar a quantidade necessária para liberar 2 mg de açúcar através de 0,5 mL de enzimas em diferentes diluições em 60 minutos de reação. Os Gráficos 3 e 4 relacionam as diluições da Cellic® CTec e HTec 2, e suas respectivas concentrações, assim como a glicose liberada durante a reação.

**Gráfico 2** – Curva Padrão de Glicose em função da absorbância em 540nm.



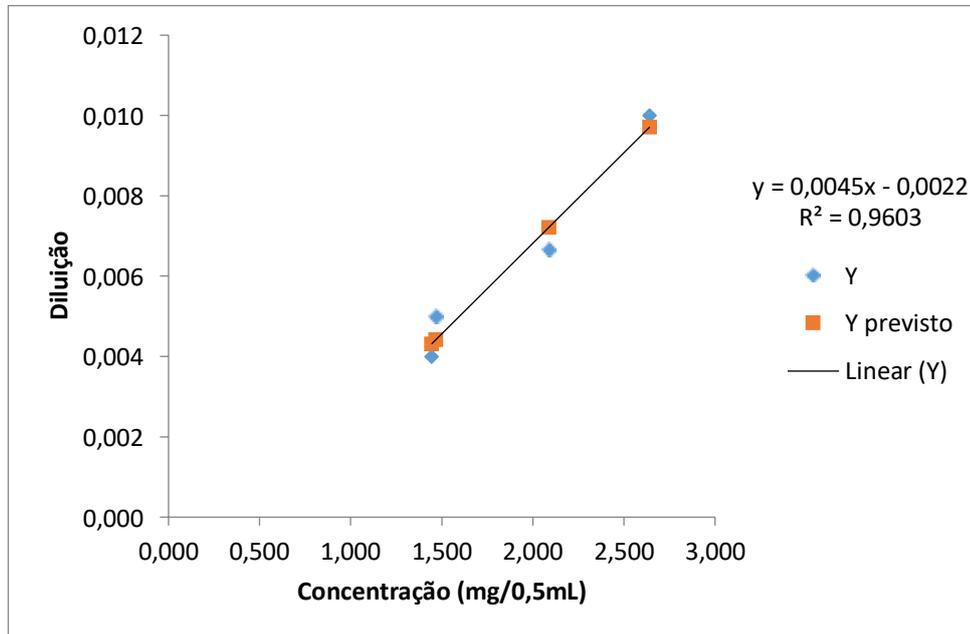
Fonte: Do autor (2017).

**Gráfico 3** – Determinação de glicose liberada por 0,5 mL de Cellic® CTec 2 em função das diferentes diluições.



Fonte: Do autor (2017).

**Gráfico 4** – Determinação de glicose liberada por 0,5 mL de Cellic® HTec 2 em função das diferentes diluições.



Fonte: Do autor (2017).

Segundo o método proposto por Ghose (1987) uma unidade de atividade de enzima, baseia-se na liberação exata de 2 mg de glicose (2,00/0,18  $\mu$ mol) por 0,5 mL de solução de enzima diluída em 1 hora de reação. Desta forma com as equações das retas obtidas nos Gráficos 11 e 12, foi possível determinar a atividade enzimática da Cellic® CTec e HTec 2 para liberar exatamente 2 mg de glicose em função das diluições, na Tabela 8.

**Tabela 8** – Atividade Enzimática das enzimas comerciais Cellic® CTec e HTec2.

Enzima	Atividade Enzimática (FPU/mL)
CTec 2	97,37
HTec 2	54,41

Fonte: Do autor (2017).

Existe uma grande diferença na literatura de metodologias para determinação de atividade enzimática, e uma ampla faixa de atividades encontradas para os mesmos complexos enzimáticos. Como os valores encontrados por Pengilly e colaboradores (2015) que obtiveram para Cellic® CTec e HTec2, 112 FPU/mL e 77 FPU/mL, respectivamente, Isoroi e colaboradores (2012) obtiveram 148 FPU/mL na CTec2 e os autores Kim e Kim (2013) 84 FPU/mL também na CTec2.

Portanto, o complexo enzimático utilizado neste trabalho possui um alto valor de atividade e está no limiar próximo ao encontrado na literatura. As variações nos valores

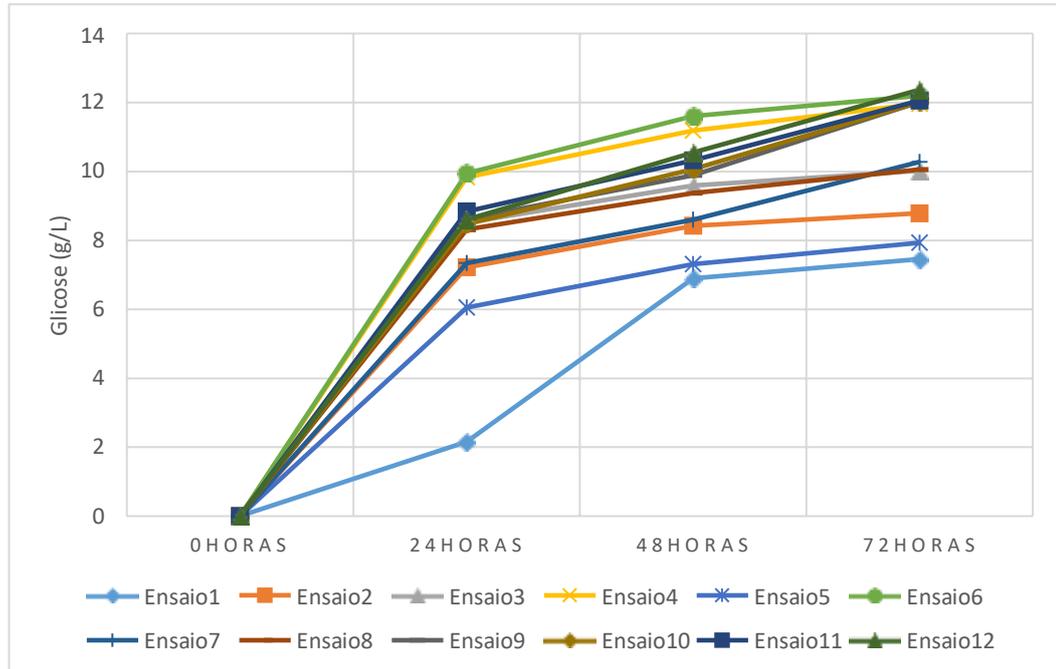
reportados na literatura se deve possivelmente a uma diferença nos lotes do complexo enzimático ou ainda nas imprecisões das análises, dada às elevadas diluições requeridas.

## 5.4 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MASSAS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO EM DIFERENTES QUANTIDADES DE COQUETEL ENZIMÁTICO

### 5.4.1 Análise do Planejamento Experimental

Com o intuito de averiguar a eficiência da hidrólise enzimática através do Coquetel Enzimático de enzimas comerciais Cellic® CTec e HTEc 2 foi proposto um Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR),  $2^2 + 2 * 2$  pontos axiais + 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. Respeitando a cinética do processo, para cada ensaio do DCCR, foram retiradas amostras em função do tempo para determinação da concentração de glicose liberadas, como mostra o Gráfico 5. Os níveis utilizados e o planejamento experimental estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

**Gráfico 5** – Acompanhamento da liberação de glicose em função do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) para cada ensaio do DCCR.



Fonte: Do autor (2017).

Nesta etapa, analisou-se a eficiência da liberação de concentração de glicose com máximo de Material Lignocelulósico e com mínimo de Coquetel Enzimático. De acordo com Kinnarinen e Hakkinen (2014) a etapa de hidrólise, pré-tratamento e produção de enzimas são

responsáveis por quase metade do custo total da produção do bioetanol, devido ao alto preço das enzimas, por tais razões o importante foi avaliar as quantidade mínimas de enzimas necessárias para atingir altos rendimentos de hidrólise. De forma geral, como mostrado no Gráfico 5, nos ensaios 3, 4 e 6, o aumento do Material Lignocelulósico em 72 horas de hidrólise ocasionou um aumento da concentração de glicose, como também mostrado nos ensaios 1, 2, 3 e 4. Devido ao aumento da concentração do Coquetel Enzimático, em função do tempo observado, houve um aumento da concentração de glicose.

**Tabela 9** – Valores utilizados no DCCR para Concentração e Rendimento de glicose.

Variáveis	Unidade	-1,41	-1	0	1	1,41
Material Lignocelulósico	g	0,5	0,7	1	1,3	1,5
Coquetel Enzimático	mL	0,1	0,114	0,15	0,186	0,2

Fonte: Do autor (2017).

**Tabela 10** – Planejamento Experimental utilizando duas variáveis para Concentração e Rendimento de glicose na etapa de hidrólise enzimática.

	Material Lignocelulósico (g)	Coquetel Enzimático (mL)	Material Lignocelulósico (g)	Coquetel Enzimático (mL)	Concentração (g/L)	Rendimento (%)
Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Respostas	
1	-1	-1	0,7	0,114	7,45	45,63
2	-1	1	0,7	0,184	8,79	53,79
3	1	-1	1,3	0,114	10,02	33,02
4	1	1	1,3	0,186	11,96	39,43
5	-1,41	0	0,5	0,15	7,93	67,96
6	1,41	0	1,5	0,15	12,19	34,83
7	0	-1,41	1	0,1	10,28	44,04
8	0	1,41	1	0,2	10,05	43,09
9 ©	0	0	1	0,15	12,01	51,48
10 ©	0	0	1	0,15	12,01	51,46
11 ©	0	0	1	0,15	12,05	51,66
12 ©	0	0	1	0,15	12,36	52,99

Fonte: Do autor (2017).

A avaliação dos resultados foi realizada pelo software *Statistica*® v.12.0 possibilitando o cálculo dos coeficientes de regressão e os modelos matemáticos que descrevem a influência das condições experimentais sobre a variável dependente de resposta. Em virtude das respostas obtidas no Gráfico 5 em função dos tempos (0, 24, 48 e 72 horas) foi escolhido a concentração

em 72 horas para os cálculos de rendimentos, devido ao fato das concentrações de glicose neste tempo terem sido maiores em quase todos os ensaios, utilizada como a resposta do planejamento experimental, sendo apresentados assim os coeficientes de regressão na Tabela 11.

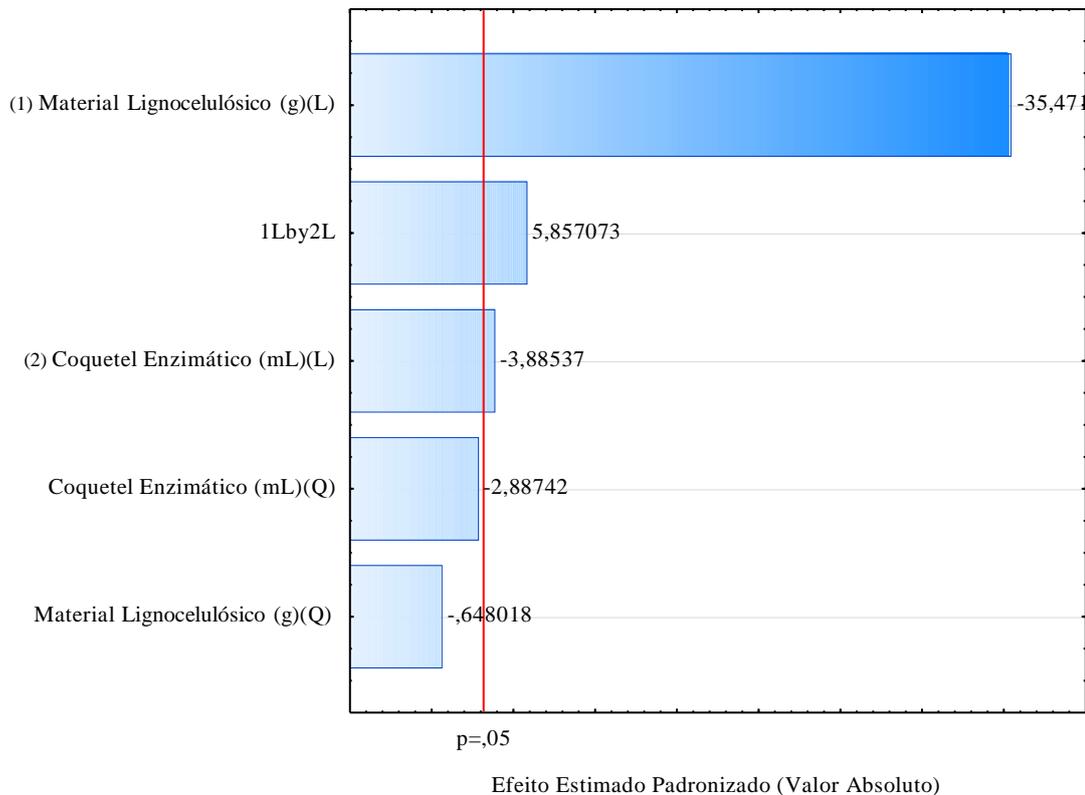
**Tabela 11** – Coeficientes de Regressão do rendimento em 72 horas (%).

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p - valor	Coeficientes
<b>Média</b>	<b>47,9083</b>	<b>0,367511</b>	<b>130,3588</b>	<b>0,000001</b>	<b>47,90831</b>
<b>(1)Material Lignocelulósico(L)</b>	<b>-18,4167</b>	<b>0,519202</b>	<b>-35,4711</b>	<b>0,000049</b>	<b>-9,20833</b>
(1)Material Lignocelulósico(Q)	-0,3794	0,585520	-0,6480	0,563149	-0,18971
<b>(2)Coquetel Enzimático(L)</b>	<b>-1,1427</b>	<b>0,294116</b>	<b>-3,8854</b>	<b>0,030215</b>	<b>-0,57137</b>
(2)Coquetel Enzimático(Q)	-0,4578	0,158559	-2,8874	0,063146	-0,22891
<b>1L*2L</b>	<b>2,1695</b>	<b>0,370403</b>	<b>5,8571</b>	<b>0,009923</b>	<b>1,08474</b>

Fonte: Do autor (2017).

De acordo com Rodrigues e Iemma (2014), a grande variabilidade inerente dos bioprocessos que envolvem as enzimas, pode-se considerar inicialmente significativos os parâmetros com p – valores menores que 5%, caso não haja significância desejada entre as variáveis estudadas, optar por parâmetros com p-valores menores que 10%. A partir disso, observa-se que apenas as variáveis lineares, Material Lignocelulósico e Coquetel Enzimático, junto com a sua interação (1L\*2L) foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), representadas em negrito na tabela.

O gráfico de Pareto, representado no Gráfico 6, mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão. A linha vertical mostra que os coeficientes estão significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 6** – Representação das variáveis significativas dos efeitos padronizados.

Fonte: Do autor (2017).

A Tabela 11, descreve o modelo de regressão a partir dos valores codificados. Os termos lineares estão associados a letra “L” e os termos quadráticos a letra “Q”. A partir das variáveis significativas ao nível de 5% de significância, a Equação 11, descreve o rendimento em 72 horas previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas significativas. Onde  $x_1$  representa o Material Lignocelulósico e  $x_2$  representa o Coquetel Enzimático.

$$\text{Rendimento (\%)} = 47,91 - 9,21 * x_1 - 0,57 * x_2 + 1,08 * x_1 * x_2 \quad (11)$$

A partir do modelo reparametrizado devido a significância das variáveis encontradas, na Tabela 12, foi realizado uma Análise de Variância (ANOVA) para verificar a significância e falta de ajuste do modelo reparametrizado encontrado.

**Tabela 12** – ANOVA do modelo reparametrizado do rendimento em 72 horas (%).

Fonte de Variação	Soma de Quadrado	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F-Calculado	p-valor
<b>Regressão:</b>					
<b>(1) Material Lignocelulósico (g)(L)</b>	<b>678,23648</b>	<b>1</b>	<b>678,23648</b>	<b>1258,2007</b>	<b>0,000049</b>
<b>(2) Coquetel Enzimático (mL)(L)</b>	<b>10,35721</b>	<b>1</b>	<b>10,35721</b>	<b>19,2137</b>	<b>0,021985</b>
<b>1L*2L</b>	<b>18,49237</b>	<b>1</b>	<b>18,49237</b>	<b>34,3053</b>	<b>0,009923</b>
Resíduos	297,28	8	37,16		
<b>Falta de Ajuste</b>	<b>295,66435</b>	<b>5</b>	<b>59,13287</b>	<b>109,6978</b>	<b>0,001356</b>
Erro Puro	1,61716	3	0,53905		
Total	1007,34320	11			

$R^2 = 70,49\%$

Fonte: Do autor (2017).

Uma das formas de avaliar a qualidade do ajuste do modelo reparametrizado é através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que mostra como os dados obtidos se ajustam ao modelo. O coeficiente de determinação fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. Valores entre 10-19%, uma correlação bem fraca, de 20-39%, uma correlação fraca, de 40-69%, uma correlação moderada, de 70-89%, uma correlação forte, de 90-100%, uma correlação muito forte (WERKEMA e AGUIAR, 2006).

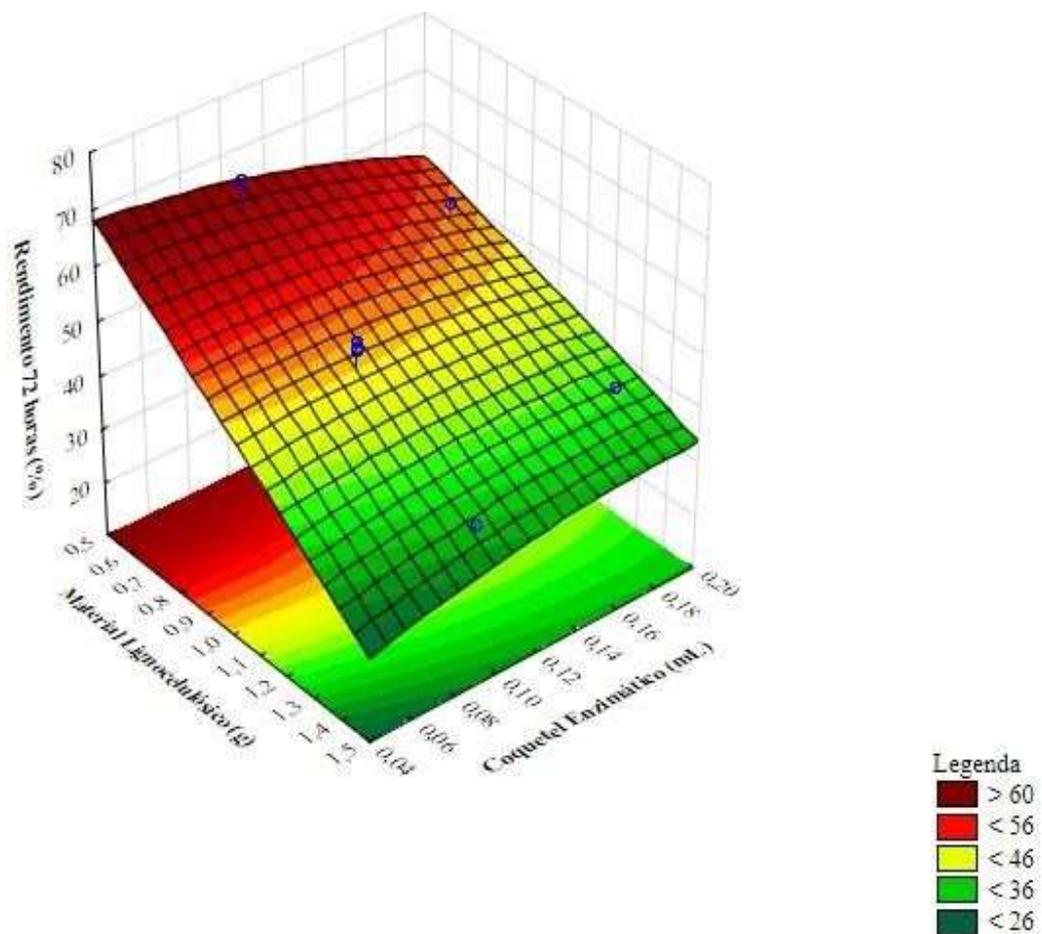
Desta forma, o  $R^2$  foi de 70,49%, ou seja, 70,49% dos dados foram bem representadas pelo modelo gerado e este valor é bom para um planejamento estatístico. De acordo com Rodrigues e Iemma (2014), a magnitude do coeficiente de determinação pode fornecer informações importantes para a formulação de interpretações sobre o experimento. No entanto, outros parâmetros como a falta de ajuste podem complementar as discussões.

A regressão de acordo com a Tabela 12, foi altamente significativa ao nível de 5% de significância (negrito na Tabela), contudo a falta de ajuste apresentou também significância ( $p=0,001356$ ), sendo assim, o modelo encontrado não pode ser considerado preditivo mesmo com um bom coeficiente de correlação dos dados.

A falta de ajuste é explicada devido ao fato de que o quadrado médio do erro puro apresenta um valor muito inferior ao quadrado médio da falta de ajuste, devido à boa repetição

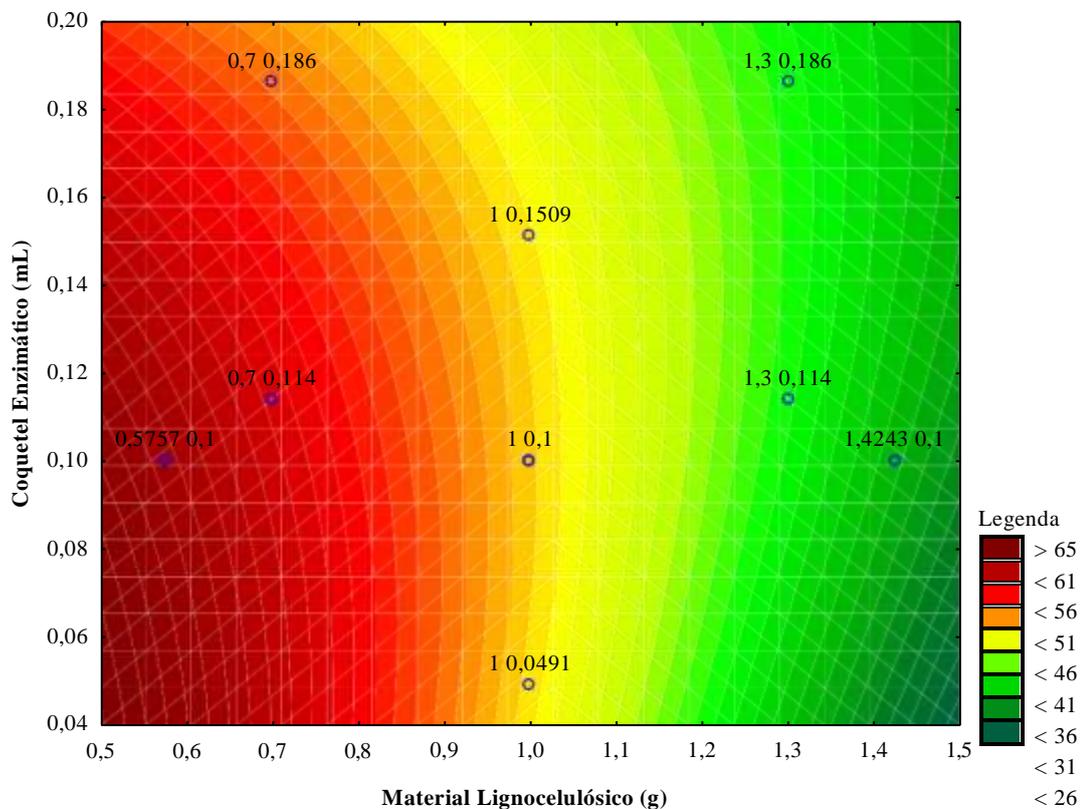
dos ensaios dos pontos centrais (Ensaio 9,10,11 e 12), isso faz com que a razão entre eles resulte num valor muito alto para o F-Calculado obtido, e torne a falta de ajuste extremamente significativa (CASARIN et al., 2016; SAXENA et. al, 2009; RIBEIRO et al., 2008). Apesar do modelo não ter sido considerado preditivo a superfície de resposta e curvas de contornos, considerando apenas os efeitos significativos, são apresentadas no Gráfico 7 e 8, a fim de demonstrar a tendência do processo estimada pelo modelo encontrado.

**Gráfico 7** – Superfície de resposta para o rendimento em 72 horas de reação na hidrólise enzimática.



Fonte: Do autor (2017).

**Gráfico 8** –Curvas de Contorno para o rendimento em 72 horas de reação na hidrólise enzimática.



Fonte: Do autor (2017).

O melhor resultado de rendimento em 72 horas para a hidrólise enzimática neste experimento, foi o do ensaio 5 com 67,96% de rendimento, na qual representa uma concentração de glicose de 7,93 g/L, após a hidrólise. O Ensaio 6, apresentou a maior concentração de glicose liberada, 12,19 g/L, isso se dá pela alta quantidade de Material Lignocelulósico utilizada, no entanto um rendimento de apenas 34,83%. Os rendimentos obtidos foram maiores com uma menor quantidade de Material Lignocelulósico, tais resultados eram esperados, uma vez que as enzimas conseguem degradar a maioria do material presente em quantidades menores de Material Lignocelulósico, como é ilustrado no Gráfico 8, onde mostra a região de altos rendimentos estimados na cor vermelho.

Os dados analisados em cada ensaio mostraram outros açúcares nas análises por CLAE (Cromatografia de Alta Eficiência), contudo, açúcares como a celobiose apresentaram picos com concentrações acima dos valores das concentrações estimadas pelos padrões (0,5-20 g/L) e a xilose juntamente com a arabinose apresentaram valores muito abaixo dos valores das concentrações estimadas nos padrões.

O uso do Coquetel Enzimático proposto não foi o suficiente para quebrar totalmente a celobiose. Este açúcar é um inibidor das celulasas durante a hidrólise enzimática da celulose. Além disso, em uma possível etapa de fermentação as leveduras industriais utilizadas, não são capazes de assimilar a celobiose como açúcar fermentescível, resultando em uma incompleta conversão do hidrolisado proveniente da celulose em etanol. Em ambos os casos, há diminuição do rendimento. Portanto, a utilização de maiores quantidades de Cellic® CTec 2 ( $\beta$ -glicosidases) é necessária para se obter melhores Rendimentos (SUN e CHENG, 2002).

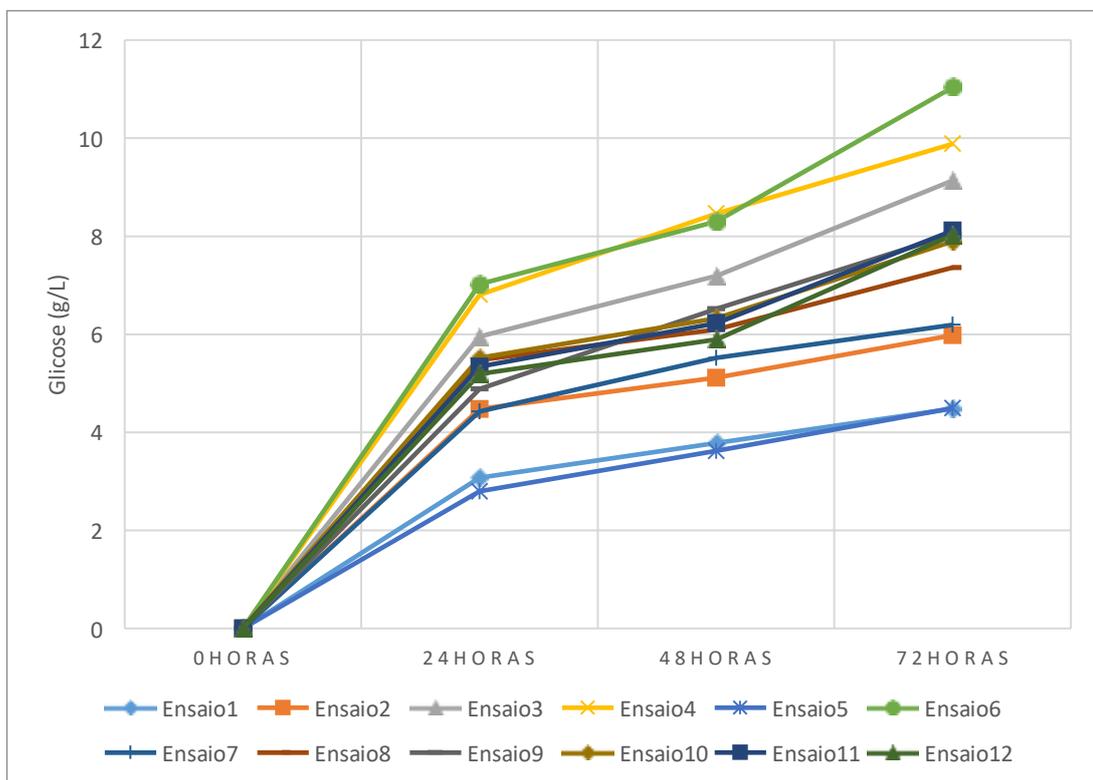
A velocidade das reações enzimáticas bem como os fatores que influenciam é estudada pela cinética enzimática. Os princípios gerais da cinética das reações químicas aplicam-se às reações catalisadas enzimaticamente e a própria saturação enzimática com o Material Lignocelulósico. As enzimas do Coquetel Enzimático se ligam as moléculas do Material Lignocelulósico em uma região específica denominada sítio de ligação. Muitos tipos de substancias ou até mesmo açúcares, como a celobiose, inibem ou saturam as enzimas. Desta forma uma molécula inibidora quando apresenta estrutura semelhante ao da celulose que se liga a enzima para realizar a catálise, a mesma impede ou diminui a ação catalítica enzimática completa, que seria a transformação total da celulose em glicose, portanto o inibidor satura as enzimas e reduz a liberação de glicose no processo (SOUZA, 2016).

Os resultados apresentados nos Gráficos 7 e 8 demonstram claramente que a concentração de glicose e o rendimento nos ensaios estão diretamente associados a quantidade de Material Lignocelulósico presente na hidrólise enzimática, enquanto estas duas variáveis respostas têm relação marginalmente mais estreita com o Coquetel Enzimático. Por tais razões, estes pontos serão considerados na definição de uma melhor condição de planejamento para a hidrólise enzimática.

### 5.4.2 Análise do Segundo Planejamento Experimental

Em busca de um melhor rendimento foi proposto um novo planejamento experimental baseado na tendência do primeiro planejamento. A partir do delineamento de composto central rotacional (DCCR) foi proposto um novo planejamento  $2^2 + 2*2$  pontos axiais + 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. Assim como no primeiro planejamento experimental foi respeitado a cinética do processo, na qual, para cada ensaio do DCCR foram retiradas amostras em função do tempo para determinação da concentração de glicose liberadas, como mostra o Gráfico 9. Os níveis e as variáveis testadas foram alteradas e estão representados nas Tabelas 13 e 14, respectivamente. É importante destacar que os limites de operação de cada uma das variáveis estudadas neste planejamento experimental foram definidos como base no primeiro planejamento e, tendo-se em mente sempre a questão da viabilidade técnico-econômica do processo.

**Gráfico 9** – Acompanhamento da liberação de glicose em função do tempo (0, 24, 48 e 72 horas) para cada ensaio do DCCR no segundo planejamento experimental.



Fonte: Do autor (2017).

O Gráfico 9 demonstra a liberação de glicose em função de 0, 24, 48 e 72 Horas de reação. Cada ensaio apresenta uma quantidade menor de Material Lignocelulósico e uma quantidade maior de Coquetel Enzimático quando comparado ao Gráfico 5 (primeiro

planejamento). Por isso, os valores de liberação de glicose tiveram uma região de concentrações menores aos encontrados no primeiro planejamento. Similarmente ao primeiro planejamento os ensaios com maior quantidade de Material Lignocelulósico (Ensaio 3, 4 e 6) apresentaram também maiores concentrações de glicose em função do tempo.

**Tabela 13** – Valores utilizados no DCCR para concentração e rendimento de glicose no segundo planejamento experimental.

Variáveis	Unidade	-1,41	-1	0	1	1,41
Material Lignocelulósico	g	0,25	0,32	0,5	0,68	0,75
Coquetel Enzimático	mL	0,2	0,228	0,3	0,372	0,4

Fonte: Do autor (2017).

**Tabela 14** – Planejamento Experimental utilizando duas variáveis para concentração e rendimento de glicose na etapa de hidrólise enzimática.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Concentração (g/L)	Rendimento (%)
	Material Lignocelulósico (g)	Coquetel Enzimático (mL)	Material Lignocelulósico (g)	Coquetel Enzimático (mL)		
1	-1	-1	0,32	0,228	4,48	60,04
2	-1	1	0,32	0,372	5,98	80,07
3	1	-1	0,68	0,228	9,14	57,58
4	1	1	0,68	0,372	9,88	62,3
5	-1,41	0	0,25	0,3	4,49	77
6	1,41	0	0,75	0,3	11,04	63,06
7	0	-1,41	0,5	0,198	6,19	53,06
8	0	1,41	0,5	0,402	7,36	63,09
9 ©	0	0	0,5	0,3	8,04	68,95
10 ©	0	0	0,5	0,3	7,89	67,66
11 ©	0	0	0,5	0,3	8,11	69,54
12 ©	0	0	0,5	0,3	8,03	68,8

Fonte: Do autor (2017).

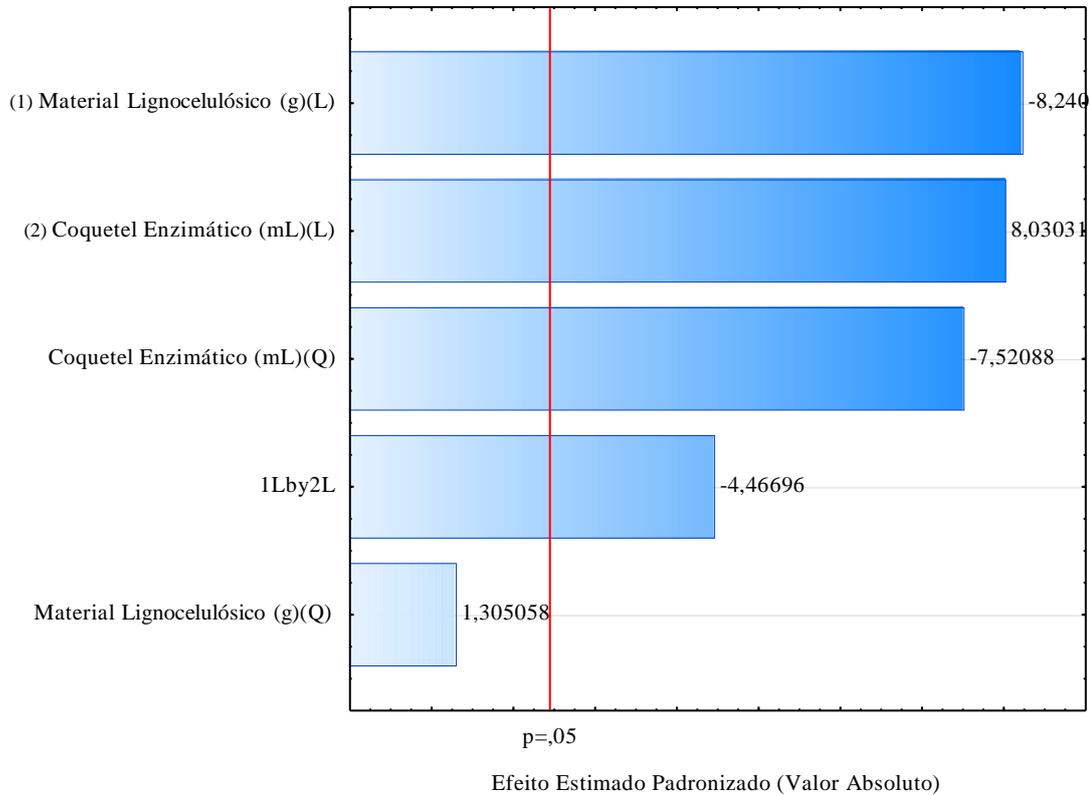
Como realizado no primeiro planejamento experimental foram escolhidas as concentrações de glicose em 72 horas de reação para os cálculos de rendimento. Analogamente ao primeiro planejamento foi utilizado o software *Statistica v12.0* para avaliações dos coeficientes de regressão e modelagem matemática das condições experimentais avaliadas. Através da variável resposta rendimento, foram calculados os coeficientes de regressão apresentadas na Tabela 15.

**Tabela 15** – Coeficientes de Regressão do rendimento em 72 horas (%) do segundo planejamento experimental.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t(3)	p - valor	Coeficientes
<b>Média</b>	<b>68,7366</b>	<b>0,391747</b>	<b>175,4617</b>	<b>0,000000</b>	<b>68,73664</b>
<b>(1)Material Lignocelulósico(L)</b>	<b>-9,9872</b>	<b>0,554014</b>	<b>-18,0270</b>	<b>0,000372</b>	<b>-4,99360</b>
(1)Material Lignocelulósico(Q)	1,7684	0,619407	2,8549	0,064846	0,88418
<b>(2)Coquetel Enzimático(L)</b>	<b>9,7324</b>	<b>0,554014</b>	<b>17,5671</b>	<b>0,000402</b>	<b>4,86621</b>
<b>(2)Coquetel Enzimático(Q)</b>	<b>-10,1909</b>	<b>0,619407</b>	<b>-16,4526</b>	<b>0,000489</b>	<b>-5,09544</b>
<b>1*2</b>	<b>-7,6562</b>	<b>0,783494</b>	<b>-9,7719</b>	<b>0,002277</b>	<b>-3,82812</b>

Fonte: Do autor (2017).

De acordo com a Tabela 15, observa-se que as variáveis lineares, Material Lignocelulósico e Coquetel Enzimático, a variável quadrática Coquetel Enzimático junto com a sua interação (1\*2) foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), representadas em negrito. O gráfico de Pareto, no Gráfico 10, mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão. A linha vertical mostra os coeficientes que estão significativos ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 10** – Representação das variáveis significativas dos efeitos padronizados.

Fonte: Do autor (2017).

A partir da representação do Gráfico 10, nota-se que no segundo planejamento a variável Coquetel Enzimático teve um efeito mais significativo do que o primeiro planejamento (Gráfico 14), o que era esperado, devido as modificações na região observada das variáveis. É importante observar neste planejamento que tanto as variáveis Material Lignocelulósico quanto a Coquetel Enzimático são diretamente proporcionais ao rendimento. Sendo assim, a partir das variáveis significativas ao nível de 5% de significância, a Equação 12, descreve o rendimento em 72 horas previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas. Onde  $x_1$  representa o Material Lignocelulósico e  $x_2$  representa o Coquetel Enzimático.

$$\text{Rendimento (\%)} = 68,74 - 4,99 * x_1 + 4,87 * x_2 - 5,09 * x_2^2 - 3,83 * x_1 * x_2 \quad (12)$$

Encontrado o modelo reparametrizado, devido a significância das variáveis obtidas na Tabela 16, foi realizado uma Análise de Variância (ANOVA) para verificar a significância e falta de ajuste do modelo reparametrizado gerado.

**Tabela 16** – ANOVA do modelo reparametrizado do rendimento em 72 horas (%).

Fonte de Variação	Soma de Quadrado	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F- Calculado	p-valor
<b>Regressão:</b>					
<b>(1)Material Lignocelulósico (g)(L)</b>	<b>199,49</b>	<b>1</b>	<b>199,49</b>	<b>324,97</b>	<b>0,00037</b>
<b>(2)Coquetel Enzimático (mL)(L)</b>	<b>189,44</b>	<b>1</b>	<b>189,44</b>	<b>308,60</b>	<b>0,00040</b>
<b>(2)Coquetel Enzimático (mL)(Q)</b>	<b>185,31</b>	<b>1</b>	<b>185,31</b>	<b>301,88</b>	<b>0,00042</b>
<b>1L * 2L</b>	<b>58,61795</b>	<b>1</b>	<b>58,61795</b>	<b>95,4902</b>	<b>0,002277</b>
Resíduos	22,63	7	3,23		
Falta de Ajuste	20,78794	4	5,19698	8,4660	0,055205
Erro Puro	1,84159	3	0,61386		
Total	655,48838	11			

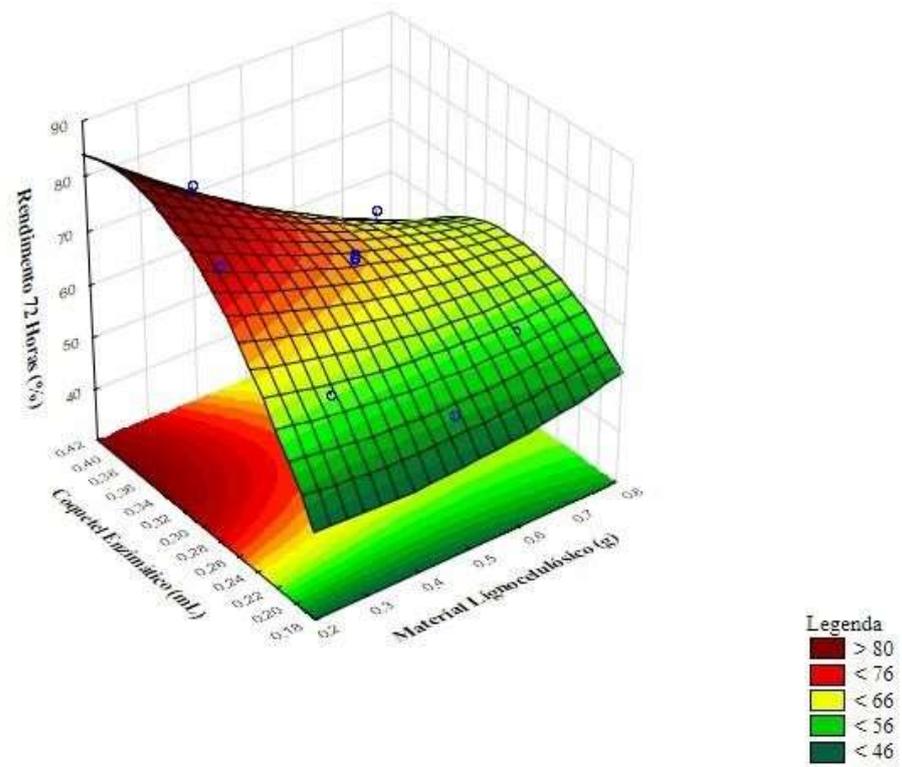
$R^2 = 96,55\%$

Fonte: Do autor (2017).

A resposta rendimento em 72 horas apresentou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 96,55%, ou seja, 96,55% dos dados foram extremamente bem representados pela regressão do modelo reparametrizado gerado. A regressão de acordo com a Tabela 16, foi significativa ao nível de 5% de significância (em negrito na Tabela), a falta de ajuste não apresentou significância, sendo assim, o modelo encontrado pode ser considerado preditivo. Em virtude disto, o modelo representa bem a relação entre os efeitos e as respostas (BOX et. al, 2005; MONTGOMERY, 2017).

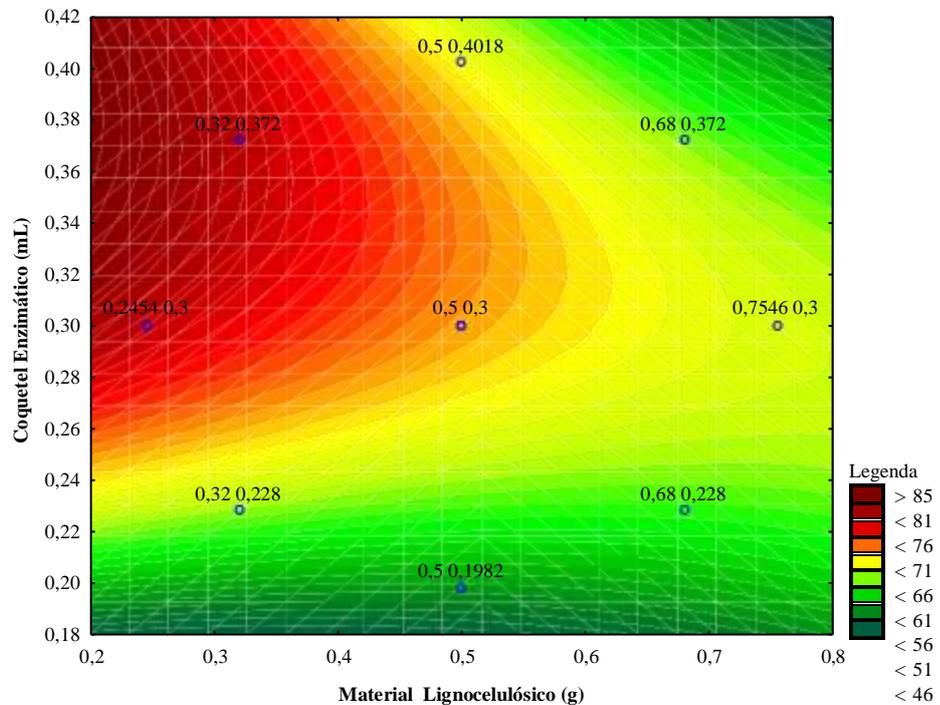
Com a confirmação do excelente ajuste através modelo obtido por este planejamento experimental ao nível de 5% de significância foram gerados a superfície de resposta e as curvas de contornos, mostradas nos Gráficos 11 e 12, para ilustrar os dados.

**Gráfico 11** – Superfície de resposta do segundo planejamento experimental.



Fonte: Do autor (2017).

**Gráfico 12** – Curvas de Contorno para o segundo planejamento experimental.



Fonte: Do autor (2017).

Tendo em vista a primeira análise de planejamento experimental, na Tabela 10, a média de rendimento foi de 47,45%, enquanto que para o segundo planejamento, Tabela 14, a média foi de 65,93%, o que era se esperado em virtude da diminuição da quantidade de Material Lignocelulósico do primeiro para o segundo planejamento. É possível observar nas curvas de contornos, presentes no Gráfico 12, que os melhores rendimentos foram encontrados na região próxima a tonalidade vermelha, representada nos ensaios 2 e 5, onde as quantidades de Material Lignocelulósico eram menores e também nos ensaios dos pontos centrais 9, 10, 11 e 12 com média de 68,74% de rendimento.

Em comparação aos ensaios em relação as quantidades de glicose liberada ao longo da região temporal observada no planejamento, nos ensaios 5 e 6 referentes aos pontos axiais do estudo (-1,41 e +1,41) a quantidade de Material Lignocelulósica, no ensaio 5 cujo a quantidade era baixa, a concentração de glicose foi de 4,49 g/L, e com o aumento do Material Lignocelulósico, no ensaio 6, a concentração encontrada foi para 11,04 g/L, em contrapartida, em relação ao rendimento no ensaio 5 era de 77,00% e no ensaio 6 de 63,06%.

Em relação a variável Coquetel Enzimático como mostrado nos ensaios 7 e 8, referentes aos pontos axiais desta variável, ocorreu um aumento tanto para concentração de glicose quanto para aumento de rendimento, no ensaio 7 foi de 53,06% para 63,09% no ensaio 8. Segundo a literatura, era esperado este aumento de rendimento, como mostrado por Ioelovich e Morag (2012), que demonstraram uma maior liberação de açúcares com o aumento das enzimas na etapa de hidrólise, apesar disso este aumento da quantidade do Coquetel Enzimático eleva o custo da produção.

Por tais razões, o objetivo deste trabalho foi de encontrar um equilíbrio entre a quantidade de Material Lignocelulósico e Coquetel Enzimático que possibilite excelentes concentrações de glicose e rendimento, sendo o mesmo alcançado como é mostrado nos ensaios de pontos centrais 9, 10, 11 e 12.

### 5.4.3 Validação Experimental do Modelo para o Rendimento

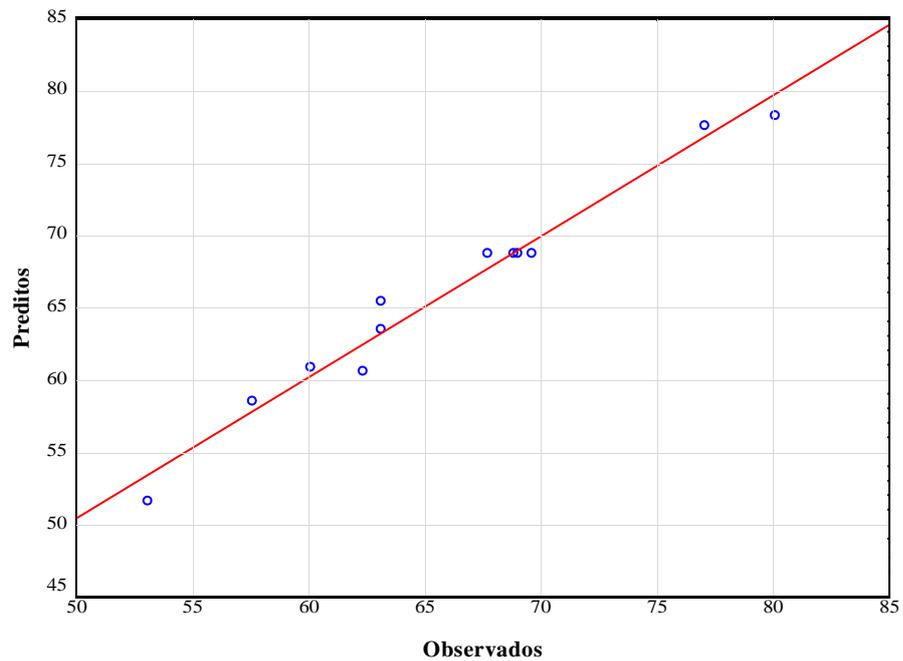
A Tabela 17, apresenta os valores observados experimentalmente e os previstos pelo modelo para o Rendimento, contendo os erros de ajuste e os erros relativos para cada ensaio do DCCR. O Gráfico 13 e 14 permitem avaliar a qualidade do ajuste e a força da associação através da relação entre os valores observados e preditos pelo valor de  $R^2$  e o comportamento dos resíduos obtidos pelo modelo.

**Tabela 17** – Valores do Rendimento observadas e previstas pelo modelo e os desvios para o DCCR.

Ensaio	Valores Observados	Valores Preditos	Resíduos	Erro Relativo (%)
1	60,03951	60,8247	-0,7851	1,307720759
2	80,07158	78,2133	1,8583	-2,320751368
3	57,57749	58,4937	-0,9162	1,591259461
4	62,29708	60,5699	1,7272	-2,772528347
5	77,00333	77,5670	-0,5637	0,732045615
6	63,06463	63,4430	-0,3784	0,599948799
7	53,06205	51,6639	1,3981	-2,634927579
8	63,08742	65,4276	-2,3402	3,709458341
9 ©	68,95001	68,7366	0,2134	-0,309456082
10 ©	67,66343	68,7366	-1,0732	1,586107702
11©	69,53711	68,7366	0,8005	-1,151137039
12©	68,79602	68,73664	0,05938	-0,086309066

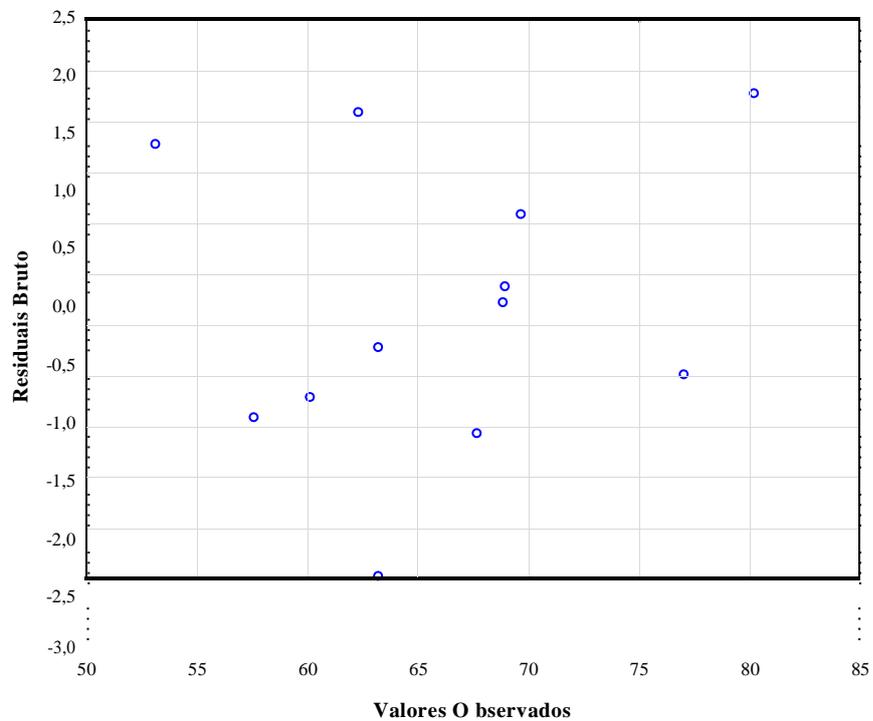
Fonte: Do autor (2017).

**Gráfico 13** – Valores observados *versus* preditos pelo modelo para o rendimento.



Fonte: Do autor (2017).

**Gráfico 14** – Estudo dos resíduos para validação do modelo experimental proposto.



Fonte: Do autor (2017).

Pode-se observar que os erros relativos encontrados na Tabela 16 foram baixos na região desejada, ensaios 5, 6, 7 e 8. Por apresentar erros relativos baixos nos pontos axiais (-1,41 e +1,41), baixa e máxima, tanto para variável Material Lignocelulósico quanto para Coquetel Enzimático, confirmou-se o bom ajuste do modelo gerado. Além disso, por ter apresentado um  $R^2$  de 96,55% ocorreu uma boa concordância dos dados, como era de se esperar baseado nos resultados da análise de variância, na Tabela 16. Em relação ao Gráfico 14, um modelo ajustado deve apresentar em seus resíduos comportamentos aleatórios e valores próximo ao zero ou não muito distantes de zero, sendo assim, o modelo obtido atende a estas características (BOX et. al, 2005; CALADO e MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES e IEMMA, 2014).

A partir das análises da superfície de resposta e curvas de contorno foi possível determinar as condições para que se obtenha o máximo rendimento do processo. Tais condições de processo são apresentadas nos ensaios 2 e 5, e principalmente nos ensaios do ponto central (9, 10, 11 e 12), onde os valores em que as variáveis proporcionam as características desejadas do processo, foram:

- i) Rendimento do processo marginalmente próximo ou superior a 70% e, obviamente, inferior a 100%.
- ii) A concentração de glicose deve ser adequada, na medida que seja possível obter uma alta conversão da celulose em glicose quando se utiliza uma grande quantidade de Material Lignocelulósico.

Em suma, apesar da existência de desvios entre os resultados observados e preditos, os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios. Tais resultados mostram que a utilização do planejamento experimental por delineamento de composto central rotacional promove a otimização de mais de uma resposta, estabelecendo condições que garantam o resultado desejado para o processo final.

## 6 CONCLUSÕES

No processo de hidrólise enzimática o complexo enzimático Cellic® CTec e HTec 2, mostrou-se eficiente por possuir enzimas de alta eficiência que hidrolisam a celulose e hemicelulose, o que contribui para a obtenção de bons valores de conversão da celulose em glicose.

No primeiro planejamento quando a concentração de casca de arroz na hidrólise enzimática era alta, constatou-se que as concentrações de açúcares aumentaram, porém, o rendimento da hidrólise diminuiu com o aumento da mesma. Observou-se que a quantidade de Material Lignocelulósico é diretamente proporcional a liberação de açúcares, mas também é afetada pela transferência de massa durante a hidrólise enzimática. Notou-se, que quantidades alta de casca de arroz dificulta na adsorção das enzimas e causam o baixo rendimento do processo. Foi possível confirmar, neste primeiro planejamento, a necessidade de adicionar mais Cellic® CTec2 ( $\beta$ -glicosidase), já que com ela é possível converter maior quantidade de celobiose presente no meio para glicose.

No segundo estudo, feito os devidos ajustes nos valores das variáveis, ocasionou um aumento de rendimento e assim o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi maior do que o primeiro, confirmando um melhor ajuste dos dados. Concluiu-se que o aumento das concentrações do Coquetel Enzimático com um melhor ajuste na quantidade de Material Lignocelulósico, tiveram efeito positivo no processo e fizeram com que os rendimentos do planejamento aumentassem.

Uma vantagem em utilizar o delineamento de composto central rotacional para a otimização é ter um excelente planejamento aplicando técnicas estatísticas gerando bons resultados do processo. Em suma, a validação dos modelos determinados pelo planejamento experimental para conversão e concentração de glicose demonstra que a otimização planejada foi alcançada com êxito. E finalmente o melhor rendimento da condição de hidrólise enzimática dentro da faixa investigada foi de 80,07%.

## 6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base no projeto desenvolvido, foi verificado a necessidade de várias ações que deverão ser estudadas em todo o processo para uma melhor viabilidade do uso da casca de arroz e/ou outro material lignocelulósico para produção de bioetanol, tais como:

- 1) Análise de custos e balanços de massa para avaliar a viabilidade do pré-tratamento e comparar com outros pré-tratamentos.
- 2) Estudar diferentes condições de pré-tratamento com intuito de se diminuir ou minimizar a concentração dos inibidores na biomassa pré-tratada.
- 3) Avaliar o efeito dos inibidores e estudar a melhor forma de minimizá-los.
- 4) Otimizar as melhores condições do pré – tratamento.
- 5) Continuar os estudos de hidrólise enzimática com o uso de enzimas comerciais em diferentes materiais lignocelulósicos e aumento da escala de aplicabilidade.
- 6) Avaliar a agitação durante o processo de hidrólise enzimática.
- 7) Aplicar modelagem cinética durante a etapa de hidrolise enzimática usando modelos determinísticos.
- 8) Realizar a fermentação dos açúcares.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBAJO, M. O.; FROST, R. L. Infrared and <sup>13</sup>C MAS nuclear magnetic resonance spectroscopic study of acetylation of cotton. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, n. 1–2, p. 449–453, 2004.
- ADEL, A. M. et al. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part II: Physicochemical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 676–687, 2011.
- ALVES, R. E. **Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução**. São Carlos, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ANTUNES, A. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 1–9, 2006.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 4, 2010.
- ARREDONDO, H. I. V. **Avaliação exergética e exergo-ambiental da produção de biocombustíveis**. Tese de doutorado da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.
- BALL, S. et al. Analysis of Carbohydrates, Alcohols, and Organic Acids by Ion-Exchange Chromatography. **Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium, Agilent Technologies.**, v. 1, p. 1–98, 2011.
- BARROS, J. R. M. Prolegômenos. O passado no presente: a visão do economista. In: BUAINAIN, A. M. et al. (Eds.). **O mundo rural no Brasil do século 21: A formação de um novo padrão agrário e agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 2014. p. 16–22.
- BATALHA, M. O.; SILVA, A. L. Gerenciamento de sistemas agroindustriais: definições e correntes metodológicas. **Gestão Agroindustrial**, 2001.
- BERNARDES, R. C.; VARELA, C. A.; SOARES, A. Desafios da Consolidação sustentável da cadeia produtiva do Biodiesel no Brasil: Uma abordagem com base no Método da Hélice Tripla. **Revista de Administração da UNIMEP**, v. 10, n. 3, p. 145–161, 2012.

BOX, G. E.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery**. 2nd. ed. Wiley-Interscience New York, 2005.

BRAGA, B. et al. **Introdução à Engenharia Ambiental**. 2nd. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia na Agricultura**, v. 20, n. 4, p. 36–52, 2005.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. June, 2012.

CASARIN, F. et al. Planejamento experimental do processo de secagem da amora-preta (*Rubus sp*) para a produção de farinha enriquecida com compostos bioativos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.

CÉSAR, A. A. DA S. et al. TRANSFORMAÇÃO DA CASCA DE ARROZ EM UM PRODUTO DE MAIOR VALOR AGREGADO: POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE PAINÉIS PARTICULADOS. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 1, p. 303–313, 2017.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462–1476, 2012.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 85–89, 2007.

CONAB. Monitoramento Agrícola. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 2, n. 9, p. 1–104, 2015.

CONAB. Cana-de- açúcar. **Companhia Nacional de Abastecimento - 2º Levantamento 2016/17**, 2016.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: Arroz. **Monitoramento agrícola- Safra 2017**, v. 4, n. 1, p. 1–98, 2017.

COSTA, E. S.; MANSUR, H. S. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BLENDA DE QUITOSANA/POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) RETICULADAS QUIMICAMENTE COM GLUTARALDEÍDO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDO. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460–1466, 2008.

- COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 39–109, 1985.
- DA SILVA, A. E. D. S. **Identificação e quantificação via técnicas Cromatografia de Ácidos Graxos com Potencial Farmacológico em Frutos Amazônicos**. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais. Universidade de São Paulo, 2012.
- DAVIS, J. H.; GOLDBERG, R. A. **A Concept of Agribusiness**. Division of Research, Graduate School of Business Administration, Harvard University, 1957.
- DELLA, V. P. et al. Estudo comparativo entre sílica obtida por lixívia ácida de CA por tratamento térmico de CCA. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175–1179, 2006.
- DELLA, V. P.; KÜHN, I.; HOTZA DACHAMIR. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2001**, v. 1, n. 6, p. 778–782, 2001.
- DIEP, N. Q. et al. Potential for rice straw ethanol production in the Mekong Delta, Vietnam. **Renewable Energy**, v. 74, p. 456–463, 2015.
- ERDEI, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 506–514, 2013.
- ERNESTO, V. A. R. T. et al. Thermal characterization of lignocellulosic residue from different sugarcanes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 653–656, 2009.
- FARINAS, C. S. A parede Celular Vegetal e as Enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa**, 2011.
- FORSYTHE, W. G. et al. An efficient and flexible synthesis of model lignin oligomers. **Green Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 3031, 2013.
- FRAGOSO, D. DE B. et al. **Caracterização e Diagnóstico da Cadeia Produtiva do Arroz no Estado do Tocantins**. 1 Edição ed. Brasília: EMBRAPA, 2013.
- FUENTES, L. L. G. **Determinação de Dados Cinéticos da Deslignificação do Bagaço de Cana-de-Açúcar e da Hidrólise Enzimática no Pré-Tratamento com Hidróxido de Cálcio**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2009.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GRASEL, F. DOS S. et al. Inovação em Biorrefinarias I. Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*) e Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum*). v. 9, n. 1, 2017.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 141–146, 2006.

GUILLARME, D. et al. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1069–1082, 2010.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384–410, 2005.

HARI KRISHNA, S. et al. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 5, p. 467–470, 2000.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e a avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

HOAREAU, W. et al. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: Characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, n. 3, p. 567–576, 2004.

HORST, D. J. **Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

HUANG, H. et al. Thermochemical liquefaction characteristics of microalgae in sub- and supercritical ethanol. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 1, p. 147–153, 2011.

HUANG, H. J. et al. Thermochemical liquefaction of rice husk for bio-oil production with sub- and supercritical ethanol as solvent. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 102, p. 60–67, 2013.

IOELOVICH, M.; MORAG, E. Study of enzymatic hydrolysis of pretreated biomass at increased solids loading. **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 4672–4682, 2012.

ISROI et al. Structural changes of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) after fungal and phosphoric acid pretreatment. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14995–15012, 2012.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 93–99, 2012.

- KIM, S.; KIM, C. H. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. **Renewable Energy**, v. 54, p. 150–155, 2013.
- KINNARINEN, T.; HAKKINEN, A. Influence of enzyme loading on enzymatic hydrolysis of cardboard waste and size distribution of the resulting fiber residue. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 136–142, 2014.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.
- KOOTSTRA, A M. J. et al. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. Paper 31, p. 31, 2009.
- LABAT, G. A. A. **Estudo cinético da oxidação de ligninas obtidas da palha e do bagaço de cana e aplicações de lignina de bagaço em resinas à base de materiais naturais.** Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Universidade de São Paulo, 2008.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.
- LIU, Y. K. et al. Producing bioethanol from cellulosic hydrolyzate via co-immobilized cultivation strategy. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 2, p. 198–203, 2012.
- MACEDO, L. A.; ROUSSET, P. L. A.; VALE, A. T. Influência da composição da biomassa no rendimento em condensáveis da torrefação de resíduos vegetais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 34, n. 80, 2014.
- MARCHESINI, T.; PEREIRA, F. A.; MORAIS, M. M. **CASCA DE ARROZ : CARACTERIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA LIGNINA.** XVI Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química. **Anais**.Fortaleza, Ceará: set. 2016
- MARIA, A.; GALLETTI, R.; ANTONETTI, C. Biomass Pre-treatment: separation of cellulose, hemicellulose and lignin. Existing technologies and perspectives. **Eurobioref**, p. 69, 2011.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments.** 9th. ed. John Wiley & Sons, 2017.
- MONTIPÓ, S. et al. Bioconversão de hidrolisado da casca de arroz a ácido láctico. **II WSPI – Workshop em Sistemas e Processos Industriais**, p. 8–10, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, 2013.

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

MOREIRA, N. **Growing expectations: new technology could turn fuel into a bumper crop** *Science News*, 2005.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

OLIVEIRA, G. S. et al. An alkaline thermostable recombinant *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase presents bifunctional (endo/exoglucanase) activity on cellulosic substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 19–26, 2013.

PALLAPOLU, V. R. et al. **Effects of enzyme loading and B-glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies** *Bioresource Technology*, 2011.

PAN, X. et al. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 121–124, n. 3, p. 1069–1079, 2005.

PAULA, L. E. DE R. E. **Produção e avaliação de briquetes de resíduos lignocelulósicos**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira. Universidade Federal de Lavras, 2010.

PENGILLY, C. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. **Fuel**, v. 154, p. 352–360, ago. 2015.

PEREIRA, S. R. et al. Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: A way to boost the production of second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 131–135, 2012.

PEREIRA RAMOS, L. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863–871, 2003.

PETROLEUM, B. BP Statistical Review of World Energy. **BP Statistical Review of World Energy**, n. June, p. 1–48, 2016.

PINO, V. et al. Determination of the alkyl- and methoxy-phenolic content in wood extractives by micellar solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 505–513, 2007.

PINTO, B.; CALLONI, G. Obtenção de acetato de celulose a partir da casca de arroz (*Oryza sativa*). **Revista Liberato**, v. 14, p. 01–112, 2013.

PRATTO, B. et al. Estudo cinético da etapa de hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar: efeito da velocidade de agitação e da concentração de substrato. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ**, p. 1–8, out. 2014.

R.C. SAXENA, D.K. ADHIKARI, H. B. G. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melão de cana-de-açúcar Optimization of ethanol

production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p. 167–178, 2009.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas, 2010..

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 22–27, 2005.

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

RIBEIRO, S. C. A. et al. Otimização da desidratação osmótica de filés de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) através da metodologia de superfície de resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 485–492, 2008.

ROCHA, G. J. M. et al. Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: Delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 63–68, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 3a. ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RODRIGUES, P. D. O. **Ação sinérgica de celulasas e hemicelulasas fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis - Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. Instituto de Química da Universidade Federal Uberlândia / Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, 2016.

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 1, p. 54–63, 2008.

ROMANÍ, A. et al. Integrated approach for effective bioethanol production using whole slurry from autohydrolyzed Eucalyptus globulus wood at high-solid loadings. **Fuel**, v. 135, p. 482–491, 2014.

ROWLANDS, H.; ANTONY, J. Application of design of experiments to a spot welding process. **Assembly Automation**, v. 23, n. 3, p. 273–279, 2003.

RYABOVA, O. et al. A novel family of hemicellulolytic alpha-glucuronidase. **FEBS Letters**, v. 583, n. 9, p. 1457–1462, 2009.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 10, p. 971–977, 2008.

SANTOS, F. A et al. Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

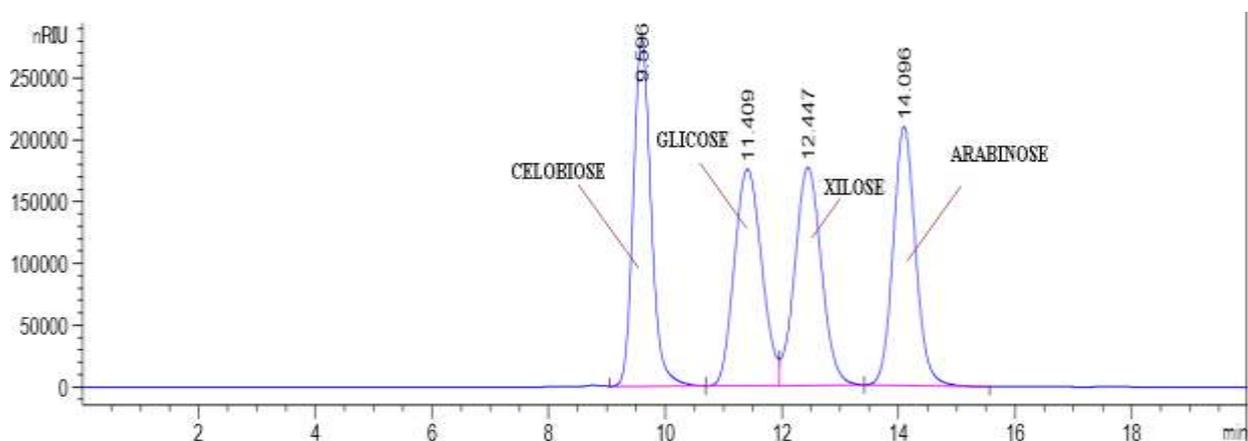
- SARAIVA MORAIS, J. P.; DE FREITAS ROSA, M.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. **Embrapa Algodão**, p. 54, 2010.
- SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.
- SHEN, D. K. et al. The pyrolytic degradation of wood-derived lignin from pulping process. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6136–6146, 2010.
- SHI, W. et al. Influence of ultrasonic pretreatment on the yield of bio-oil prepared by thermochemical conversion of rice husk in hot-compressed water. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 355–362, 2013.
- SILVA, V. F. N. DA. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. p. 116, 2009.
- SILVÉRIO, F. O. et al. Metodologia de Extração e Determinação do Teor de Extrativos em Madeiras de Eucalipto. **Revista Árvore**, v. 30, n. 6, p. 1009–1016, 2006.
- SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713–728, 2014.
- SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. 106f. Tese de Doutorado em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2016.
- SUHAS et al. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, 2016.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.
- TAPPI. T 203 cm-99. Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp. 2009.
- WATANABE, H.; TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 609–32, 2010.
- WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. **Análise de regressão: como entender o relacionamento das variáveis de um processo**. Volume 7 ed. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni da Escola de Engenharia da UFMG, 2006.
- XU, F.; SUN, R. C.; LU, Q. Characteristics of cellulose isolated by a totally chlorine-free method from *Caragana korshinskii*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, n. 5, p. 3251–3263, 5 set. 2006.
- XU, Y. et al. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 15, p. 1239–1241, 2003.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26–40, 2008.

YUNPU, W. et al. Review of microwave-assisted lignin conversion for renewable fuels and chemicals. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 119, p. 104–113, 2015.

ZHANG, J. et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4585–4589, 2011.

## ANEXOS

**Figura 10** – Padrão dos açúcares por Cromatografia Líquida.**Figura 11** – Ensaio 2 do segundo planejamento por Cromatografia Líquida.