



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PROCESSOS DE HIDRÓLISE APLICADOS EM BIOMASSAS DISTINTAS:  
CASCAS DE ARROZ E MICROALGAS PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES  
REDUTORES**

RODRIGO DE FARIA RODRIGUES

RIO GRANDE-RS

2018

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

**PROCESSOS DE HIDRÓLISE APLICADOS EM BIOMASSAS DISTINTAS:  
CASCAS DE ARROZ E MICROALGAS PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES  
REDUTORES**

RODRIGO DE FARIA RODRIGUES

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

Orientador: Prof. Dr. ADRIANO DA SILVA

Coorientador: Prof. Dr. PAULO HENRIQUE BECK

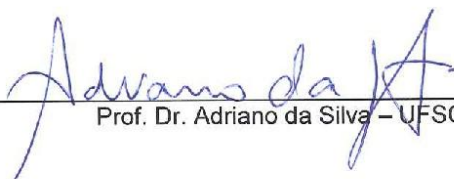
Coorientador: Prof. Dr. TONI JEFFERSON LOPES

RIO GRANDE-RS

2018

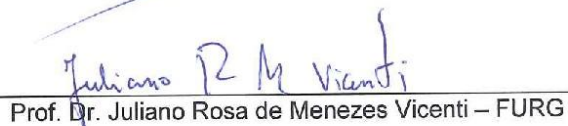
## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Rodrigo de Faria Rodrigues e aprovada em 1º de março de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

  
Prof. Dr. Adriano da Silva – UFSC

  
Prof. Dr. Toni Jefferson Lopes – FURG

  
Prof. Dr. Paulo Henrique Beck – FURG

  
Prof. Dr. Juliano Rosa de Menezes Vicenti – FURG

  
Prof. Dr. Fernando Junges – UNIPAMPA

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar saúde, força e coragem no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus queridos pais Rudney e Mabel, por todo amor, carinho e incentivo em todos os momentos, por todos os esforços e ensinamentos que me ajudaram a vencer mais está etapa;

Ao meu amor e noiva Silvia Monteiro da Rocha pelo companheirismo, apoio incondicional e amor dedicado, durante está caminhada. A você e toda sua família;

Minha irmã Sabrina e filha Isabelle, que mesmo não estando perto, sempre estiverem do meu lado torcendo por mim e compreenderam a minha ausência;

Aos meus avós e família que sempre estiveram comigo, reforçando minhas energias;

Ao grupo de amigos *The Bros*, pelas conversas, discussões e amizade que sempre me deram, mesmo longe;

Ao meu coorientador e como não dizer amigo, Dr. Paulo Henrique Beck, por ajudar a me orientar, buscar estruturas, condições e recursos para o desenvolvimento do trabalho. Muito obrigado;

Meu coorientador e também amigo Dr. Toni Jefferson Lopes, pelo acompanhamento em todos os momentos da elaboração desta dissertação, serei sempre grato por nunca ter deixado de lado o compromisso firmado comigo, obrigado pela ajuda;

Aos meus colegas de mestrado, em especial ao Miral por compartilhar trabalhos, estudos e experimentos durante este período;

Aos colegas do laboratório de orgânica, que me auxiliaram sempre que necessário nos experimentos realizados;

Aos técnicos de laboratório Michele e Jean, pela disposição de ajudar em todos os momentos que necessitei;

A FURG por oferecer um Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química de qualidade e gratuito;

A Capes pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, Muito Obrigado!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*  
Arthur Schopenhauer

## RESUMO

A atual dependência energética mundial de combustíveis fósseis e as preocupações com as alterações climáticas, provocadas pelo uso descontrolado destes combustíveis, têm instigado estudos direcionados para a produção de biocombustíveis. De todas as matérias-primas que se tem conhecimento atualmente, resíduos lignocelulósicos tem chamado atenção nas últimas décadas. Dentre estes, resíduos da orizicultura detacam-se por não terem alto valor agregado e necessitarem de descartes corretos. No contexto atual, as microalgas surgem como uma promissora biomassa sustentável, principalmente pela possibilidade de cultivo em terras que não consideradas aráveis e por utilizarem praticamente quaisquer tipos de águas para sua produção. Porém, estudos relatados para a produção de biocombustíveis destas biomassas, são direcionados exclusivamente para um tipo de material, neste caso, lignocelulósico ou de microalgas. Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um único processo que possa atender a produção de bioetanol a partir de biomassas distintas, casca de arroz e microalgas, onde as espécies estudadas foram *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.* Uma avaliação de processos de hidrólise química e físico-química foi proposta na biomassa de casca de arroz, material mais resiliente a quebra, para então uma futura aplicação das melhores condições avaliadas nas microalgas, sendo a variável resposta desta avaliação a concentração de açúcar redutor, determinada através do método do reagente 3,5 DNS. Dos métodos de hidrólise estudados para a ruptura da parede celular promovendo a extração de açúcares que tenham potencial para conversão em biocombustíveis, o físico-químico foi o que promoveu a melhor relação de rendimento para a extração nos dois tipos de biomassas secas estudadas (casca de arroz e microalgas), sendo o reagente de hidrólise o ácido sulfúrico a 2 mol/L, pressão de 117,68 kPa, 30 min e carga de biomassa de 40 g/L. A qual promoveu um rendimento na conversão de açúcar redutor nas microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.* e na casca arroz, de 89,4%, 54,7% e 24,5%, respectivamente. Estes resultados indicaram que tecnologias que atendam a extração de açúcares redutores em biomassas distintas, são viáveis, desde que estudos nas biomassas demonstrem similaridade em suas estruturas da parede celular. Determinar o perfil de açúcares formados em ambas biomassas, é uma etapa sugerida a trabalhos futuros, já que através disto será possível avaliar os microorganismos específicos para o máximo de conversão em etanos, dos açúcares formados.

Palavras-chave: Açúcar redutor; Bioetanol; Casca de arroz; Hidrólise; Microalgas.

## ABSTRACT

The current global dependence on fossil fuels and concerns about climate change brought about by the uncontrolled use of these fuels has instigated studies aimed at the biofuels production. Among these, residues of rice cultivation call attention because do not have high added value and, they need correct discards. In the current context, microalgae appear as a promising sustainable biomass, mainly due to the possibility of cultivation on land that is not considered arable and for practicing virtually any type of water for its production. However, studies reported for the biofuels production from these biomasses are exclusively directed to a type of material, in this case, lignocellulosic or microalgae. This study aims to develop a single process that can meet the production of bioethanol from different biomass, rice husk and microalgae, where the species studied were *Scenedesmus obliquos* and *Desmodesmus sp.* An optimization of chemical and physical-chemical hydrolysis processes was proposed in rice husk biomass, more resilient material to break, and then a future application of best optimized conditions in microalgae, being a variable response of the optimization to a reducing sugar concentration, through the reagent 3.5 DNS method. Of the hydrolysis methods studied for breaking the cell wall by promoting the sugars extraction which have potential for conversion to biofuels, physicochemical it promoted the best performance ratio for the extraction in the two types studied dry biomass (rice husk and microalgae). Hydrolysis reagent being 2 mol/L sulfuric acid, pressure of 117.68 kPa, 30 min and biomass loading of 40 g/L. Which promoted a yield in the conversion of reducing sugar in the microalgae *Scenedesmus obliquos* and *Desmodesmus sp.* and rice husk, of 89.4%, 54.7% and 24.5%, respectively. These results indicate that technologies that satisfy the reducing sugars extraction in distinct biomasses are feasible, since studies in the biomasses show similarity in their cellular wall structure. To determine the profile of the sugars formed in both biomasses, it is a suggested step for future work, since it would be possible to evaluate the specific microorganisms for the maximum conversion, from the sugars formed to ethanol.

Keywords:; Bioethanol; Hydrolysis; Microalgae; Reducing sugar; Rice husk.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arranjos de celulose envolvidos por hemicelulose e lignina.....	19
Figura 2 - Esquema da estrutura cristalina e amorfa da celulose. ....	20
Figura 3 - Unidades de glicose formadas através da hidrólise da celulose. ....	20
Figura 4 - Estrutura dos principais componentes da hemicelulose. ....	21
Figura 5 - Processo para a produção de biocombustível a partir de biomassa de microalgas. ....	23
Figura 6 - Vantagens e Desvantagens dos tipos de pré-tratamento de biomassas. ....	25
Figura 7 – Casca de Arroz limpa e tratada. ....	27
Figura 8 - Microalga <i>Scenedesmus obliquos</i> descongelada.....	27
Figura 9 - Fluxograma de procedimento e análise na casca de arroz.....	31
Figura 10 - Sistema hidrólise em refluxo .....	32
Figura 11 – Sistema Hidrólise em autoclave de mesa.....	33
Figura 12 - Reação colorimétrica entre o reagente DNS e a glicose.....	33
Figura 13 - Cromatograma para padrão na concentração de 10 mg/L para HMF e furfural e 100 mg/L para os ácidos fórmico, acético e levulínico.....	36
Figura 14 - Curva de calibração da glicose para o método de avaliação de açúcar redutor com o reagente 3,5 DNS.....	40
Figura 15 – Diagrama de pareto do efeito dos fatores e interações da hidrólise alcalina em refluxo na variável resposta. ....	44
Figura 16 - Cubo resposta do modelo proposto para hidrólise alcalina em refluxo com os fatores codificados. ....	45
Figura 17 - Diagrama de pareto do efeito dos fatores e interações da hidrólise ácida em refluxo na variável resposta. ....	47
Figura 18 - Cubo resposta do modelo proposto para hidrólise ácida em refluxo com os fatores codificados. ....	48
Figura 19 - Diagrama de pareto do efeito dos fatores e interações da hidrólise ácida em autoclave na variável resposta. ....	50
Figura 20 - Cubo resposta do modelo proposto para hidrólise ácida em autoclave com os fatores codificados. ....	51
Figura 21 - Produtos de degradação de açúcares em condições ácidas.....	53
Figura 22 - Comparação de secagem das microalgas. ....	57
Figura 23 - Comparação da obtenção de açúcar redutor (AR) dos métodos de secagem nas microalgas. ....	58



Figura 24- Microalgas maceradas após secagem em estufa. (a) <i>Scenedesmus obliquos</i> , (b) <i>Desmodesmus sp.</i> .....	58
Figura 25 - Extração de açúcar redutor da biomassa seca <i>Scenedesmus obliquos</i> , através dos processos de hidrólises avaliados em casca de arroz. ....	59
Figura 26 - Extração de açúcar redutor (AR) da biomassa seca <i>Desmodesmus sp.</i> , através dos processos de hidrólises avaliados em casca de arroz .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na hidrólise ácida de casca de arroz e microalga .....	37
Tabela 2 - Resultado da composição da casca de arroz. ....	39
Tabela 3 - Comparação da % total de celulose da casca de arroz utilizada neste trabalho com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais, relatados na literatura. ....	39
Tabela 4 – Comparação de diferentes ácidos na hidrólise em refluxo. ....	41
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2 <sup>3</sup> , com fatores e níveis estudados nos processos de hidrólise e suas respectivas respostas .....	42
Tabela 6 - Efeito dos fatores e interações com os respectivos índices estatísticos da hidrólise alcalina em refluxo para a concentração de açúcar redutor no hidrolisado. ....	43
Tabela 7 - Análise de variância para o modelo da hidrólise alcalina em refluxo .....	44
Tabela 8 - Efeito dos fatores e interações com os respectivos índices estatísticos da hidrólise ácida em refluxo para a concentração de glicose no hidrolisado. ....	46
Tabela 9 - Análise de variância para o modelo da hidrólise ácida em refluxo .....	47
Tabela 10 - Efeito dos fatores e interações com os respectivos índices estatísticos da hidrólise ácida em autoclave para a concentração de glicose no hidrolisado .....	49
Tabela 11 - Análise de variância para o modelo da hidrólise ácida em refluxo .....	49
Tabela 12 - Comparação dos processos de hidrólise em casca de arroz. ....	52
Tabela 13 - Concentração dos produtos de degradação nos processos de hidrólise da casca de arroz. .	53
Tabela 14 - Composição celulósica e %açúcar redutor obtido nos processos de hidrólise para cada biomassa lignocelulósica. ....	54
Tabela 15 - Composição de carboidratos das espécies de microalgas estudadas. ....	56
Tabela 16 - Concentração dos produtos de degradação nos processos de hidrólise da microalga <i>Scenedesmus obliquos</i> . ....	59
Tabela 17 - Concentração dos produtos de degradação nos processos de hidrólise da microalga <i>Desmodesmus sp</i> . ....	61
Tabela 18 - Comparação dos rendimentos obtidos nos processos otimizados das biomassas de Casca de arroz e microalgas. ....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de reagentes químicos utilizados durante o trabalho experimental.....	28
--	----

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

AR – Açúcar redutor

ART – Açúcar redutor total

CA – Casca de arroz

DNS – Método do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico

ECA – Extrativo da Casca de arroz

HACA – Hidrólise ácida em autoclave

HACR- Hidrólise ácida em refluxo

HALR – Hidrólise alcalina em refluxo

HAQ – Hidrólise ácida quantitativa

HMF – Hidroximetilfurfural

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês – High performance liquid chromatography)

PA – Palha de arroz

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Biomassa na matriz energética .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Material lignocelulósico .....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Celulose.....	20
3.2.2 Hemicelulose .....	21
<b>3.3 Casca de arroz.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Microalgas.....</b>	<b>22</b>
3.4.1 Carboidratos em microalgas.....	24
<b>3.5 Ruptura celular e hidrólise dos polissacarídeos.....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>26</b>
4.1.1 Casca de Arroz .....	26
4.1.2 Microalgas.....	27
4.1.3 Reagentes .....	28
<b>4.2 Métodos .....</b>	<b>29</b>
4.2.1 Caracterização da casca de arroz.....	29
4.2.1.1 Determinação do teor total de celulose.....	29
4.2.1.2 Determinação do teor total de sílica e inorgânicos (cinzas).....	29
4.2.1.3 Determinação do teor total de lignina.....	30
4.2.1.4 Determinação do teor total de hemicelulose .....	30
4.2.2 Obtenção do extrativo de casca de arroz.....	30
4.2.3 Determinação do teor total de umidade nas microalgas .....	31
4.2.4 Hidrólise.....	31
4.2.4.1 Hidrólise em refluxo .....	32
4.2.4.2 Hidrólise ácida em autoclave .....	32

4.2.5	Determinação do teor de açúcares redutores por método colorimétrico.....	33
4.2.5.1	Ajuste do pH da Amostra.....	34
4.2.6	Hidrólise ácida quantitativa (HAQ).....	34
4.2.7	Planejamento experimental.....	34
4.2.8	Identificação e quantificação de produtos de degradação de açúcares.....	35
4.2.9	Parametrização das condições dos processos de hidrólise.....	36
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Composição da Casca de Arroz.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Determinação da curva padrão do método 3,5 DNS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>Definição dos reagentes de hidrólise .....</b>	<b>41</b>
5.3.1	Reagente Ácido .....	41
5.3.2	Reagente alcalino.....	41
<b>5.4</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>42</b>
5.4.1	Hidrólise alcalina em refluxo (HALR) .....	43
5.4.2	Hidrólise ácida em refluxo (HACR).....	46
5.4.3	Hidrólise ácida em autoclave (HACA) .....	49
<b>5.5</b>	<b>Inibidores formados nos processos de hidrólise da casca de arroz .....</b>	<b>52</b>
<b>5.6</b>	<b>Aplicação das hidrólises avaliadas em outros materiais lignocelulósico .....</b>	<b>54</b>
<b>5.7</b>	<b>Aplicação dos processos avaliados de hidrólise em casca de arroz nas Microalgas <i>Scenedesmus obliquos</i> e <i>Desmodemus sp.</i> .....</b>	<b>55</b>
5.7.1	Processo de secagem das microalgas.....	56
<b>5.8</b>	<b>Aplicação nas microalgas dos resultados avaliados em casca de arroz.....</b>	<b>58</b>
<b>5.9</b>	<b>Comparação dos processos avaliados em biomassas distintas: Casca de arroz e Microalga.....</b>	<b>62</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
	REFERÊNCIAS .....	66

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento mundial econômico, assim como o aumento populacional, vem produzindo um crescimento exponencial no consumo de bens e serviços o que vem se destacando nas últimas décadas principalmente nos países emergentes (SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

Neste sentido destacam-se os combustíveis fósseis como carvão e principalmente o petróleo que é a maior fonte de matéria prima para produtos químicos para produção de bens e também sendo este o responsável pela maior parte da geração de energia no mundo. (DE ALMEIDA e SILVA, 2009, CARDOSO, 2005).

Inevitavelmente associou-se ao aumento no consumo e utilização de combustíveis fósseis provenientes de fontes não renováveis, a crescente geração de resíduos, poluição ambiental, o efeito estufa e com isto as mudanças climáticas inerentes (SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

Dentro deste contexto, salienta-se, a necessidade de explorar novas fontes de energia, assim como de aprimorar metodologias de produção associando-se as premissas de sustentabilidade, melhorando tanto os métodos de produção como o reaproveitamento de resíduos e também em agregar valores a subprodutos dos processos existentes de forma a manter o ciclo de crescimento sustentável em longo prazo (LAUFENBERG *et al.*, 2003; BEVILAQUA, 2010).

Com estes novos horizontes aparecem necessidades mundiais pela busca por novas fontes de matéria prima, para a produção de produtos acabados e energia com ênfase em sustentabilidade valorizando a baixa emissão de poluentes, para implementar a matriz energética atual (BEVILAQUA, 2010; LOPES, 2014). Tendo em vista as premissas de sustentabilidade a biomassa ressurge e agora como fonte renovável para biocombustíveis, que podem compor a matriz de geração de energia, principalmente em motores diminuindo a demanda e dependência de compostos de origem fóssil. (ANP, 2017).

O Brasil utiliza principalmente a cana-de-açúcar para bioetanol, combustível de primeira geração, por isso apresenta uma série de problemas, como utilizar terras aráveis para demanda alimentar, principalmente com o crescimento populacional (LOPES, 2014). Um grande interesse se destaca então na utilização de bioetanol de segunda geração, proveniente de biomassas consideradas de rejeito agroindustrial e florestal, onde se salienta os resíduos lignocelulósicos devido a sua abundância e baixo teor de proteína dificultando sua utilização como alimento animal (BEVILAQUA, 2010; GALBE; ZACCHI, 2012; REYES *et al.*, 1998).

Uma das maiores culturas produzidas no Brasil é o arroz, com o Rio Grande do Sul o maior produtor nacional (IBGE, 2016). A casca de arroz é um material lignocelulósico que contém um teor de celulose relativamente elevado (40-60%) e está amplamente disponível a um custo relativamente baixo (ANG *et al.*, 2013), sendo considerado um subproduto que representa milhões de toneladas produzidas no ano, já que é aproximadamente 20% em peso da semente seca de arroz (BEVILAQUA, 2010). A lignocelulose possui estrutura química complexa a qual é formada por celulose, hemicelulose e lignina, o percentual destes compostos varia com a natureza da biomassa e as condições de cultivo (SANCHEZ, 2009). Devido a esta estrutura complexa, é necessário um pré-tratamento com função de promover uma ruptura da parede celular, a fim de tornar a biomassa mais acessível à bioconversão (ANG *et al.*, 2013). A hidrólise ácida diluída ou alcalina é uma técnica muito estudada, que permite a liberação das pentoses e hexoses contidas na hemicelulose (HICKERT, 2010).

Outras fontes de biomassas são estudadas para suprir a demanda e auxiliar estes biocombustíveis de segunda geração, onde pode-se destacar as microalgas como uma das principais alternativas, sendo fonte para os biocombustíveis de terceira geração, já que fornecem carboidratos (celulose, xilose, galactose, arabinose, glicose e manose) que podem ser fonte de carbono para a fermentação, devido a isto, o interesse atual de utilizar esta biomassa na produção de bioetanol (HARUN *et al.*, 2010). As principais vantagens de utilizar biomassa de terceira geração, no caso microalgas, quando comparadas com fontes tradicionais de primeira e segunda geração são (LOPES., 2014; MIRANDA *et al.*, 2012):

- Alta produtividade por área de terreno, pela alta eficiência fotossintética;
- Grande capacidade de remoção de dióxido de carbono;
- Não necessitam de demanda de água doce;
- Praticamente todos os tipos de águas (salgadas e residuais podem ser utilizadas);
- Não utilizam terras aráveis;
- Facilidade de colheita;
- Alternativa de cultivo em terrenos inapropriados para culturas alimentícias, não comprometendo a produção de alimentos.

A estrutura química é particular de cada espécie de microalga, *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp* são as estudadas neste trabalho. Para recuperar os açúcares fermentescíveis presentes na parede intracelulares de microalgas e levar a bioetanol, é necessário haver a ruptura da parede celular, um pré-tratamento.

A biomassa pode ser pré-tratada de maneiras diferentes; Físico (exemplos: microondas, congelamento, quebra por esferas e autoclave) tem um alto consumo de energia associado;

biológico (enzimas ou micróbios) que está associado a uma taxa de hidrólise baixa que prolonga o tempo do processo; químico (hidrólise usando agentes alcalinos ou ácidos) comprovado com sucesso para várias biomassas, além de uma combinação Físico-Química (hidrólise química em Autoclave) (HARUN *et al.*, 2011; HARUN e DANQUAH, 2011; LEE *et al.*, 2010). Os processos de pré-tratamento químicos ácidos geralmente aplicam ácido clorídrico e sulfúrico e nos alcalinos cal e hidróxido de sódio. O pré-tratamento ácido é mais preferível uma vez que proporciona maior eficiência na conversão de materiais celulósicos (RABELO *et al.*, 2009). Durante o processo de pré-tratamento ácido, vários parâmetros influenciam significativamente a quantidade total de açúcares fermentáveis libertados. Estes incluem tempo de processo, temperatura, quantidade de carga de substrato e concentração de ácido ou base (HARUN e DANQUAH, 2011).

Dentro deste contexto, diversos estudos já foram realizados com o objetivo de maximizar a bioconversão de materiais lignocelulósicos e de microalgas, porém, até o momento, não se encontrou estudos que proponham uma única tecnologia, que vise atender estas duas biomassas distintas na bioconversão em etanol. A ideia de alinhar duas biomassas distintas, se reforça com o pensamento de sustentabilidade e maior produção de biorrefinarias, que não teriam mais sua dependência atrelada a uma única fonte renovável. Então neste trabalho, é proposto estudo que possa alinhar o processo de hidrólise na extração de açúcares redutores, em biomassa de casca de arroz, o qual tem uma parede celular de difícil ruptura, com a biomassa de microalga, tendo o intuito de identificar se é possível uma única tecnologia que possa realizar o máximo de extração de açúcares fermentescíveis nestas biomassas distintas.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo é analisar um estudo utilizando o método estatístico, dos processos de hidrólise (ácida e alcalina em refluxo e ácida em autoclave) em biomassa de casca de arroz (CA), para extração de açúcar redutor (AR), e posterior, utilização dos melhores resultados obtidos, em biomassa de microalgas das espécies *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*, avaliando através de comparações entre os resultados e com a literatura se a iniciativa de promover uma avaliação que seja aplicável em bioamassas distintas é viável.

### 2.2 Objetivos específicos

- Definir os reagentes químicos utilizados nos processos de hidrólise química;
- Avaliar as variáveis no processo de hidrólise: tempo, concentração do agente de hidrólise e carga da biomassa de CA;
- Analisar estatisticamente os resultados e definir as melhores condições das variáveis de cada processo para obtenção de AR na CA;
- Estudar o provável perfil majoritário de açúcares formados no melhor processo de hidrólise;
- Aplicar nas microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*, os melhores resultados do processos de extração de AR obtidos na CA;
- Discutir os resultados obtidos nas duas biomassas (CA e microalgas) e avaliar a possibilidade aplicar uma única metodologia na extração de açúcares em biomassas distintas.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

De acordo com DEMIRBAS (2008) o mundo atual é energeticamente dependente de combustíveis fósseis que representam 80% das formas atuais de abastecimento de energia, onde destacam-se o carvão e, principalmente, o petróleo. A utilização descomedida destes combustíveis fósseis acarretou inevitavelmente em um aumento exponencial na poluição ambiental, o efeito estufa e a geração de resíduos. O desenvolvimento de processos tecnológicos que permitam a explorar novas fontes de energia renováveis, torna-se de suma importância e vem sendo explorado em escala laboratorial para posterior uso industrial. Onde destaca-se as biomassas, que atendem estas premissas e necessidades atuais (DEMIRBAS, 2008; SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

Devido a diversificação de biomassas e de suas estruturas, muitos processos de sua conversão em biocombustíveis são utilizados, porém, de forma direcionada a um material específico. No entanto, nem de forma direcionada há um domínio da tecnologia de bioconversão completamente desenvolvido, logo processos que permitam ser utilizados para diversas biomassas diferentes torna-se uma perspectiva importante (BRETHAUER e WYMAN, 2010; GALBE; ZACCHI, 2012).

#### 3.1 Biomassa na matriz energética

O termo biomassa equivale a qualquer matéria orgânica que seja renovável, derivada de animais ou plantas. Tem ganhado cada vez mais importância ao longo das décadas, devido à dependência energética do mundo atual de combustíveis de origem fóssil, tendo como uma promissora alternativa a utilização de biomassa, que atende as premissas de sustentabilidade para produção de biocombustíveis, que podem auxiliar a diminuir esta dependência energética, além de reduzir o impacto drástico ao meio ambiente que a queima de combustíveis fósseis acarreta ao planeta. A biomassa além de ter a premissa de renovável, está abundantemente no planeta e a baixo custo. É constituída principalmente de compostos com alta massa molar como, por exemplo, celulose, hemicelulose, amido, lipídeos, proteína e lignina (ANP, 2017; HOSSAIN *et al.*, 2008; ZHANG, 2008).

Porém, não é todo tipo de biomassa que traz apenas benefícios, biomassas oriundas de culturas alimentares como exemplo o milho, beterraba, cana de açúcar, etc. para a produção de bioetanol, os quais são denominados biocombustíveis de primeira geração, os quais utilizam terras aráveis para a produção alimentar (LOPES, 2014).

Pode-se ressaltar a biomassa lignocelulósica que é a união da celulose, hemicelulose e lignina, oriunda de resíduos agroindustrial e florestal (palhas, cascas, madeiras, cavacos etc), corresponde a mais de 50% da biomassa produzida mundialmente, é um resíduo de difícil utilização como alimento animal devido seu baixo teor de proteína e sendo por tudo isso uma alternativa de baixo custo com potencial de se tornar importante matérias-prima na bioconversão em etanol. Os biocombustíveis produzidos de materiais lignocelulósicos são considerados de segunda geração (BEVILAQUA, 2010; ESCOBAR *et al*, 2009; GALBE; ZACCHI, 2012).

Porém nos últimos anos, um crescente interesse no setor industrial na produção de biocombustíveis derivados da biomassa de algas, classificados como de terceira geração, vem ganhando força, como um fonte de energia renovável e sustentável. Vários aspectos positivos são mencionados na utilização desta matéria-prima na produção de biocombustível, onde destaca-se: facilidade no cultivo, altas taxas de crescimento, não utilizam terras aráveis, podem ser cultivadas em praticamente todos tipos de água (doce, salobra, efluente domésticos e industriais), reduzem a emissão de CO<sub>2</sub> já que utilizam como fonte de alimento e são altamente biodegradáveis (HARUN *et al.*, 2010; LOPES., 2014; MIRANDA *et al.*, 2012).

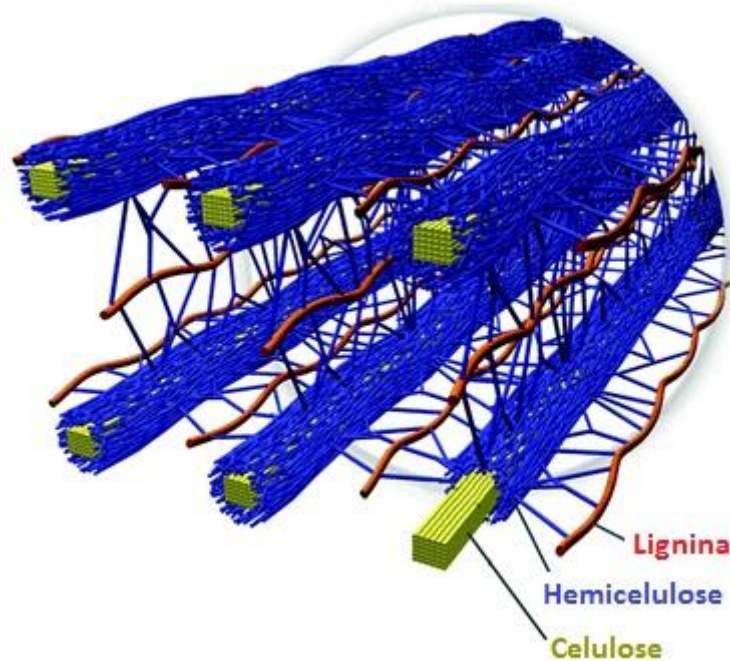
### **3.2 Material lignocelulósico**

A biomassa lignocelulósica, é resíduo agroindustrial e florestal que não concorrem com a produção de produtos alimentícios e sua abundancia representa uma matéria-prima importante para a produção de biocombustível, denominado para este tipo de biomassa como de segunda geração. Além de poder reduzir a dependência na utilização de matéria-prima de origem fóssil e a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa (ligado diretamente às mudanças climáticas). Porém a abundância de resíduo oriundo da agroindústria, como exemplo a orizicultura que tem seus principais resíduos a casca e a palha de arroz, tem sido um fator de preocupação, pois seu descarte inadequado tem provocado danos ao meio ambiente (BEHERA, *et al.*, 2014; BEVILAQUA, 2010; SIVAKUMAR 2010). No entanto, o processo de bioconversão de matérias lignocelulósicos a etanol é muito mais árduo do que na utilização da cana-de-açúcar (biocombustível de primeira geração) e materiais ricos em amido. Atrelado a isto, não há um domínio da tecnologia de bioconversão completamente desenvolvido para este tipo de material, tendo ainda baixas conversões em etanol, um balanço energético negativo e acarretado a isto ainda tem os elevados custos de produção. (BRETHAUER e WYMAN, 2010; GALBE; ZACCHI, 2012, ZHENG *et al.*, 2009).

A composição exata dos resíduos lignocelulósicos com relação aos constituintes e as proporções entre eles variam de cada espécie, tempo de colheita e de suas condições ou estágio de crescimento. Este tipo de biomassa oriunda da orizicultura é composto por celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e a lignina (10-25%), além de extrativos e compostos orgânicos (KUMAR *et al.*, 2008; RABELO *et al.*, 2009).

A biomassa lignocelulósica tem uma estrutura rígida e pouco reativa, pode-se observar na Figura 1, que as microfibras de celulose estão envolvidas em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina, a qual atua como um bloqueio natural a ataques externos. Devido a isto, a dificuldade em se bioconverter este tipo de material. (BEVILAQUA, 2010; DOHERTY, 2011).

Figura 1 - Arranjos de celulose envolvidos por hemicelulose e lignina.



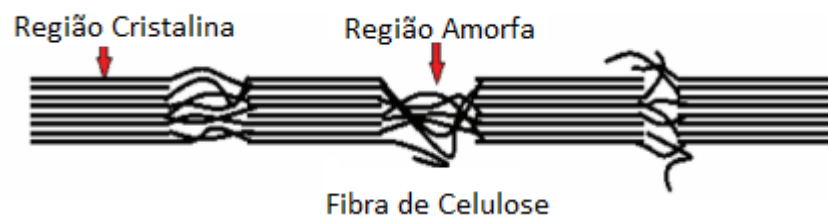
Fonte: DOHERTY, 2011.

Devido a esta complexidade estrutural, um processo que consiga acessar e quebrar principalmente a estrutura cristalina da celulose com o máximo de conversão em monossacarídeos é um entrave na tecnologia.

### 3.2.1 Celulose

A celulose é um biopolímero linear formado por monômeros que são unidades de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), unidas através de ligações químicas  $\beta$  – (1-4) envolvendo átomos de oxigênio, formando o dímero celobiose que se repetem várias vezes em sua cadeia. É o principal componente da parede celular do material lignocelulósico. É normalmente o composto mais abundante na biomassa e sua maior fração apresenta estrutura cristalina tendo maior dificuldade à quebra de sua estrutura, porém uma parte apresenta estrutura amorfa a qual é mais sucessível a degradação, Figura 2. Apresentam um alto grau de polimerização por molécula (7000 a 10000 moléculas) (ANG, *et al.*, 2013; BAJPAI, *et al.*, 2013; SANCHES, 2009).

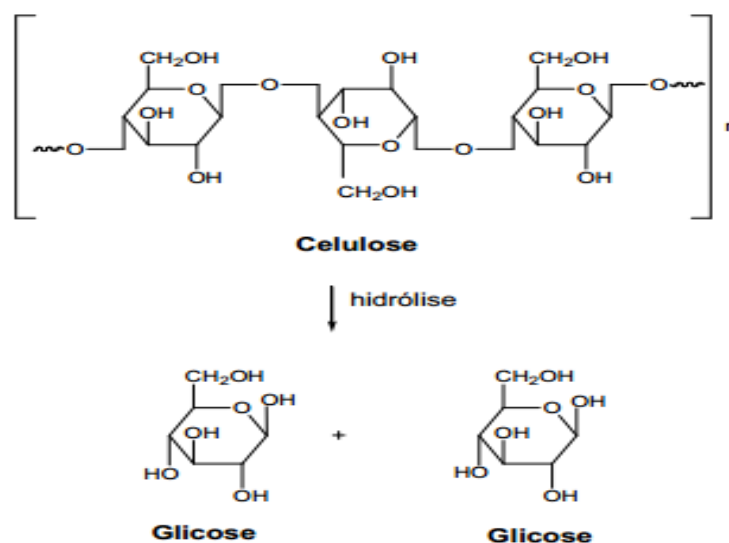
Figura 2 - Esquema da estrutura cristalina e amorfa da celulose.



Fonte: Adaptado de BAJPAI, *et al.*, 2013.

Então para obterem-se os monômeros de glicose é necessário que haja uma ruptura nesse polímero através de um processo de hidrólise, representado na Figura 3 (BEVILAQUA, 2010).

Figura 3 - Unidades de glicose formadas através da hidrólise da celulose.

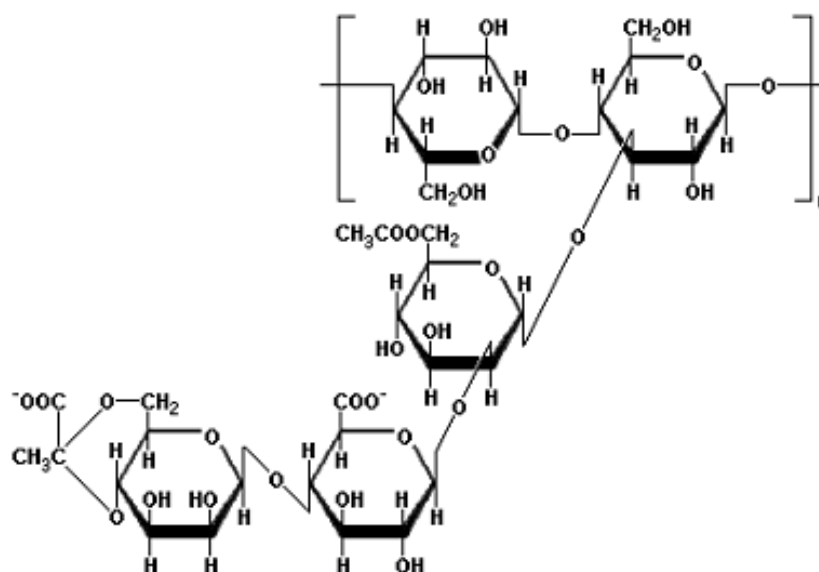


Fonte: BEVILAQUA, 2010.

### 3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose (poliose) se diferencia da celulose por ser completamente amorfo, um polímero ramificado de estrutura aleatória, com pouca força, facilitando a sua quebra em monômeros, Figura 4. Age como substância de reserva e de sustentação da fibra vegetal, chegando até 40% do material da parede celular. Estruturalmente a hemicelulose está associada à celulose, presentes em quase todas as paredes celulares das plantas. Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta cadeias mais curtas, 500 a 3000 moléculas. Tem-se a hemicelulose composta por diversos açúcares dentre os principais as hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose), este último geralmente em maior quantidade. Em alguns casos podem apresentar ácidos urônico e acético em sua estrutura (BEVILAQUA, 2010; KULKARNI, *et al.*, 2012; SINGH, *et al.*, 2011).

Figura 4 - Estrutura dos principais componentes da hemicelulose.



Fonte: KULKARNI, *et al.*, 2012.

### 3.3 Casca de arroz

O arroz é um cereal explorado mundialmente para alimentação, sendo assim uma das culturas alimentícias mais importantes no mundo, sendo parte da dieta básica de praticamente todos os países, segundo o balanço realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção mundial da safra de 2016/2017 foi de 483,81 milhões de toneladas, sendo a China o principal produtor, responsável por 30% de grãos de arroz produzido. O Brasil é o maior produtor do MERCOSUL e um dos maiores produtores mundiais deste cereal com uma produção na safra de 2016/2017 de 12,3 milhões de toneladas, sendo o Rio Grande

do Sul (RS) o principal estado produtor no Brasil (CONAB, 2017). Segundo dados do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA) uma produção na última safra 2016/2017 atingiu 8,7 milhões de toneladas de arroz produzido no estado, responsável por 70% de toda produção nacional. Relacionado a isto, 20% do peso do arroz é correspondente a casca, podendo estimar que apenas na última safra arrozeira do RS se produziu 1,8 milhões de toneladas de casca de arroz (ANG *et al.*, 2013; BEVILAQUA, 2010; CONAB, 2017; IBGE, 2016; IRGA, 2017).

Na agroindústria arrozeira a casca de arroz, por ser formada em grandes quantidades é um resíduo que trás alguns problemas, principalmente por não possuir valor comercial pela sua baixa propriedade nutritiva e elevado teor de sílica, que impedem então o seu uso na alimentação animal. Há outros problemas como, espaço para armazenamento, lenta biodegradação e um elevado custo de transporte (LUDWING, 2004; REYES, *et al.*, 1998). Assim, seu descarte acaba sendo através da queima, do descarte em aterros ou ainda algumas empresas da agroindústria no Estado do Rio Grande do Sul (RS) utilizam este resíduo na geração de energia elétrica da planta (FOUNTORA, 2015).

A casca de arroz é composta principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e sílica, com a quantidade destes compostos variando com diversos fatores como o cultivo, tempo de colheita e de suas condições ou estágio de crescimento (JOHA, *et al.*, 2012). É um material fibroso, abrasivo e com natureza resiliente, a qual é um problema na sua bioconversão, necessitando então de um pré-tratamento para romper a ligação da celulose e hemicelulose com a lignina, que serve como uma “cola” entre elas, além de desestabilizar a estrutura cristalina da celulose (ANG *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2013).

Devido a sua composição alta de celulose e hemicelulose, a casca de arroz é um material lignocelulósico promissor na quebra destes polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (monossacarídeos) e então sua bioconversão em etanol. Entretanto é necessário um pré-tratamento da biomassa, a qual consiga converter ao máximo as estruturas polissacarídeas em monossacarídeos, porém o processo de pré-tratamento deve ser considerado como um todo, desde a liberação de açúcares fermentescíveis até a digestão dos sólidos (FOUNTORA, 2015; SHI *et al.*, 2013).

### **3.4 Microalgas**

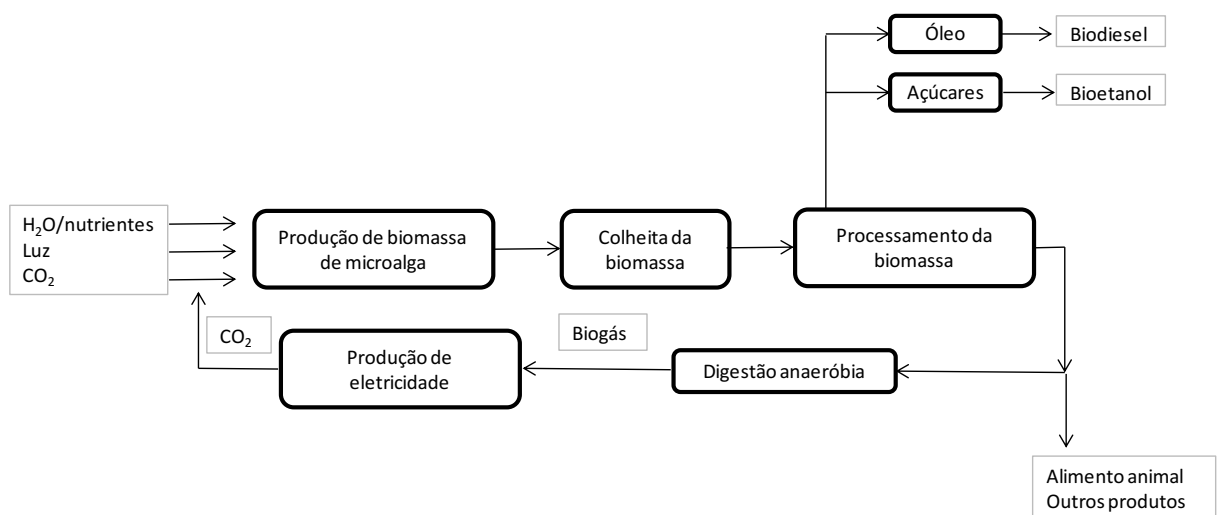
As algas estão entre as formas de vida mais antigas no mundo, consideradas precursoras das plantas, podem apresentar estrutura procariótica (geralmente cianobactérias) ou eucariótica (geralmente algas comuns). Microalga é um termo que se refere às algas

microscopias (eucariontes) e as cianobactérias, bactérias fotossintéticas (procariontes) e são classificadas de acordo com a pigmentação, ciclo de vida, estrutura celular e morfologia por exemplo (BRENNAN e OWENDE, 2010).

As microalgas são pequenos organismos fotossintéticos com um crescimento acelerado em praticamente todos os tipos de água e em diversas condições ambientais. O fato das microalgas se encontrarem submersas em água facilita o acesso ao dióxido de carbono e a nutrientes, conferindo uma maior eficiência na conversão da energia solar em biomassa (SCHENK *et al.*, 2008). As microalgas podem ajustar sua estrutura interna para eliminar compostos que podem atuar como inibidores de seus organismos, devido a isto sua capacidade de adaptação a praticamente qualquer ambiente (CHISTI, 2007).

A produção de biocombustível de microalga começou a ser investigada em 1950, porém ganhou mais interesse a partir de 1980. Vários resultados indicam as microalgas como fonte promissora, por serem capazes de produzir diversos biocombustíveis, entre eles o bioetanol produzido a partir do material celulósico, hemiceluloses, açúcares amido e resíduos (DEMIRBAS, 2008). Segundo CHISTI (2007), as microalgas surgem no atual cenário energético como a principal matéria-prima sustentável capaz de assegurar a produção de biocombustíveis, os quais são classificados de terceira geração, na Figura 5 está à representação do processo para a produção de biocombustíveis proposto por CHISTI (2008).

Figura 5 - Processo para a produção de biocombustível a partir de biomassa de microalgas.



Fonte: CHISTI, 2008.

Este tipo de combustível (terceira geração) se destaca entre os de primeira e segunda geração, já que a produção da biomassa de microalga não necessita de demanda de água doce



para seu cultivo, não utiliza terras aráveis e por sua capacidade de crescimento, independente da qualidade da água e/ou em terras não aráveis com capacidade de absorver grandes quantidades de CO<sub>2</sub> (utiliza o gás que causa o efeito estufa como alimento), sintetizando em matéria-prima (exemplo: polissacarídeos) para a produção de biocombustível (CHISTI, 2008; HARUN *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2012).

### **3.4.1 Carboidratos em microalgas**

Os carboidratos são os principais produtos derivados da fixação do CO<sub>2</sub> durante o processo fotossintético. Estes carboidratos são acumulados principalmente na forma de celulose na parede celular e amido nos plastídios (grupo de organelas), tendo baixo teor de hemicelulose e sem lignina. Porém sua composição pode divergir significativamente para cada espécie (CHEN *et al.*, 2013).

Para algumas microalgas, os polímeros de glicose produzidos através de celulose / amido são o componente predominante nas paredes celulares e produtos armazenados de microalgas. As microalgas são consideradas uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol porque possuem paredes celulares à base de celulose, com amido acumulado como principal fonte de carboidratos. Tanto o amido como a maioria dos polissacarídeos de parede celular pode ser convertido em açúcares fermentáveis para a produção subsequente de bioetanol por meio de fermentação microbiana (CHEN *et al.*, 2013; HARUN *et al.*, 2011).

### **3.5 Ruptura celular e hidrólise dos polissacarídeos**

No processo de ruptura celular os polissacarídeos provenientes da celulose, hemicelulose, amido ou de outros polissacarídeos presentes no interior da biomassa, são liberados a partir do meio intracelular, necessitando serem hidrolisados para darem origem a monossacarídeos (hexoses e pentoses) (BRENNAN e OWENDE, 2010; HARUN *et al.*, 2011). Esta etapa de ruptura é geralmente chamada de pré-tratamento. Usualmente os principais métodos são físico, químicos e biológicos, onde as principais vantagens e desvantagens de cada pré-tratamento estão demonstradas na Figura 6, apresentados por PAULO (2011).

Figura 6 - Vantagens e Desvantagens dos tipos de pré-tratamento de biomassas.

<b>Pré-tratamento</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Físico	Não há produtos químicos tóxicos envolvidos.	Consumo de energia elevado e hidrólise insuficiente.
Químico	Rapidez e eficiência da hidrólise.	Custos elevados. Se for utilizado ácido concentrado pode ocorrer corrosão do equipamento e formação de substâncias tóxicas. Em condições ácidas pode ainda ocorrer decomposição dos monossacáridos em componentes indesejáveis que inibem a fermentação.
Biológico	Selectividade, menor quantidade de resíduos, pode ser desenvolvido a temperaturas relativamente baixas e possibilita o uso de equipamento simples.	Necessita de pré-tratamento prévio, processo moroso e custo elevado de algumas hidrolases.

Fonte: PAULO, 2011.

Geralmente o processo físico é realizado para proporcionar uma maior área de superfície de contato feito com processos de pirólise e fragmentação mecânica. No pré-tratamento biológico a degradação da biomassa visando liberar açúcares fermentescíveis se dá através de micróbios e enzimas, consideradas mais corretas no âmbito ambiental, porém apresenta um tempo longo de processo, comparado com os outros métodos, pela baixa taxa de hidrólise. Já o pré-tratamento químico (ácido e alcalino) é o mais comumente utilizado, o qual tornou-se um dos métodos mais promissores para melhorar a biodegradabilidade da celulose pela remoção da hemicelulose e/ou lignina, também para diminuir o grau de polimerização e cristalinidade, e é considerado um sistema de baixo custo (BEHERA, *et al.*, 2014; HARUN *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2009).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo é utilizada as biomassas de casca de arroz e de microalgas de duas espécies: *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*

Os processos de hidrólise como método de ruptura da parede celular destas biomassas serão testados, a fim de quantificar os açúcares redutores liberados. Os processos de hidrólise química e físico-química realizados como pré-tratamento para liberação de açúcares fermentescíveis com possível capacidade de bioconversão a etanol, são estudados na biomassa de casca de arroz a fim de avaliar estes processos e, posteriormente, aplicados nas biomassas de microalgas.

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Casca de Arroz

A casca de arroz (CA) utilizada é originária da cidade de Dona Francisca no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Inicialmente, toda casca de arroz utilizada foi lavada com água corrente (3 vezes com 100 mL), até notar-se límpido, visando à remoção de sujidades como poeiras e outros compostos que estejam aderidos à casca. A casca de arroz tem em torno de 3% de umidade e, por isso, após a lavagem passou para secagem em estufa a 60°C por 48 h (REYES *et. al*, 1998).

Antes do processo de hidrólise, a casca de arroz foi limpa e tratada com solventes polares e apolares de forma a reduzir a interferência de possíveis contaminantes que não fazem parte da estrutura da casca de arroz, esse procedimento é chamado de remoção de extrativos. O procedimento remoção de extrativos de compostos lignocelulósicos consiste em lavagens exaustiva do material com n-hexano e etanol por 48 h a casca é filtrada e seca em estufa a 50°C até peso constante (BROWNING, 1967). Por fim, a CA é submetida a um moinho de facas e então passada em uma peneira onde a casca utilizada foi retida na peneira de mesh 46 (diâmetro de partícula 0,420-0,354mm) e então pronta para o processo de hidrólise. Na Figura 7, está representada a CA após os procedimentos citados.

Figura 7 – Casca de Arroz limpa e tratada.



#### 4.1.2 Microalgas

A produção das duas espécies de biomassa de microalgas, *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*, para este projeto foi realizada na FURG na Estação Marinha de Aquicultura – EMA na Praia do Cassino em Rio Grande – RS e no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina encontra-se instalado na Estação de Maricultura da Barra da Lagoa, Ilha de Santa Catarina, SC. As microalgas mantiveram-se congelada a  $-12^{\circ}\text{C}$  e só foram descongeladas porções prévias necessárias para cada experimento de secagem. Na Figura 8, está demonstrada a microalga *Scenedesmus obliquos* descongelada.

Figura 8 - Microalga *Scenedesmus obliquos* descongelada.



### 4.1.3 Reagentes

Todos reagentes utilizados durante este estudo são comerciais e não sofreram nenhum processo de purificação ou secagem, e os principais estão demonstrados no Quadro 1, abaixo.

**Quadro 1** - Lista de reagentes químicos utilizados durante o trabalho experimental

Nome	MM	Fórmula	Pureza	Outras características	Marca
Ácido 3,5 - dinitrossalicílico	228,12	$C_7H_6O_5 \cdot H_2O$	puro	--	Merck
Ácido acético glacial	60,05	$CH_3COOH$	p.a. acs	--	Alphatec
Ácido clorídrico	36,46	HCl	p.a. acs	--	Dinâmica
Ácido fórmico	46,03	$CH_2O_2$	p.a.	85%	Cinética
Ácido itaconico	130,10	$C_5H_6O_4$	p.a.	--	Aldrich
Ácido nítrico	63,01	$HNO_3$	p.a.	65%	Vetec
Ácido sulfúrico	98,08	$H_2SO_4$	p.a. acs	--	Alphatec
Álcool etílico	46,07	$CH_3CH_2OH$	p.a. acs	99%	Vetec
Amianto Branco	--		p.a.	--	Nuclear
D-Glicose anidra	180,16	$C_6H_{12}O_6$	p.a.	--	Synth
Éter etílico	74,12	$(CH_3CH_2)_2O$	p.a.	--	Synth
Hidróxido de Potássio	56,11	KOH	p.a.	--	Vetec
Hidróxido de sódio	40,04	NaOH	p.a. acs	--	Vetec
n-hexano	86,17	$C_6H_{14}$	p.a.	--	Vetec
Tartarato duplo de sódio e potássio	282,23	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	p.a. acs	--	Alphatec

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Caracterização da casca de arroz

#### 4.2.1.1 Determinação do teor total de celulose

O teor total de celulose da casca de arroz foi calculado conforme a Equação 1 descrito por RODRIGUES (2010), que se baseia na dissolução de todos os componentes da amostra, com exceção dos minerais e da celulose, por meio de um reagente ácido. O método foi utilizando casca de arroz limpa e seca. Primeiramente, preparou-se amianto como meio de filtração e tarou-se cadinhos de porcelana, incinerando cada cadinho a 550 °C durante 30 min. Para a amostra foi pesado aproximadamente 1 g de amostra previamente seca (2 h em estufa a 105 °C), em triplicata, e levada à digestão em tubos de ensaio contendo uma solução de 72,7% de ácido acético, 18,2% de água destilada e 9,1% de ácido nítrico durante 30 min. Após adição de etanol e resfriamento a temperatura ambiente, a solução foi filtrada, sendo em seguida levada a uma estufa a 105 °C para secagem durante 2 h. Após resfriar em dessecador e fazer a pesagem (cadinho + celulose + minerais), a amostra foi incinerada em mufla a 550 °C por 30 min para obtenção do massa de celulose.

$$\%celulose = \left( \frac{m_{ca}^i - m_{caf}}{m_{ca}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Em que:  $m_{ca}^i$ =massa de casca de arroz antes da mufla (após a hidrólise ácida dos componentes);  $m_{caf}$ = massa de casca de arroz após a mufla; e  $m_{ca}$ = massa de casca de arroz inicial.

#### 4.2.1.2 Determinação do teor total de sílica e inorgânicos (cinzas)

A composição total de sílica e cinzas é determinada através da Norma ASTM D1102 (ASTM, 2013). Onde a amostra limpa e seca do material lignocelulósico é adicionada a um cadinho calcinado (submetido à queima em forno mufla 550°C, resfriado e mantido em dessecador), seco e pesado. O cadinho contendo a amostra então é submetido a mufla, em um aquecimento gradual até 600°C e então é mantido por 3 h, segundo o método, neste tratamento todos os compostos orgânicos são carbonizados. Após isto, o cadinho é submetido a consecutivos aquecimentos de 30 min, resfriamento e pesagens até se observar a massa constante. E então, a composição de sílica e cinzas se dá pela relação da massa inicial da

amostra original com a diferença de massa inicial e a massa final de casca de arroz. O método foi realizado em triplicata e utilizando a massa de 1 g de casca de arroz.

#### **4.2.1.3 Determinação do teor total de lignina**

A determinação do teor total de lignina se realizou através da Norma TAPPI, T 222 om-02 (TAPPI, 2002), a qual utiliza o método de Klason. Este método baseia-se na hidrólise total dos carboidratos em uma solução de ácido sulfúrico concentrado de 72% (m/m) por 48 h, posteriormente, com um refluxo do mesmo ácido diluído a 4% (m/m) por mais 24 h. O resíduo final deste processo é seco e pesado. No final se tem todos os compostos celulósicos degradados e separados do substrato por solubilização. Com isto, descontando o percentual de sílica mais cinzas, determinasse o teor de lignina insolúvel em ácido (Lignina de Klason). Já o teor de lignina solúvel em meio ácido é quantificado na solução filtrada através da absorvância no ultravioleta com comprimento de onda de 280 nm, e somando ao primeiro valor, assim chega-se a lignina de Klason existente na amostra. O método foi realizado em triplicata e utilizando 1 g de casca de arroz.

#### **4.2.1.4 Determinação do teor total de hemicelulose**

Considerando a composição total do material lignocelulósico sendo de lignina, material inorgânico, celulose e hemicelulose, a obtenção do percentual de composição da hemicelulose pode se dar pela diferença dos percentuais dos outros compostos, conforme Equação 2.

$$\%hemicelulose = 100\% - \%lignina - \%celulose - \%(sílica + cinzas) \quad (2)$$

#### **4.2.2 Obtenção do extrativo de casca de arroz**

Uma metodologia foi proposta por SIMUNDI (2017), a fim de se remover todos compostos do material lignocelulósico exceto celulose e sílica, ou seja, o procedimento tem como finalidade de obter um extrativo de casca de arroz (ECA), um composto celulósico puro. A extração da celulose foi realizada em processo de três etapas, em que a primeira etapada foi utilizando ataque ácido (ácido sulfúrico), na segunda etapa a sílica foi extraída utilizando uma solução de hidróxido de potássio, e na terceira etapa sucessivos procedimentos de branqueamento por ácido sulfúrico, hidróxido de potássio e clorito de sódio.

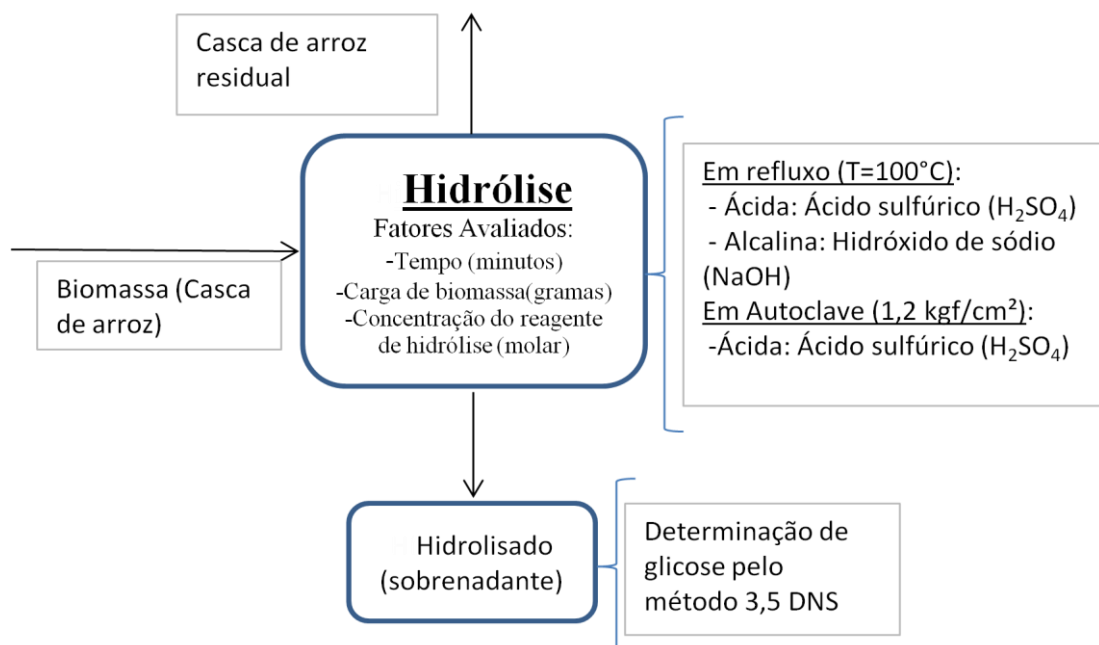
### 4.2.3 Determinação do teor total de umidade nas microalgas

Para determinar o teor total de umidade nas biomassas de microalgas, dois métodos foram utilizados. O primeiro foi utilizando o método de liofilização, onde é feita a retirada da água do produto congelado pelo processo de sublimação. Três porções de cada tipo de microalga úmida foram colocadas em placas de petri que foram então pesadas e levadas ao liofilizador, no fim do processo as placas foram novamente pesadas, determinando então o percentual de água retirada. O segundo processo foi utilizando estufa com circulação de ar, onde, também, três porções de cada tipo de microalga úmida foram colocadas em placas de petri que foram pesadas e então levadas a uma estufa a 80°C até se registrar peso constante.

### 4.2.4 Hidrólise

Para a avaliação da hidrólise na CA os experimentos foram conduzidos conforme a Figura 9.

**Figura 9** - Fluxograma de procedimento e análise na casca de arroz



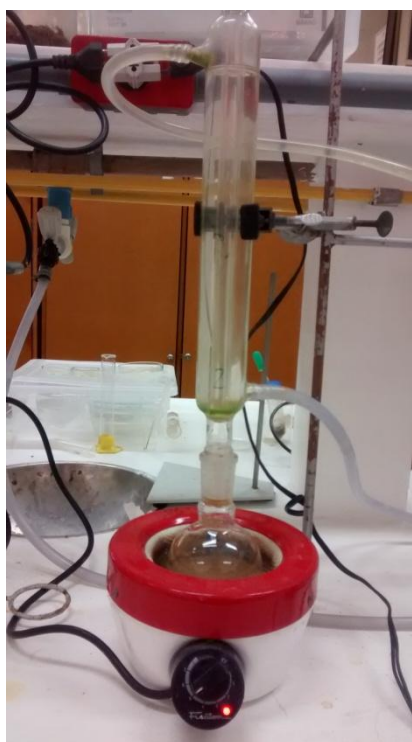


#### 4.2.4.1 Hidrólise em refluxo

O sistema de hidrólise é constituído de um balão de fundo redondo de 250 mL com pérolas de vidro, para evitar a ebulição tumultuosa, conectado a um condensador de refluxo sendo submetido à manta de aquecimento, esquema demonstrado na Figura 10.

No balão contendo 50 mL de solução, foi adicionada água destilada e o agente de hidrólise ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ou alcalina ( $\text{NaOH}$ ) nas concentrações de 1 e 2 mol/L e a carga de biomassa de 1 e 2 g. A mistura de reação permaneceu a  $100^\circ\text{C}$  pelo tempo de 10 e 30 min. Após o término da reação, esperou-se esfriar a temperatura ambiente e então a biomassa foi separada do hidrolisado por filtração a vácuo. Este hidrolisado contendo os açúcares redutores foi levado posteriormente, para análise quantitativa de glicose presente.

Figura 10 - Sistema hidrólise em refluxo



#### 4.2.4.2 Hidrólise ácida em autoclave

O processo de hidrólise ocorreu em uma autoclave de mesa fechado com agitação magnética, colocado em banho de areia e aquecido por uma placa de aquecimento/agitação até atingir uma pressão de  $1,2 \text{ kgf/cm}^2$ , que equivale a  $117,68 \text{ kpa}$  (Figura 11). No recipiente contendo 50 mL de solução, foi adicionada água destilada e ácido sulfúrico em concentrações

de 1 e 2 mol/L, carga de biomassa de 1 e 2 g por um tempo de 10 e 30 min. Após o término da reação, a solução teve sua temperatura reduzida a ambiente e, então, a biomassa foi separada do hidrolisado por filtração a vácuo. Este hidrolisado contendo os açúcares redutores foi levado, posteriormente, para análise quantitativa de glicose.

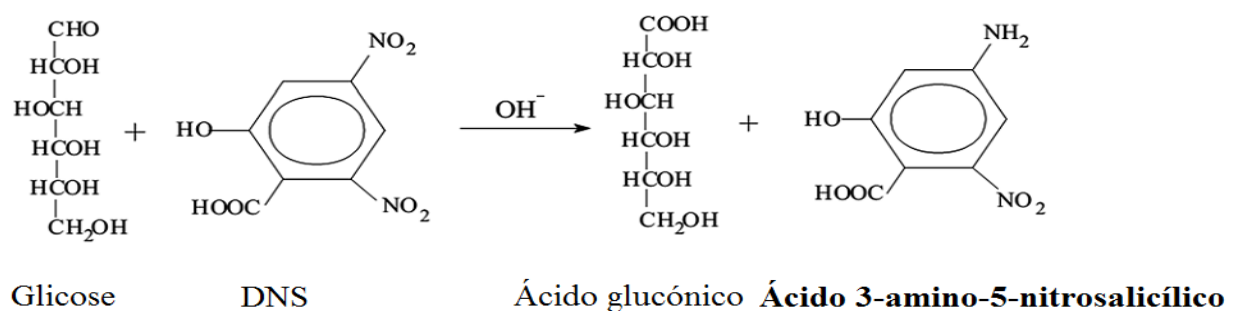
Figura 11 – Sistema Hidrólise em autoclave de mesa



#### 4.2.5 Determinação do teor de açúcares redutores por método colorimétrico

A quantificação de AR foi realizado conforme descrito pelo método do reagente 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O método tem por base a reação entre o AR e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de coloração amarela, que é reduzido a um composto avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, oxidando o monossacarídeo redutor, Figura 12. A concentração óptica de cada amostra juntamente com o reagente foi determinada em um espectrofotômetro U-2800 (Hitachi, Japão), a 540nm para a determinação do açúcar redutor glicose.

Figura 12 - Reação colorimétrica entre o reagente DNS e a glicose.



#### 4.2.5.1 Ajuste do pH da Amostra

Sendo os experimentos de extração de açúcares de biomassa efetuado em concentrações ácidas elevadas (1 e 2 mol/L) e, como a reação química envolvida no método 3,5 DNS ocorre em meio alcalino, há então a necessidade de neutralizar o efeito do meio ácido das amostras com hidróxido de sódio. A adição de 1 mL de hidróxido de sódio 4 mol/L em 3 mL de soluções de glicose em meio ácido foi suficiente para anular o efeito ácido. Com isso, em todas as análises de amostras ácidas pelo método do reagente de DNS, uma neutralização prévia foi executada no volume de amostra. Com a neutralização ocorre à formação de sais (sulfato ou cloreto de sódio), e o estudo feito por MIRANDA e colaboradores (2012) revelou que a presença destes sais não provoca qualquer efeito interferente no método do reagente de DNS.

#### 4.2.6 Hidrólise ácida quantitativa (HAQ)

Em um estudo proposto por HOEBLER e colaboradores (1989), a concentração total de açúcares foi determinada através da hidrólise total da biomassa. Em um tubo de ensaio contendo 0,5 g de biomassa seca, foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) e temperatura de 30°C durante 30 min. Posteriormente, o conteúdo do tubo foi transferido para um frasco de 250 mL e diluído com água destilada até uma concentração final de 4% (m/m) de ácido. Então, os frascos foram autoclavados durante 1h em uma temperatura de 120°C. Por fim, o hidrolisado foi filtrado para posterior determinação da concentração de AR pelo método do reagente 3,5 DNS, procedimento realizado em duplicata (HOEBLER *et al.*, 1989; MIRANDA *et al.*, 2012).

#### 4.2.7 Planejamento experimental

A fim de avaliar as condições de reação dos processos de hidrólise ácida e alcalina em refluxo e hidrólise ácida em autoclave com a casca de arroz, por ser o material mais resiliente dos dois propostos (casca de arroz e microalga) e, então, posteriormente aplicar nas microalgas, foi proposto um planejamento experimental fatorial completo  $2^3$ , em duplicata, com os ensaios sendo feitos de forma aleatória para não haver vício nos resultados, onde as variáveis independentes (fatores) analisadas foram: concentração do agente de hidrólise ( $H_2SO_4$  e NaOH), tempo de hidrólise e carga de biomassa para ambos processos de hidrólise

(refluxo e autoclave), bem como os possíveis efeitos das interações entre estas, sobre o processo de hidrólise dos carboidratos presentes na casca de arroz. Depois da etapa de hidrólise, as amostras foram analisadas pelo método colorimétrico de 3,5 DNS e as concentrações de AR determinadas e, então, consideradas no planejamento como valores da variável dependente (resposta).

Todos os resultados dos planejamentos obtidos geraram modelos os quais foram discutidos através de índices estatísticos como, por exemplo, o valor de probabilidade “ $p$ ”, para analisar se são significativas as mudanças de níveis de um fator ou suas interações e avaliar qual se adaptou melhor a cada planejamento. Então, os modelos foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Outra medida também estudada é o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o qual demonstra o percentual de variação do resultado, de acordo com o modelo construído. Também, os coeficientes das equações obtidas de cada modelo e seus efeitos foram analisados por meio do Teste de Fisher ( $F$ ), para avaliar a significância do modelo, valor de distribuição F tabelado obtido de BARROS NETO e colaboradores (2010). Por fim é analisada a máxima variação explicada, que é a máxima variação que o modelo consegue explicar retirando o erro puro, o qual relaciona a razão da diferença entre a soma quadrática total e o erro puro pela soma quadrática total, dentro disto tem a variação explicada que vem da regressão, que é a razão da soma quadrática da regressão pela soma quadrática total, que é realmente a variação que o modelo proposto consegue explicar. Todos estes estudos foram interpretados utilizando o *software* STATISTSCA 7.0, e os resultados de todos os planejamentos, foram obtidos através do cubo resposta, por indicar que os modelos construídos de cada planejamento, tem interação das três variáveis independentes, que são representadas pelas arestas, na variável resposta (dependente) representada pelos vértices (FERREIRA, *et al.*, 2007).

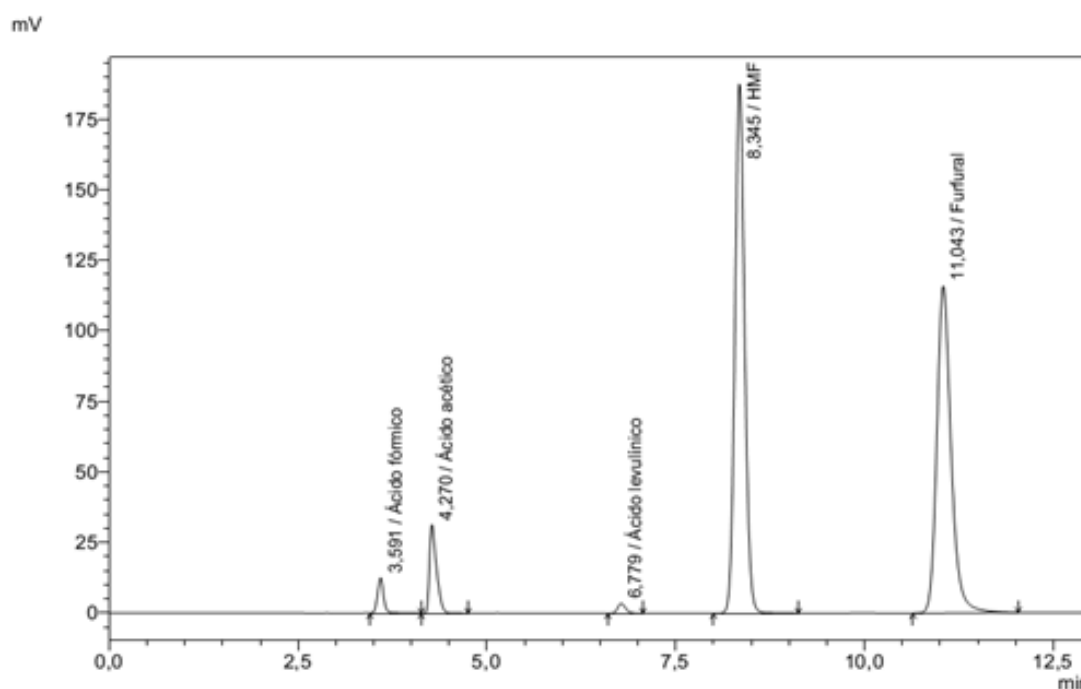
#### **4.2.8 Identificação e quantificação de produtos de degradação de açúcares**

A identificação e quantificação dos produtos de degradação oriundo dos açúcares foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High performance liquid chromatography). Para tal foi utilizado um cromatógrafo à líquido Prominence (Shimadzu, Japão) equipado por uma bomba modelo LC-20AD, um forno modelo CTO-20A, um detector UV SPD-20A, uma coluna cromatográfica modelo CLC-ODS de 25 cm, pré-coluna modelo G-ODS e um injetor automático modelo SIL-20A, todos da Shimadzu. As determinações foram realizadas a temperatura constante de 40°C para coluna e o detector. A eluição foi

realizada no modo isocrático, sendo a fase móvel composta por 90% de água ultrapura e 10% de acetonitrila, com vazão de 1 mL/min. Para os ácidos, as determinações foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm, enquanto que para o HMF e o furfural foi utilizado 284 nm. O tempo total de análise foi de 13 min, conforme pode ser observado no cromatograma na Figura 13.

Para as quantificações, foram preparadas curvas analíticas nas faixas de concentração de 0,5 a 10 mg/L para HMF e furfural e 5 a 100 mg/L para os ácidos fórmicos, acético e levulínico.

Figura 13 - Cromatograma para padrão na concentração de 10 mg/L para HMF e furfural e 100 mg/L para os ácidos fórmico, acético e levulínico.



#### 4.2.9 Parametrização das condições dos processos de hidrólise

Tendo como objetivo deste estudo a avaliação de um único processo para a extração do máximo possível de AR de biomassas distintas, CA e microalga, uma pesquisa na literatura foi realizada, Tabela 1, identificando a melhor condição para os parâmetros: tempo, concentração do agente de hidrólise, carga de biomassa e temperatura. Esta pesquisa teve o objetivo de identificar e propor condições similares ao apresentado na literatura, a fim de estabelecer condições promissoras para a extração de AR em ambas biomassas. Esta pesquisa foi realizada apenas para a hidrólise ácida, já que as mesmas condições vão ser aplicadas na

hidrólise alcalina, cuja finalidade além de avaliar sua conversão é comparar com o processo ácido.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na hidrólise ácida de casca de arroz e microalga.

Biomassas	Tempo (min)	Conc. ácido (mol/L)	Carga biomassa (g/L)	Temperatura (°C)	Referência
Microalgas: <i>Scenedesmus Obliquos</i>	30	1	50	121	MIRANDA <i>et al.</i> , 2012.
	25	0,2	15	140	HARUN; DANQUAH, 2011.
	30	1	100	121	PAULO, 2011.
Casca de Arroz	40	0,088	200	129	HICKERT, 2010.
Casca de Arroz	120	0,031	100	100	ANG <i>et al.</i> , 2013.
Casca de Arroz	5	8	100	50	MA <i>et al.</i> , 2011.

Neste estudo foram evidenciadas diferentes condições aplicadas nas biomassas estudadas, além disso, observou-se que no processo de hidrólise há formação de inibidores de fermentação como hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, liberados da hexose (glicose) e pentoses (xilose), respectivamente. Observou-se também que sob condições reacionais mais severas (altas concentrações de ácido (exemplo: 72% m/m), temperaturas altas (exemplo: 200°C) e longo período de reação (exemplo: 2 h), o HMF e o furfural são desidratados formando ácidos carboxílicos alifáticos, como o ácido acético, fórmico e levulínico (JONSSON; MARTIN, 2016). Segundo JÖNSSON e MARTIN (2016) a reação de hidrólise então pode ser conduzida em altas concentrações de ácido, baixo tempo de hidrólise (exemplo: 5 min) e baixas temperaturas (exemplo: 50°C), este método apresenta boa conversão da biomassa em AR. Porém há maior formação de inibidores de fermentação, além da necessidade de viabilizar um método de recuperação deste ácido para o processo se tornar economicamente viável. Outra opção é baixas concentrações de ácido, alto tempo de reação e altas temperaturas, este apresenta maior aplicabilidade, já que gera menos inibidores de fermentação, porém há um maior custo do processo, no que se diz respeito a gasto energético (ANG *et al.*, 2013; HARUN; DANQUA, 2011; JÖNSSON; MARTIN, 2016; MIRANDA *et al.*, 2012; MOOD *et al.*, 2013).

Diante disto, foi proposta a utilização de condições reacionais intermediárias que possam atender as duas biomassas estudadas, tendo como objetivo o máximo possível de extração em AR, mas procurando evitar a formação de altas concentrações de inibidores de fermentação e alto consumo energético com o tempo gasto de reação e altas temperaturas. Definiu-se avaliar no processo ácido a temperatura fixa em dois processos, um a 100°C em refluxo e a outra a

121°C (117,68 kPa de pressão) em autoclave, já no processo alcalino apenas a condição de 100°C em refluxo, já que a hidrólise alcalina, segundo a literatura, consta valores baixos de obtenção de açúcares redutores, logo, por economia de recursos, não será realizado este processo em autoclave. E os parâmetros avaliados dos processos foram definidos em: Tempo de reação de 10 e 30 min; Concentração do agente de hidrólise de 1 e 2 mo/L; Carga de biomassa de 1 e 2 g (20 e 40 g/L).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição da Casca de Arroz

Os resultados para a caracterização da composição média da CA é apresentada na Tabela 2, os quais foram obtidos através das metodologias descritas no Capítulo 4.

Tabela 2 - Resultado da composição da casca de arroz.

Composto	Percentual (%)
Cinzas	16,06±0,31
Lignina	22,35±1,00
Celulose	41,15±0,16
Hemicelulose	20,44±0,59 <sup>(1)</sup>

(1) Valor obtido por diferença: (hemicelulose=massa total – (Cinzas+ Lignina+ Celulose)).

Verifica-se que a CA utilizada neste trabalho apresenta um teor celulósico (celulose e hemicelulose) de em torno de 62%. Estes valores estão dentro da faixa observada na literatura de 40-60% por ANG e Colaboradores (2013) para a celulose e de 12-28% de hemicelulose relatada por HICKERT (2010).

Uma comparação entre a composição total do teor celulósico (celulose e hemicelulose) da CA deste trabalho com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais relatados na literatura é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação da % total de celulose da casca de arroz utilizada neste trabalho com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais, relatados na literatura.

Resíduo Lignocelulósico	%Total do teor celulósico	Referência
Casca de Arroz	62	Neste estudo
Casca de Arroz	65	ANG <i>et al.</i> , 2013
Casca de Arroz	58	MANSILLA <i>et al.</i> , 1998
Casca de Arroz	47	HICKERT, 2010.
Palha de Arroz	65	ROBERTO <i>et al.</i> , 2003
Palha de Trigo	57	CANILHA, 2006
Bagaço de Cana	66	AGUIAR e MENEZES, 2000
Casca de Soja	65	CASSALES, 2010
Farelo de Cevada	66	CRUZ <i>et al.</i> , 2000.



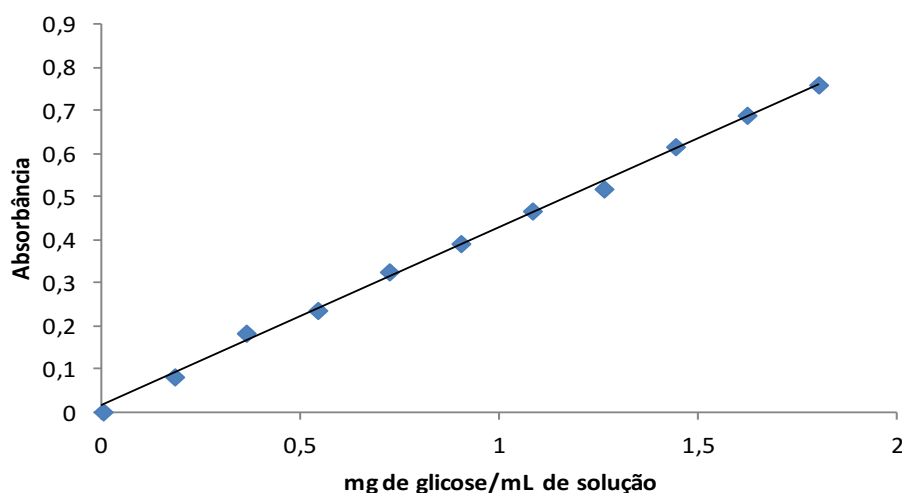
Ao avaliar os percentuais do teor celulósico na Tabela 3, verifica-se que o percentual total do conteúdo celulósico, o qual pode ser relacionado com a quantidade total de açúcares fermentescíveis da CA obtido está dentro da faixa de valores relatados na literatura, sendo o percentual obtido neste trabalho 4,6% inferior ao encontrado por ANG e Colaboradores (2013), 6,4% superior ao que foi mencionado por MANSILLA e colaboradores (1998) e 24% superior ao relatado por HICKERT (2010). Esta variação pode ser aludida com a natureza da biomassa, condição de cultivo e diferenças nas técnicas de análise.

Quando compara-se a CA com outros resíduos agroindustriais como a palha de arroz, palha de trigo, bagaço de cana, casca de soja e farelo de cevada verifica-se que o teor total do conteúdo celulósico presente casca de arroz se mostrou equivalente, sendo próximo de valores com alto teor como o bagaço de cana e o farelo de cevada. A casca de arroz então demonstra ser um resíduo altamente promitente principalmente por sua estrutura e disponibilidade, para a bioconversão a produtos de alto valor agregado.

## 5.2 Determinação da curva padrão do método 3,5 DNS

A determinação colorimétrica do teor de açúcares nas biomassas estudadas, foi realizada através do método reagente 3,5 DNS. O qual permite determinar os açúcares redutores presentes no hidrolisado das reações. A concentração em ARs da amostra foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações de glicose entre 0 a 1,8 g/L. A curva de calibração está mostrada na Figura 14, a qual obteve um coeficiente de determinação com ótimo ajuste.

Figura 14 - Curva de calibração da glicose para o método de avaliação de açúcar redutor com o reagente 3,5 DNS.



$R^2 = 0,9981$  ; Equação da reta:  $y = 0,4161x + 0,0137$ .

### 5.3 Definição dos reagentes de hidrólise

#### 5.3.1 Reagente Ácido

De acordo com BINOD e colaboradores (2010), na literatura os ácidos comumente utilizados são o ácido sulfúrico e clorídrico, então foi proposto um estudo comparando alguns ácidos na obtenção de AR. Foram testados cinco tipos de reagentes ácidos. A biomassa de teste utilizada foi a CA, já que esta apresenta alta relisiência a quebra de sua parede celular, então uma observação nesta biomassa se mostra mais interessante. Todos foram submetidos em iguais condições de tempo (30 min), carga de CA (2 g) e concentração do reagente ácido (2 mol/L) e os experimentos realizados em duplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparação de diferentes ácidos na hidrólise em refluxo.

Ácido	%AR (g eq <sub>AR</sub> / g biomassa seca)
Sulfúrico	21,15±1,03
Nítrico	16,09±2,39
Clorídrico	1,10±0,22
Fórmico	0,45±0,051
Itacônico	0,39±0,13

Qualquer dos ácidos estudados levaria a concentração de sais no hidrolisado final, podendo comprometer a fermentação alcoólica, matando o microorganismo, porém MIRANDA e colaboradores (2012) relatam que o íon sulfato é um nutriente presente no meio de cultura de leveduras e, também, pode ser removido o seu excesso por precipitação com compostos baixa toxicidade para os microorganismos.

Através disto, ainda pode-se observar na Tabela 4, que o ácido sulfúrico foi o que apresentou o melhor rendimento na conversão de AR em biomassa de CA, sendo então por estes motivos o ácido utilizado no processo de avaliação da hidrólise ácida.

#### 5.3.2 Reagente alcalino

Comumente o hidróxido de sódio (NaOH) é o reagente alcalino mais utilizado no processo de hidrólise, porém neste estudo o NaOH foi colocado em comparação com outro reagente alcalino, o hidróxido de potássio (KOH). Também foi utilizada a CA como biomassa de teste e os dois reagentes foram submetidos em iguais condições de tempo (30 min), carga

de CA (2 g) e concentração do reagente ácido (2 mol/L) e os experimentos realizados em duplicata. Os resultados obtidos na extração de AR para NaOH e KOH foram 0,11 e 0,073 (g eq<sub>AR</sub>/g biomassa seca) respectivamente. Então o NaOH foi o reagente alcalino escolhido no processo de avaliação da hidrólise alcalina, que está de acordo com a literatura.

#### 5.4 Análises estatísticas

Através da metodologia de planejamento de experimentos os efeitos significativos foram analisados, assim como as interações entre as variáveis independentes (carga de biomassa, tempo e concentração do reagente de hidrólise) que influenciaram na variável resposta (concentração de AR), identificada no sobrenadante de hidrólise da casca de arroz.

Na Tabela 5 é mostrada a matriz de planejamento completo 2<sup>3</sup> em duplicata com fatores e níveis estudados na hidrólise da biomassa de casca de arroz e a resposta da extração de AR (mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução).

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>, com fatores e níveis estudados nos processos de hidrólise e suas respectivas respostas

Ensaio	Fatores (variáveis independentes)			Resposta (variável dependente) mg eq <sub>AR</sub> /mL		
	A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	A <sup>4</sup>	A <sup>5</sup>	A <sup>6</sup>
1	10(-1)	1(-1)	1(-1)	0,0229	1,4724	0,6159
2	10(-1)	1(-1)	1(-1)	0,0288	1,2769	0,9655
3	30(1)	1(-1)	1(-1)	0,0377	1,7682	0,666
4	30(1)	1(-1)	1(-1)	0,042	1,9323	0,6209
5	10(-1)	2(1)	1(-1)	0,0797	4,1068	2,3737
6	10(-1)	2(1)	1(-1)	0,0753	4,8328	1,4884
7	30(1)	2(1)	1(-1)	0,0887	4,2685	2,4992
8	30(1)	2(1)	1(-1)	0,0822	4,0811	3,5645
9	10(-1)	1(-1)	2(1)	0,0694	1,7248	1,4564
10	10(-1)	1(-1)	2(1)	0,0622	1,6437	1,2559
11	30(1)	1(-1)	2(1)	0,0695	2,7945	1,8063
12	30(1)	1(-1)	2(1)	0,0805	3,1682	2,6954
13	10(-1)	2(1)	2(1)	0,104	4,5511	3,5769
14	10(-1)	2(1)	2(1)	0,1096	4,8532	3,301
15	30(1)	2(1)	2(1)	0,1127	7,9823	4,2685
16	30(1)	2(1)	2(1)	0,1079	7,4571	6,7085

\*(-1) e (+1) são os níveis de variação dos fatores.

<sup>1</sup>Tempo (minutos) ; <sup>2</sup>Massa de casca de arroz (gramas) ; <sup>3</sup> Concentração do reagente de hidrólise (molar);

<sup>4</sup>Processo de hidrólise alcalina em refluxo ; <sup>5</sup>Processo de hidrólise ácida em refluxo ; <sup>6</sup>Processo de hidrólise ácida em autoclave.

O planejamento foi aplicado em todos os processos de hidrólise: Refluxo em meio ácido e alcalino e ácido em autoclave.

Através dos resultados obtidos na Tabela 5, realizou-se uma análise das três variáveis independentes estudadas sobre a resposta (mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução) obtida nos experimentos de hidrólise. A escolha do modelo empírico a ser utilizado para a resposta foi discutido através da análise de variância (ANOVA) de cada modelo proposto e suas respectivas relações estatísticas da ANOVA com um nível de significância de 95% dos modelos mais ajustados para cada processo de hidrólise.

#### 5.4.1 Hidrólise alcalina em refluxo (HALR)

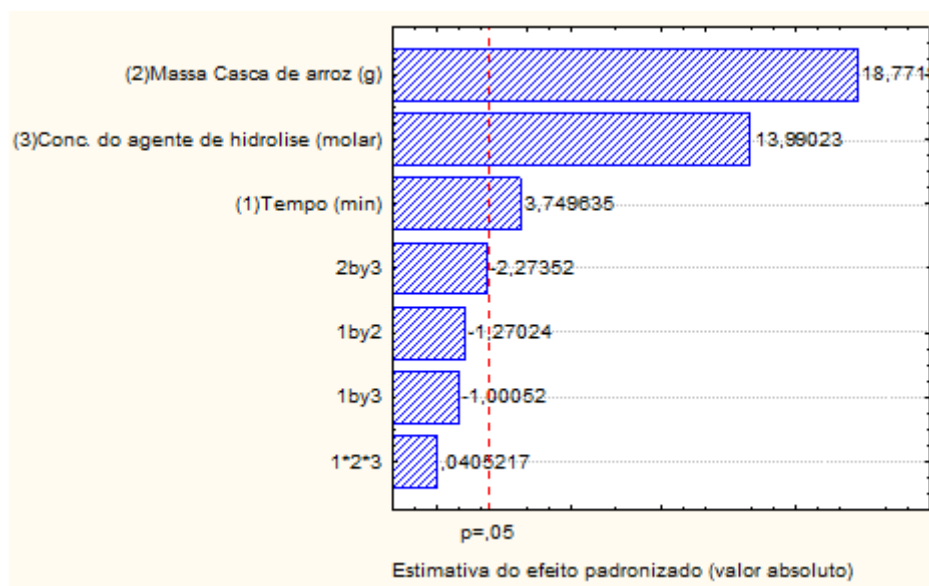
No processo de HALR com hidróxido de sódio como reagente de hidrólise, utilizando a resposta de concentração de AR referente ao resultado deste processo da Tabela 5, os efeitos significativos dos fatores bem como as interações entre eles foi proposta em um modelo preliminar para avaliação, demonstrada na Tabela 6 e pelo diagrama de pareto Figura 15.

Tabela 6 - Efeito dos fatores e interações com os respectivos índices estatísticos da hidrólise alcalina em refluxo para a concentração de açúcar redutor no hidrolisado.

	Efeito	Desvio Padrão	Nível p	Limite de confiança	
				-95,00%	95,00%
Média	0,0733	0,0012	<0,0000	0,0707	0,0760
(1)Tempo (min)	0,0087	0,0023	<0,0006	0,0033	0,0140
(2)Massa Casca de arroz (g)	0,0434	0,0023	<0,0000	0,0380	0,0487
(3)Conc. NaOH (mol/L)	0,0323	0,0023	<0,0000	0,0270	0,0377
(1) em (2)	-0,0029	0,0023	0,2397	-0,0083	0,0024
(1) em (3)	-0,0023	0,0023	0,3464	-0,0076	0,0030
(2) em(3)	-0,0053	0,0023	0,0526	-0,0106	0,0001
1*2*3	0,0001	0,0023	0,9687	-0,0052	0,0054

R<sup>2</sup>=0,98616

Figura 15 – Diagrama de pareto do efeito dos fatores e interações da hidrólise alcalina em refluxo na variável resposta.



Ao analisar a Figura 15 e a Tabela 6 observa-se que os três fatores (tempo, massa de casca de arroz e concentração de NaOH) são significativos, como confirmado pelos índices estatísticos apresentados, como por exemplo o valor de probabilidade  $p \leq 0,05$  (que é um critério de aceitabilidade) e o fato do intervalo de confiança não conter o número zero indicar que o fator em análise não pode ter efeito nulo, ou seja, ser considerado significativo no nível de confiança testado. As interações dos fatores não mostraram significância, exceto a interação entre a Massa Casca de arroz (g) (2) e a Conc. NaOH (3) que apresentou através do gráfico de pareto (Figura 15) e dos índices estatísticos, valores tão próximo ao aceitável que pode ser significativo ao modelo. Com isto um modelo com os três fatores e a interação entre Massa Casca de arroz (g) (2) e a Conc. NaOH (3) é proposto e a ANOVA deste modelo é demonstrada na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de variância para o modelo da hidrólise alcalina em refluxo

	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	0,0120	4	0,0030	146,9627	3,3600
Resíduos	0,0003	11	2,06E-05		
Falta de ajuste	0,0002	3	1,86E-05	0,8721	4,0700
Erro puro	0,0002	8	2,13E-05		
Total	0,0127				

\*SQ= Soma Quadrática ; GL= graus de liberdade ; MQ= média quadrática ; F= Valor de Fisher.  $R^2=0,98163$   
 Variação explicada: 96,39%  
 Variação máxima explicada: 98,64%

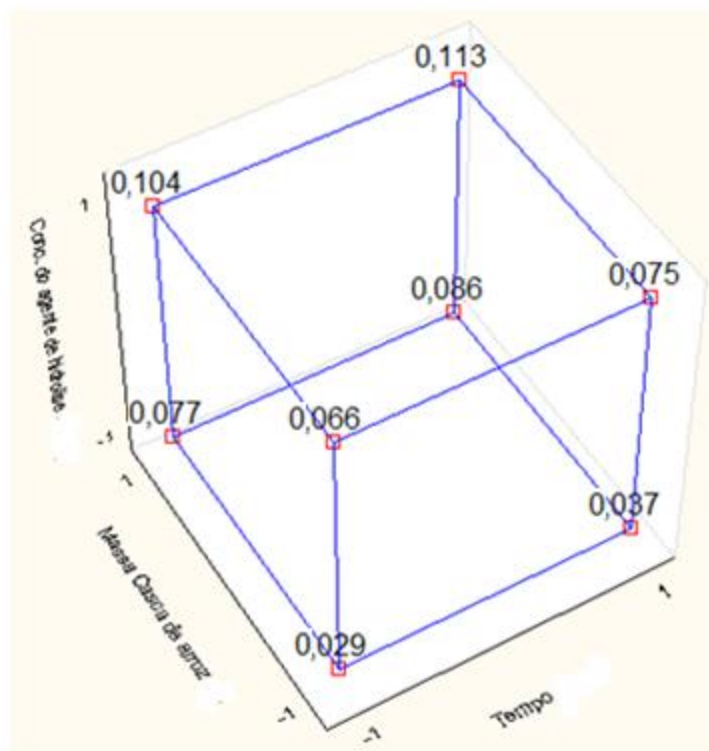
Pode-se observar que o modelo proposto com os três fatores significativos e sem interações é estatisticamente significativo já que o F calculado para a regressão em relação aos resíduos (146,9627) é 43 vezes maior que o valor da distribuição F tabelado (3,36) indicando que o modelo serve para previsão e o F calculado da falta de ajuste (0,8721) é menor que o valor da distribuição F tabelado (4,07) demonstrando que a maior parte dos desvios vem da parte experimental validando o modelo, além de um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) demonstrar bom ajuste do modelo ( $R^2=0,98163$ ). O valor da variação explicada (96,39%) é bastante alto frente à variação máxima explicável (98,64%). A partir da regressão os coeficientes do modelo foram calculados para a concentração de AR, representado pela Equação 3.

$$[CAR] = 0,073 + 0,0043 * t + 0,022 * Mca + 0,016 * CH - 0,0026 * (Mca, CH) \quad (3)$$

Em que: [CAR] = Concentração de AR ; t = tempo (minutos) , Mca= Massa de casca de arroz; CH = Concentração do reagente de hidrólise; (Mca, CH)= Interação entre os fatores Massa Casca de arroz e Conc. do reagente de hidrólise.

O cubo resposta gerado para o modelo proposto e representado pela Equação 3 é mostrado na Figura 16.

Figura 16 - Cubo resposta do modelo proposto para hidrólise alcalina em refluxo com os fatores codificados.



Ao analisar a Figura 16 tem-se que a melhor condição para a extração de AR é o vértice dos pontos Concentração do agente de hidrólise (NaOH) 2 mol/L (nível 1), Massa casca de arroz 2 g (nível 1) e tempo 30 min (nível 1). A escolha deste ponto se dá por obter uma maior extração de AR (0,113 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução).

#### 5.4.2 Hidrólise ácida em refluxo (HACR)

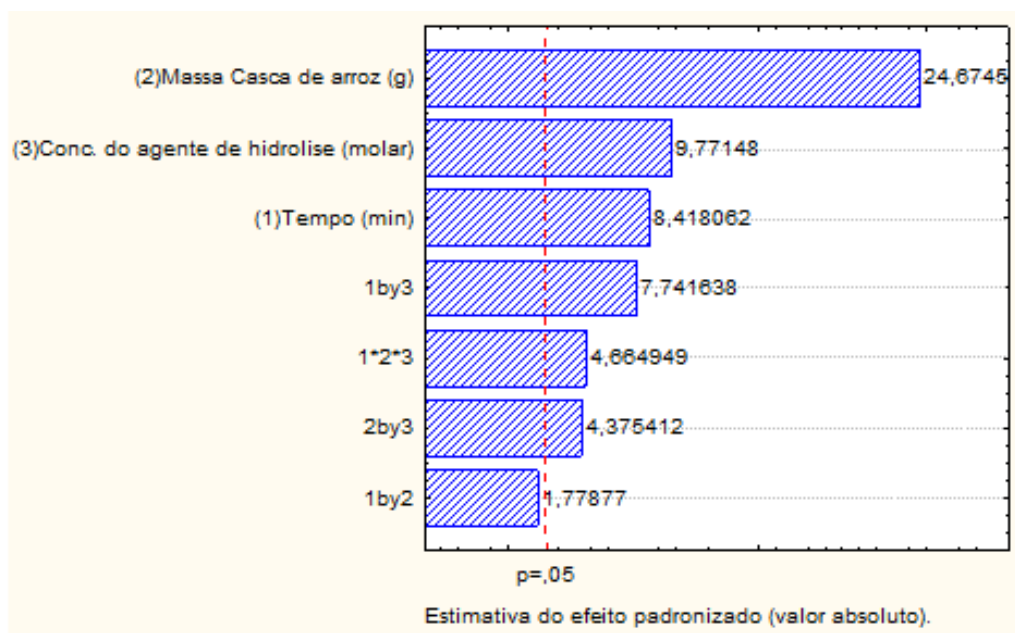
Na HACR foi utilizado o mesmo procedimento de análise estatística da resposta anterior. No processo de hidrólise ácida em refluxo utilizando o ácido sulfúrico como reagente de hidrólise utilizando a resposta de concentração de AR referente ao processo da Tabela 5. Na Tabela 8 estão demonstrados os efeitos significativos dos fatores bem como as interações entre eles proposta em um modelo preliminar para avaliação, representado no diagrama de pareto Figura 17.

Tabela 8 - Efeito dos fatores e interações com os respectivos índices estatísticos da hidrólise ácida em refluxo para a concentração de glicose no hidrolisado.

	Efeito	Desvio Padrão	Nível p	Limite de confiança	
				-95,00%	95,00%
Média	3,6196	0,0667	<0,0000	3,4657	3,7735
(1)Tempo (min)	1,1238	0,1335	<0,0000	0,8160	1,4316
(2)Massa Casca de arroz (g)	3,2940	0,1335	<0,0000	2,9862	3,6019
(3)Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (molar)	1,3045	0,1335	<0,0000	0,9966	1,6123
(1) em (2)	0,2375	0,1335	0,1132	-0,0704	0,5453
(1) em (3)	1,0335	0,1335	0,0001	0,7256	1,3413
(2) em(3)	0,5841	0,1335	0,0024	0,2763	0,8920
1*2*3	0,6228	0,1335	0,0016	0,3149	0,9306

R<sup>2</sup>=0,99098

Figura 17 - Diagrama de pareto do efeito dos fatores e interações da hidrólise ácida em refluxo na variável resposta.



Levando em conta a mesma análise estatística feita anteriormente na Tabela 6 aplicada agora na Tabela 8. Apenas a interação entre o fator tempo (1) e a massa casca de arroz (2) não mostra significância, com isto um modelo apenas sem esta interação é proposto e a ANOVA deste modelo é demonstrada na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise de variância para o modelo da hidrólise ácida em refluxo

	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	62,4492	6	10,4082	117,7021	3,3700
Resíduos	0,7959	9	0,0884		
Falta de ajuste	0,2256	1	0,2256	3,1640	5,3200
Erro puro	0,5703	8	0,0713		
Total	64,0409				

\*SQ= Soma Quadrática ; GL= graus de liberdade ; MQ= média quadrática ; F= Valor de Fisher.  $R^2=0,98742$   
 Variação explicada: 97,51%  
 Variação máxima explicada: 99,11%

Pode-se observar que o modelo proposto com os três fatores significativos e as interações entre Tempo (1) e Conc.  $H_2SO_4$  (3), Massa Casca de arroz (2) e Conc.  $H_2SO_4$  (3) e as interação entres os três fatores (1)\*(2)\*(3) é satisfatório, já que o F calculado para a regressão em relação aos resíduos (117,7021) é pelo menos 34 vezes maior que o valor da distribuição F tabelado (3,37) indicando que o modelo serve para previsão e o F calculado da falta de ajuste



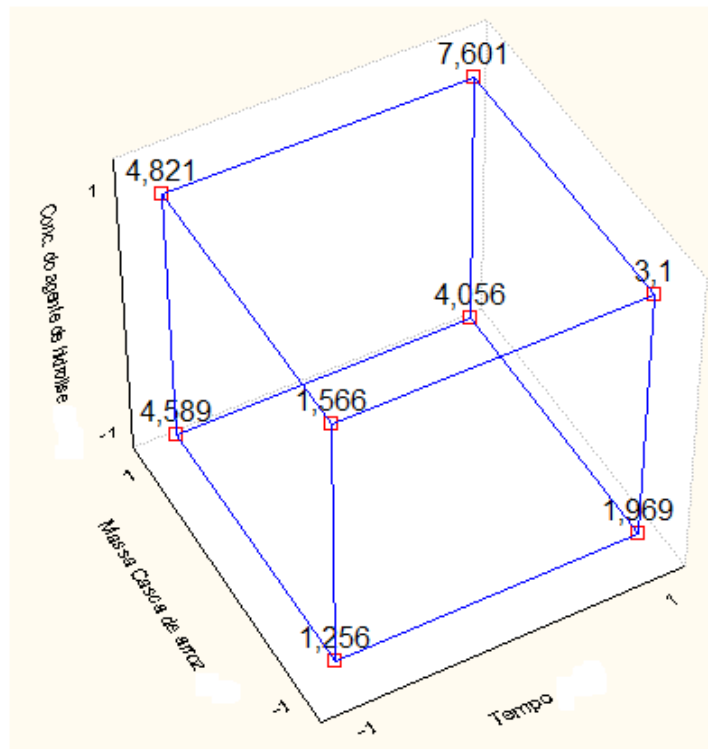
(3,1640) é menor que o valor da distribuição F tabelado (5,32), demonstrando que a maior parte dos desvios vem da parte experimental, além de um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) demonstrar bom ajuste do modelo ( $R^2=0,98742$ ). O valor da variação explicada (97,51%) é bastante alto frente à variação máxima explicável (99,51). A partir da regressão os coeficientes do modelo foram calculados para a concentração de AR, representado pela Equação 4.

$$[CAR] = 3,619 + 0,562 * t + 1,647 * Mca + 0,652 * CH + 0,517 * (t, CH) + 0,292 * (Mca, CH) + 0,311 * (t, Mca, CH) \quad (4)$$

Em que: (t,CH) = Interação entre os fatores tempo e Conc. do reagente de hidrólise ;  
 (Mca,CH)= Interação entres os fatores Massa Casca de arroz e Conc. do reagente de hidrólise;  
 (t,Mca,CH)= Interação entre todos os fatores.

O cubo resposta gerado para o modelo proposto e representado pela Equação 4 é mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Cubo resposta do modelo proposto para hidrólise ácida em refluxo com os fatores codificados.



Ao analisar a Figura 18 tem-se que a melhor condição para a extração de AR é o vértice dos pontos Concentração de  $H_2SO_4$  2 mol/L (nível 1), Massa casca de arroz 2 g (nível 1) e

tempo 30 min (nível 1). A escolha deste ponto se dá por obter uma maior extração de AR (7,601 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução).

### 5.4.3 Hidrólise ácida em autoclave (HACA)

Utilizando na HACA os mesmos procedimentos de discussão estatística que descritos nos processos anteriores. Na tabela 10 estão demonstrados os efeitos significativos bem como as interações entre eles proposta em um modelo preliminar para avaliação.

Tabela 10 - Efeito dos fatores e interações com os respectivos índices estatísticos da hidrólise ácida em autoclave para a concentração de glicose no hidrolisado

	Efeito	Desvio Padrão	Nível p	Limite de confiança	
				-95,00%	95,00%
Média	2,3664	0,1865	0,0000	1,9364	2,7965
(1)Tempo (min)	0,9745	0,3730	0,0310	0,1144	1,8345
(2)Massa Casca de arroz (g)	2,2123	0,3730	0,0003	1,3522	3,0724
(3)Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (molar)	1,5344	0,3730	0,0034	0,6743	2,3945
(1) em (2)	0,6007	0,3730	0,1459	-0,2594	1,4608
(1) em (3)	0,4977	0,3730	0,2188	-0,3624	1,3578
(2) em(3)	0,4479	0,3730	0,2641	-0,4122	1,3080
1*2*3	-0,0233	0,3730	0,9518	-0,8834	0,8368

R<sup>2</sup>=0,89004

Levando em conta a mesma análise estatística feita anteriormente observa-se que os três fatores (tempo, massa de casca de arroz e concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) são significativos, como confirmado pelos índices estatísticos apresentados na Tabela 10 e representados no diagrama de pareto, Figura 19. Já as interações dos fatores não mostraram significância, com isto um modelo com os três fatores e sem suas interações é proposto e a ANOVA deste modelo é demonstrada na Tabela 11.

Tabela 11 - Análise de variância para o modelo da hidrólise ácida em refluxo

	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	32,7925	3	10,9308	17,0556	3,4900
Resíduos	7,6907	12	0,6409		
Falta de ajuste	3,2391	4	0,8098	1,4552	3,8400
Erro puro	4,4517	8	0,5565		
Total	48,1739				

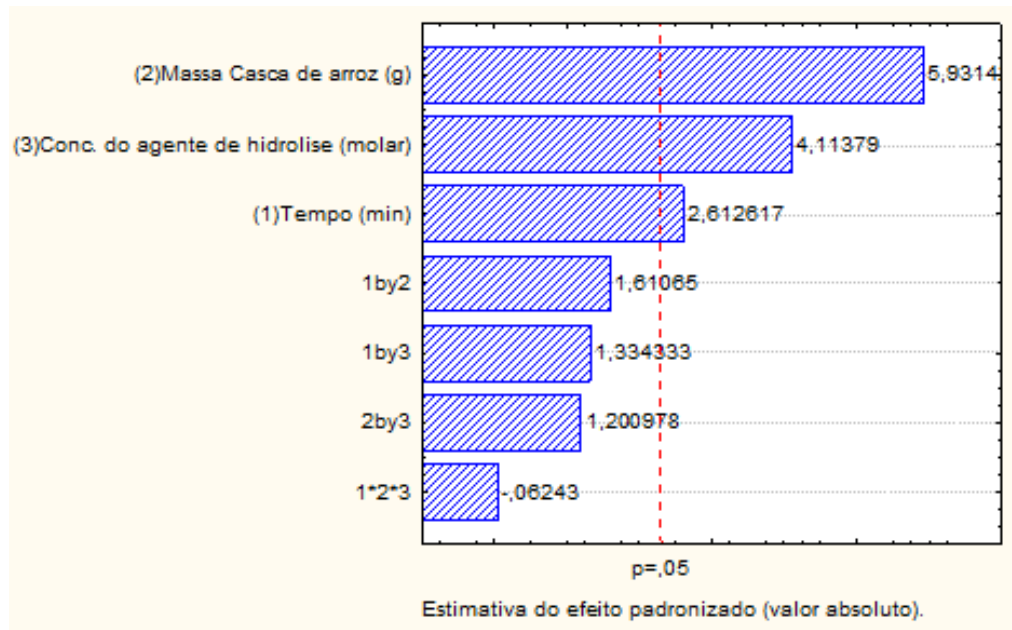
\*SQ= Soma Quadrática ; GL= graus de liberdade ; MQ= média quadrática ; F= Valor de Fisher.

R<sup>2</sup>=0,81003

Varição explicada: 68,07%

Varição máxima explicada: 90,76%

Figura 19 - Diagrama de pareto do efeito dos fatores e interações da hidrólise ácida em autoclave na variável resposta.

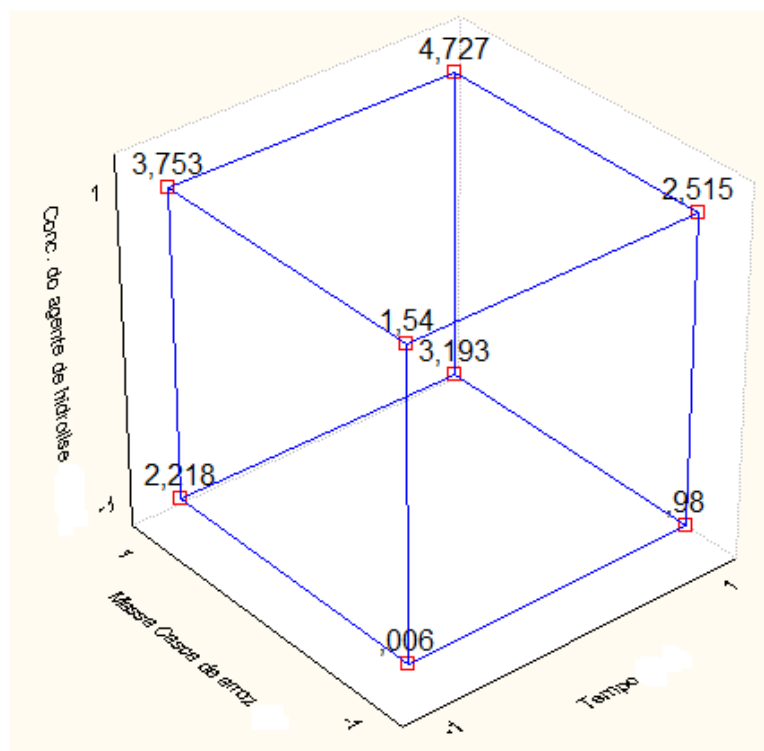


Pode-se observar na Figura 19 e na Tabela 11 que o modelo proposto com os três fatores significativos e sem interações entre eles é satisfatório já que o F calculado para a regressão em relação aos resíduos (17,0556) é quase 5 vezes maior que o valor da distribuição F tabelado (3,49) indicando que o modelo serve para previsão e o F calculado da falta de ajuste (1,4552) é menor que o valor da distribuição F tabelado (3,84) demonstrando que a maior parte dos desvios vem da parte experimental além de um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) demonstrar um ajuste aceitável do modelo ( $R^2=0,81003$ ) e próximo ao modelo preliminar com todas as interações ( $R^2=0,89004$ ). O valor da variação explicada (68,07%) é baixo frente à variação máxima explicável (90,76%), resultado de um alto erro puro encontrado (4,4517) o qual demonstra alta variação da parte experimental, oriunda de fatores não controlados durante os ensaios experimentais. A partir da regressão os coeficientes do modelo foram calculados para a concentração de AR, representado pela Equação 5.

$$[CAR] = 2,366 + 0,487 * t + 1,106 * Mca + 0,767 * CH \quad (5)$$

O cubo resposta gerado para o modelo proposto e representado pela Equação 5 é mostrado na Figura 20.

Figura 20 - Cubo resposta do modelo proposto para hidrólise ácida em autoclave com os fatores codificados.



Ao analisar a Figura 20 tem-se que a melhor condição para a extração de glicose é o vértice dos pontos Concentração de  $H_2SO_4$  2 mol/L (nível 1), Massa casca de arroz 2 g (nível 1) e tempo 30 min (nível 1). A escolha deste ponto se dá por obter uma maior extração de glicose (4,727 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução) no processo de hidrólise ácida em autoclave.

O processo de HALR demonstrou um rendimento baixo de 0,113 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução, mas que é corroborado por ANG e Colaboradores (2013), o qual utilizou hidróxido de sódio e de cálcio como reagentes de hidrólise alcalina na CA e obtiveram valores inferiores a 1 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução. Nos processos ácidos de hidrólise (HACR e HACA) o processo em refluxo foi onde obteve-se o melhor resultado obtido 7,601 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução, levemente superior ao valor também reportado por ANG e Colaboradores (2013) que foi de 7,200 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução e inferior ao apresentado por HICKERT (2010) que relatou uma recuperação de AR em torno de 12 mg eq<sub>AR</sub>/mL de solução, reforçando que estes estudos foram realizados especificamente para a CA.

Para avaliar melhor o rendimento obtido nas hidrólises em CA foi proposto aplicar a HAQ na mesma, demonstrado na Tabela 12, método que é utilizado para determinar ART em matérias lignocelulósicos.

Tabela 12 - Comparação dos processos de hidrólise em casca de arroz.

Processos	AR (% g eq. <sub>AR</sub> /g biomassa)
HACR	21,35±1,03
HACA	15,18±4,77
HALR	0,28±0,0086
HAQ	19,11±1,04

\*AR= Açúcar redutor; HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

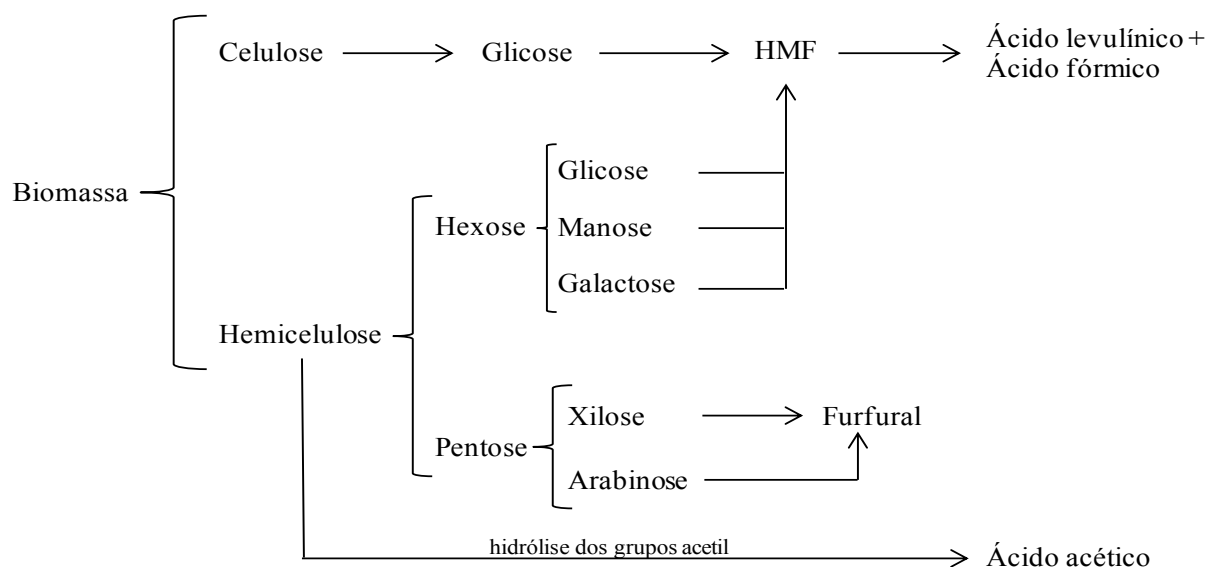
Pode-se observar que o resultado obtido na HACR neste estudo foi promissor, já que a HAQ não apresentou valor superior na obtenção de AR. O baixo rendimento observado na HALR provavelmente tenha acontecido pelo fato do reagente alcalino ter provavelmente quebrado ligações entre polissacarídeos complexos, mas não os quebrou em açúcares simples, podendo ter ocorrido também a solubilização parcial da lignina (GALBE; ZACCHI, 2012; ZHENG *et al.*, 2009). Já na HACA a pressão exercida no meio pode ter degradado os açúcares no formados no processo em inibidores (HMF e furfural).

Considerando o teor de polissacarídeo (celulose + hemicelulose) da CA, o processo de HACR teve um rendimento percentual de 34,44 (% g eq.<sub>AR</sub>/g teor de polissacarídeo da CA).

### 5.5 Inibidores formados nos processos de hidrólise da casca de arroz

Através da análise realizada por HPLC foi possível determinar nos hidrolisados a presença de produtos de degradação dos açúcares, HMF e furfural que podem ser desidratados formando ácidos carboxílicos alifáticos, como o ácido acético, fórmico e levulínico (Figura 21). Os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 13.

Figura 21 - Produtos de degradação de açúcares em condições ácidas.



Fonte: Adaptado de GIRISUTA *et al.*, 2006; JÖNSSON; MARTÍN, 2016.

Tabela 13 - Concentração dos produtos de degradação nos processos de hidrólise da casca de arroz.

Processos de hidrólise	Produtos de degradação dos AR (mg/L)			
	Ácido fórmico	Ácido acético	HMF	Furfural
HACR	-	287,11±1,03	1,97±0,10	24,23±31,95
HACA	-	283,71±9,27	2,83±0,13	104,27±13,45
HALR	20,89±2,33	322,51±16,52	-	-
HAQ	-	-	2,69±0,09	59,49±2,32

\*AR= Açúcar redutor; HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

Os resultados representados na Tabela 13, demonstram que a hidrólise em autoclave (HACA) foi o processo que mais produziu produtos de degradação de AR (em torno de 390 mg/L), neste processo a produção de Furfural foi bem superior aos demais. Comparando com a hidrólise sem pressão exercida (HACR) nota-se um aumento em torno de cinco vezes, aumentando a suspeita que a pressão degradou as pentoses formadas, acarretando na diminuição da conversão do processo em AR, também o pouco aumento na produção de HMF comparado com o Furfural, sugere que a maior fonte de AR formados no processo de HACR é de pentoses da estrutura hemicelulósica, como observa-se na Figura 21. Desconfiasse que uma justificativa para isto, é que o meio ácido é consumido principalmente na estrutura da ligação amorfa entre a hemicelulose e a lignina, outra hipótese é a dificuldade em quebrar a estrutura cristalina da celulose, porém uma investigação mais aprofundada é proposta. O ácido levulínico não foi detectado em nenhum dos processos.

## 5.6 Aplicação das hidrólises avaliadas em outros materiais lignocelulósicos

A fim de investigar melhor onde o ataque da hidrólise age preferencialmente na CA, foi proposto avaliar a melhor das hidrólises otimizadas (HACR) e a HAQ em outros materiais lignocelulósicos com diferentes composições de celulose e hemicelulose e observar como se comporta a conversão em AR nos dois processos. Então foi utilizado como biomassas de estudo a palha de arroz (PA), onde a caracterização realizada foi à mesma proposta para a CA, e o extrato de casca de arroz (ECA) onde foi feita a remoção de todos componentes da CA exceto a celulose e a sílica. Na Tabela 14 esta demonstrada às composições celulósicas das três biomassas (CA, PA e ECA) e a conversão em AR em relação à biomassa inicial da HACR, a qual foi o melhor processo de hidrólise e do método quantitativo (HAQ), ambos realizados em duplicata.

Tabela 14 - Composição celulósica e %açúcar reductor obtido nos processos de hidrólise para cada biomassa lignocelulósica.

Biomassas	Composição celulósica inicial		%AR (% g eq. <sub>AR</sub> /g biomassa)	
	%Celulose	%Hemicelulose	HACR	HAQ
CA	41	21	21,35±1,03	19,11±1,04
PA	36	28	24,31±2,01	26,13±1,58
ECA	63	-	3,33±0,25	24,35±1,03

\*CA= Casca de arroz; PA= Palha de arroz; ECA=Extrato da casca de arroz; AR= Açúcar reductor; HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

Analisando primeiramente o processo HACR, pode-se observar que a PA é a biomassa que mais converteu sua composição celulósica em AR e o ECA o material que menos converteu. Este resultado indica provavelmente que o ataque do processo otimizado (HACR) esta sendo preferencialmente na hemicelulose, já que a PA apresentou o melhor resultado e tem a maior composição de hemicelulose e em contra partida o ECA que não tem hemicelulose em sua estrutura, apresentou um rendimento muito baixo. Estes resultados aumentam a suspeita que o ataque da HACR esta sendo preferencialmente na estrutura hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos, já que a PA obteve a maior conversão em AR e tem a maior concentração de hemicelulose. Outra suspeita também reforçada, que a concentração do meio ácido da HACR não é suficiente para quebrar a estrutura cristalina celulósica da CA, já que no ECA onde só há celulose cristalina em sua estrutura, a conversão foi praticamente sete vezes menor quando aplicada na CA e em torno de oito vezes quando aplicada na PA.

Porém na HAQ, os valores de conversão em AR da CA e PA ( $19,11 \pm 1,04$  e  $26,13 \pm 1,58$  %g eq.AR/g biomassa) foram praticamente iguais aos do processo HACR ( $21,35 \pm 1,03$  e  $24,31 \pm 2,01$  %g eq.AR/g biomassa), muito provável pela primeira etapa da HAQ ser um ataque extremamente severo, com alta concentração ácida (72% m/m), sendo responsável pela conversão de praticamente toda estrutura hemicelulósica da CA e PA, já a segunda etapa a qual utiliza um ataque mais brando, com baixa concentração de ácido (4% m/m), não conseguir atacar os interstícios da estrutura cristalina da celulose, tendo assim no processo geral seu ataque sendo preferencialmente na estrutura hemicelulósica, assim como na HACR. Esta hipótese se torna plausível, principalmente quando observa-se a alta conversão em AR ( $24,35 \pm 1,03$  %AR g eq.AR/g biomassa) da HAQ no ECA (estrutura formada apenas por celulose cristalina e sílica), sendo em torno de oito vezes maior do que obteve-se na HACR do mesmo material ( $3,33 \pm 0,25$  %g eq.AR/g biomassa). Isto deve ter ocorrido principalmente pela primeira etapa, alta concentração de ácido, do processo de HAQ ter sido consumido apenas pela celulose do ECA, tendo maior eficiência na quebra de sua estrutura cristalina pelo meio fortemente ionizado, ao contrário do que aconteceu na CA e PA, onde a alta concentração ácida da primeira etapa do processo é provavelmente em grande parte consumida na quebra da ligação da estrutura hemicelulósica amorfa e a lignina, fragilizando assim o grau de ionização do meio no ataque a estrutura cristalina da celulose.

### **5.7 Aplicação dos processos avaliados de hidrólise em casca de arroz nas Microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodemus sp.***

Tendo em vista a ideia de definir um único processo de hidrólise para a extração de AR em biomassas distintas, após a avaliação de hidrólises realizada em material lignocelulósico (CA) os três processos são aplicados nas duas espécies de microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodemus sp.* para avaliar a obtenção de AR e de inibidores em cada processo para cada microalga.

Primeiro um estudo na literatura foi realizado para verificar a composição média de carboidratos presentes em cada microalga, este estudo é de extrema importância no processo de obtenção de AR de microalgas, já que há uma grande variação desta composição para a mesma espécie de microalga, isto porque, as microalgas podem ser cultivadas em diversas condições e isto afeta diretamente no seu crescimento e sua composição final. Diversos estudos de cultivo de microalgas são propostos, eles visam maximizar a obtenção de compostos de interesse, como por exemplo, lipídios e carboidratos fontes para a produção de



biodiesel e bioetanol, respectivamente. Vários estudos (DRAGONE *et al.*, 2011; HO *et al.*, 2012; HO *et al.*, 2013; YEH; CHANG, 2011) relatam a utilização de condições em déficit de nitrogênio, as quais demonstraram acentuados aumentos do teor de lipídios e carboidratos, que podem ser transformados através de proteínas ou péptidos acumulados dentro da célula de microalga em condições livres de hidrogênio, outros fatores são estudados como tempo de cultivo e iluminação (HO *et al.*, 2012). Na Tabela 15 está demonstrada a faixa de carboidratos presente em cada microalga, considerando elas em condições normais de cultivo, ou seja, sem utilizar condições controladas.

Tabela 15 - Composição de carboidratos das espécies de microalgas estudadas.

Microalgas	% Carboidratos	Referência
<i>Scenedesmus Obliquos</i>	10-17	SPOLAORE <i>et al.</i> , 2006
<i>Desmodesmus sp.</i>	29-34	HO <i>et al.</i> , 2014; TAN <i>et al.</i> , 2016

Foi proposto utilizar a média das faixas de carboidratos demonstrada na Tabela 15, sendo então 13,5% e 31,5% de carboidratos para *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.* respectivamente, a média utilizada para propor o rendimento de cada processo em cada espécie de microalga.

### 5.7.1 Processo de secagem das microalgas

Sabe-se que as microalgas em geral após o processo de colheita são compostas por cerca de 80% de água na sua estrutura. MIRANDA e Colaboradores (2012) realizaram um estudo sobre o efeito da umidade presente na biomassa de microalga no processo de hidrólise com a microalga da espécie *Scenedesmus obliquos* e observaram que principalmente na hidrólise ácida o processo de secagem influenciou positivamente a extração de AR. Os resultados indicaram que o processo de secagem fragiliza a parede celular da microalga, já que a água é retirada dos poros existentes entre a estrutura da celulose, alterando irreversivelmente sua estrutura e favorecendo assim ao surgimento de zonas amorfas. A microalga *Scenedesmus obliquos* ainda é descrita por MIRANDA e Colaboradores (2012) por apresentar alta resistência a ruptura celular, pois esta espécie possui uma parede celular com multicamadas. Outros estudos (HARUN; DANQUAH., 2010; HO *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2010) sobre a ruptura celular de diferentes espécies de microalgas, citam a utilização da biomassa já seca, corroborando a justificativa de MIRANDA e Colaboradores (2012).

Logo, neste trabalho é utilizada a biomassa seca de microalga. Um estudo foi feito, a fim estabelecer qual dos métodos de secagem, utilizando estufa ou liofilizador, comumente utilizados em secagem de microalga, é o mais eficaz em termos de retirada de umidade e ainda se algum destes dois métodos influência mais na obtenção de AR, nas duas microalgas.

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos dos dois métodos de secagem, para cada microalga em percentual de umidade retirado, o qual observa-se que mesmo considerando os desvios, não há diferença significativa na remoção de umidade entre os métodos de secagem. Já na Figura 23, está demonstrado o percentual de AR convertido em cada processo de secagem, para cada microalga, onde, também evidencia-se que não há diferença significativa na obtenção de AR entre os métodos. Foram aplicadas as mesmas condições de hidrólise (HACR otimizada) em todos os experimentos. Através dos resultados apresentados, optou-se pela utilização do método de secagem por estufa, já que o liofilizador é um processo dispendioso.

Figura 22 - Comparação de secagem das microalgas.

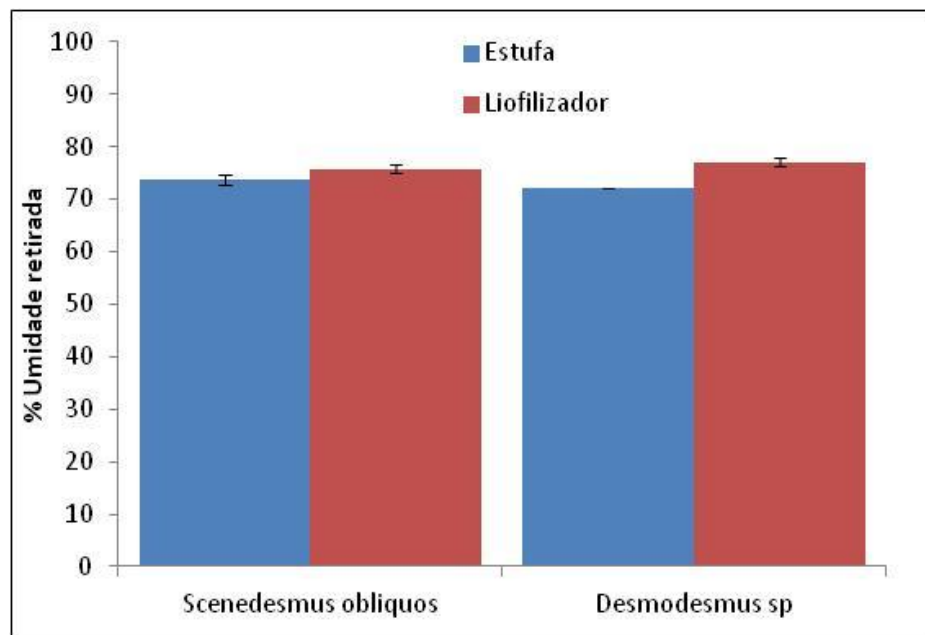
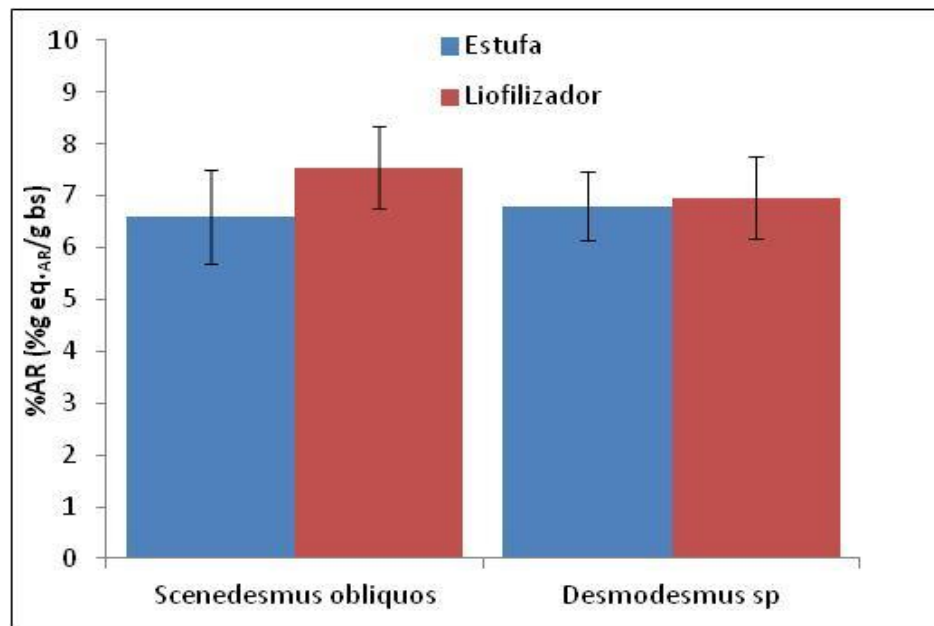
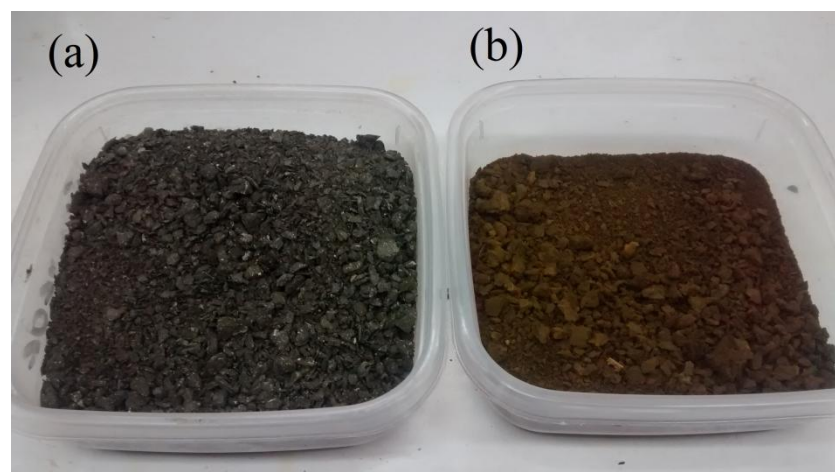


Figura 23 - Comparação da obtenção de açúcar redutor (AR) dos métodos de secagem nas microalgas.



Na Figura 24 estão demonstradas as duas microalgas já maceradas após o processo de secagem em estufa, já na forma a qual são utilizadas nos processos de hidrólise.

Figura 24- Microalgas maceradas após secagem em estufa. (a) *Scenedesmus obliquos*, (b) *Desmodesmus sp.*



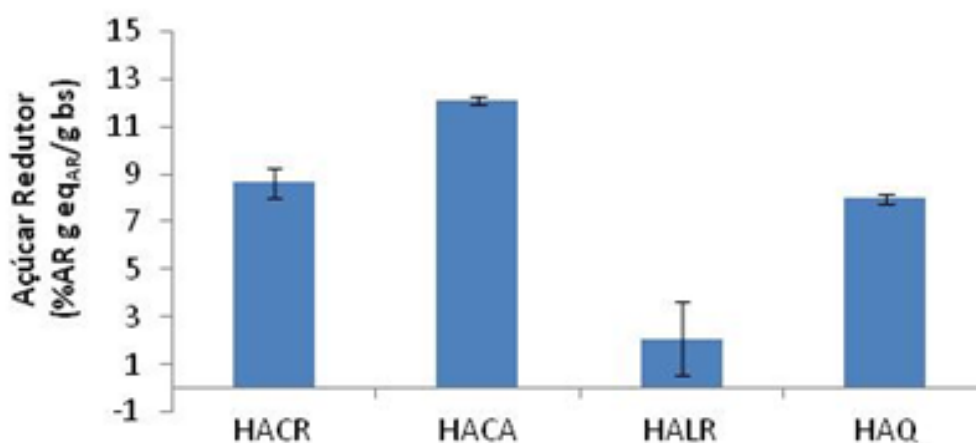
## 5.8 Aplicação nas microalgas dos resultados avaliados em casca de arroz

Após todo estudo realizado nos processos de hidrólise como escolha dos reagentes de hidrólise, parametrização das condições e planejamento experimental, os melhores resultados determinados nestes estudos são aplicados nas microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.* além do método quantitativo, a fim de observar a conversão em AR e o

rendimentos dos processos aplicados nas microalgas, comparando com os resultados obtidos em CA.

Dos três processos avaliados, HACR, HACA e HALR, as melhores condições foram às mesmas: 30 min de reação; concentração do agente de hidrólise de 2 mol/L e carga de biomassa de 2 g (40g/L). As Figuras 25 e 26 demonstram os resultados obtidos em AR (%AR g eq<sub>AR</sub>/g biomassa seca) e as Tabelas 16 e 17 apresentam os produtos formados da degradação dos AR (inibidores de fermentação) nas microalgas das espécies *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp*, respectivamente.

Figura 25 - Extração de açúcar redutor da biomassa seca *Scenedesmus obliquos*, através dos processos de hidrólises avaliados em casca de arroz.



\*HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

Tabela 16 - Concentração dos produtos de degradação nos processos de hidrólise da microalga *Scenedesmus obliquos*.

Processos de hidrólise	Produtos de degradação dos AR (mg/L)		
	Ácido acético	HMF	Furfural
HACR	465±242	2,92±0,59	2,85±0,095
HACA	1304±187	4,9±1,21	5,74±2,67
HALR	-	-	-
HAQ	-	4,45±0,0043	6,25±1,74

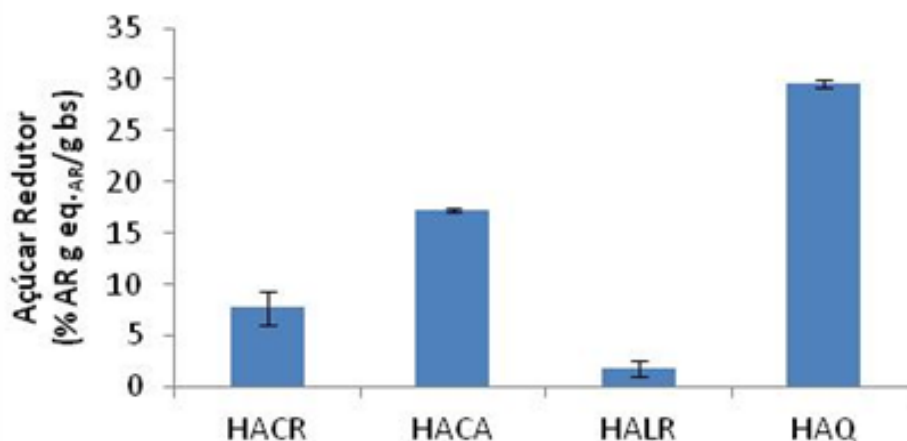
\*AR= Açúcar redutor; HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

Na microalga *Scenedesmus obliquos*, Figura 25, observa-se que o melhor resultado obtido foi a HACA, processo em meio ácido e que utiliza pressão, com uma extração de AR de 12%, sendo superior ao processo quantitativo (HAQ), o qual demonstrou uma conversão em AR de 8%. No sistema alcalino (HALR), nota-se uma conversão mais expressiva da biomassa de microalga em AR (2%), quando comparada com o mesmo sistema aplicado na CA (0,11% na conversão em AR), muito provável pela alta composição de lignina, que é consumida pelo meio alcalino, presente na CA. Já a HACR, sistema em refluxo, que foi o melhor método estudado para a extração de AR em CA, apresentou uma extração em AR em torno de 9%, conversão inferior a HACA, evidenciando neste caso que a pressão introduzida ao processo de hidrólise ácida tem efeito positivo na quebra da estrutura celular em AR, porém a HACR apresentou resultado levemente superior a que foi encontrada na HAQ. Em termos de concentração, neste trabalho obteve-se em torno de 3,45; 4,82; 0,83 e 3,19 mg de AR/mL de solução nos processos HACR, HACA, HALR e HAQ, respectivamente.

MIRANDA e Colaboradores (2012) que realizaram um estudo específico para a biomassa de microalga, obtiveram uma concentração de AR da microalga *Scenedesmus obliquos* em torno de 14 mg de AR/mL de solução, este resultado foi 2,9 vezes maior que o obtido neste estudo, porém este resultado de MIRANDA e Colaboradores (2012) foi realizado com a microalga tendo o seu cultivo potencializado e a composição de açúcares presentes na microalga de 31,8%, definido pelo método quantitativo, e foi em torno de 4 vezes maior comparado com a microalga estudada neste trabalho, que obteve 8% de açúcares obtido da HAQ.

Avaliando os produtos de degradação da microalga *Scenedesmus obliquos*, Tabela 16, o melhor dos processos avaliados na obtenção de AR, HACA, demonstrou o maior potencial na produção de produtos de degradação de AR, sendo em torno de 1,3 mg de produto de degradação/mL de solução. Nota-se então que a pressão exercida no processo teve efeito positivo de 40% a mais na obtenção de AR, porém efeito contrário na produção de produtos de degradação, em torno de 180% a mais, quando comparado com a HACR (processo sem pressão). Ácidos levulínico e fórmico não foram detectados em nenhum dos processos.

Figura 26 - Extração de açúcar redutor (AR) da biomassa seca *Desmodesmus sp.*, através dos processos de hidrólises avaliados em casca de arroz



\*HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

Tabela 17 - Concentração dos produtos de degradação nos processos de hidrólise da microalga *Desmodesmus sp.*

Processos de hidrólise	Produtos de degradação dos AR (mg/L)			
	Ácido acético	Ácido levulínico	HMF	Furfural
HACR	692,55±381,22	-	3,94±0,19	-
HACA	-	-	32,51±5,21	11,27±1,50
HALR	-	-	-	-
HAQ	-	106,03±8,90	13,69±0,37	8,00±1,03

\*AR= Açúcar redutor; HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo; HAQ= Hidrólise ácida quantitativa.

Para a microalga *Desmodesmus sp.*, o método quantitativo (HAQ) proposto por Hoebler e Colaboradores (1989), apresentou uma extração de AR de 30%, Figura 26, valor superior aos demais processos aplicados nesta microalga. Dos processos avaliados, o processo HACA foi o qual demonstrou melhor resultado, 17% de AR convertidos da biomassa seca inicial. Já o método alcalino (HALR) teve resultado ainda significativo (em torno de 2% de AR), quando comparado com a CA, porém também é ainda pouco expressivo. E a HACR nesta microalga, teve valor relativamente baixo de 7,7% de AR extraído, quando comparado com os demais processos, principalmente pelo potencial demonstrado na HAQ (30% de AR). Assim como na microalga *Scenedesmus obliquus*, a HACA evidenciou também para a microalga *Desmodesmus sp.* que a pressão exercida do processo tem efeito positivo na extração de AR. A microalga *Desmodesmus sp.* apresenta comportamento de estrutura da parede celular

parecido com o ECA, já que os resultados obtidos nos processos estudados tiveram o mesmo comportamento, alta extração de AR na HAQ quando comparada com os processos avaliados, provavelmente porque esta microalga também deve apresentar estrutura em grande parte na forma cristalina, dificultando o acesso dos processos avaliados pelo planejamento experimental (HACR, HACA e HALR) nos interstícios na biomassa, já o método quantitativo (HAQ) tem seu ataque beneficiado na primeira etapa de hidrólise pelo meio fortemente ionizado. Já em termos de concentração, obteve-se 3,09; 6,89; 0,72 e 11,82 mg de AR/mL de solução nos processos HACR, HACA, HALR e HAQ, respectivamente.

Um estudo realizado por HARUN e DANQUAH (2011), obteve 3,36 mg de AR/mL de solução, para microalga da espécie *Chlorococcum humicola*, a qual apresentou uma composição de 32% de carboidratos, semelhante ao referenciado neste trabalho para a microalga *Desmodesmus sp.* (em torno de 31,5% de carboidratos), resultado o qual demonstrou-se inferior ao melhor resultado obtido neste trabalho (HACA = 11,82 mg de AR/mL de solução), dos processos avaliados, para a microalga *Desmodesmus sp.*

Em termos de produtos de degradação dos ARs, nota-se, na Tabela 17, que considerando os principais produtos HMF e Furfural, a HACA foi o processo que mais converteu os AR nestes produtos, mais de 10 vezes do que a hidrólise ácida sem a pressão exercida (HACR) e praticamente o dobro em comparação com a HAQ. Foi detectado o ácido acético apenas na HACR e o ácido levulínico na HAQ, ácido fórmico não foi constatado em nenhum dos processos.

## **5.9 Comparação dos processos avaliados em biomassas distintas: Casca de arroz e Microalga**

Então as hidrólises otimizadas em CA e aplicadas nas microalgas das espécies *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*, são comparadas por seus rendimentos, Tabela 18, levando em consideração o teor polissacarídeo de cada biomassa. Para a CA um teor de 62% (celulose + hemicelulose) da biomassa inicial, já para as microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*, um teor de 13,5% e 31,5% (teórico teor médio do total de carboidratos), respectivamente.

Tabela 18 - Comparação dos rendimentos obtidos nas biomassas de Casca de arroz e microalgas.

Biomassa	% Rendimento (% g eq. <sub>AR</sub> /g teor polissacarídeo da biomassa)		
	HACR	HACA	HALR
Casca de Arroz	34,44	24,48	0,45
<i>M. Scenedesmus ob.</i>	64,01	89,41	15,56
<i>M. Desmodesmus sp.</i>	24,54	54,70	5,75

\*HACR= Hidrólise ácida em refluxo; HACA= Hidrólise ácida em autoclave; HALR= Hidrólise alcalina em refluxo.

Como já observado nos resultados supracitados, a melhor hidrólise foi envolvendo o reagente ácido. Considerando apenas o rendimento na obtenção de AR, ao avaliar a HACR, nota-se que ela teve o melhor rendimento apenas na biomassa da CA, onde foi de 10% superior a HACA. Já na HACA o rendimento foi superior a 25% melhor, constatado em cada microalga estudada. Avalia-se então que a HACA é o processo que mais se adequou aos dois tipos de biomassas estudadas, tendo conversões em AR em materiais lignocelulósicos e de microalga similares ao encontrado na literatura em processos específicos para um único material, discutidos anteriormente.



## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se até o momento deste estudo, que é possível a aplicação de um único processo para a extração de AR, aplicado em biomassas de natureza distintas. Porém uma ressalva deve ser feita, é de extrema importância que as biomassas envolvidas no processo, tenham estruturas de suas paredes celulares similares. A HACA demonstrou-se com potencial para aplicação em biomassas distintas, com rendimento de 24,5% 89,4% e 54,7% para a CA, e as microalgas *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.*, respectivamente.

O ácido sulfúrico mostrou-se o reagente ácido com melhor desempenho frente aos demais estudados, visto que teve o melhor rendimento na obtenção de AR. Definiu-se através de pesquisa na literatura, uma faixa intermediária de condições dos principais parâmetros do processo de hidrólise, que atendesse o objetivo de extração de AR, da CA e de microalgas.

Por ser uma biomassa de estrutura resiliente da parede celular, a CA foi à biomassa definida para o processo de avaliação. A fim de avaliar os processos de hidrólise propostos na extração de AR, a utilização de técnicas de planejamento experimental se provou uma ferramenta competente propiciando realizar um estudo de forma organizada, sistemática e criteriosa do processo. Verificou-se também a influência de diferentes parâmetros na extração de AR pelos diversos índices estatísticos que facilitaram a análise e obtenção de modelos empíricos característicos de cada processo de hidrólise. As condições do processo de hidrólise otimizadas para a extração de AR foram determinadas para a CA. Para HALR, HACR e HACA as condições foram as mesmas: Tempo de 30 min, massa de casca de arroz 2 g e concentração de hidróxido de sódio 2 mol/L. A HACR mostrou-se o processo mais eficiente com 7,601 mg de AR/mL de solução que corresponde em torno de 21% de AR extraído da CA, o qual teve rendimento melhor que a HAQ, método proposto por HOEBLER e colaboradores (1989), que foi em torno de 19% de AR extraído da CA.

Avaliou-se em qual das estruturas da parede celular (celulose e hemicelulose) da CA a HACR ataca preferencialmente, para isto, outros dois materiais foram testados, ECA composto apenas de celulose de sílica e a PA com maior composição de hemicelulose quando comparado com a CA. Observou-se que o ataque da HACR acontece preferencialmente na estrutura hemicelulósica do material lignocelulósico.

Então os processos avaliados pelo planejamento experimental (HALR, HACR e HACA) e a HAQ foram aplicados posteriormente nas duas microalgas estudadas, *Scenedesmus obliquos* e *Desmodesmus sp.* Primeiro definiu-se o processo de secagem das microalgas, onde a estufa e o liofilizador mostraram ser de mesma eficiência de secagem para estas biomassas e

não influenciarem na obtenção de AR nos processos de hidrólise, contudo o liofilizador é um processo dispendioso, logo a estufa foi determinada o processo de secagem utilizada para as seguintes reações com as microalgas.

Na microalga *Scenedesmus obliquos* a HACA demonstrou ser o melhor processo na obtenção de AR, com 12% da biomassa sendo convertida, tendo uma eficiência de 40% a mais quando comparado com a HACR, porém o processo envolvendo pressão teve uma formação de 180% a mais de produtos de degradação dos açúcares. Para a microalga *Desmodemus sp.*, o método quantitativo (HAQ) foi o mais eficaz na obtenção de AR, em torno de 30% da biomassa inicial sendo convertida. Entretanto, dos processos avaliados a HACA, demonstrou uma conversão em AR interessante de 17%.

Sugere-se para trabalhos futuros, uma etapa de determinação do perfil de açúcares formados em ambas biomassas, de cada processo, já que com isto, seria possível avaliar os microorganismos específicos para o máximo de conversão em etanol, dos açúcares formados.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Claudio Lima; MENEZES, Tobias JB. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- ANG, Teck Nam; NGOH, Gek Cheng; CHUA, Adeline Seak May. Comparative study of various pretreatment reagents on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk. **Bioresource technology**, v. 135, p. 116-119, 2013.
- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS Produção e fornecimento de biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis>: Acesso em 26/04/2017.
- ASTM, D. 1102-84: Standard test method for ash in wood. **American Society for Testing and Materials, West Conshohocken**, 2013.
- BAJPAI, S. K. et al. Cellulose nano whiskers (CNWs) loaded-poly (sodium acrylate) hydrogels. Part-I. Effect of low concentration of CNWs on water uptake. **Journal of Macromolecular Science, Part A**, v. 50, n. 5, p. 466-477, 2013.
- BARROS NETO, Benício; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como Fazer Experimentos:- Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 4ª ed.** – Porto Alegre: Editora Bookman – 2010.
- BEHERA, Shuvashish et al. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 36, p. 91-106, 2014.
- BEVILAQUA, Daiane Balconi. **Produção de ácido levulínico por meio de hidrólise ácida da casca de arroz.** Dissertação de Mestrado (Química Analítica), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brasil, 2010.
- BINOD, Parameswaran et al. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.
- BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.
- BRETHAUER, Simone; WYMAN, Charles E. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2010.
- BROWNING, Bertie Lee et al. Methods of wood chemistry. Volumes I & II. **Methods of wood chemistry. Volumes I & II.**, 1967.

CANILHA, L. O. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**.. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)-Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

CARDOSO, Luiz Cláudio. **Petróleo do poço ao posto**. Qualitymark Editora Ltda, 2005.

CASSALES, Ana Ribeiro. **Otimização da hidrólise da casca de soja (glycine max) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

CHEN, Chun-Yen et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectivas da agropecuária. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>; . Acesso em: 10/09/2017.

CRUZ, J. M. et al. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. **Food biotechnology**, v. 14, n. 1-2, p. 79-97, 2000.

DE ALMEIDA, Pedro; SILVA, Pedro D. The peak of oil production—Timings and market recognition. **Energy Policy**, v. 37, n. 4, p. 1267-1276, 2009.

DEMIRBAS, Ayhan. **Biodiesel**. London: Editora Springer - 2008.

DOHERTY, William OS; MOUSAVIOUN, Payam; FELLOWS, Christopher M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial crops and products**, v. 33, n. 2, p. 259-276, 2011.

DRAGONE, Giuliano et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, 2011.

ESCOBAR, José C. et al. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 13, n. 6, p. 1275-1287, 2009.

FERREIRA, Sergio Luis Costa et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of chromatography A**, v. 1158, n. 1, p. 2-14, 2007.

FONTOURA, Luísa Pritsch. **Potencial econômico e aplicações da casca de arroz no estado do Rio Grande do Sul**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

GALBE, Mats; ZACCHI, Guido. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, 2012.

GIRISUTA, Buana; JANSSEN, L. P. B. M.; HEERES, H. J. A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid. **Green Chemistry**, v. 8, n. 8, p. 701-709, 2006.

HARUN, Razif; DANQUAH, Michael K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 304-309, 2011.

HARUN, Razif; DANQUAH, Michael K.; FORDE, Gareth M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, n. 2, p. 199-203, 2010.

HARUN, Razif et al. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3464-3467, 2011.

HICKERT, Lilian Raquel. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. Dissertação de mestrado (Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (URGS), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2010.

HO, Shih-Hsin; CHEN, Chun-Yen; CHANG, Jo-Shu. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource technology**, v. 113, p. 244-252, 2012.

HO, Shih-Hsin et al. Achieving high lipid productivity of a thermotolerant microalga *Desmodesmus* sp. F2 by optimizing environmental factors and nutrient conditions. **Bioresource technology**, v. 156, p. 108-116, 2014.

HO, Shih-Hsin et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource technology**, v. 135, p. 191-198, 2013.

HOEBLER, Christine et al. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 37, n. 2, p. 360-367, 1989.

HOSSAIN, ABM Sharif et al. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. **American journal of biochemistry and biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 250-254, 2008.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 29/05/2017.

IRGA, Instituto Rio Grandense do Arroz. Produção RS Série Histórica. Disponível em: [http://www.irga.rs.gov.br/upload/20170724112804produco\\_rs\\_historica.pdf](http://www.irga.rs.gov.br/upload/20170724112804produco_rs_historica.pdf). Acesso em: 10/09/2017.

JOHAR, Nurain; AHMAD, Ishak; DUFRESNE, Alain. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 93-99, 2012.

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource technology**, v. 199, p. 103-112, 2016.

KULKARNI V, S.; BUTTE K, D.; RATHOD S, S. Natural polymers—A comprehensive review. **International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences**, v. 3, n. 4, p. 1579-1613, 2012.

KUMAR, Raj; SINGH, Sompal; SINGH, Om V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

LAUFENBERG, Günther; KUNZ, Benno; NYSTROEM, Marianne. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LUDWIG, Vanelli Salati. **A agroindústria processadora de arroz: um estudo das principais características organizacionais e estratégicas das empresas líderes gaúchas**. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

LEE, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource technology**, v. 101, n. 1, p. S75-S77, 2010.

LOPES, LUIZA PAULA DA CONCEIÇÃO. **Processo produtivo de microalgas para produção de biocombustíveis, um modelo para o Brasil**. Dissertação de Mestrado Profissional em Produção – Instituto Tecnológico de Aeronáutica, São José dos Campos, 2014.

MA, Yuejia et al. Comprehensive utilization of the hydrolyzed productions from rice hull. **Industrial crops and products**, v. 33, n. 2, p. 403-408, 2011.

MANSILLA, Héctor D. et al. Acid-catalysed hydrolysis of rice hull: evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 189-193, 1998.

MILLER, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. **Anal. Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, Paula C.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 342-348, 2012.

MOOD, Sohrab Haghghi 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.

PAULO, Vanessa Patrícia Faria. **Optimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol**. Dissertação de Mestrado (Engenharia Alimentar). ISA/UTL, Lisboa, 2011.

RABELO, Sarita C.; MACIEL FILHO, Rubens; COSTA, Aline Carvalho. Lime pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, n. 1-3, p. 139-150, 2009.

REYES, Juan; PERALTA-ZAMORA, Patricio; DURAN, Nelson. 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.

ROBERTO, Inês C.; MUSSATTO, Solange I.; RODRIGUES, Rita CLB. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, n. 3, p. 171-176, 2003.

RODRIGUES, Ruben Cassel. **Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 47-51, 2010.

SANCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SCHENK, Peer M. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy research**, v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008.

SHI, Wen et al. Influence of ultrasonic pretreatment on the yield of bio-oil prepared by thermo-chemical conversion of rice husk in hot-compressed water. **Bioresource technology**, v. 146, p. 355-362, 2013.

SIMUNDI, Felipe Soeiro Meyrer. **Extração de sílica e celulose a partir da casca de arroz**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2017.

SINGH, Anita et al. Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave-alkali pretreatment and lignocellulolytic enzyme production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1773-1782, 2011.

SIVAKUMAR, Ganapathy et al. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 8-18, 2010.

SOCOL, Carlos Ricardo et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TAN, Fen et al. Nitrogen and phosphorus removal coupled with carbohydrate production by five microalgae cultures cultivated in biogas slurry. **Bioresource technology**, v. 221, p. 385-393, 2016.

TAPPI, **T. 222 OM-02**. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, USA, 2002.

YEH, Kuei-Ling; CHANG, Jo-Shu. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 11, p. 1358-1366, 2011.

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

ZHANG, Y.-H. Percival. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

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