

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA:
RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Kluyveromices marxianus* A PARTIR DE
SUBPRODUTOS DO BENEFICIAMENTO DE ARROZ**

TANIA CLAUDIA PINTRO

CASCAVEL - PR
FEVEREIRO - 2019

TANIA CLAUDIA PINTRO

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Kluyveromices marxianus* A PARTIR DE
SUBPRODUTOS DO BENEFICIAMENTO DE ARROZ**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* de Engenharia Agrícola, em requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* Cascavel.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Sene

CASCADEL - PR

FEVEREIRO - 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Pintro, Tania Claudia

Produção de bioetanol por *Kluyveromices marxianus* a partir de subprodutos do beneficiamento de arroz : - / Tania Claudia Pintro; orientador(a), Luciane Sene, 2019. 101 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, , Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, 2019.

1. etanol de segunda geração. 2. suplementação nutricional. 3. farelo de arroz. 4. casca de arroz. I. Sene, Luciane. II. Título.

TANIA CLAUDIA PINTRO

“PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* A PARTIR DE
SUBPRODUTOS DO BENEFICIAMENTO DE ARROZ”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas Biológicos e Agroindustriais, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel (UNIOESTE)

Prof. Dr. Divair Christ

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel (UNIOESTE)

Profa. Dra. Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel (UNIOESTE)

Profa. Dra. Priscila Vaz de Arruda

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *Campus* Toledo (UTFPR)

Orientadora: Profa. Dra. Jociani Ascari

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - *Campus* Santa Helena (UTFPR)

Cascavel, 12 de Fevereiro de 2019.

BIOGRAFIA

Tania Claudia Pintro possui curso Técnico em Edificações pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR (2004) e graduou-se em Tecnologia em Construção Civil (2006) na mesma instituição.

Concluiu o curso de graduação em Engenharia Agrícola na Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE em dezembro de 2012. Durante a graduação desenvolveu atividades de pesquisa participando de projeto de iniciação científica, nesta universidade.

Em fevereiro de 2015, concluiu o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, no Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UNIOESTE, na área de Engenharia de Sistemas Biológicos Agroindustriais, na linha de pesquisa da Pós-Colheita, sob orientação da Prof. Dr. Divair Christ, com o seguinte título da dissertação: “Infestação de *Sitophilus zeamais* na qualidade físico-química e microbiológica de grãos de trigo armazenados”.

Em fevereiro de 2015, ingressou no curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, no Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UNIOESTE, sob a orientação da Profa. Dra. Luciane Sene.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão de bolsa, durante a realização dos estudos.

PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* A PARTIR DE SUBPRODUTOS DO BENEFICIAMENTO DE ARROZ

RESUMO

A exploração indiscriminada dos combustíveis fósseis e um possível esgotamento das fontes tradicionais dessa matéria-prima apontam para o esgotamento desse suprimento de energia. Questão análoga está nos desafios com a preservação ambiental que trazem para o debate os bicombustíveis e seus meios de obtenção. Fontes alternativas de produção de energia vêm sendo exploradas com o intuito de obter bicombustíveis com o mesmo potencial energético, mas inserida em um contexto de desenvolvimento sustentável, evitando a disputa por terras destinadas à produção de alimentos. O Brasil é uma potência agroindustrial e dispõe de grande variedade de produtos agrícolas, tendo uma produção de arroz expressiva e que tem como subprodutos o farelo e a casca de arroz. Estudos que viabilizem metodologias que tornem a exploração dessas fontes economicamente viável e vantajosas para a obtenção de etanol de segunda geração estão sendo desenvolvidos utilizando leveduras fermentadoras. O objetivo deste trabalho foi estudar o farelo de arroz como suplemento nutricional do meio de cultura e o aproveitamento dos açúcares da fração celulósica da casca de arroz para a produção de etanol de segunda geração por *Kluyveromyces marxianus*. Foram avaliadas sete diferentes fontes de suplementação do meio de cultura para a produção de etanol: T1 - Controle (glicose 90 g/L, sem suplementação); T2 - meio suplementado com extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) (glicose 90 g/L, extrato de farelo de arroz a 20 g/L); T3 - meio suplementado com extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) + componentes inorgânicos (glicose 90 g/L, extrato de farelo de arroz 20 g/L, CaCl_2 0,1 g/L, sulfato de amônio 2 g/L); T4 - meio suplementado com extrato de malte (EM) (glicose 90 g/L, extrato de malte 3 g/L); T5 - meio suplementado com extrato de levedura (EL) (glicose 90 g/L, extrato de levedura 3 g/L); T6 - meio suplementado com peptona (PEP) (glicose 90 g/L, peptona 5 g/L); T7 - meio YMP (com concentração de glicose modificada para 90 g/L, 3 g/L extrato de malte, 3 g/L extrato de levedura e 5 g/L de peptona). Os meios foram preparados com tampão citrato de sódio (50 mmol/L), pH 5,5. Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com 100 mL de meio e concentração do inóculo 1 g/L. Os tratamentos foram incubados em *shaker* a 200 rpm, a 40° C durante 96 horas. Para a produção de etanol com casca de arroz pelas técnicas sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS), primeiramente foram avaliados vários pré-tratamentos para a obtenção da celulose. No processo SSF o inóculo (1 g/L) foi adicionado após 4 horas de sacarificação, no processo SFS o inóculo (1 g/L) foi adicionado após 72 horas de sacarificação, ambos empregando 40 FPU/g celulose da enzima Cellic[®]CTec2, casca de arroz na proporção de 10% (m/v), pH 5,0, a 50 °C, 150 rpm. Na SSF e SFS os meios foram suplementados com: YMP (T1), farelo de arroz (T2) e farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T3), selecionados na avaliação da suplementação nutricional. A maior produção de etanol (25,59 g/L, $Y_{P/S}$ 0,50 g/g e Q_P 1,16 g/L.h) foi verificada no meio suplementado com farelo de arroz, seguido do meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (25,50 g/L de etanol, $Y_{P/S}$ 0,49 g/g e Q_P de 2,13 g/L.h), e meio YMP (24,88 g/L de etanol, $Y_{P/S}$ 0,50 g/g e Q_P 2,06 g/L.h). A casca de arroz pré-tratada com NaOH 2% + H_2O_2 5% apresentou a seguinte composição: 47, 51 % de celulose, 9,57 % de hemicelulose e 20,54 % de lignina. Na SSF, obteve-se produção de etanol de 10,21, 10,05 e 9,78 g/L, rendimento $Y_{P/S}$ 0,51, 0,52 e 0,51 de g/g e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de 0,58, 0,55 e 0,61 g/L.h nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. Na SFS as concentrações máximas de etanol foram 11,36, 12,96 e 13,08 g/L, correspondendo a $Y_{P/S}$ 0,18, 0,21 e 0,21 de g/g e Q_P de 0,80, 0,96 e 0,88 g/L.h para T1, T2 e T3, respectivamente. Os resultados permitem considerar que o farelo e a casca de arroz são matérias promissoras na produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: etanol de segunda geração; suplementação nutricional; farelo de arroz; casca de arroz.

BIOETHANOL PRODUCTION BY *Kluyveromyces marxianus* FROM BY-PRODUCTS OF RICE PROCESSING

ABSTRACT

The indiscriminate exploitation of fossil fuels, as well as a possible depletion of traditional sources of raw materials, have been pointing to a possible exhaustion of energy supply. Similar to this problem, challenges with environmental preservation bring to discussion issues involving biofuels and their means of production. Alternative sources have been explored, aiming to produce biofuels with the same energy potential, within the context of sustainable development, also avoiding dispute over lands destined for food production. Brazil is an agribusiness power, with its wide variety of agricultural products, and a highly expressive rice production, which generates rice bran and the rice husk as by-products. Studies that create or improve methodologies to enable the exploring of these sources, while economically advantageous and feasible, to obtain second-generation ethanol are being developed, using fermenting yeasts. Therefore, the objective of this work was to study rice bran as a nutritional supplement of the culture medium and the utilization of the sugars from the cellulose fraction of the rice husk for the production of second-generation ethanol by *Kluyveromyces marxianus*. Seven different sources for the culture's media supplementation for ethanol production were evaluated: T1 - Control (glucose 90 g/L, without supplementation); T2 - Medium supplemented with water soluble rice bran extract (FA) (glucose 90 g/L, rice bran extract 20 g/L); T3 - Medium supplemented with water soluble rice bran extract (FA) + inorganic components (glucose 90 g/L, rice bran extract 20 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L, ammonium sulfate 2 g/L); T4 - Medium supplemented with malt extract (ME) (glucose 90 g/L, malt extract 3 g/L); T5 - Medium supplemented with yeast extract (EL) (glucose 90 g/L, yeast extract 3 g/L); T6 - Medium supplemented with peptone (PEP) (glucose 90 g/L, peptone 5 g/L); T7 - YMP medium (with glucose concentration modified to 90 g/L, 3 g/L malt extract, 3 g/L yeast extract and 5 g/L peptone). The media were prepared with sodium citrate buffer (50 mmol/L), pH 5.5. The assays were performed in triplicates, in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL medium and 1 g/L inoculum concentration. The treatments were incubated on a shaker at 200 rpm, at 40 °C for 96 hours. For the production from rice husks by the simultaneous saccharification to fermentation (SFS) and separate saccharification and fermentation (FSS) techniques, several pre-treatments were pre-evaluated to obtain cellulose. In the SSF process, the inoculum (1 g/L) was added after 4 hours of saccharification; in the SFS process, the inoculum (1 g/L) was added after 72 hours of saccharification, both using 40 FPU/g cellulose of the enzyme Cellic[®]CTec2, rice husk in the ratio of 10% (m/v), pH 5.0, at 50 °C, 150 rpm. For both SSF and SFS methods, the media were supplemented with the following nutrients: YMP (T1), rice bran (T2), and rice bran + CaCl₂ + ammonium sulfate (T3) selected in the evaluation of the nutritional supplementation. The highest ethanol production (25.59 g/L, Y_{P/S} 0.50 g/g and Q_P 1.16 g/L.h) was verified in the medium supplemented with rice bran, followed by the medium supplemented with rice bran + CaCl₂ + ammonium sulfate (25.50 g/L ethanol, Y_{P/S} 0.49 g/g, and Q_P of 2.13 g/L.h), and YMP medium (24.88 g/L ethanol, Y_{P/S}, 50 g/g, and Q_P 2.06 g/L.h). The rice husk pretreated with 2% NaOH + 5% H₂O₂ showed the following composition: 47.51% cellulose, 9.57% hemicellulose, and 20.54% lignin. In the SSF, 10.21, 10.05, and 9.78 g/L of ethanol was produced, Y_{P/S} produced 0.51, 0.52, and 0.51 g/g, and ethanol volumetric productivity (Q_P) of 0.58, 0.55, and 0.61 g/L.h in T1, T2, and T3 treatments, respectively. For the SFS, the maximum ethanol concentrations were 11.36, 12.96, and 13.08 g/L, corresponding to Y_{P/S} 0.18, 0.21, and 0.21 g/g, and Q_P of 0.80, 0.96, and 0.88 g/L.h for T1, T2 and T3, respectively. With these results, it is possible to consider that rice bran and rusk are promising raw materials for the production of second-generation ethanol.

Key words: Second-generation ethanol; nutritional supplementation; rice bran; rice husk.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Produção de etanol combustível	4
3.2 Estrutura da biomassa lignocelulósica	6
3.2.1 Celulose.....	8
3.2.2 Hemicelulose	9
3.2.3 Lignina	10
3.3 Obtenção de etanol através de matérias-primas lignocelulósicas	11
3.3.1 Pré-tratamento do material lignocelulósico.....	12
3.3.1.1 Métodos físicos.....	12
3.3.1.2 Métodos químicos.....	12
3.3.1.3 Métodos biológicos	12
3.3.2 Sacarificação simultânea à fermentação.....	19
3.3.3 Sacarificação e fermentação separadas	20
3.4 <i>Kluyveromices marxianus</i>	21
3.5 Histórico e produtividade do arroz.....	21
3.5.1 Casca de arroz	22
3.5.2 Farelo de arroz	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Parte I - Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura no crescimento e produção de etanol por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907	26
4.1 Caracterização química do farelo de arroz.....	26
4.1.1 Determinação do teor de umidade	27
4.1.2 Determinação do teor de proteínas	27
4.1.3 Determinação do teor de lipídeos	28
4.2 Microrganismo e preparo do pré-inóculo.....	28
4.3 Preparo do extrato de farelo de arroz.....	28
4.4 Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura.....	29

4.5	Métodos analíticos	30
4.5.1	Determinação da concentração de glicose, ácido acético, glicerol e etanol	30
4.5.2	Determinação do pH	30
4.5.3	Determinação da concentração celular	30
4.6	Cálculos dos parâmetros fermentativos	30
4.6.1	Fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$)	30
4.6.2	Fator de conversão de glicose em células ($Y_{X/S}$)	31
4.6.3	Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)	31
4.6.4	Produtividade volumétrica em células (Q_x)	31
4.7	Análise estatística	32
Parte II - Avaliação da utilização das cascas de arroz para a produção de bioetanol por sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS) empregando <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907		
4.8	Obtenção das cascas de arroz.....	32
4.9	Pré-tratamento da biomassa e hidrólise enzimática	33
4.10	Caracterização química das cascas de arroz.....	35
4.10.1	Determinação do teor de cinzas.....	35
4.10.2	Determinação do teor de umidade	35
4.10.3	Determinação do teor de proteínas	35
4.10.4	Determinação do teor de lipídeos	35
4.10.5	Porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina.	35
4.11	Pré-tratamento da biomassa com NaOH 2% + H ₂ O ₂ 5%.....	36
4.11.1	Espectrometria de absorção na região infravermelha (FTIR)	37
4.11.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
4.12	Avaliação da hidrólise enzimática	37
4.12.1	Determinação da atividade enzimática.....	38
4.12.2	Cálculo da atividade enzimática.....	38
4.13	Micro-organismo e preparo do pré-inóculo.....	39
4.14	Sacarificação simultânea à fermentação (SSF)	39
4.15	Sacarificação e fermentação separadas (SFS)	40
4.16	Métodos analíticos	40
4.16.1	Determinação da concentração de glicose, etanol, ácido acético e glicerol	40
4.16.2	Determinação do pH	41
4.17	Cálculo dos parâmetros fermentativos	41
4.17.1	Fator de conversão da glicose em etanol ($Y_{p/s}$)	41
4.17.2	Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)	41
4.18	Análise estatística	41

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
	Parte I - Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura no crescimento e produção de etanol por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907	42
5.1	Análise da caracterização química do farelo de arroz	42
5.2	Consumo de glicose e produção de etanol	42
5.3	Concentração celular	45
5.3.1	Formação de subprodutos	46
5.3.2	Parâmetros fermentativos	48
	Parte II - Avaliação da utilização das cascas de arroz para a produção de bioetanol por sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS) empregando <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	52
5.4	Hidrólise enzimática da casca de arroz	52
5.5	Análise da composição química da casca de arroz <i>in natura</i>	53
5.5.1	Análise da casca de arroz por espectroscopia no infravermelho com transformação de Fourier (FTIR)	55
5.5.2	Cascas de arroz <i>in natura</i> e pré-tratada em microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
5.6	Sacarificação simultânea à fermentação (SSF)	59
5.6.1	Formação de subprodutos	62
5.6.2	Parâmetros fermentativos	63
5.7	Sacarificação e fermentação separadas (SFS)	64
5.7.1	Pré-sacarificação	64
5.7.2	Sacarificação e fermentação separadas (SFS)	65
5.7.3	Formação de subprodutos	67
5.8	Comparação da produção de etanol entre os métodos SSF e SFS	68
6	CONCLUSÕES	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Evolução da produção mundial de etanol (em bilhões de galões).	5
Figura 2	Organização da estrutura lignocelulósica.	6
Figura 3	Estrutura da parede celular dos vegetais mostrando o arranjo das microfibrilas de celulose, cadeias de hemicelulose e de lignina, além de monossacarídeos presentes nestas estruturas.	7
Figura 4	Representação dos níveis morfológicos da celulose: (a) fibras da celulose; (b) microfibrilas, ou fibrilas que compõem cada fibra; (c) cada microfibrila é composta de feixes de microfibrilas; (d) microfibrilas, que são compostas de feixes de cadeias de moléculas de celulose.	9
Figura 5	Fluxograma da produção de etanol de segunda geração.	11
Figura 6	Pré-tratamento esquemático do material lignocelulósico.	13
Figura 7	Aspecto físico do farelo de arroz.	26
Figura 8	Aspecto físico da casca de arroz.	33
Figura 9	Consumo de glicose durante a fermentação com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl ₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X)	43
Figura 10	Produção de etanol durante a fermentação com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl ₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X); meio suplementado com extrato de levedura (✕); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).	44
Figura 11	Concentração celular durante a fermentação com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl ₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X); meio suplementado com extrato de levedura (✕); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).	46
Figura 12	Produção de ácido acético durante a fermentação com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl ₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X); meio suplementado com extrato de levedura (✕); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).	47

- Figura 13** Produção de glicerol durante a fermentação com *K. marxianus* ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X); meio suplementado com extrato de levedura (✕); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+). 48
- Figura 14** Perfil cinético da hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz submetida a diferentes pré-tratamentos: T1 - (H₂SO₄ 1%, 121 °C), 1 h; T2 - (NaOH 8%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h); T3 - (NaOH 2% + H₂O₂ 5%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h); T4 - (H₂SO₄ 1%, 121 °C, 1 h + NaOH 2%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h); T5 - (NaOH 2%, 121°C; 30 min); T6 - (NaOH 8%, 121°C; 30 min).52
- Figura 15** Liberação de açúcares redutores (g/L) ao longo de 96 horas de hidrólise da casca de arroz, utilizando três diferentes concentrações de enzima (10, 20, 40 FPU/g de celulose enzima Cellic[®]CTec2..... 53
- Figura 16** Espectro FTIR da casca de arroz *in natura* e pré-tratada (H₂O₂ 5% + NaOH 2%). 56
- Figura 17** Micrografias da casca de arroz reduzidas a partículas de 50 mesh, obtidas por MEV. (A) *in natura* em aumento de 100 vezes; (C) *in natura* em aumento de 200 vezes; pré-tratada em aumento de 100 vezes (B); pré-tratada em aumento de 200 vezes (D). 58
- Figura 18** Micrografias da casca de arroz reduzidas a partículas de 50 mesh, obtidas por MEV. (A) *in natura* em aumento de 500 vezes; (C) *in natura* em aumento de 2000 vezes; pré-tratada em aumento de 500 vezes (B); pré-tratada em aumento de 2000 vezes (D). 59
- Figura 19** Variação das concentrações de glicose, celobiose, xilose e produção de etanol em SSF da casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* ATCC 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (T3). 61
- Figura 20** Concentração de ácido acético e glicerol em SSF de casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (T3). 62
- Figura 21** (g/L) de glicose, celobiose e xilose em função do tempo de pré-sacarificação da biomassa pré-tratada em meio YMP (T1); suplementado com farelo de arroz (T2); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (T3).65
- Figura 22** Variação das concentrações de glicose, celobiose, xilose e produção de etanol durante a SFS da casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* ATCC 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz

	(T2); e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl ₂ + sulfato de amônio (T3).	66
Figura 23	Concentração de ácido acético e glicerol durante a SFS da casca de arroz pré-tratada por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl ₂ + sulfato de amônio (T3).	67
Figura 24	Comparação da concentração máxima de etanol nos processos de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS).	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química de diferentes materiais lignocelulósicos.....	7
Tabela 2	Composição química do farelo de arroz	42
Tabela 3	Parâmetros fermentativos e máxima produção de etanol durante a fermentação com <i>K.marxianus</i> ATCC 36907, utilizando sete diferentes meios de fermentação	49
Tabela 4	Produção de etanol em 7 diferentes meios de fermentação, nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação.....	49
Tabela 5	Produção de etanol em 7 diferentes meios de fermentação, nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação.....	50
Tabela 6	Análise de variância (ANOVA) para crescimento celular em 7 diferentes meios de fermentação, nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação	51
Tabela 7	Concentração celular em 7 tratamentos com ou sem suplementação após 12, 24, 36 horas de fermentação.....	51
Tabela 8	Composição química da casca de arroz <i>in natura</i>	54
Tabela 9	Indicação das bandas e componentes removidos durante o pré-tratamento ...	57
Tabela 10	Parâmetros fermentativos e máxima produção de etanol durante o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) de casca de arroz pré-tratada com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907	63
Tabela 11	Parâmetros fermentativos e máxima produção de etanol durante o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SFS) de casca de arroz pré-tratada com <i>K. marxianus</i> ATCC 36907	68
Tabela 12	Análise de variância (ANOVA) para análise da produtividade volumétricas máximas dos processos em SFS (sacarificação e fermentação separadas) e SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) em 24 de fermentação comparando os diferentes meios de cultura	70
Tabela 13	Análise de variância (ANOVA) para análise da produção máxima de etanol dos processos em SFS (sacarificação e fermentação separadas) e SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) em 24 de fermentação	70

1 INTRODUÇÃO

O esgotamento dos combustíveis fósseis, o aumento acentuado no preço dos produtos petrolíferos e as consequências dos avanços do aquecimento global têm gerado preocupação e necessidade de estudos para produção de combustíveis através de fontes renováveis. O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis tem sido apresentado como uma solução para esses problemas.

A produção de etanol a partir de diferentes matérias-primas tem sido apontada como uma das alternativas mais promissoras para a substituição de combustíveis derivados do petróleo. Essa alternativa é importante para que haja uma mudança significativa no cenário mundial do uso dos recursos em que, aproximadamente, 75% do consumo primário de energia são supridos pelo petróleo, carvão e gás natural. Dentre as matérias primas que podem ser utilizadas para a produção de etanol de segunda geração, destacam-se os materiais lignocelulósicos, devido ao fato de serem encontrados em grandes quantidades, baixo custo e rendimento em etanol.

O arroz é o segundo cereal mais consumido no mundo, com uma produção mundial estimada na safra 2017/18 de 486,26 toneladas, segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Sabe-se que o processo de beneficiamento desse produto gera uma grande quantidade de resíduos, como a casca e o farelo de arroz.

O farelo de arroz é um subproduto utilizado na alimentação animal, principalmente de suínos e aves. Resulta do processo de polimento dos grãos, quando são removidas as camadas do pericarpo e tegumento, além de partículas remanescentes da casca. Rico em carboidratos, proteínas, lipídeos, fibras insolúveis, vitaminas e minerais.

A casca de arroz é um subproduto do processo de produção do arroz e um dos materiais mais abundantes gerados das atividades agrícolas no mundo, grande parte desse material é composto por polímeros complexos como celulose e hemicelulose, que podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis, portanto, constitui um material em potencial para a produção de etanol de segunda geração.

O processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) é uma forma de evitar a inibição enzimática, pois, à medida que a celulose está sendo hidrolisada pela celulase e a glicose está sendo liberada, a glicose também está sendo consumida pelo microrganismo para a produção de etanol. Portanto, no processo de SSF, recomenda-se o emprego de leveduras termotolerantes, com capacidades fermentativas na mesma faixa ótima de temperatura das enzimas, levando a uma maior conversão de celulose em etanol.

No processo de sacarificação e fermentação separadas (SFS), a temperatura da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas, visto que essas duas etapas

ocorrem em momentos distintos, porém há, como desvantagem, a inibição da celulase pela glicose.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de etanol pela levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* empregando subprodutos do processamento do arroz, tais como o farelo de arroz para suplementação nutricional, comparando com outros nutrientes, bem como a casca de arroz como biomassa celulósica, comparando dois tipos de processos para a produção de etanol, isto é, fermentação e sacarificação realizadas simultânea (SSF) e separadamente (SFS).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obtenção do etanol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, empregando subprodutos do processamento do arroz.

2.2 Específicos

- Avaliar o extrato do farelo de arroz como suplemento nutricional para *K. marxianus* e seu efeito sobre o crescimento e produção de etanol, comparando-o com outros nutrientes comumente utilizados para leveduras;
- Determinar a composição química da casca de arroz;
- Verificar o efeito do pré-tratamento alcalino da casca de arroz sobre a hidrólise enzimática;
- Verificar o efeito do pré-tratamento alcalino da casca de arroz sobre a sua estrutura com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- Verificar a casca de arroz pré-tratada como biomassa celulósica para a produção de etanol por *K. marxianus*, pelo processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF);
- Verificar a casca de arroz pré-tratada como biomassa celulósica para a produção de etanol por *K. marxianus*, pelo processo de sacarificação e fermentação separadas (SFS);
- Comparar os métodos de SSF e SFS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de etanol combustível

Entre os desafios enfrentados pelo mundo moderno estão as questões relacionadas ao aquecimento global, dependência dos combustíveis fósseis, segurança alimentar e energética. O aumento populacional e o crescente desenvolvimento industrial levam a uma maior demanda por energia, mas os combustíveis fósseis convencionais, incluindo o petróleo, são recursos finitos e emitem gases do efeito estufa quando queimados. Fontes renováveis de energia são necessárias para atender às demandas de combustíveis derivados do petróleo (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2017).

Com o crescimento da indústria automobilística houve aumento significativo na procura por combustíveis derivados do petróleo. Segundo Nigam e Singh (2011), o setor de transporte é responsável por 58% do consumo mundial desse combustível, contribuindo com as emissões de 19% de dióxido de carbono e 70% de monóxido de carbono. Estima-se que até 2050 haverá mais de 2 bilhões de veículos no mundo, valor muito superior ao do de 2007, aproximadamente, 806 milhões. Este aumento poderá impactar negativamente o equilíbrio dos ecossistemas, o clima e as reservas de petróleo (BALAT, 2011).

Dentre os biocombustíveis existentes, o etanol é uma alternativa promissora, no que diz respeito à diminuição de impactos ambientais gerados pelos combustíveis fósseis. Sua produção é dividida em dois tipos: primeira geração, etanol obtido a partir de matérias-primas sacarídeas ou amiláceas, e segunda geração (2G), obtido a partir de matérias-primas lignocelulósicas (PEREIRA JUNIOR, 2010).

O etanol combustível, também chamado de álcool etílico é um recurso renovável, constituído por dois átomos de carbono, cinco átomos de hidrogênio e um grupo hidroxila, além disso, é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído (MINAS GERAIS, 2012).

A Figura 1 retrata a evolução da produção mundial de etanol no período de 2003 a 2015. (em bilhões de galões). Em 2017, os Estados Unidos produziram a maior quantidade de etanol combustível no mundo, gerando cerca de 59,88 bilhões de litros. De acordo com o Ministério de Minas e Energia, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, com destaque para os estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais, com uma produção aproximada de 29,2 bilhões de litros em 2018. A produção de etanol no Brasil deve aumentar 4,6% na safra de 2018/2019 (AGÊNCIA BRASIL, 2018).

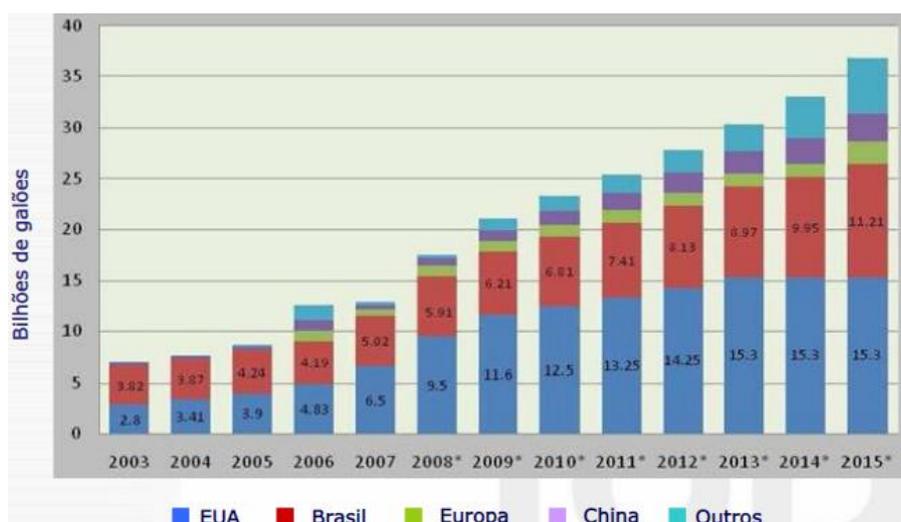


Figura 1 Evolução da produção mundial de etanol (em bilhões de galões).

Fonte: Licht (2016).

Pelo fato de os resíduos agrícolas estarem disponíveis na maior parte do mundo não competindo diretamente com a alimentação e áreas cultiváveis, diversos países têm demonstrado interesse na produção e consumo do etanol de segunda geração. Por essa razão, durante a Conferência das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas de 2016 (COP- 22) foi lançada a Plataforma para o Biofuturo, iniciativa de 20 países liderados pelo Brasil, que buscam ampliar a colaboração internacional e acelerar o processo de desenvolvimento do 2G em escala mundial (BNDES, 2016).

Das seis usinas em todo o mundo, que produzem etanol de segunda geração (em escala comercial duas estão no Brasil: GranBio e Raízen. A Bioflex 1, usina industrial da GranBio localizada em São Miguel dos Campos (Alagoas), foi a primeira fábrica de etanol celulósico no país e do hemisfério sul, com capacidade de produção de 82 milhões de litros do biocombustível por ano. A Raízen decidiu trazer a tecnologia para o estado de São Paulo, o maior produtor nacional de cana-de-açúcar. Fundada em 2014, com um investimento de R\$ 237 milhões, a usina está localizada em Piracicaba -SP e tem uma produção estimada em 40 milhões de litros de etanol por ano (CNPEM, 2017).

Segundo Gallo, Bueno e Schuchardt (2014), as biorefinarias ainda não são uma realidade, mas seguem nos projetos de pesquisas mundiais. Já foram estudados vários processos que utilizam a biomassa como matéria-prima para produção de etanol, porém, ainda não são economicamente viáveis, o que se torna o principal obstáculo para produção de etanol de segunda geração ou 2G. O etanol (2G) poderá ser economicamente viável a partir de 2025, se forem transpostas as atuais barreiras agrícolas, industriais e tecnológicas para a sua produção e se o setor sucroenergético brasileiro superar a estagnação em que se encontra, com capacidade para produzir 10 bilhões de litros (CTBE, 2017).

Segundo Mussato (2016), o petróleo é o maior contribuinte para as emissões do dióxido de carbono, poluindo o ar e acarretando a chuva ácida, que contribui significativamente na mudança climática global. A produção de etanol a partir de biomassa tem potencial de redução de 86% em emissões de gases causadores do efeito estufa.

Com as emissões de gases de efeito estufa provenientes da queima destes combustíveis e o esgotamento progressivo dos mesmos, houve um estímulo dos pesquisadores a buscarem por fontes de energia renováveis, de baixo custo e com menores emissões desses gases (NIGAM; SINGH 2011). Nesse contexto, o uso de combustíveis renováveis (etanol), produzidos através de materiais lignocelulósicos, tem sido considerado uma alternativa.

3.2 Estrutura da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é um complexo rígido composto de diferentes moléculas, que constitui quase a totalidade da parcela estrutural das plantas, ou seja, a maior porcentagem da biomassa dos vegetais. É um substrato de baixo custo, que é considerado resíduo final industrial e agrícola. É composta principalmente por três polímeros: celulose (35-50%), hemicelulose (20-30%), e lignina (10-25%), (Figuras 2 e 3) podendo ser transformada em energia e produtos químicos (KUMAR et al., 2009; MORAIS et al., 2012).

Celulose, hemicelulose e lignina não são uniformemente distribuídas dentro das paredes celulares. A estrutura e a quantidade desses componentes da parede celular vegetal variam de acordo com as condições ambientais, localização geográfica, período de colheita, espécies, tecidos e maturidade da parede celular da planta (FELIX; TILLEY, 2009; BARAKAT; VRIES; ROUAU, 2013). A Tabela 1 resume tipos específicos de biomassa lignocelulósica e sua composição química.

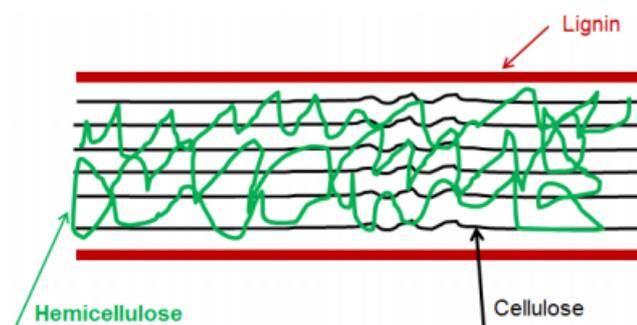


Figura 2 Organização da estrutura lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de Mosier et al. (2005).

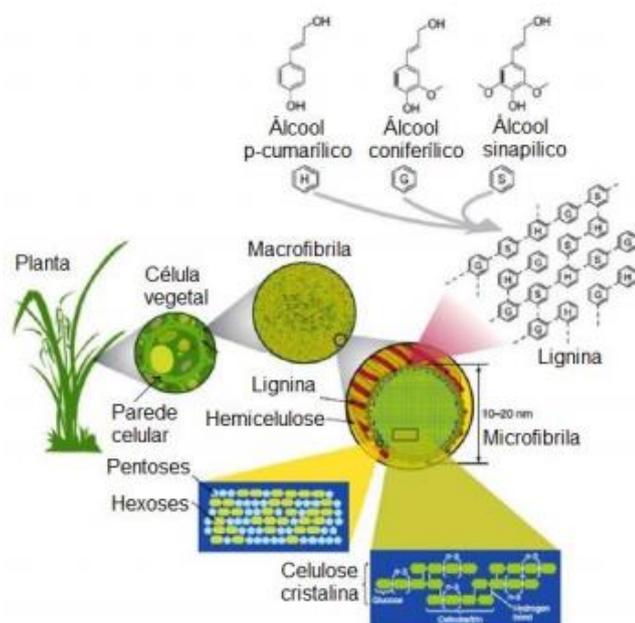


Figura 3 Estrutura da parede celular dos vegetais mostrando o arranjo das microfibrilas de celulose, cadeias de hemicelulose e de lignina, além de monossacarídeos presentes nestas estruturas.

Fonte: Adaptado de Rubin (2008).

Além dos três principais componentes de materiais lignocelulósicos há uma fração menor que compreende vários componentes solúveis em solventes orgânicos (por exemplo, etanol, acetona, diclorometano e benzeno), que também é encontrada na composição da biomassa, que são os extrativos. Estes, não fornecem função estrutural, mas atuam como metabólicos intermediários reserva de energia ou como parte dos mecanismos de defesa contra ataques microbianos (MONCADA; TAMAYO; CARDONA, 2014).

Tabela 1 Composição química de diferentes materiais lignocelulósicos

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Bagaço de cana	38,20	25,00	24,00	Amores et al. (2013)
Bagaço de malte	17,00	28,00	28,00	Mussato, Dragone, e Roberto, (2006)
Casca de arroz	35,00	25,00	20,00	Abbas e Ansumali (2010)
Palha de arroz	43,70	24,00	15,30	Wi et al. (2013)
Palha de trigo	44,20	26,50	22,40	Chen e Liu (2014)
Palha de cevada	38,00	21,30	21,00	Kim et al. (2013)
Palha de milho	34,90	22,60	14,00	Bondesson, Galbe e Zacchi (2013)
Palha de aveia	35,00	26,00	15,00	Menon e Rao (2012); Cherubini (2010)
Farelo de girassol	44,10	24,70	23,20	Camargo et al. (2015)

Fonte: Camargo et al. (2015), com adaptações.

A biomassa lignocelulósica representa recurso de baixo custo, sustentável e que pode ser convertido em combustíveis e produtos químicos em larga escala (MUSSATO, 2016).

Segundo Fengel e Wegener (1989), a biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos natural do mundo. A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais lignocelulósicos são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina. Essa matriz amorfa age como barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos.

3.2.1 Celulose

A celulose constitui 15-30% da matéria seca das paredes celulares primárias e 40% das paredes celulares secundárias (STICKLEN, 2010). É uma sequência linear de unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Especificamente, cada molécula de celulose compreende entre 5000 e 10.000 unidades de glicose (grau de polimerização) (CROCKER; ANDREWS, 2010). As cadeias longas de celulose dispõem-se lado a lado formando microfibrilas com estrutura quase cristalina, cuja integridade é mantida por ligações de hidrogênio entre os numerosos grupos OH-adjacentes (TARZIA, 2010).

Como demonstrado na Figura 4, as estruturas primárias formadas pelas ligações de hidrogênio, feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas, nas quais regiões altamente ordenadas (cristalinas), que se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). A partir desse arranjo inicial, as microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (VIEIRA, 2012; MENG; RAGAUSKAS, 2014).

A celulose pode ser hidrolisada até celobiose pela ação de celulasas, enzimas produzidas por fungos, bactérias, protozoários e moluscos. Quando a ação da celulase é combinada com a celobiase, o produto final da decomposição será a D-glicose (VILELA; BACILA; TASTALDI, 1978).

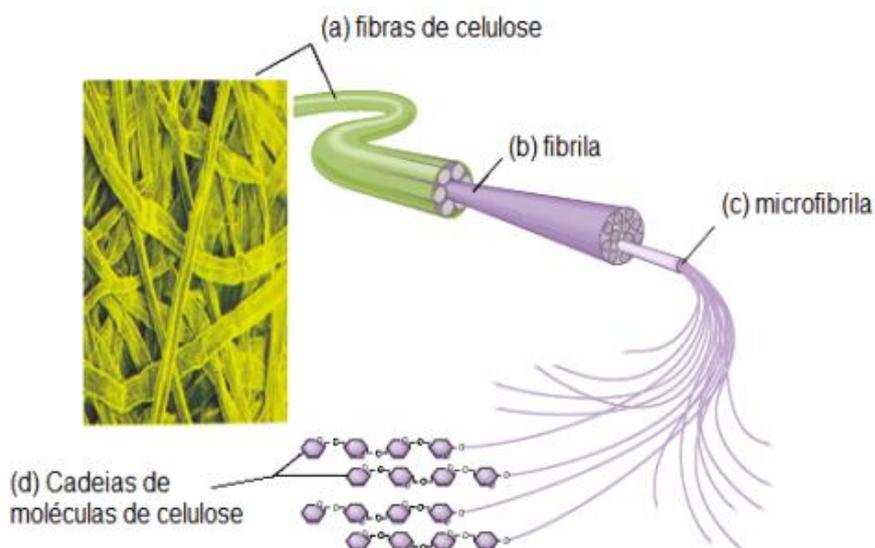


Figura 4 Representação dos níveis morfológicos da celulose: (a) fibras da celulose; (b) macrofibrilas, ou fibrilas que compõem cada fibra; (c) cada macrofibrila é composta de feixes de microfibrilas; (d) microfibrilas, que são compostas de feixes de cadeias de moléculas de celulose.

Fonte: Cruz (2011).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo componente mais abundante da biomassa lignocelulósica (XU, 2010).

O termo hemicelulose se refere a polissacarídeos de massas moleculares relativamente baixas, os quais estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas. Enquanto a celulose, como substância química, contém como unidade fundamental exclusivamente a β -D-glicose, as hemiceluloses são polímeros cuja composição apresenta um ou mais tipos de açúcar, contendo 5 ou 6 átomos de carbono e classificadas de acordo com sua composição (como por exemplo galactoglicomanana, arabinogalactana etc.). Também contêm grupos substituintes acetil e metil (FENGEL; WEGENER, 1989).

Segundo Gírio et al. (2010), as hemiceluloses são uma classe de polímeros de cadeia heterogênea que, em geral, representa 15-35% da biomassa vegetal. Essa fração é formada por pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos (α -D-glicurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônico). Eles se ligam a microfibrilas de celulose por ligação de hidrogênio e lignina por ligações covalentes. Ao contrário de celulose, que difere apenas em cristalinidade e grau de polimerização, as hemiceluloses presentes apresentam variáveis e estrutura amorfa, constituída por cadeias laterais curtas ou longas, de uma cadeia principal que pode ser facilmente degradada por hidrólise enzimática ou tratamentos químicos (XU,

2010). Outros açúcares, tais como α -L-ramnose e α -L-fucose, também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxila podem conter grupos acetil (GÍRIO et al., 2010).

A xilana é um dos principais constituintes da fração hemicelulósica presente na parede de células vegetais, após a celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza. As endo-xilanases formam o principal grupo de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da xilana. Portanto, a sua conversão em açúcares, principalmente a xilose e arabinose, para a subsequente produção de biocombustíveis ou outros bioprodutos, é essencial para que sejam obtidas elevadas eficiências no processo de conversão de biomassa em energia renovável (DODD; CANN, 2009).

3.2.3 Lignina

A lignina é o terceiro polímero natural mais abundante na natureza, ficando atrás somente da celulose e da hemicelulose, estando presente em todos os materiais vegetais. Estima-se que a quantidade de lignina no mundo é de 300 toneladas com taxa de produção biosintética de 20 toneladas por ano, o que torna a lignina importante matéria-prima biológica para a produção de bioprodutos e biocombustíveis. Constitui de 15 a 20% da matéria-seca da biomassa vegetal, sendo responsável pela rigidez das matérias lignocelulósicas, concedendo resistência à degradação biológica e química (ARGYROPOULOS; MENACHEM, 1998; BALAT, 2011).

É o principal composto responsável pela recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Durante o processo de lignificação, os monolignóis produzem polímero tridimensional e amorfo, através de ligações β -O-4, α -O-4, β -5, β -1, 5-5, não possuindo unidades regulares e repetições ordenadas como encontrado em outros polímeros (HERGET, 1989; BURANOV; MAZZA, 2008).

A estrutura heterogênea e irregular da lignina proporciona rigidez e resistência física à parede celular de biomassa, atuando como material de ligação entre as células que dá resistência significativa ao impacto, compressão, elasticidade e ao ataque microbiano. Devido à sua natureza, a lignina é geralmente insolúvel na maioria dos solventes, a não ser que sofra degradação por meio de tratamentos químicos ou físicos (GALBE; ZACHI, 2007).

Segundo Buranov e Mazza (2008), os três principais grupos de ligninas são: ligninas de coníferas (gimnospermas), ligninas de folhosas (angiospermas) e ligninas de gramíneas (não lenhosas ou de culturas herbáceas).

A aplicação da lignina não se restringe somente na obtenção de combustível para a energia térmica, pode ser utilizada como matéria-prima para a indústria farmacêutica e

química, principalmente para a produção de cosméticos, polímeros, resinas e colas (STEWART, 2008).

3.3 Obtenção de etanol através de matérias-primas lignocelulósicas

O etanol é combustível alternativo para reduzir os problemas energéticos e ambientais no mundo em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição por ele causada. O uso de combustível de etanol no Brasil aumentou em, aproximadamente, 13,4 bilhões de litros, em 2014, para cerca de 24,44 bilhões de litros em 2018, dados divulgados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2018).

A produção de etanol a partir de biomassa tornou-se alternativa sustentável e economicamente viável para substituir a gasolina, no entanto, a produção de etanol a partir de culturas alimentares, como cereais, beterraba, mandioca, milho e outros (biocombustíveis de primeira geração (1G)) resultaram em concorrência direta com oferta de alimentos, tornando assim, o etanol de segunda geração (2G) uma alternativa interessante a ser explorada (BINOD et al., 2010; McINTOSH; VANCOV, 2011).

O esquema geral de produção de etanol de segunda geração é apresentado na Figura 5.



Figura 5 Fluxograma da produção de etanol de segunda geração.

Fonte: Adaptado de Rabelo (2010).

O processo para a obtenção de etanol de segunda geração, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolve quatro etapas básicas: pré-tratamento, hidrólise

enzimática ou ácida e fermentação e, em seguida, a separação do produto pelo processo de destilação (GÓMEZ et al., 2010; JOSHI; SHUKLA, A.; SHUKLA, 2011).

Os processos de hidrólise da celulose podem ser químicos ou enzimáticos. No entanto, a hidrólise química (ácida) da celulose vem sendo abandonada, visto que apresenta o inconveniente de requerer o emprego de elevadas temperatura e pressão, levando à destruição de parte dos carboidratos e a obtenção de produtos de degradação tóxicos aos microrganismos. As enzimas do complexo celulolítico são classificadas em três grupos: (i) Endoglucanases, que clivam ligações internas da fibra celulósica; (ii) Exoglucanases, que atuam na região externa da celulose; (iii) β -glucosidases, que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (CAMARGO, 2007).

As leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolan tannophilus* são os microrganismos mais promissores capazes de fermentarem não só as hexoses (açúcares compostos por 6 carbonos), mas também as pentoses (açúcares compostos por 5 carbonos) (CHANDEL et al., 2007).

As principais dificuldades tecnológicas encontradas para a produção do etanol celulósico em escala industrial são: desenvolvimento de sistemas de pré-tratamento adequados para diferentes processos e tipos de materiais lignocelulósicos; processos de detoxificação dos produtos da hidrólise; desenvolvimento de enzimas com maior atividade enzimática e baixo custo; integração dos processos de hidrólise e fermentação; desenvolvimento de novas cepas de leveduras capazes de fermentar tanto açúcares C6 como C5; (LORA; CORAL; ROCHA, 2008).

3.3.1 Pré-tratamento do material lignocelulósico

Segundo Nunes et al.(2013), a etapa de pré-tratamento da biomassa tem por objetivo facilitar o acesso das enzimas que melhoram a digestibilidade da celulose. A celulose tem estrutura cristalina e ordenada, apresenta-se associada às hemiceluloses e encontram-se envoltas em lignina que atua como barreira física, dificultando a hidrólise (LEE, 2005). Por esse motivo, torna-se necessária a etapa de pré-tratamento para quebrar a estrutura cristalina da celulose, remover ou diminuir o teor de lignina e facilitar a posterior hidrólise enzimática por celulasas para enfim obter uma eficiente conversão dos açúcares a etanol (REYES; PERALTA-ZAMORA; DURÁN, 1997; SILVA, 2009; OGEDA; PETRI, 2010) (Figura 6).

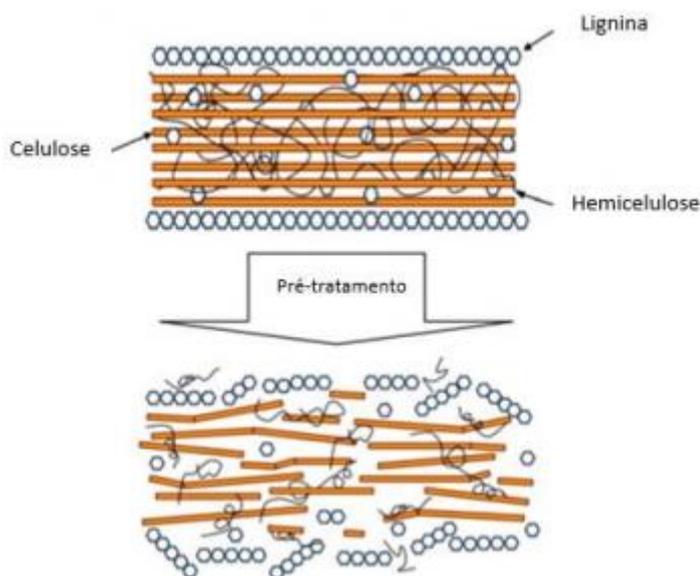


Figura 6 Pré-tratamento esquemático do material lignocelulósico.

Fonte: Mood et al. (2013), com adaptações.

Os métodos de pré-tratamento são divididos em diferentes categorias, tais como: métodos mecânicos, químicos, físico-químicos e biológicos ou várias combinações destes. (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; SUN; CHENG, 2002; YU et al., 2009; YANG; SHEIH; FANG, 2012).

Várias opções de pré-tratamento foram relatadas para fracionar, solubilizar, hidrolisar e separar os componentes celulose, hemicelulose e lignina. Alguns deles incluem moagem, irradiação, micro-ondas, explosão de vapor, explosão de fibra de amônia (AFEX), CO₂ supercrítico e sua explosão, SO₂, hidrólise alcalina, pré-tratamento de água quente líquida, processos organosolv, oxidação úmida, ozonólise, hidrólise de ácido diluído e concentrado e pré-tratamentos biológicos. (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). O objetivo comum desses métodos é reduzir o tamanho da biomassa e abrir sua estrutura física. Cada um desses métodos possui vantagens e desvantagens diferentes.

Por meio de pesquisa e desenvolvimento, o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica tem grande potencial para melhorar a eficiência e reduzir o custo de produção (MOSIER et al., 2005). A integração de vários métodos de pré-tratamento de biomassa com outros processos como sacarificação enzimática, destoxificação, fermentação dos hidrolisados e recuperação de produtos podem reduzir significativamente o custo total do uso de materiais lignocelulósicos para fins práticos (SAHA, 2005).

3.3.1.1 Métodos físicos

Segundo Mshandete et al. (2006), os principais pré-tratamentos físicos empregados em materiais lignocelulósicos destinados à produção de biocombustíveis são: moagem, irradiação, cisalhamento, esmagamento e pirólise, os quais têm sido utilizados para melhorar a acessibilidade a polímeros hidrolisáveis dentro do material lignocelulósico (AMIN et al., 2017). Entretanto, na escolha do método é necessário avaliar o custo e a finalidade a que se destinará o material lignocelulósico, no caso de produção de biogás a moagem é a mais utilizada por diversos pesquisadores (MSHANDETE, et al., 2006).

O pré-tratamento mecânico de material lignocelulósico tem se destacado e seus objetivos são diminuir o tamanho e a cristalinidade da partícula; reduzir o grau de polimerização e aumentar a superfície específica disponível ou superfície acessível; aumentar a capacidade de adsorção acelerando o processo de hidrólise enzimática transformando o material lignocelulósico em biocombustíveis. Através da moagem, o material lignocelulósico pode ser reduzido a dimensões entre 0,2 e 2 mm (SUN; CHENG, 2002; BARAKAT et al., 2014).

De acordo com Cheng e Timilsinav (2011), a moagem também gera nova área de superfície, melhora as propriedades de fluxo e aumenta a densidade e a porosidade. Na moagem mecânica, diferentes moinhos são usados para quebrar o material lignocelulósico e reduzir a cristalinidade do material. Moinhos comumente usados incluem moinhos de atrito, moinhos de bolas, moinhos centrífugos, moinhos coloidais, moinhos de martelos, extrusores, moinhos de facas, moinhos de pinos e moinhos vibratórios.

Outro método sugerido é irradiação de celulose por raios gama, que quebra as ligações β -1,4 - Glicosídicas, permitindo assim, maior área de superfície (TAKÁCS et al., 2010). Porém, esse método é demasiado caro para ser usado em grande escala (GALBE; ZACCHI, 2007).

O processo de pirólise envolve o aquecimento da biomassa em altas temperaturas (aproximadamente 500 °C), o que implica a ruptura de ligações carbono-carbono e a formação de ligações carbono-oxigênio. Mais apropriadamente, a pirólise é um processo de oxidação-redução na qual uma parte da biomassa é reduzida a carbono, entretanto, a outra parte, é oxidada e hidrolisada dando origem a fenóis, carboidratos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. Esses produtos primários se combinam entre si para dar moléculas mais complexas tais como ésteres, produtos poliméricos (DAS; SARMAH, 2015; ROCHA; PÉREZ; CORTEZ, 2004).

3.3.1.2 Métodos químicos

Os pré-tratamentos químicos distinguem-se pelos compostos orgânicos ou inorgânicos, assim como os mecanismos responsáveis pelas modificações estruturais e químicas da parede celular. Podem ser utilizados ácidos bases ou solventes orgânicos. (BRODEUR et al., 2011), bem como agentes oxidantes e redutores (CHANG; NAGWANI; HOLTZAPPLE, 1998).

Diferentes tipos de ácidos são utilizados em processos de pré-tratamento da biomassa, como: ácido sulfúrico diluído, ácido nítrico diluído, ácido fosfórico diluído e ácido peracético. Uma das principais vantagens desse tipo de tratamento é a eficácia com a maioria dos materiais lignocelulósicos. O custo é superior aos tratamentos físico-químicos, devido à natureza corrosiva do reagente e à manutenção dos reatores que é cara (GUPTA, 2009).

Os processos de hidrólise ácida de material lignocelulósico se dividem em dois grupos principais: processos que utilizam ácidos concentrados e processos que utilizam ácidos diluídos. Nessas condições, podem-se empregar diferentes ácidos incluindo o ácido sulfuroso, sulfúrico, fórmico, clorídrico, fluorídrico e nítrico, entre outros (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002).

Para separar a hemicelulose do material lignocelulósico, o pré-tratamento com ácido diluído é um dos processos mais utilizados. Nesse pré-tratamento, o ácido solubiliza a porção hemicelulósica, com um pequeno impacto na degradação da lignina, tornando a celulose mais susceptível à ação enzimática (BINOD et al., 2010).

O processo de hidrólise com ácido diluído consiste em aquecer uma solução de ácido e biomassa no reator. São utilizadas temperaturas que variam de 140-200 °C, em que cerca de 80-90% das hemiceluloses são recuperadas majoritariamente na forma de monômeros e 30-50% de lignina é passível de extração alcalina. A hidrólise com ácido diluído exige a utilização da matéria-prima com baixo teor de cinzas e impurezas, sendo necessária a lavagem da biomassa antes do pré-tratamento (CARDOSO et al., 2012).

Daginino et al. (2013) otimizaram pré-tratamento de cascas de arroz com ácido diluído. Foi utilizado Planejamento Composto Central (“CCD - Central Composite Design”) para obter a equação das regressões em função das variáveis: concentração do ácido e tempo de aquecimento. As condições ótimas foram obtidas pela função de desejabilidade, como uma estratégia para obtenção do melhor material para a produção de etanol por fermentação para minimizar a degradação de açúcares. A melhor condição foi estabelecida quando maximizou glucanas no sólido e a xilose no líquido (0,3% (w / v) de ácido sulfúrico; 33 min.). As cascas de arroz foram pré-tratadas enzimaticamente. O desempenho da hidrólise enzimática da casca de arroz foi cerca de 50% (25% de açúcares totais presentes),

ao longo de um período de 48 horas de reação, e a eficiência de conversão dos açúcares dissolvidos em bioetanol foi de 84%.

Yong et al. (2011) estudaram os efeitos de diferentes ácidos selecionados e álcalis sobre o pré-tratamento da casca de arroz para torná-los eficientes na fermentação. Em ordem decrescente de produção: ácido nítrico, ácido acético, hidróxido de sódio, água, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, hidróxido de cálcio e ácido clorídrico. Os melhores desempenhos encontrados na presença desses três principais compostos. De acordo com os autores, o emprego de ácido nítrico, ácido acético e hidróxido de sódio resultaram em 4,2, 0,7 e 0,4 mg/g de açúcares redutores provenientes das cascas de arroz, respectivamente, depois de oito horas de pré-tratamento a 100 °C. Portanto, ácido nítrico, ácido acético e hidróxido de sódio podem ser reagentes adequados para o pré-tratamento das cascas de arroz antes da fermentação, em comparação com os outros reagentes estudados.

Processos de tratamento alcalinos são geralmente muito eficazes no pré-tratamento de resíduos agrícolas, como a palha de trigo e culturas herbáceas (CHEN et al., 2007).

O pré-tratamento alcalino envolve a aplicação alcalina como NaOH ou KOH para remover lignina e uma parte da hemicelulose. O pré-tratamento alcalino pode resultar em um considerável aumento nos rendimentos de sacarificação, podendo ser realizado em baixas temperaturas, mas com um tempo relativamente longo e alta concentração da base. Em comparação com o ácido, o tratamento alcalino parece ser o mais eficaz método para quebrar as ligações éster entre celulose, hemicelulose e lignina, evitando a fragmentação da hemicelulose (GASPAR; KALMAN; RECZEY, 2007).

Os líquidos iônicos são uma classe de solventes (ROGER; SEDDON, 2002), formados por um cátion orgânico e um ânion inorgânico, com temperatura do ponto de fusão inferior a 100 °C (DUPONT, 2004; TADESSE; LUQUE, 2011). Têm sido utilizados como pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, pois possuem capacidade de desestruturar a celulose e remover parcialmente a hemicelulose e a lignina, permitindo uma maior acessibilidade à celulose (SWATLOSKI et al., 2002).

Lynam et al. (2012) estudaram o pré-tratamento de cascas de arroz com três diferentes líquidos iônicos (L.I) como solvente da biomassa lignocelulósica: (acetato de 1-etil-3-metilimidazólio acetato ([EMIM] Ac), cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio, (HMIM Cl), e 1-alil-3-metilimidazólio cloreto de (AMIM Cl). Os componentes lignocelulósicos puderam ser precipitados a partir do LI utilizado com água e etanol. Verificaram que EMIM Ac removeu completamente a lignina da casca de arroz (a 110 °C durante 8 horas). HMIM Cl (8h a 110 °C) precipitou, aproximadamente, 20% da celulose na amostra das cascas de arroz utilizando água como co-solvente, enquanto que mais de 60% da hemicelulose pode ser precipitada com etanol.

Zhang et al. (2012) utilizaram em seus experimentos pré-tratamento alcalino para palha de arroz com 2% de NaOH, 20% de sólidos, a 85 °C durante 1 hora e constataram que diminuiu o teor de lignina em 36%. O pré-tratamento alcalino geralmente utiliza temperaturas mais baixas, pressões e tempos menores, quando comparados com outros processos de pré-tratamento (McMILLAN, 1994).

Embora o pré-tratamento alcalino tenha sido estudado em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica incluindo, palha de milho, palha de trigo, palha de arroz e arroz em casca, a maioria das pesquisas sobre o pré-tratamento alcalino tem-se centrado na otimização dos parâmetros do processo para melhorar a digestibilidade do substrato (McLINTOSH; VANCOV, 2011).

Saha e Cotta (2008) estudaram o pré-tratamento da casca de arroz ($35,6 \pm 0,1\%$ de celulose e $12,0 \pm 0,7\%$ de hemicelulose) com hidróxido de cálcio. O rendimento máximo de açúcares foi de 154 ± 1 mg/g de casca (rendimento de 32%), utilizando 100 mg Ca(OH)₂/g biomassa seca a 121 °C por 1 h e efetuando a sacarificação enzimática com mistura de enzimas comerciais (celulase, β -glicosidase hemicelulase). O pré-tratamento com hidróxido de cálcio não gerou nenhum furfural e 5-hidroximetilfurfural detectável no hidrolisado. A concentração de álcool etílico produzido, utilizando uma linhagem de *Escherichia coli* recombinante a pH 6,5 e 35°C em 19 h, foi $9,8 \pm 0,5$ g/L, com um rendimento de 0,49 g/g de açúcares livres. A concentração do álcool etílico foi de $11,0 \pm 1,0$ g/L no caso da sacarificação simultânea a fermentação utilizando a mesma linhagem de bactéria.

A eficácia do pré-tratamento alcalino depende da composição química e física do substrato, bem como as condições de tratamento. Em geral, o pré-tratamento alcalino é mais eficaz em madeira, culturas arvenses (culturas cujo ciclo não excede um ano), e resíduos agrícolas, que têm um teor de lignina inferior, do que sobre substratos tais como madeira macia (coníferas), que contêm quantidades elevadas de lignina (CHEN et al., 2013).

Nikzad et al. (2013) realizaram em seu experimento três métodos diferentes de pré-tratamento para a casca de arroz, com a finalidade de determinar como cada método afeta a composição da casca, a digestibilidade, hidrólise enzimática e a produção de etanol. Diluíram H₂SO₄ (1%v/v, 121 °C, 30 min), NaOH (3% p/v, 121 °C, 30 min) e utilizaram tratamento térmico (121 °C, 30 min). O melhor resultado observado foi o tratamento com a casca de arroz com solução de NaOH a 3% p/v, pois aumentou substancialmente a remoção de lignina, digestibilidade enzimática da celulose, acessibilidade da celulose além de produção de açúcar fermentado. A concentração mais elevada de glicose, rendimento da glicose e a produção de etanol foram 14,54 g/L, 6,22 g/L, sendo 5,44, 3,77 e 6,15 vezes mais elevadas do que no controle (amostras não tratadas). Além disso, nas amostras que utilizaram NaOH foram observadas mudanças físicas significativas na casca de arroz.

Segundo Sun e Cheng (2002), o ozônio é um agente oxidante eficiente para a desestruturação da parede celular vegetal. É altamente reativo, em relação a compostos que incorporam ligações duplas conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons. Portanto, a lignina é o material mais provável de ser oxidado na ozonização de materiais lignocelulósicos, devido ao seu alto teor de ligações duplas entre carbonos. A principal vantagem da utilização de ozônio é que compostos inibidores da fermentação alcoólica, tais como, compostos furânicos, vanilina, siringaldeído, ácido cumárico e ácido ferúlico podem não ser gerados durante o processo de ozonólise (KAUR et al., 2012; TRAVAINI et al., 2013; EQRA; AJABSHIRCHI; SARSHAR, 2014).

Miura et al. (2012) realizaram a ozonólise em cedro japonês (*Japonica do Cryptomeria*) para melhorar a produção de açúcar em sacarificação enzimática. Quando o teor de umidade atingiu mais do que 40%, o consumo de ozônio diminuiu, resultando em menor deslignificação. O tratamento com ozônio removeu pequenas quantidades de lignina e polissacarídeos.

3.3.1.3 Métodos biológicos

Segundo Sindhu, Binod e Pandey (2015), no pré-tratamento biológico são utilizados microrganismos (fungos e bactérias) ou enzimas para deslignificar e reduzir o grau de polimerização da celulose e hemicelulose. Esse tratamento requer baixo valor energético. Avanços recentes na biologia molecular ampliaram o conhecimento sobre os sistemas ligninolíticos existentes, incluindo a descoberta de novas enzimas e o desenvolvimento de sistemas com potencial para o pré-tratamento efetivo e a plena utilização da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias. Apesar de ser efetivo, limpo e sem produção de metabólitos indesejáveis, o processo é excessivamente lento para ser aplicado em escala industrial. Outra desvantagem é que esses microrganismos não são seletivos, portanto, degradam celulose, hemicelulose e lignina.

Os fungos de podridão branca são microrganismos utilizados para o pré-tratamento biológico, pois possuem capacidade de degradar e modificar a lignina (BARRETO; MENEZES, 2015). Taniguschi et al. (2005) estudaram 19 fungos da podridão branca, e os resultados encontrados mostraram que 35% da celulose da palha de trigo foi convertida em açúcar através de hidrólise enzimática depois de 60 dias de pré-tratamento.

O pré-tratamento com *Coriolus versicolor* para hidrólise enzimática de resíduos de bambu foi estudado, e alcançou uma taxa de sacarificação de 37% de (ZHANG; XU; WANG, 2007).

Embora grande número de tecnologias já tenham sido propostas para o pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, a escolha da melhor tecnologia não é uma

tarefa fácil e depende muito do objetivo do pré-tratamento (produtos desejados), o tipo de biomassa que vai ser utilizada e a sua composição. Para o desenvolvimento de uma tecnologia eficaz, economicamente viável e sustentável de pré-tratamento, a compreensão da estrutura da biomassa, a seleção dos componentes, o método mais adequado e operações sob condições ideais são necessários (MUSSATO, 2016).

3.3.2 Sacarificação simultânea à fermentação

Na sacarificação simultânea à fermentação (SSF), a hidrólise enzimática e a fermentação das hexoses (açúcares C6) ocorrem na mesma etapa, enquanto a hidrólise da hemicelulose ocorre em etapa diferente, bem como a produção das celulases (TAHERZADEH; KARIMI, 2007; DAHNUM et al., 2015).

Segundo Vásquez et al.(2007), o processo SSF apresenta algumas vantagens em relação à sacarificação e fermentação separadas (SFS). Dentre elas: redução da inibição das celulases pelos seus produtos de hidrólise; menor complexidade e custo do processo, pois reduz o número de reatores; minimização dos riscos de contaminação; rendimentos de hidrólise, uma vez que os equilíbrios das reações enzimáticas são deslocados no sentido de formação de mais produtos, visto que a glicose é concomitantemente consumida.

Dentre as principais vantagens do processo SSF para produção de etanol a partir de biomassas, está a sua capacidade de converter rapidamente os açúcares em etanol, assim que eles são formados, evitando seu acúmulo no meio. Tendo em vista que os açúcares são inibitórios para o processo de hidrólise, existe o potencial para se alcançar taxas mais elevadas e maiores rendimentos, em comparação ao SFS (WYMAN; SPINDLER; GROHMANN, 1992).

A realização do processo de SSF requer estudos avançados, principalmente no que diz respeito a leveduras termotolerantes capazes de suportar temperaturas próximas a 40 °C, faixa otimizada para a atuação das celulases (BALLESTEROS et al., 2004). Segundo Suryawati et al. (2008), o uso de temperaturas abaixo da atividade ótima da enzima aumenta o tempo de SSF e a quantidade de enzimas utilizadas. Em temperaturas acima de 40 °C a taxa de crescimento e produção de etanol através das leveduras diminui significativamente (SREE et al., 2000).

Tomás-Pejó et al.(2009) estudaram o efeito de celulases comerciais (Celluclast 1,5 L FG) em *K. marxianus* CECT 10875 no crescimento celular e produção de etanol no processo SSF. Foram realizados testes preliminares em meio contendo glicose (50 g/L), a fermentação mostrou que quantidade elevada de enzima (2,5-3,5 FPU/mL) pode causar efeito negativo na taxa de crescimento e no número de células viáveis de *K. marxianus*. No entanto, a produção de etanol não foi afetada e cerca de 86% do valor teórico (22 g/L) foi

alcançado em todos os casos independente da dosagem de enzimas. Em trabalhos de SSF, a viabilidade das células foi sempre afetada pela carga de enzimática. No entanto, pequenas diferenças observadas na viabilidade celular durante os processos de fermentação da glicose com as concentrações detectadas dos aditivos não justificaram o efeito negativo observado no experimento em SSF.

Ballesteros et al. (2004) utilizaram o processo SSF para a produção de etanol a partir de diferentes madeiras lignocelulósicas (madeira *Populus nigra* e *Eucalyptus globus*, palha de trigo, bagaço de sorgo, e resíduo de mostarda *Brassica carinata*), pré-tratadas com explosão a vapor usando cepa de levedura *K. marxianus* CECT 10875. Os experimentos de SSF foram realizados a 42 °C, com concentração de 10% (m/v) de substrato, utilizando celulase comercial (Cellucst 1,5L) na concentração de 15 FPU/g de material. Os resultados mostraram que a eficiência (baseada no rendimento teórico a partir da glicose disponível no material pré-tratado) da SSF variou de 50 a 72%, dependendo do substrato empregado, com tempo de fermentação entre 72 e 82 horas.

3.3.3 Sacarificação e fermentação separadas

A principal vantagem do processo em separado, (SFS) é que as temperaturas da hidrólise enzimática e fermentação podem ser otimizadas. Geralmente, a temperatura ótima para ação das enzimas está entre 45 e 50°C e a temperatura ótima para grande parte das leveduras utilizadas na produção de etanol está entre 30 e 37°C (SANTOS et al., 2010).

O problema nesta operação é que a glicose e a celobiose permanecem no mesmo meio que as enzimas. Dessa forma, à medida que ocorre o aumento da concentração da glicose e celobiose, estas podem inibir suas respectivas enzimas catalíticas. As celulases são inibidas pela celobiose, enquanto a β -glicosidase é inibida pela glicose, gerando rendimentos baixos em função da hidrólise incompleta da celulose (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Outra desvantagem do SFS é a possibilidade de contaminação. Como a etapa de hidrólise requer tempos muito longos, o hidrolisado rico em açúcares torna-se uma fonte disponível para fermentações secundárias (WINGREN et al., 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

No processo SFS, o material lignocelulósico obtido após o pré-tratamento é submetido à hidrólise enzimática por um período que varia de 48 a 96 h. Após a sacarificação da celulose, o hidrolisado resultante é fermentado e convertido a etanol em um reator separado (SANCHEZ; CARDONA, 2008).

3.4 *Kluyveromices marxianus*

Segundo Kurtzman; Fell e Boekhout (2011), a levedura *Kluyveromices marxianus* pertence a subclasse dos Saccharomycotina, que compreende as leveduras unicelulares e elípticas.

A *K. marxianus* possui características que as tornam atrativas em aplicações em escalas industriais como ser termotolerante, ser capaz de produzir etanol em altas temperaturas com rendimentos que chegam próximos ao teórico (considerando-se o rendimento teórico de etanol 0,51g/g a partir de glicose) e por possuir a capacidade de assimilar uma grande variedade de açúcares (SILVEIRA et al., 2005; FONSECA et al., 2008; LANE; MORRISEY, 2010; LANE et al., 2011). Outra vantagem é que a xilose liberada no pré-tratamento pode ser consumida sem a repressão por altas concentrações de glicose, uma vez que essa é liberada do complexo celulolítico de forma gradual. Genes de enzimas do complexo lignocelulolítico, tais como endo- β -1,4- glucanase, celobiohidrolase e β -glucosidase foram clonados e eficientemente expressos em linhagens de *K. marxianus* (HONG et al., 2007).

K. marxianus é uma espécie de levedura promissora para a produção de etanol de segunda geração devido à sua extrema termotolerância, pois cresce em temperaturas que variam de 30 a 52 °C, tornando-se atraente à sacarificação e fermentação simultâneas (FONSECA et al., 2008; FONSECA; CARVALHO; GOMBERT, 2013). Possui, também, a vantagem de reduzir a inibição das celulasas por glicose, uma vez que este açúcar é consumido durante a fermentação.

3.5 Histórico e produtividade do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta anual, da família das gramíneas e apresenta diferentes variedades e devem ser cultivadas em temperaturas amenas. É excelente fonte de carboidratos, rico em proteínas, vitaminas, sais minerais e fibras, sendo que quase a totalidade de carboidratos é representada pelo amido (amilose e amilopectina) (CARVALHO; BASSINELLO, 2006).

A visão comumente aceita é que o arroz tem origem provável no Sudoeste da Ásia, que inclui Índia, Indochina e China. Nesse continente, localizam-se aproximadamente 58% da população do planeta, que consomem 90% da produção mundial de arroz, que é a base da alimentação (BASSINELLO; CASTRO, 2004; FAO, 2018).

Segundo Bassinello e Castro (2004), no Brasil o arroz teve seu plantio no início do período de colonização, por volta de 1540. Sua produção se espalhou pelo litoral brasileiro, principalmente no Nordeste. Devido ao clima mais apropriado para a cultura, em 1820, o cereal começou a ser cultivado no Rio Grande do Sul, mas somente em 1904 surgiram as primeiras lavouras empresariais, que utilizaram o sistema de irrigação.

O grão de arroz é constituído de casca, película, germe e endosperma. A película refere-se ao conjunto de camadas de células localizadas entre a casca e o endosperma (pelicarpo e aleurona). Durante seu beneficiamento a película e o germe são retirados integralmente através do polimento do grão, dando origem ao farelo, onde as vitaminas e sais minerais estão concentrados. O endosperma é o órgão de reserva nutricional da semente, contém basicamente amido e é o produto final consumido pela população (BASSINELLO; CASTRO, 2004).

O Brasil é um dos maiores consumidores *per capita* de arroz no mundo, cerca de 50 kg/habitante/ano do produto beneficiado. Em termos comparativos, na Europa, o consumo ocorre, em média, duas vezes na semana e gira em torno de 20 kg/habitante/ano. Juntamente com o feijão, constitui o principal alimento do povo brasileiro, sendo consumido principalmente na forma de grãos inteiros. Dada a sua relevância no abastecimento interno e na segurança alimentar da população, o arroz sempre teve grande importância na formulação e execução das políticas agrícolas e de abastecimento. É um dos produtos a que o governo brasileiro tem dado muita atenção, de modo que, quando ocorrem fatores conjunturais dentro do raio de ação dos instrumentos de apoio, o poder público tem estado presente (CONAB, 2015).

Segundo os dados divulgados pela FAO (2018), a produção mundial de arroz em 2017 foi de aproximadamente em 756,5 milhões de toneladas de arroz em casca (502,2 milhões de toneladas de arroz beneficiado). Para tanto, foram plantados 161,01 milhões de hectares, sendo esperada uma produtividade média de 4.387 kg/ha. Durante o transcorrer dos próximos dez anos, a produção de arroz deve aumentar a uma taxa média anual de 1,6%, principalmente como resultado de melhorias na produtividade (AGROLINK, 2019).

3.5.1 Casca de arroz

A casca de arroz é um resíduo agrícola lignocelulósico disponível em abundância em países produtores de arroz. A casca de arroz corresponde entre 0,2 e 0,33 kg por kg de arroz colhido, tem lenta biodegradação, baixa densidade e peso específico. É composta por quatro camadas estruturais, fibrosas, esponjosas ou celulares: epiderme externa coberta por espessa cutícula de células silificadas; esclerênquima ou fibra hipoderme, com parede

lignificada; célula parênquima esponjosa; epiderme interna (BAKAR; PUTRAJAYAC; ABDULAZIZ; 2010; LIM et al., 2012).

A casca de arroz é um material com baixa composição de proteínas e pouca digestibilidade. É composto por, aproximadamente, 35-33,43% celulose, 23,0-22,0% de hemicelulose e 18,25-17,2% de lignina. O percentual restante é constituído principalmente por cinzas e sílica 17,45-17,3% (ABBAS; ANSUMALLI, 2010; BAKAR; PUTRAJAYAC; ABDULAZIZ, 2010). Isso representa uma atraente possibilidade para a utilização da casca de arroz para conversão em bioetanol (SOOKKUMNERD; ITO; KITO, 2005).

A casca de arroz como matéria-prima integral tem aplicação em diversos produtos tais como: adesivos, componente da alimentação animal para prevenção de formação de distúrbios e gases estomacais, adsorvente de materiais tóxicos, na produção de tijolos na fase de queima e para construção civil (JUNGINGER; GOH; FAAIJ, 2010). Quando a casca de arroz é carbonizada, pode ser usada como substrato na propagação de plantas florestais, frutíferas, olerícolas e ornamentais.

As variações nas composições relatadas da casca de arroz dependem da safra, ou seja, da variedade plantada, do clima e das condições do solo, além da localização geográfica. É importante conhecer a composição da biomassa, pois permite a estimativa do potencial de produção de etanol e seu rendimento. Apenas celulose e hemicelulose são responsáveis pela conversão em etanol, enquanto lignina e cinzas podem ser convertidas em energia por combustão ou para outros produtos secundários (ABBAS; ANSUMALLI, 2010).

Porém, o desconhecimento da importância da utilização da casca de arroz acarreta seu baixo aproveitamento (CARVALHO; VIEIRA, 1999). Por isso, é necessária a realização de pesquisas em relação ao reaproveitamento desse resíduo na produção do etanol de segunda geração, utilizando microrganismos fermentadores e capazes de despolimerizar açúcares presentes nos resíduos alternativos.

Moon, Jeong e Kim (2010) estudaram a viabilidade da produção de etanol a partir de casca de arroz, por meio de técnicas de ácido concentrado, impregnação e fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Um dos fatores mais importantes no tratamento da biomassa foi a concentração de ácido para a determinação da condição ótima necessária para fornecer o rendimento máximo de açúcares fermentescíveis e a menor quantidade de inibidores. Sob condições ótimas de pré-tratamento ácido (2:1 de razão de ácido para biomassa, 5-h de impregnação, e 2-h de hidrólise), os rendimentos de conversão de glucana e xilana foram 92 e 95%, respectivamente. Extrema acidez e maior tempo de retenção sob a alta temperatura foram os fatores que mais influenciam a degradação da glicose e xilose. Embora o hidrolisado da casca de arroz fosse suficiente para a produção de etanol, a presença de inibidores no hidrolisado diminuiu a taxa de crescimento específico, crescimento de células

de *S. cerevisiae* e o rendimento de etanol. Esses resultados confirmam que a casca do arroz é uma alternativa promissora de biomassa para a produção de etanol por meio da técnica de impregnação e hidrólise ácida.

Cunha-Pereira et al. (2011) estudaram a possibilidade de utilizar hidrolisado da casca de arroz como substrato para a produção de etanol e xilitol por *S. cerevisiae* ICV D254 e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A (uma cepa de levedura isolada de Mata Atlântica), o *S. arborariae* provou ser um conversor eficiente de hexoses e pentoses em etanol. Co-culturas destas leveduras provaram ser eficientes para a produção de etanol, com rendimentos elevados de 0,77 g/L/h e 0,62 g/L/h em meio sintético e hidrolisado de casca de arroz, respectivamente. Mais estudos foram realizados a fim de otimizar culturas de *S. arborariae*, isoladamente ou em co-culturas com outros microorganismos etanologênicos, especialmente em hidrolisados lignocelulósicos.

A utilização das cascas de arroz tem sido estudada como matéria prima para a produção de etanol de segunda geração, seja através de hidrólise em separado seguida de fermentação (SFS) ou sacarificação simultânea à fermentação (SSF) (SAHA et al., 2005), no entanto ainda não há registros na literatura sobre o emprego de cascas de arroz na SSF com a levedura termotolerante *K. marxianus*.

3.5.2 Farelo de arroz

O farelo de arroz consiste de algumas camadas externas do arroz integral que são retiradas para a produção do arroz polido (HOFFPAUER, 2005). Corresponde de 8% a 10% do grão em casca. Associado às características de qualidade, outros fatores que colocam o farelo como matéria-prima com amplo potencial de utilização é a sua abundância e baixo preço. É utilizado como aditivos em rações animais, adubos ou descartado muitas vezes de forma inapropriada na natureza (CARVALHO; VIEIRA, 1999).

Apresenta fonte de vitaminas e aminoácidos, com teor de 12-15 de lipídeos, 11-12% de proteína e 2.750 kcal/kg de energia metabolizável, contém vitamina B e as lipossolúveis A e tocoferóis com atividade vitamínica E. É fonte de nutrientes de baixo custo na alimentação da dieta humana (ALENCAR; ALVARENGA, 1991; DIAS et al., 1994).

É composto, aproximadamente, de 2,64% de celulose, 17,3% de hemicelulose e 20,9% de lignina. É produto rico em fibras insolúveis, contendo 10,1% de fibra em detergente ácido e 27,4% fibra em detergente neutro. Por possuírem boa capacidade de retenção de água e óleo, as fibras podem ser usadas na indústria farmacêutica para obtenção de produtos laxativos (DIAS et al., 1994; CARVALHO; VIEIRA, 1999; BUTOLO, 2002).

Martiniano et al. (2013) avaliaram o potencial do extrato de farelo de arroz (FAD) e concluíram que é uma alternativa promissora de fontes de nitrogênio, tais como peptona e extrato de levedura. Utilizaram cepas de leveduras isoladas de florestas brasileiras (*Scheffersomyces shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A). As leveduras *S. shehatae* e *S. arborariae* ambas em meio de fermentação do hidrolisado suplementado com RBE obtiveram produção de etanol de 17,0 g/L e 5,4 g/L; com rendimento de etanol de 0,33 g/g e 0,14 g/g e eficiência da fermentação de 64% e 21%, respectivamente.

Wang et al. (2014) utilizaram em seu estudo, hidrolisados de farelo de arroz desengordurado (FAD) como matéria-prima para a produção de ácido láctico. Os resultados mostraram que o meio com extrato de levedura, glicose, e sais podem ser substituídos por hidrolisados de FAD em culturas de *Lactobacillus rhamnosus*. O meio de farelo de arroz desengordurado foi testado em um reator de 5 L. Obteve uma produtividade elevada de ácido láctico de 3,63 g/L/h, com fermentação 1,65 vezes maior do que com extrato de milho. A concentração de ácido láctico na fermentação em batelada combinada com aumento de temperatura atingiu 210 g/L, induzindo à redução do custo de matéria prima na produção de ácido láctico.

Silva et al. (2014) avaliaram o desempenho fermentativo de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* e *Candida guilliermondii* no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana, suplementado com fontes de nitrogênio, incluindo extrato de farelo de arroz. Os experimentos foram realizados com hidrolisado com extrato de farelo de arroz suplementado com peptona e extrato de levedura e hidrolisado não-suplementado (controle). *S. stipitis* produziu somente etanol, enquanto que *C. guilliermondii* produziu xilitol como o produto principal e etanol como subproduto. A produção máxima de etanol por *S.stipitis* foi observada quando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foi suplementado com peptona e extrato de levedura. A produção máxima de xilitol por *C. guilliermondii* foi obtido pelo emprego de hidrolisado suplementado com extrato de levedura e extrato de farelo de arroz.

O extrato de farelo de arroz tem o potencial de substituir fontes de nitrogênio orgânico para a produção de etanol celulósico em biorrefinarias, bem como o xilitol, conforme já comprovado por diversos autores (CANILHA, et al., 2008; CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009). Sendo assim, torna-se interessante avaliar o extrato de farelo de arroz como suplemento do meio de cultivo de *K. marxianus*, visto que até o momento, não há estudos referentes às necessidades nutricionais desta levedura visando melhorar seu desempenho fermentativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram realizados na Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), nos Laboratórios de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETEF) e no Laboratório de Análises Agro-Ambientais (LAAA) - *Campus Cascavel*.

Parte I - Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura no crescimento e produção de etanol por *K. marxianus* ATCC 36907

4.1 Caracterização química do farelo de arroz

A composição química do farelo de arroz foi avaliada quanto à umidade, proteínas e lipídeos. A Figura 7 exhibe o aspecto do farelo de arroz.



Figura 7 Aspecto físico do farelo de arroz.

Fonte: a autora.

4.1.1 Determinação do teor de umidade

Pesaram-se, em triplicata 5 g de farelo de arroz que, na sequência, foram depositados em estufa à temperatura de 105 °C pelo período de 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram retiradas e colocadas no dessecador por um período de 20 minutos. Então, novamente passaram pelo processo de pesagem, para que se obtivesse novo peso e, assim, foi determinada a umidade da casca de arroz por diferença de pesagem em termos de porcentagem, conforme recomendações do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Os valores do teor de umidade foram expressos em porcentagem (%).

4.1.2 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo conteúdo de nitrogênio (N) total das amostras, pelo método microKjedahl, descrito por AOAC (1995). O procedimento do método utilizou 0,2 g de amostra seca, pesada em balança analítica com precisão de (0,0001 g). O método consiste em três passos básicos: 1) Digestão da amostra em ácido sulfúrico; 2); Destilação 3) Quantificação por titulação (SILVA; QUEIROZ, 2009).

O fator de correção foi utilizado para transformar a porcentagem de nitrogênio em proteína, considerando-se que as proteínas contêm em média, 16% de nitrogênio, ou seja, $100 - 16 = 84$ (valor médio). Os resultados foram calculados por meio Equação 1, e expressos em massa seca (MS):

$$\begin{aligned} \%N &= \text{Vol.HCL.gasto (mL)} \times N/10 \times 0,014 \times 100/\text{peso amostra (g)}/2 \times \text{MS} \times 100 \\ \%PB &= \%N \times 6,25 \end{aligned} \quad (1)$$

em que:

- Volume de HCl gasto na titulação = volume gasto de HCl 0,1N;
- $n/10$ = valor da normalidade do HCl 1N diluído por dez vezes (100 mL da solução de tritisol HCl 1N adicionados em balão volumétrico de 1 L e completados com água destilada = 0,1 N);
- Fator do ácido = 1 mL H₂SO₄ equivale a 0,014 de nitrogênio;
- % PB = % de proteína bruta,
- % N = % de nitrogênio multiplicado pelo fator de correção de 6,25.

4.1.3 Determinação do teor de lipídeos

Para a determinação do teor de lipídeos, utilizou-se o método Soxhlet. Foram colocados no determinador de lipídeos (Tecnal), 2 g de casca de arroz e os lipídeos foram extraídos com éter de petróleo. O teor de lipídeos foi determinado por diferenças de pesagem de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e expressos em porcentagem (%).

4.2 Microrganismo e preparo do pré-inóculo

O microrganismo utilizado neste experimento foi a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, obtida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas - SP. Repicada e mantida em tubos contendo ágar extrato de malte - YMP (extrato de malte 30 g/L, peptona micológica 5 g/L e ágar 15 g/L), inclinado e conservada em geladeira a 4 °C.

O pré-inóculo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio sintético *Yeast Malt Peptone Medium* – YMP (glicose 10 g/L, extrato de malte 3 g/L, extrato de levedura 3 g/L e peptona 5 g/L). O cultivo foi realizado em incubadora rotatória (MARCONI MA-240) a 200 rpm, temperatura de 35 °C, por 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos, lavadas com água destilada estéril e após nova centrifugação, ressuspensas em água destilada estéril para, então, serem utilizadas como inóculo a uma concentração celular inicial de 1 g/L, quantificada através de uma curva padrão que correlaciona densidade óptica com massa seca de células (g/L), conforme descrito no item 4.5.3.

4.3 Preparo do extrato de farelo de arroz

O farelo de arroz foi fornecido pela Empresa Alimentos Itasa, localizada na cidade de Santa Teresa do Oeste – PR.

O extrato líquido concentrado de farelo de arroz foi preparado, misturando-se 200 g de farelo de arroz com 1,0 L de solução tampão citrato de sódio (0,05 mol/L). A mistura foi autoclavada a 110 °C (0,5 atm) por 15 min. Em seguida, os sólidos foram separados por

centrifugação em condições estéreis (2000 rpm; 20 min) e o sobrenadante utilizado como nutriente.

4.4 Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura

O inóculo foi transferido para os meios testados, sendo eles:

T1 - controle (glicose 90 g/L);

T2 - meio com extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) (glicose 90 g/L, suplementado com 20 g/L de farelo de arroz);

T3 - meio com extrato hidrossolúvel com farelo de arroz (FA) (glicose 90 g/L, suplementado com 20 g/L de farelo de arroz, CaCl_2 0,1 g/L, sulfato de amônio 2 g/L);

T4 - meio extrato de malte (EM) (glicose 90 g/L, extrato de malte 3 g/L);

T5 - meio extrato de levedura (EL) (glicose 90 g/L, extrato de levedura 3 g/L);

T6 - meio peptona (PEP) (glicose 90 g/L, peptona 5 g/L);

T7 - meio YMP (com concentração de glicose modificada para 90 g/L, 3 g/L extrato de malte, 3 g/L extrato de levedura e 5 g/L de peptona).

Em substituição à água destilada, os meios foram preparados com tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,5 (50 MM/L). Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. A concentração de glicose de 90 g/L foi definida por Tavares et al. (2018), como a concentração de substrato ótima para *K. marxianus*.

Os tratamentos foram incubados em *shaker* (Marconi Ma-420) a 200 rpm, a 40° C durante 96 horas, sendo que a cada 12 horas foram retiradas alíquotas para a avaliação do crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol e subprodutos como glicerol e ácido acético.

Os suplementos nutricionais testados que obtiveram uma maior produção de etanol foram utilizados na segunda etapa deste estudo, para a produção de bioetanol com casca de arroz por sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS) empregando *Kluyveromyces marxianus*.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação da concentração de glicose, ácido acético, glicerol e etanol

Para a quantificação de glicose e etanol as amostras foram filtradas em filtro VertiPure™ PTFE (politetrafluoretileno) “Syringe Filters” com abertura de poros de 0,45 μm e tamanho de 13 mm e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A), com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) 150 x 7.8 mm, fase móvel H_2SO_4 0,005 mol/L, fluxo de 0,6 mL/min e temperatura do forno de 65 °C. A fase móvel foi filtrada a vácuo, em membrana GVWP 0,45 μm (MILLIPORE). As concentrações dos açúcares, ácido acético, glicerol e etanol foram determinadas a partir de curvas obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC).

4.5.2 Determinação do pH

Os valores de pH iniciais, durante os cultivos e finais foram determinados em pHmetro Luthon pH 206.

4.5.3 Determinação da concentração celular

A concentração do inóculo de *K. marxianus* e concentração celular durante as fermentações foram determinadas pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, e a conversão do valor da leitura por meio de uma curva padrão que correlaciona a absorbância ao peso seco das células de meio sintético (YMP).

4.6 Cálculos dos parâmetros fermentativos

4.6.1 Fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$), expresso em g/g, foi determinado por meio da Equação 2:

$$Y_{p/s} = (\Delta P/\Delta S) = (P_f - P_i)/(S_i - S_f) \quad (2)$$

em que:

P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f = concentração inicial e final de substrato (glicose).

4.6.2 Fator de conversão de glicose em células (Y_{x/s})

O fator de conversão de glicose em células (Y_{x/s}) expresso em g/g, foi determinado por meio da equação 3:

$$Y_{x/s} = (\Delta X/\Delta S) = (X_f - X_i)/(S_i - S_f) \quad (3)$$

em que:

X_i e X_f = concentração inicial e final das células;

S_i e S_f = concentração inicial e final de substrato (glicose).

4.6.3 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressa em g/L.h, foi calculada por meio da Equação 4.

$$Q_p = (\Delta P/\Delta t) = (P_f - P_i)/(t_f - t_i) \quad (4)$$

em que:

P_i e P_f = Concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f = Tempo inicial e final da fermentação.

4.6.4 Produtividade volumétrica em células (Q_x)

Fator de conversão da produtividade volumétrica em células, expresso em g/L.h, foi determinado por meio da equação 5.

$$Q_x = (X_f - X_0/t_f) \quad (5)$$

em que:

X_f – concentração celular final (g/L);

X₀ – concentração celular inicial (g/L);

t_f – tempo total de fermentação (horas).

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes paramétricos de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre os grupos foi realizada pelo pós-teste Tukey. O valor fixado para significância estatística foi de $p < 0.05$.

Parte II - Avaliação da utilização das cascas de arroz para a produção de bioetanol por sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS) empregando *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907

4.8 Obtenção das cascas de arroz

As cascas de arroz foram fornecidas pela Empresa Alimentos Itasa, localizada na cidade de Santa Tereza do Oeste – PR.

Após a chegada das cascas no laboratório, elas foram acondicionadas em sacos plásticos com capacidade de 50 L e congeladas a aproximadamente -4 °C até o início dos experimentos. Antes de cada procedimento experimental, as amostras foram descongeladas, trituradas em moinho de facas a uma granulometria de 50 mesh e secas em estufa à temperatura 60 °C até peso constante.

Na Figura 8, visualiza-se o aspecto das cascas de arroz.



Figura 8 Aspecto físico da casca de arroz.

Fonte: Da autora.

4.9 Pré-tratamento da biomassa e hidrólise enzimática

Foram testados diferentes 6 pré-tratamentos: T1, T2, T3, T4, T5 E T6, conforme descritos abaixo.

T1 – Pré-tratamento com ácido sulfúrico H_2SO_4 1%. Utilizou-se 5 g de casca de arroz a uma proporção de 10% (p/v). Após a adição da biomassa em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo a solução de H_2SO_4 , o frasco foi mantido em autoclave a 121 °C, durante 60 minutos.

T2 - Pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) 8%. Utilizou-se 4 g de amostra de casca de arroz a uma proporção de 8% (p/v). Os frascos foram mantidos em *shaker* (Marconi Ma-420) a 180 rpm, 40 °C, durante 4 horas. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para 60 °C, por mais 20 horas, mantendo a agitação contínua, totalizando, assim, 24 horas de reação.

T3 – Pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) 2% + peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5%. O pré-tratamento foi realizado de acordo com o método proposto por Wang et al. (2016), com algumas modificações. Utilizou-se 1 g de amostra de casca de arroz a uma proporção de 2% (p/v). Após a adição da biomassa em Erlenmeyer de 250 mL, contendo soluções de NaOH 2% + H_2O_2 5%, os frascos foram mantidos em *shaker* (Marconi Ma-420) a 180 rpm, 40 °C, durante 4 horas. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para 60 °C por mais 20 horas, mantendo a agitação contínua, totalizando, assim, 24 horas de reação.

T4 - Pré-tratamento com ácido sulfúrico H_2SO_4 1%. Utilizou-se 5 g de casca de arroz a uma carga de 10% (p/v). Após a adição da biomassa em frascos Erlenmeyer de 500 mL,

contendo solução de H_2SO_4 , o frasco foi mantido em autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$, durante 60 minutos. Em seguida, o material foi lavado com água destilada até atingir a neutralidade. A biomassa recuperada pelo processo de filtragem foi seca em estufa a $50\text{ }^\circ\text{C}$, até peso constante. Em seguida, realizou-se o pré-tratamento com NaOH 1% e os frascos foram mantidos em *shaker* (Marconi Ma-420) a 180 rpm, $40\text{ }^\circ\text{C}$, durante 4 horas. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para $60\text{ }^\circ\text{C}$ por mais 20 horas, mantendo a agitação contínua, totalizando, assim, 24 horas de reação.

T5 - Pré-tratamento com NaOH 2%. Utilizou-se 4 g de casca de arroz a uma carga de 8% (p/v). Após a adição da biomassa em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo solução de H_2SO_4 , o frasco foi mantido em autoclave $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.

T6 - Pré-tratamento com NaOH 8%. Utilizou-se 4 g de casca de arroz a uma carga de 8% (p/v). Após a adição da biomassa em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo solução de H_2SO_4 , o frasco foi mantido em autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$, durante 30 minutos.

Para todos os seis pré-tratamentos, o material foi lavado com água destilada até atingir a neutralidade. A biomassa recuperada pelo processo de filtragem foi seca em estufa a $50\text{ }^\circ\text{C}$ até peso constante, esse processo foi realizado nos 6 pré-tratamentos. O material resultante foi utilizado para a realização da hidrólise enzimática da casca de arroz, na proporção de biomassa de 8% (m/v), em frascos de 125 mL, contendo 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,0 e 40 FPU/g celulose da enzima Cellic[®]CTec2, a $50\text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, por 96 horas. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, para quantificação de açúcares redutores (AR), utilizando o reativo ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS).

Após a análise dos resultados obtidos da hidrólise enzimática a uma carga enzimática fixa (40 FPU/g) de cada tratamento, selecionou-se aquele que resultou em melhor conversão de açúcares redutores para realização de uma nova hidrólise enzimática com três diferentes concentrações de enzima.

Para a avaliação da carga enzimática, realizou-se experimentos de hidrólise enzimática da casca de arroz, na proporção de 8% (m/v), em frascos de 125 mL, contendo 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,0 e 10, 20 e 40 FPU/g celulose da enzima Cellic[®]CTec2, a $50\text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm, por 96 horas. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas para quantificação de açúcares redutores (AR) utilizando o reativo ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS).

4.10 Caracterização química das cascas de arroz

A composição química da casca de arroz foi avaliada quanto ao teor de cinzas totais, umidade, proteínas, lipídeos e as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina.

4.10.1 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas nas amostras foi obtido pelo método de incineração em mufla a 550 °C, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Foram pesados 5 g da amostra em cápsula de porcelana, colocados em mufla, em temperatura de 550 °C, até a eliminação completa do carvão e obtenção do aspecto acinzentado, branco ou ligeiramente acinzentado. A determinação de cinzas ocorreu por diferença de massas.

4.10.2 Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.1.1.

4.10.3 Determinação do teor de proteínas

Para a determinação do teor de proteínas foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.1.2.

4.10.4 Determinação do teor de lipídeos

Para a determinação do teor de lipídeos foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.1.3.

4.10.5 Porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina

As análises foram realizadas segundo método sequencial de Van Soest (1994). Foram pesados 0,5 g de casca de arroz previamente moídas, secas em estufa a 60 °C e

trituras em peneira de 50 mesh. Empregou-se solução detergente ácido para remover os outros componentes celulares que interferem na determinação do teor de fibra.

As análises foram realizadas em equipamento determinador de fibra TE – 149, marca TECNAL (FDN; FDA; FB), sendo que a sigla FB se refere à fibra bruta.

A lignina foi determinada a partir da fibra em detergente ácido (FDA), em que as amostras foram tratadas em solução de ácido sulfúrico a 72%, originando o resíduo insolúvel da lignina. As amostras foram cobertas com ácido sulfúrico a 72% e agitadas com bastão de vidro a cada 20 minutos. Após 1 hora, o ácido foi filtrado e as amostras novamente cobertas com ácido, esse procedimento foi repetido por três vezes.

Em seguida, as amostras foram filtradas e lavadas com água quente até completa neutralização; estas permaneceram em estufa a 105 °C por 12 horas e foram levadas à mufla a 550 por 6 horas e, posteriormente, foram colocadas em dessecador até o completo resfriamento e pesadas em balança analítica (0,0001g), obtendo o peso (tara+lignina). Os valores para porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina estão descritos nas equações 6, 7 e 8:

$$\text{Celulose (\%)} = \text{FDA} - \text{LIG} \quad (6)$$

$$\text{Hemicelulose (\%)} = \text{FDN} - \text{FDA} \quad (7)$$

$$\text{Lignina (\%)} = \text{FDA} - (\% \text{ cinzas da casca de arroz}) \times 100 \quad (8)$$

4.11 Pré-tratamento da biomassa com NaOH 2% + H₂O₂ 5%

Este pré-tratamento foi o selecionado (Item 4.9) com o intuito de remover a hemicelulose e lignina das cascas de arroz, de forma a favorecer a etapa posterior de sacarificação enzimática da celulose.

O pré-tratamento foi realizado de acordo com o método proposto por Wang et al. (2016), com algumas modificações. Utilizou-se 1 g de amostra de casca de arroz, adicionada em Erlenmeyer de 250 mL, contendo soluções de NaOH 2% + H₂O₂ 5%, os frascos foram mantidos em *shaker* (Marconi Ma-420) a 180 rpm, 40 °C, durante 4 horas. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para 60 °C, por mais 20 horas, mantendo a agitação contínua, totalizando, assim, 24 horas de reação. Em seguida, o material foi lavado com água destilada até atingir a neutralidade. A biomassa recuperada pelo processo de filtragem foi seca em estufa a 50 °C até peso constante. O material resultante foi caracterizado quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina e utilizado para o processo de SSF e SFS.

4.11.1 Espectrometria de absorção na região infravermelha (FTIR)

As análises de espectroscopia no Infravermelho com a transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no Politereflato de Etileno (PET), na lignina e nas blendas, em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, no modo refletância total atenuada (ATR). Todas as amostras foram analisadas na faixa entre 400 a 500 cm^{-1} , com acumulação de 16 varreduras e com resolução de 2 cm^{-1} . As análises foram realizadas no Laboratório Central de Análises na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus* Medianeira.

4.11.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As cascas de arroz *in natura* e pré-tratadas foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Departamento de Engenharia de Materiais - DEMAR, da EEL/USP, para verificar as mudanças estruturais causadas pela ação química durante o pré-tratamento. As amostras foram fixadas sobre uma placa de aço por meio de uma fita de carbono e aplicada uma fina camada de prata de, aproximadamente, 20 nm em uma metalizadora MED020 (BAL-TEC /MCS MULTICONTROL SYSTEM). As micrografias de MEV foram obtidas em um equipamento HITACHI TM3000, empregando sinal de elétrons secundários e voltagem de 20 kV.

4.12 Avaliação da hidrólise enzimática

A biomassa de casca de arroz, após ter passado pelos processos de pré-tratamento, foi submetida ao estudo da avaliação da hidrólise enzimática. A conversão da celulose da casca de arroz em glicose foi realizada empregando-se o complexo enzimático Cellic[®] CTec2 da Novozymes Latin America LTDA. A atividade enzimática da celulase foi determinada e expressa em unidade de papel filtro (FPU), conforme a metodologia proposta por Ghose (1987).

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 10% (m/v) da casca de arroz pré-tratada (celulose) em base seca, juntamente com 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,0 e 40 FPU/g celulose da enzima Cellic[®]CTec2.

Os frascos foram mantidos em shaker a 50 °C, 150 rpm, por 96 horas. Para a obtenção da hidrólise, foram retiradas alíquotas em intervalos de 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de reação, pois a liberação de açúcar estabilizou em 96 horas. Para parar a reação, as amostras coletadas eram colocadas em um banho de água fervente por 5 minutos para inativar a enzima. Após esse tempo, as mesmas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 20 minutos, para quantificação de açúcares redutores (ART) utilizando o reativo ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959). O experimento foi realizado em triplicata.

4.12.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da celulase foi determinada em termos de unidades de papel filtro ("Filter Paper Unit" – FPU) por mililitro da solução enzimática original, ou seja, FPU/mL (GHOSE, 1987).

A determinação da atividade enzimática foi realizada em duplicata por tubos de ensaio contendo 50 mg de substrato (aproximadamente 1 cm x 4,55 cm de papel filtro qualitativo), 1 mL de tampão citrato 0,05 M pH 5,0 e 0,5 mL de enzima diluída adequadamente, incubados a 50 °C, por 60 minutos. Também foram incubados tubos-controle de enzima (0,5 mL de enzima diluída e 1,0 mL de tampão citrato) e um tubo correspondente ao branco (1,5 mL de tampão citrato). Os tubos com os padrões de glicose continham 0,5 mL de glicose (1,0 mg/mL a 3,35 mg/mL) e 1 mL de tampão citrato.

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de solução de ácido dinitrossalicílico (DNS) e os açúcares redutores totais foram dosados segundo o método de Miller (1959), a 540 nm, em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus).

4.12.2 Cálculo da atividade enzimática

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor), em função da absorbância, obtendo-se, assim, uma equação que relaciona as duas grandezas

De posse das leituras das absorbâncias, obtidas após a hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida por meio da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração de ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Assim, traçou-se uma reta relacionando a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL da enzima diluída, determinando-se, assim, a atividade enzimática por meio da Equação 9.

$$\text{FPU/mL} = \frac{2,0}{(0,18016 * 0,5 * 60 * [\text{enzima diluída}])} \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{mL}^{-1} \quad (9)$$

$$\text{FPU/mL} = 0,37 / [\text{enzima diluída}].$$

Para a celulase, uma unidade da atividade enzimática (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação.

4.13 Micro-organismo e preparo do pré-inóculo

Para a produção de etanol a partir da porção celulósica foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Para a conservação da cultura e preparo do pré-inóculo foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.2.

4.14 Sacarificação simultânea à fermentação (SSF)

Para a realização dos ensaios de produção de etanol por *K. marxianus* pelo processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF), empregou-se a carga enzimática que resultou no melhor perfil de hidrólise enzimática, determinada em ensaios preliminares (40 FPU/g de celulose).

Após a remoção da fração hemicelulósica através do pré-tratamento, a fração celulósica restante foi seca em estufa a 50 °C até peso constante e seguiu-se ao processo de SSF, realizado conforme metodologia utilizada por Ballesteros et al. (2004). A biomassa celulósica, após o pré-tratamento, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL, numa proporção de 10% (m/v), com os nutrientes selecionados no experimento anterior (Item 4.4), sem adição de glicose, sendo eles: T1 – extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) 20 g/L ; T2 - extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) 20 g/L, CaCl_2 0,1 g/L, sulfato de amônio 2 g/L; e T3 - YMP (extrato de malte 3 g/L, extrato de levedura 3 g/L e de peptona 5 g/L). Os frascos foram incubados em shaker a 40 °C, 150 rpm.

Inicialmente, adicionou-se a enzima aos meios e os frascos foram mantidos em *shaker*, a 50 °C, 150 rpm, por 4 horas, período denominado de pré-sacarificação. Após esse período, foi adicionado o inóculo (1g/L) de *K. marxianus* e a temperatura foi reduzida para

40 °C, durante 96 horas, sendo que a cada 12 horas eram retiradas alíquotas para a quantificação de açúcares, etanol, ácido acético e glicerol e medição do pH. O experimento foi realizado com 4 repetições cada.

4.15 Sacarificação e fermentação separadas (SFS)

Para a realização dos ensaios de produção de etanol por *K. marxianus* pelo processo de sacarificação e fermentação separadas (SFS), foi empregada a mesma carga enzimática utilizada no ensaio anterior.

Após a remoção da fração hemicelulósica no pré-tratamento, a fração celulósica restante foi seca em estufa a 50 °C e transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL, numa proporção de 10% (m/v) com os nutrientes selecionados no experimento anterior, sem adição de glicose, sendo eles: T1 – extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) 20 g/L; T2 - extrato hidrossolúvel de farelo de arroz (FA) 20 g/L, CaCl₂ 0,1 g/L, sulfato de amônio 2 g/L; e T3 - YMP (extrato de malte 3 g/L, extrato de levedura 3 g/L e de peptona 5 g/L). Os frascos foram incubados em shaker a 50 °C, 150 rpm, com uma concentração de celulase de 40 FPU/g de celulose.

Após 72 horas de sacarificação foi adicionado o inóculo (1g/L) de *K. marxianus*, mantendo-se os frascos em shaker a 150 rpm, a 40°C, durante 72 horas, sendo que a cada 12 horas eram retiradas alíquotas para a quantificação de açúcares, etanol, ácido acético, glicerol e medição do pH. O experimento foi realizado com 4 repetições cada.

4.16 Métodos analíticos

4.16.1 Determinação da concentração de glicose, etanol, ácido acético e glicerol

Para a determinação da concentração de glicose, ácido acético e glicerol, foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.5.1.

4.16.2 Determinação do pH

Os valores de pH iniciais, durante os cultivos e finais foram determinados em pH-metro Luthon pH 206.

4.17 Cálculo dos parâmetros fermentativos

4.17.1 Fator de conversão da glicose em etanol ($Y_{p/s}$)

O fator de conversão de glicose em etanol, expresso em g/g, foi determinado por meio da Equação 10:

$$Y_{p/s} = (\Delta P / \Delta S) = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (10)$$

em que:

P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f = concentração inicial e final de substrato (glicose).

4.17.2 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressa em g/L.h, foi calculada por meio da Equação 11.

$$Q_p = (\Delta P / \Delta t) = (P_f - P_i) / (t_f - t_i) \quad (11)$$

em que:

P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol;

S_i e S_f = tempo inicial e final da fermentação.

4.18 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio dos testes paramétricos de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre os grupos foi realizada pelo pós-teste Tukey. O valor fixado para significância estatística foi de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I - Efeito da suplementação nutricional do meio de cultura no crescimento e produção de etanol por *K. marxianus* ATCC 36907

5.1 Análise da caracterização química do farelo de arroz

A composição química do farelo de arroz *in natura* está expressa em porcentagem na Tabela 2 e corrobora os valores encontrados por outros autores em relação aos teores de umidade (5,59 – 9,7 %), lipídeos (13,43 – 20,79%), proteínas (14 – 19,30 %), e cinzas (8,47 – 18%) (AMISSAH et al., 2003; HUANG, 2005; ZAID; TAIWO, 2008; MIAH et al., 2014).

Tabela 2 Composição química do farelo de arroz

Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)
9,95	9,87	17,24	15,80

5.2 Consumo de glicose e produção de etanol

A cinética de consumo de glicose com sete diferentes meios nutricionais pode ser observada na Figura 9. Verificou-se que glicose foi totalmente consumida em 24 horas de fermentação no tratamento T3. Nos tratamentos T2, T5 e T6 a glicose foi consumida em 36 horas, enquanto que no T4 mais lentamente, apresentando cerca de 10 g/L de glicose residual ao final das 96 horas de fermentação. Com o meio controle (T1) o consumo foi muito mais lento e em 96 horas o meio ainda apresentava 59,86 g/L de glicose, provavelmente porque este último continha somente a fonte de carbono, evidenciando a necessidade de suplementação do meio para o cultivo de *K. marxianus*.

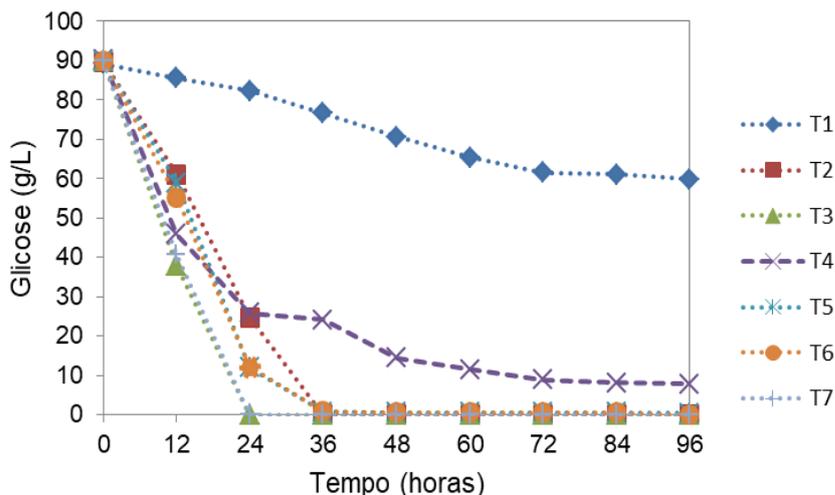


Figura 9 Consumo de glicose durante a fermentação com *K. marxianus* ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (×).

Na Figura 10, demonstra-se a produção de etanol ao longo de 96 horas de fermentação pela levedura *K. marxianus*. A partir dos resultados, verifica-se que nas primeiras 12 horas ocorreu a produção de etanol nos sete tratamentos, sendo máxima produção nas condições T3 e T7 (25,50, 24,88 g/L, respectivamente), e em 24 h T2 (25,59 g/L). Tal fato se deve a que os meios contendo farelo de arroz e o meio YMP são meios mais ricos em nutrientes, contendo maiores quantidades de proteínas e carboidratos, favorecendo não somente o crescimento celular, como também a formação do produto de interesse. Para os tratamentos T6, T4 e T5 foi observada uma produção de 16,51, 16,34 e 14,29 g/L, respectivamente. O tratamento controle, contendo apenas glicose, apresentou menor produção de etanol, em média 2,11 g/L.

Observa-se, porém, que após o maior pico de produção de etanol, independentemente da condição avaliada, a sua concentração nos meios fermentados diminuiu gradativamente. Essa redução pode ser atribuída a um possível consumo da levedura, por ter havido escassez de glicose no meio de fermentação que coincidiu com o tempo de escassez desse composto (24 h, Figura 9), passando a utilizar o etanol como fonte de carbono. O consumo de etanol foi relatado por Dalanhol (2014) ao observar decréscimo na concentração de etanol, a partir de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de maçã, provavelmente devido à assimilação do composto como fonte de carbono pelas leveduras *Candida guilliermondii* e *K. marxianus*. Rouhollahet al. (2007) também observaram uma diminuição na concentração de etanol a partir das 72 horas de fermentação pelas leveduras *P. stipitis* e *K. marxianus*, em concentrações acima de 30 g/L de etanol e ausência total de açúcares.

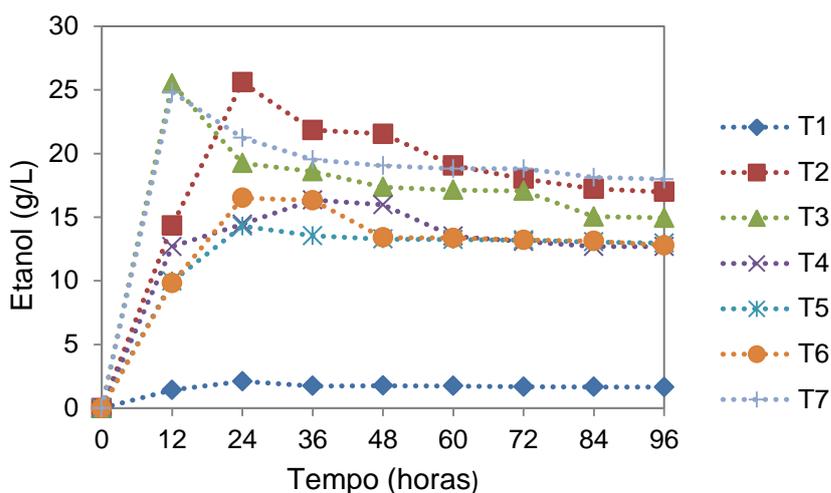


Figura 10 Produção de etanol durante a fermentação com *K. marxianus* ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X); meio suplementado com extrato de levedura (*); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).

Aziz et al. (2011), ao estudarem diferentes fontes de carboidratos (glicose, sacarose e melão), em diferentes concentrações (100, 120, 150 e 170 g/L), na produção de etanol por *K. marxianus* M 15, obtiveram a concentração máxima de 75 g/L de etanol em meio contendo 150 g/L.

Milessi et al. (2013) estudaram o potencial do extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio para a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y- 7124 utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. *S. stipitis* foi cultivada em três diferentes meios de fermentação compostos de hidrolisado destoxificado como fonte de carbono suplementado com fontes de nitrogênio variadas, ou seja, meio contendo extrato de farelo de arroz + sulfato de amônio + cloreto de cálcio; meio extrato de levedura + peptona e meio extrato de levedura + peptona + extrato de malte, apresentando produção máxima de etanol de 8,6 g/L, 8,1 g/L, 8,1 g/L e 7,4 g/L, respectivamente.

Martiniano et al. (2013) avaliaram o potencial do extrato de farelo de arroz (RBE) na produção de etanol e concluíram que é uma alternativa promissora de fontes de nitrogênio, tais como peptona e extrato de levedura. Utilizaram cepas de leveduras isoladas de florestas brasileiras (*Scheffersomyces shehatae* e CG8-8BY e *Spathaspora arboraria* e UFMG-HM19.1A). As leveduras *S. shehatae* e *S. arborariae*, ambas em meio de fermentação do hidrolisado suplementado com RBE obtiveram produção de etanol de 17,0 g/L e 5,4 g/L.

Neste trabalho, evidencia-se a possibilidade de utilização do extrato de farelo de arroz como fonte de nitrogênio em processos fermentativos empregando a levedura *K. marxianus* ATCC e que, por ser de menor custo, pode tornar a produção de etanol um

processo potencialmente competitivo economicamente. Mochidzuki et al (2015) também avaliaram o uso de farelo de arroz (27,6 g de farelo de arroz, 121,4 mL de tampão e 12,5 µL de α -amilase) como suplemento nutritivo barato para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em (SSF). A concentração final de etanol foi de 69,3 g/L.

5.3 Concentração celular

Na Figura 11 estão apresentados os dados da concentração celular da levedura *K. marxianus* ATCC 36907, ao longo de 96 horas de fermentação dos experimentos realizados em frascos sob agitação, com diferentes meios suplementados (T1 a T7). Observou-se que o maior crescimento celular ocorreu nos tempos 12 e 24 horas, para todos os tratamentos. A maior concentração celular foi verificada no meio extrato hidrossolúvel com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T3) 9,11 g/L, seguido pelo meio YMP (T7) 7,05 g/L, no meio extrato hidrossolúvel com farelo de arroz (T2), 7,03 g/L. Valores inferiores foram verificados no meio suplementado com extrato de levedura (T5), 3,84 g/L, peptona (T6), 3,61 g/L, no meio controle glicose (T1) 2,88 g/L, e no meio contendo extrato de malte (T4), 2,58 g/L,

O extrato hidrossolúvel de farelo de arroz é uma fonte barata de nitrogênio, que segundo Kahlon (2009), contém cerca de 2,4% do nitrogênio total, enquanto o extrato de levedura e peptona têm aproximadamente 10,9% de nitrogênio total, respectivamente.

No presente trabalho, verificaram-se resultados semelhantes, quando se empregou o farelo de arroz (T2, T3) e YMP (T7). Verificou-se que o T3 tem resultados eficientes no crescimento celular em relação aos meios mais enriquecidos (T3 e T7), isso demonstra a viabilidade da utilização do farelo de arroz na produção de biocombustível - etanol de segunda geração, visto que esse tratamento contém apenas meio hidrossolúvel de farelo de arroz. Por outro lado, nota-se ainda que para os tratamentos T2, T4 e T7 houve um decréscimo do crescimento de *K. marxianus* no período de 48 a 72 horas, mantendo-se constante até o final do processo. Oda et al. (2010) correlacionaram a viabilidade celular de *K. marxianus* com a quantidade de etanol produzida e constataram que a viabilidade celular reduziu drasticamente com o acúmulo de etanol no meio.

Lebron et al. (2018) avaliaram o farelo de arroz como suplemento no processo de fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol em 12 horas de fermentação, com diferentes concentrações (2,5 - 7,5 g/L) e concentração celular (1 - 5 g/L), utilizaram a curva padrão de peso seco para monitorar o crescimento celular. Os melhores resultados, comprovados estatisticamente, foram alcançados no ponto de máxima

concentração de farelo de arroz e concentração mínima de células, representados por 7,5 e 1 g/L, respectivamente (0,57 g/g e 1,63 g/L.h).

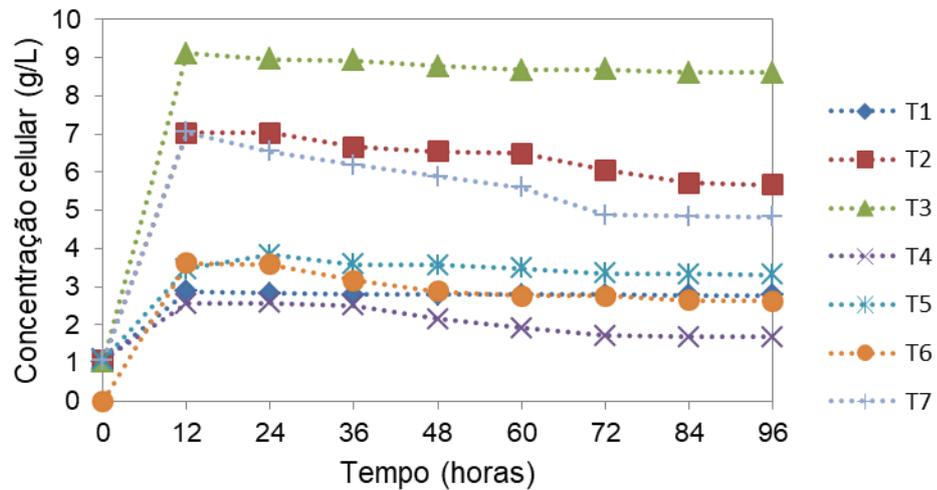


Figura 11 Concentração celular durante a fermentação com *K. marxianus* ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (X); meio suplementado com extrato de levedura (*); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).

5.3.1 Formação de subprodutos

Além da produção de etanol nos diferentes meios de cultura, foi quantificada a produção de ácido acético e glicerol por *K. marxianus*, durante a fermentação. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 12 e 13.

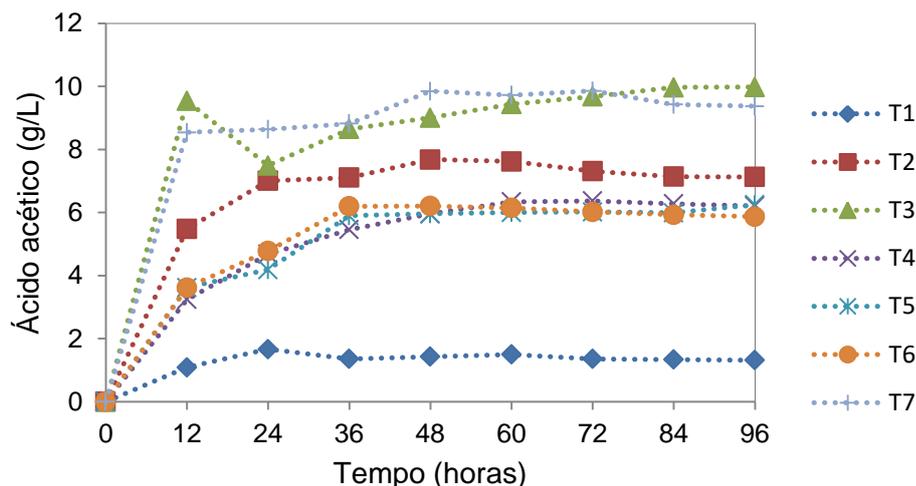


Figura 12 Produção de ácido acético durante a fermentação com *K. marxianus* ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (×); meio suplementado com extrato de levedura (*); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).

A maior produção de ácido acético ocorreu no tratamento T3 com um valor máximo de 9,54 g/L, estabilizando a partir de 12 horas. A produção de ácido acético teve seu máximo coincidente com o crescimento celular e produção de etanol. Observou-se uma pequena produção de ácido acético no tratamento controle T1, com meio contendo somente glicose, correspondendo a uma produção de 1,50 g/L em 36 horas.

Embora as concentrações máximas de ácido acético tenham diferido entre os tratamentos, observou-se que, para todos eles, a produção deste ácido estabilizou após 36 horas de fermentação.

Observou-se uma pequena produção de ácido acético no tratamento controle com meio contendo somente glicose, foi observado que em 36 horas teve uma produção de 1,50 g/L e foi diminuindo ao longo do tempo obtendo um valor de 1,28 g/L em 96 horas.

Já para o meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio e o meio YMP o comportamento na produção de ácido acético foi semelhante, sendo que a maior produção para ambos os tratamentos ocorreu em 48 horas, obtendo-se uma concentração de 7,68 e 9,86 g/L, respectivamente.

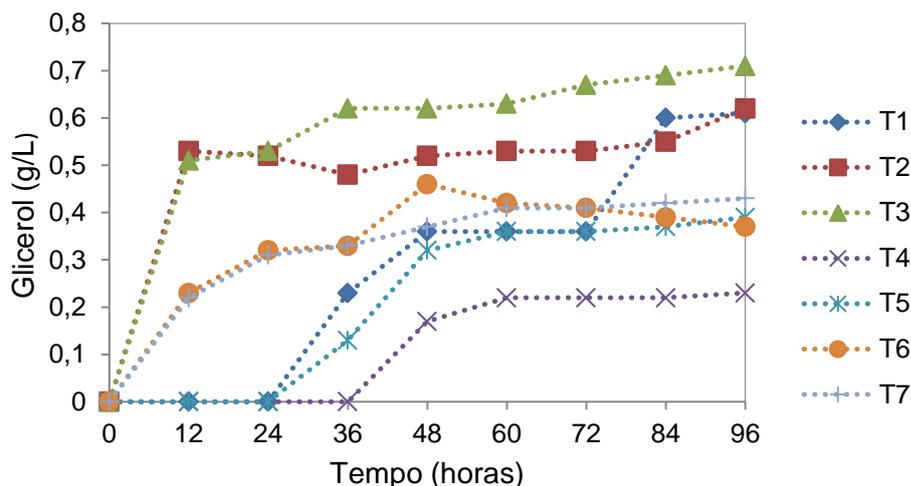


Figura 13 Produção de glicerol durante a fermentação com *K. marxianus* ATCC 36907 em meio controle glicose (◆); meio suplementado com farelo de arroz (■); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (▲); meio suplementado com extrato de malte (×); meio suplementado com extrato de levedura (✱); meio suplementado com peptona (●) e meio YMP (+).

Com relação à produção de glicerol, observou-se que os tratamentos T7, T6, T2 e T3, após 12 horas de fermentação, apresentaram valores de produção de 0,22, 0,53 e 0,53 g/L, respectivamente. Os tratamentos T5 e T1 apresentaram produção de etanol, a partir de 24 horas de fermentação, variando entre 0,23 e 0,61 g/L. O tratamento T4 começou a produzir etanol somente após 36 horas de fermentação, tendo uma produção máxima de 0,23 g/L.

5.3.2 Parâmetros fermentativos

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros fermentativos utilizando a levedura *K. marxianus*, nos 7 diferentes meios de fermentação testados.

Os valores de $Y_{P/S}$ dos sete tratamentos variaram entre 0,28 e 0,50 g/g, sendo que os valores mais próximos ao $Y_{P/S}$ teórico (0,51 g/g) foram obtidos nos tratamentos com meio contendo extrato hidrossolúvel com farelo de arroz (T2), meio extrato hidrossolúvel com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T3) e o meio YMP (T7) com valores de 0,50, 0,49 e 0,50 g/g, respectivamente.

As maiores produtividades volumétricas também ocorreram nos tratamentos de maior valor de Q_p , os quais foram 1,16, 2,06 e 2,13 g/L.h para os tratamentos T2, T7 e T3, respectivamente.

Tabela 3 Parâmetros fermentativos e máxima produção de etanol durante a fermentação com *K.marxianus* ATCC 36907, utilizando sete diferentes meios de fermentação

Meio de fermentação	Etanol (g/L) ^a	Y _{P/S}	Y _{X/S}	Q _X
T1	2,11	0,38	0,12	0,15
T2	25,59	0,50	1,16	0,50
T3	25,50	0,49	2,13	0,67
T4	16,34	0,29	1,06	0,12
T5	14,28	0,32	0,83	0,20
T6	16,51	0,28	0,82	0,21
T7	24,88	0,50	2,06	0,50

Notas: Meios de fermentação: T1 - (meio controle glicose); T2 - (meio suplementado com farelo de arroz); T3 – (meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio); T4 - (meio suplementado com extrato de malte); T5 - (meio suplementado com extrato de levedura); T6 - (meio suplementado com peptona); T7 - (meio YMP) após 96 horas de fermentação.

^a maior concentração de etanol;

Y_{P/S}: Fator de conversão de substrato em produto (g/g);

Y_{X/S}: fator de conversão do substrato em células (g/g);

Q_X: produtividade volumétrica em células (g/L.h).

Costa (2011), ao estudar a produção de etanol por *K. marxianus* CCT 4086, em meio sintético, contendo uma concentração inicial de glicose de 47,81 g/L obteve fatores de conversão de substrato em etanol inferiores ao desta pesquisa, da ordem de 0,13 g/g.

Tavares et al. (2019) avaliaram o efeito da remoção do etanol a vácuo no desempenho fermentativo com a mesma cepa utilizada no presente estudo. A levedura foi cultivada em biorreator de bancada a uma concentração inicial de glicose de 90g/L em meio suplementado com YMP, em dois lotes sequenciais de 36 horas. Nas fermentações com vácuo, após o primeiro ciclo, verificou-se Y_{P/S} 0,38 g/g; Q_P 0,94 g/L.h e Y_{P/S} 0,18 g/g; Q_P 0,43 g/L.h no final do segundo ciclo.

Na Tabela 4 estão apresentados os dados de análise de variância (ANOVA) dos fatores: tratamentos com diferentes meios e tempo de fermentação (A e B), indicando que ocorreu interação significativa entre os fatores em avaliação (F = 6,187).

Tabela 4 Produção de etanol em 7 diferentes meios de fermentação, nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação

Fontes de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{calculado}	p-valor
Tratamentos	2586,89	6	426,15	76,308	0,00000
Tempo (fermentação)	50,42	2	25,21	4,514	0,01670
Tratamentos * fermentação	414,66	12	34,55	6,187	0,00004
Erro	234,55	42	5,58	-	-

Notas: ^a soma dos quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios;

Fator A: Tratamento principal/tratamento com diferentes meios;

Fator B: Tempo de fermentação.

Conforme apresentado na Tabela 5, verifica-se que os tratamentos T3 e T7, que apresentaram maior produção de etanol após 12 horas de fermentação, diferem dos demais tratamentos, com valores respectivos de 25,50 e 24,81 g/L. Após 24 horas de fermentação, o T2 apresenta maior produção de etanol, cerca de 25,59 g/L, no entanto a produção de etanol não diferiu estatisticamente dos tratamentos T3 e T7. O tratamento T7 apresenta em sua composição compostos tais como carbono, nitrogênio, aminoácidos e vitaminas do complexo B que estimulam o crescimento de leveduras e fungos que, conseqüentemente, elevam a produção do etanol. No entanto, o T3 que é meio suplementado com extrato de farelo de arroz apresentou produção equivalente ao T7, demonstrando desta forma que a utilização do extrato de arroz, apresentou-se eficiente na produção de etanol, principalmente quando foi utilizado juntamente com CaCl_2 e sulfato de amônio. Outro importante fator a ser avaliado é que a produção máxima de etanol ocorre após 12 horas de fermentação nos meios T3, T7, e em 24 horas para o meio T2.

Observou-se que apenas o T2 apresentou produção de etanol equivalente ao T3 e T7 no tempo de 12 horas. Desta forma pode-se afirmar que o extrato de farelo de arroz apresenta potencial para o uso industrial para produção de bioetanol, apesar de demandar tempo de fermentação um pouco maior para a produção máxima em torno de 25,50 g/L, o que refletiu no fator produtividade.

Tabela 5 Produção de etanol em 7 diferentes meios de fermentação, nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação

Tratamentos	12	24	36
T1	1,42 cB	2,63 cA	2,79 aC
T2	14,34 bB	25,59 cA	21,83 aA
T3	25,50 aA	19,24 bAB	18,59 bAB
T4	12,69 bA	14,44 aB	16,34 aAB
T5	9,97 bB	14,02aB	13,28 aB
T6	9,88 bB	16,51 aB	16,32 aAB
T7	24,81 aA	21,22 bAB	19,51 bA

Nota: *Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância.

Na Tabela 6 está apresentada a Anova da concentração celular nos 7 diferentes tratamentos e em relação ao tempo de fermentação, visto que ocorreu interação entre os tratamentos e os tempos de fermentação ($F = 4,17$).

Tabela 6 Análise de variância (ANOVA) para crescimento celular em 7 diferentes meios de fermentação, nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação

Fontes de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{calculado}	p-valor
Tratamentos	348,027	6	58,005	822,35	0,00000
Tempo (fermentação)	0,502	2	0,251	3,56	0,03743
Tratamentos * fermentação	3,354	12	0,294	4,17	0,00026
Erro	2,962	42	0,071	-	-

Notas: ^a soma dos quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios.

Em relação à concentração celular (Tabela 7) verificou-se que o tratamento T3 apresentou maior concentração celular nos tempos 12, 24 e 36 horas de fermentação, seguido dos tratamentos T2 e T7, que apresentaram valores muito semelhantes. Observou-se que há uma tendência de os valores de todos os tratamentos se manterem constantes e sem diferença estatística após 12 horas de fermentação, devido ao consumo total de açúcares nas primeiras 36 horas, para a maior parte dos tratamentos. Isso reflete diretamente na produção de bioetanol, em que ocorre a tendência de redução de produtividade.

Tabela 7 Concentração celular em 7 tratamentos com ou sem suplementação após 12, 24, 36 horas de fermentação

Tratamentos	12	24	36
T1	1,83 bD	2,82 aC	2,79 aD
T2	7,03 aB	7,06 aB	6,66 aAB
T3	9,11 aA	8,96 aA	8,93 aA
T4	2,56 aC	2,58 aD	2,59 aD
T5	3,47 bBC	3,84 aC	3,58 cB
T6	3,61 aBC	3,62 aC	3,16 cB
T7	7,06 aB	6,55 bAB	6,19 bC

Notas: *Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância.

Parte II - Avaliação da utilização das cascas de arroz para a produção de bioetanol por sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS) empregando *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907

5.4 Hidrólise enzimática da casca de arroz

Na Figura 14 estão apresentados os valores de hidrólise enzimática da casca de arroz submetida a seis diferentes pré-tratamentos. Utilizou-se uma carga enzimática de 40 FPU/g celulose da enzima Cellic[®]CTec2. A casca submetida aos pré-tratamentos T2, T5 e T4 resultou em valores de 22,16; 21,53 e 13,43 g/L de açúcares redutores (AR), respectivamente, ao final de 96 horas. O pior desempenho da hidrólise foi observado em T1 (H_2SO_4 1%, 121 °C, 1 h), com a produção de 4,71 g/L, sendo a menor concentração de AR, quando comparado aos demais tratamentos, indicando que esse pré-tratamento não foi eficiente em aumentar a acessibilidade enzimática à celulose da casca de arroz, visto que este consiste em um dos requisitos para a obtenção de maiores rendimentos em açúcares.

O melhor desempenho da hidrólise foi observado no pré-tratamento T3 (NaOH 2% + H_2O_2 5%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h), com produção de 51,24 g/L de A.R. Levando-se em consideração esses resultados, fez-se um novo ensaio com a biomassa submetida ao tratamento T3, desta vez, visando avaliar diferentes cargas enzimáticas.

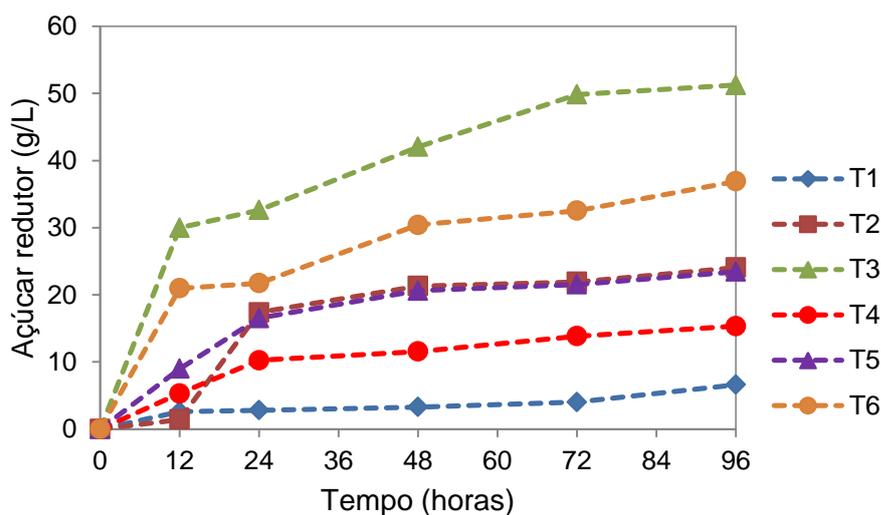


Figura 14 Perfil cinético da hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz submetida a diferentes pré-tratamentos: T1 - (H_2SO_4 1%, 121 °C), 1 h; T2 - (NaOH 8%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h); T3 - (NaOH 2% + H_2O_2 5%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h); T4 - (H_2SO_4 1%, 121 °C, 1 h + NaOH 2%, 180 rpm, 40 °C-4 h; 60 °C-20 h); T5 - (NaOH 2%, 121 °C; 30 min); T6 - (NaOH 8%, 121 °C; 30 min).

O efeito da carga de Cellic[®]CTec2 sobre a hidrólise enzimática da casca de arroz, avaliado quanto à liberação de açúcares redutores, está representado na Figura 15. Em relação ao tempo de 72 horas, quando houve estabilização na liberação dos açúcares redutores, observa-se que o rendimento da hidrólise aumentou em 41,06%, correspondendo a 70,56g/L de AR liberados quando a carga da enzima passou de 10 para 40 FPU/g de celulose.

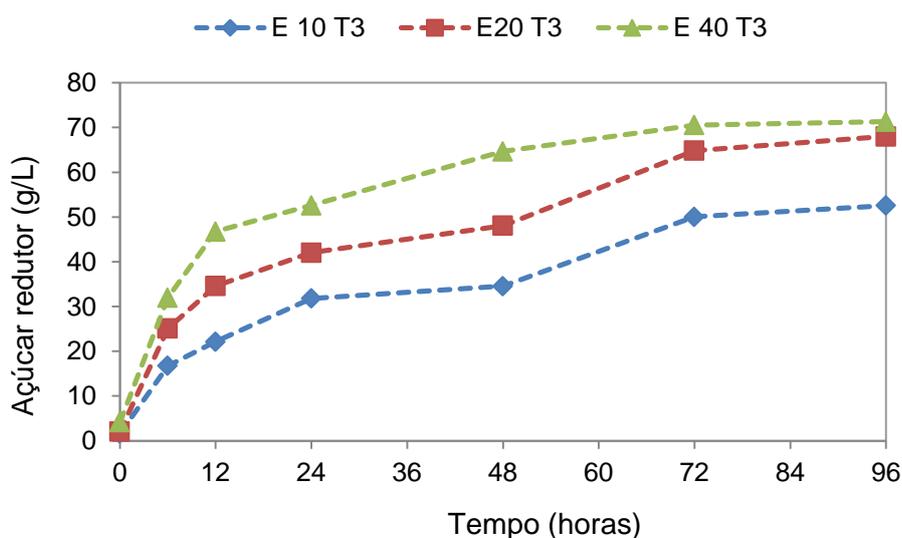


Figura 15 Liberação de açúcares redutores (g/L) ao longo de 96 horas de hidrólise da casca de arroz, utilizando três diferentes concentrações de enzima (10, 20, 40 FPU/g de celulose enzima Cellic[®]CTec2).

A enzima Cellic[®]CTec2Novozymes vem sendo amplamente empregada na hidrólise de materiais lignocelulósicos, como pode ser observado em trabalhos de diversos pesquisadores reportando a hidrólise enzimática de diferentes materiais como palha de trigo (CANELLA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015), palha de milho (BRUNECKY et al., 2014), sabugo de milho (STEVANIE; KARTAWIRIA; ABIMANYU, 2016) e folhas de beterraba (ARAMRUEANG et al., 2017).

5.5 Análise da composição química da casca de arroz *in natura*

A casca de arroz inicialmente foi submetida aos ensaios experimentais de caracterização química descritos no item 4.9. Os resultados verificados para as amostras do

material são apresentados na Tabela 8, em composição percentual dos seus principais constituintes.

Tabela 8 Composição química da casca de arroz *in natura*

Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)
Biomassa in natura						
8,44	18,94	0,17	2,63	28,21	12,29	38,88
Biomassa pré-tratada*						
-	-	-	-	20,54	9,57	47,51

Nota: *(NaOH 2% + H₂O₂ 5%). – : não realizado.

Os resultados mostraram que a casca de arroz apresentou um elevado teor de celulose, correspondendo à maior porção da biomassa da casca de arroz 38,88%, enquanto cinzas, hemicelulose e lignina representaram 18,94% 12,29 e 28,21% respectivamente. Segundo SAHA; COTTA (2008), a alta concentração de lignina e cinzas dificulta a bioconversão da casca de arroz em etanol.

Os resultados obtidos da composição química casca de arroz *in natura* foram comparados com trabalhos descritos na literatura, os quais encontraram valores de, aproximadamente, 25 - 35 % de celulose, 18 - 31,17 % de hemicelulose e 17,2 - 31% de lignina (AZEVEDO et al., 2016; LUDUEÑA et al., 2011; ABBAS; ANSUMALLI, 2010; BAKAR; PUTRAJAYA; ABDULAZIZ, 2010). Essas diferenças de valor podem ocorrer devido à variabilidade natural da composição química entre cultivares, época de plantio e ou colheita, qualidade do produto ou até mesmo ao método de análise utilizado.

Para a biomassa pré-tratada, o valor de celulose aumentou consideravelmente em relação à biomassa *in natura*, enquanto que hemicelulose e lignina diminuíram, indicando solubilização hemicelulósica e de lignina, o que é desejável, pois neste estudo o objetivo é a produção de etanol de segunda geração através da fração celulósica. Quanto menor o teor de hemicelulose e lignina melhor a degradabilidade enzimática da celulose. As hemiceluloses atuam como uma barreira física que dificulta hidrólise enzimática pelo fato de estarem alojadas entre e envolvendo as microfibrilas de celulose nas paredes celulares secundárias (ZHU et al., 2010). Enquanto a lignina, naturalmente, inibe o acesso de enzimas celulolíticas por formar uma barreira física que impede e compete por enzimas, causando adsorção não-produtiva e as desativando (XIMENES et al., 2011), a remoção de lignina pode reduzir ou eliminar a inibição da hidrólise enzimática da celulose (YANG et al., 2004).

Ainda em relação aos resultados apresentados na Tabela 8, observa-se que a fração de celulose é consideravelmente superior à da hemicelulose na biomassa pré-tratada, o que mostra que pode ser interessante para a produção de etanol, já que em sua composição há uma quantidade significativa de açúcares.

Com o pré-tratamento NaOH 2% + H₂O₂ 5%, o aumento de celulose foi de 22,20%. As reduções totais no conteúdo percentual hemicelulósico e de lignina foram de 22,13% e 27,20%, respectivamente. Os valores de remoção observados podem ser considerados altos e satisfatórios, principalmente para a lignina, pois a deslignificação é essencial para a hidrólise enzimática subsequente, pois melhora a acessibilidade das enzimas à celulose (REYES et al., 1998). A utilização do NaOH e H₂O₂ na deslignificação foi relatada por Xu et al. (2010) e Barcelos et al. (2013), visto que ocorre uma maior eficiência na sacarificação enzimática, disponibilidades de açúcares e diminuição da carga enzimática no processo de hidrólise.

Valores superiores de remoção de lignina e hemicelulose foram obtidos por Assumpção et al., (2016), ao submeterem o bagaço de cana-de-açúcar ao pré-tratamento combinado com ácido sulfúrico diluído 1,45% (v/v), seguido da deslignificação com peróxido de hidrogênio 7,5% (v/v) e hidróxido de sódio 4,0% (v/v), A caracterização química foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por fibra detergente neutro (FDN) e por fibra detergente ácido (FDA). O pré-tratamento removeu 85,5% de lignina e 70,7% de hemicelulose. A cadeia celulósica foi preservada em 39,5 % e 45,1% pelas técnicas CLAE e FDA/FDN.

Sukumaran et al. (2009) estudaram pré-tratamento ácido e básico para posterior hidrólise enzimática da palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M, 121 °C por uma hora em autoclave. Verificaram que a deslignificação alcalina apresentou o maior rendimento em açúcares fermentescíveis. Em comparação ao tratamento ácido, a palha de arroz obteve maior rendimento em açúcares redutores em relação à cana-de-açúcar.

Diaz et al. (2013) avaliaram o pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio para a conversão da casca de arroz em açúcares simples através da hidrólise enzimática para a produção subsequente de etanol. Utilizaram três concentrações 2,5, 5 e 7,5% (w/v), 90 °C, por duas horas. A concentração de peróxido de hidrogênio mostrou um efeito positivo na degradação da estrutura lignocelulósica da casca de arroz, proporcionando maior acesso às enzimas. Assim, melhores rendimentos (soma do pré-tratamento e rendimentos de hidrólise) foram obtidos quando foi utilizada a concentração de 7,5%, obtendo um rendimento total de 86,48%.

5.5.1 Análise da casca de arroz por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 16 e Tabela 9 encontra-se representado o espectro de análises de FTIR da casca de arroz *in natura* e pré-tratada (T3), com exposição ao hidróxido de sódio (NaOH) 2% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5%.

No espectro FTIR foi avaliada a região 4000-500 cm⁻¹, com o objetivo de avaliar mudanças da casca de arroz provenientes do pré-tratamento da biomassa.

No presente estudo, verificou-se um pico inicial com frequência de 2994 cm⁻¹, evidenciando a presença de estruturas químicas que apresentam ligações tipo O-H e C-H, essas ligações estão representadas nas regiões que vai de 2700 cm⁻¹ a 3200 cm⁻¹. O estiramento O-H representa que o pré-tratamento alcalino quebrou as ligações O-H da extremidade não redutora da cadeia da celulose e hemicelulose. Ocorrem também picos de vibração de 1523 cm⁻¹, evidenciando a presença de lignina (C=C) e nas vibrações 920 e 829 ocorre presença de sílica (O-Si-O).

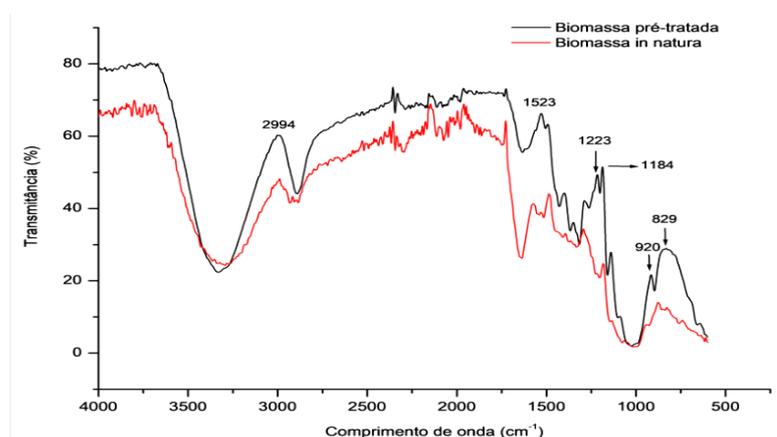


Figura 16 Espectro FTIR da casca de arroz *in natura* e pré-tratada (H₂O₂ 5% + NaOH 2%).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os relatados na literatura (Tabela 9), de acordo com Rosa et al. (2010); Em Shi et al. (2012), os agrupamentos C-C e C-O-C com intensidade entre 1115 e 1155 cm⁻¹ sugerem a presença de hemicelulose. Bandas com intensidade em 1420 cm⁻¹ e 1430 cm⁻¹ são importantes para identificar os componentes da celulose, correspondentes à estrutura amorfa e cristalina (BAHRIN et al. 2012). As bandas com intensidade de 1523 cm⁻¹ são características do anel aromático da lignina (SAVAGAN; 2010; SAMIR; BERGLUND et al. 2010). As bandas de intensidade 808 cm⁻¹ e 1100 cm⁻¹, indicam a presença de sílica (O-Si-O) (BAHRIN et al., 2012; SWANN; PATWARDHAN, 2011) Tabela 9).

Tabela 9 Indicação das bandas e componentes da biomassa lignocelulósica

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Vibração	Componente	Referências
808 e 1100	O-Si-O	Sílica	Bahrin et al., 2012; Swann; Patwardhan, 2011.
1510	C=C	Lignina	Savagan; Samir; Berglund et al., 2010;
1420 e 1430	C-O-C	Celulose	Yunus et al., 2012; Bahrin et al., 2012
1115 e 1155	C-C e C-O-C	Hemicelulose	Rosa et al., 2010; Shi et al., 2012.
2923	C-H	Compostos orgânicos: celulose, hemicelulose e lignina	Sócrates, 2004

Fonte: Souza (2014), com adaptações.

5.5.2 Cascas de arroz *in natura* e pré-tratada em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As cascas de arroz *in natura* e submetidas a pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio 2% (NaOH) e peróxido de hidrogênio 5% (H₂O₂) foram submetidas à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para verificar as mudanças estruturais na análise estrutural da casca do arroz *in natura* (Figura 17 A, C; Figura 18 A, C). Encontraram-se fragmentos com abundante deposição de sílica e compacta organização celular. Já na casca de arroz submetida ao pré-tratamento (Figura 17 B, D; Figura 18 B, D), observou-se remoção dos depósitos de sílica (Figura 17 D; Figura 18 B, D), além da descompactação das células superficiais e desorganização das microfibrilas de celulose nas paredes celulares, com a ocorrência de fissuras e poros (Figura 18 B, D).

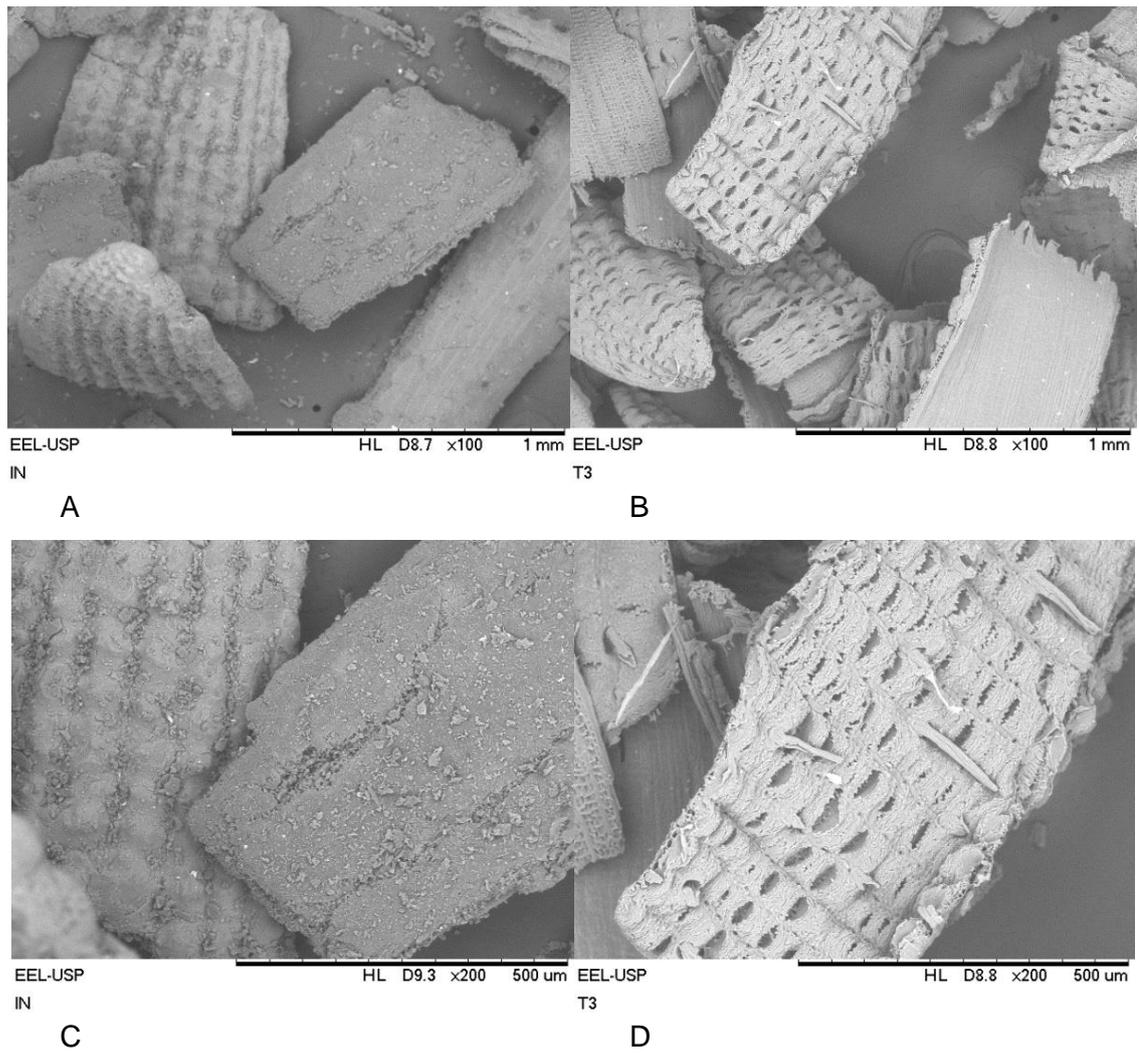


Figura 17 Micrografias da casca de arroz reduzidas a partículas de 50 mesh, obtidas por MEV. (A) *in natura* em aumento de 100 vezes; (C) *in natura* em aumento de 200 vezes; pré-tratada em aumento de 100 vezes (B); pré-tratada em aumento de 200 vezes (D).

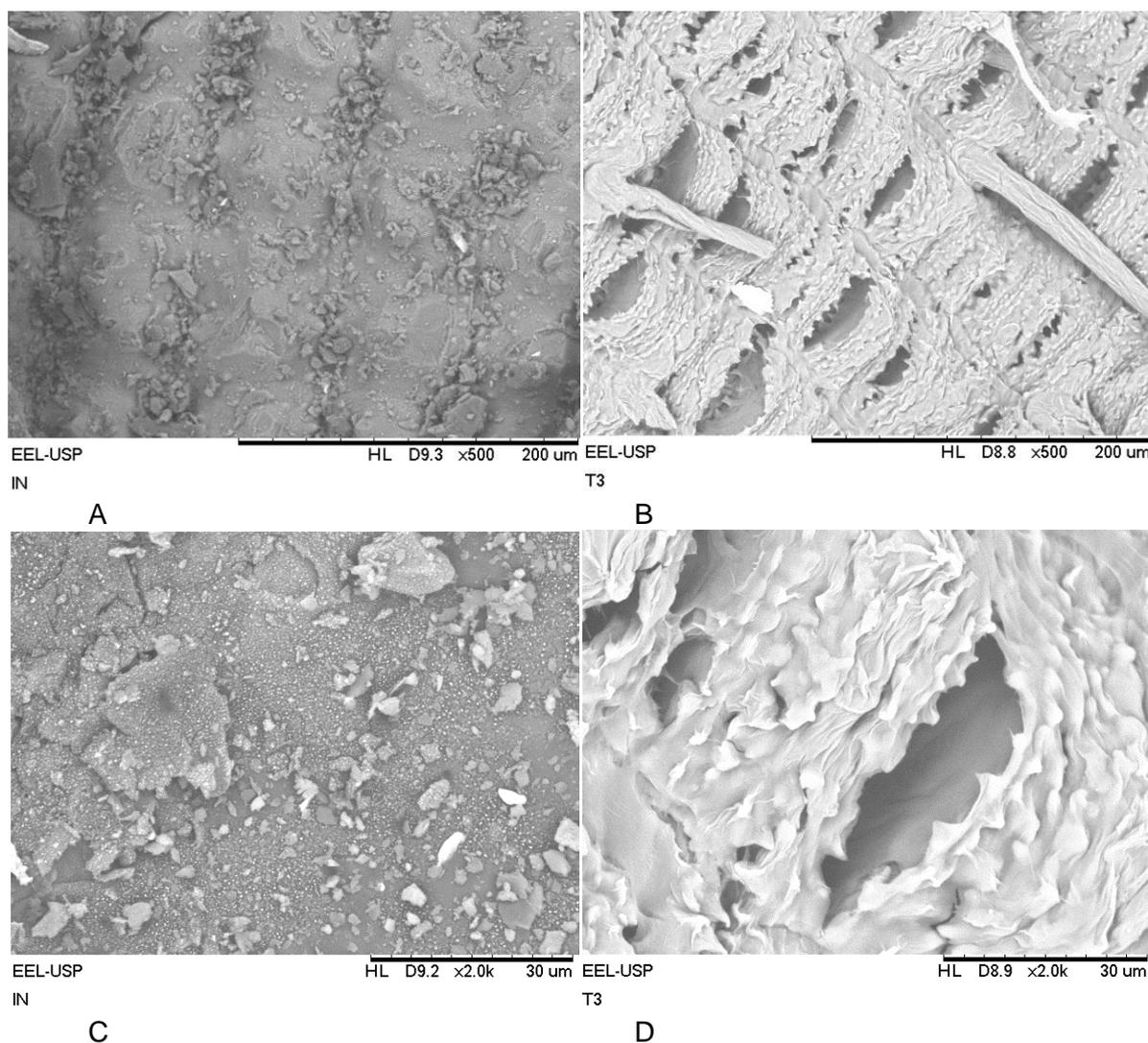


Figura 18 Micrografias da casca de arroz reduzidas a partículas de 50 mesh, obtidas por MEV. (A) *in natura* em aumento de 500 vezes; (C) *in natura* em aumento de 2000 vezes; pré-tratada em aumento de 500 vezes (B); pré-tratada em aumento de 2000 vezes (D).

5.6 Sacarificação simultânea à fermentação (SSF)

Na Figura 19 estão demonstrados os perfis de consumo de glicose, celobiose, xilose, e produção de etanol durante a SSF da casca de arroz pré-tratada com hidróxido de sódio 2% (NaOH) e peróxido de hidrogênio 5% (H₂O₂), utilizando-se a levedura *K. marxianus* nos diferentes meios de cultura, empregando 40 FPU/g de celulase. No processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), diferentemente do processo de sacarificação e fermentação separadas (SFS), a hidrólise e a fermentação ocorrem simultaneamente. Entretanto, antes de inocular a levedura e iniciar a fermentação, a biomassa foi submetida a uma pré-hidrólise, durante 4 horas. A função da pré-hidrólise é

fornecer uma fonte de carbono inicial para a levedura, uma vez que a biomassa está na forma de polímero que não é uma fonte de carbono diretamente fermentescível.

Observa-se que a concentração de glicose liberada no meio pela ação das enzimas se manteve praticamente nula partir do tempo 12 horas, não sendo possível detectar a concentração de glicose por CLAE, até as 96 horas da SSF, devido à elevada taxa de consumo deste açúcar pela levedura *K. marxianus*. Após a adição do inóculo observou-se que o perfil de consumo de glicose foi coincidente com a produção de etanol pela levedura *K. marxianus*. A glicose presente no meio foi totalmente consumida em 12 horas, apresentando em 24 horas a máxima produção de etanol de 10,21, 10,05, e 9,78 g/L, nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente, com um comportamento semelhante entre os três tratamentos.

O consumo de celobiose foi em média de 6,51%, já a xilose teve um maior consumo, 35,48% em média nos três tratamentos.

Ao se comparar a cinética do comportamento da produção de etanol por SSF nos meios testados, representada na Figura 19, é possível notar a semelhança entre os três tratamentos. Os resultados estatísticos ANOVA (Tabela 13), corroboram o que foi exposto anteriormente, pois não apontaram a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, indicando que o extrato de farelo de arroz pode ser usado como fonte de nutriente sem que ocorram prejuízos à produção de etanol, quando comparado aos nutrientes do meio YMP.

Em estudo realizado utilizando a cepa de *K. marxianus* CBS712, cultivada em meio contendo glicose e xilose como fonte de carbono, a fermentação do etanol e o consumo de açúcar foram verificados sob diferentes fontes de oxigênio (1,75%, 11,00% e 20,95% de O₂). Ao diminuir a quantidade de oxigênio, tanto a produção de biomassa como a taxa de utilização de açúcar foram progressivamente reduzidas. Em todas as condições testadas, o consumo de xilose acompanhou o esgotamento da glicose (SIGNORI et al., 2014). No entanto, no presente trabalho esse comportamento não foi observado visto que, para 12 horas, a glicose foi sendo consumida à medida que foi sendo liberada pela enzima.

Cabe-se ressaltar que o etanol foi provavelmente produzido a partir da glicose liberada, pois não se observou consumo significativo de xilose e celobiose (Figura 19).

Nachaiwieng et al. (2015) utilizaram em seu estudo a levedura *Kluyveromyces marxianus* CK8, utilizando como substrato casca de arroz a 9,44 (p/v), 45 °C, pH 4,2 por 96 horas de fermentação, na sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação em separado (SFS) e obtiveram uma produção de etanol de 15,40 g/L e 10,80 g/L, respectivamente, valores semelhantes aos observados neste estudo.

Castro e Roberto (2014), quando estudaram o processo de SSF da palha de arroz pré-tratada com ácido utilizando as leveduras *K. marxianus* NRRL Y- 6860 e

Saccharomyces cerevisiae a 30 e 45 °C, verificaram que *K. marxianus* NRRL Y- 6860 obteve uma maior eficiência, produzindo 21,5 g/L de etanol a partir de 51,3 g/L de glicose.

O processo SSF utilizando a levedura *K. marxianus* com uma concentração de palha de cevada 16% (p/v), em duas diferentes temperaturas 35 e 45 °C, resultou em uma produção de etanol 22,2 g/L e 34,3 g/L, respectivamente, em um período de 24 horas (KANG et al., 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho são menores que os obtidos por Camargo, Gomes e Sene (2014) que, ao utilizarem a mesma cepa *K. marxianus* ATCC 36907, obtiveram 27,88 g/L de etanol durante a SSF, empregando farelo de girassol.

LIN et al. (2013) avaliaram a produção de etanol a partir do bagaço de cana pré-tratada com NaOH por SSF utilizando *K. marxianus*, em que analisaram inicialmente a influência da temperatura (37, 42 e 45 °C). O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer. Obtiveram, para as temperaturas 37, 42 e 45°C, concentrações de etanol de 28,7, 26,5 e 23,7 g/L, respectivamente. Na segunda etapa, realizaram o experimento em biorreator a 42 °C, tendo como resposta maior concentração de etanol, 24,6 g/L, após 72 horas de fermentação.

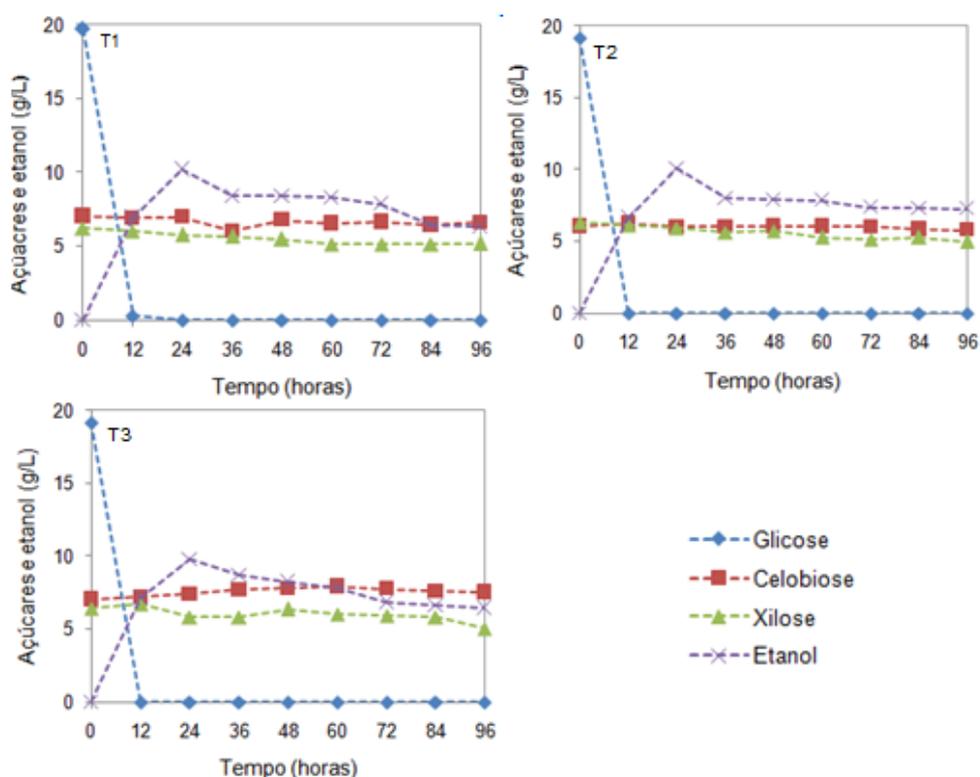


Figura 19 Variação das concentrações de glicose, celobiose, xilose e produção de etanol na SSF da casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* ATCC 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (T3).

5.6.1 Formação de subprodutos

Além da produção de etanol para os diferentes meios, também foi avaliada a produção de ácido acético e glicerol por *K. marxianus* durante a SSF, cujos resultados estão demonstrados na Figura 20. As concentrações de ácido acético aumentaram gradativamente, durante a fermentação, alcançando valores de 1,42, 1,54, 1,63 g/L ao final de 96 horas para os tratamentos T1, T2 e T3. Observou-se também uma pequena produção de glicerol no início, alcançando valores de 1,09, 0,96 e 0,95 g/L nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente.

Camargo, Gomes e Sene (2014) também observaram a formação de glicerol (0,96-2,62 g/L) como subprodutos, durante a SSF utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 para a produção de etanol, empregando a biomassa de farelo de girassol (8%) pré-tratada com 6% H₂SO₄ (m/v), 121 C, por 20 min.

Tavares et al. (2018) verificaram uma pequena produção de ácido acético, quando utilizaram a levedura *K. marxianus* para a produção de etanol utilizando 90 g/L de glicose, com concentração máxima de 1,5 g/l, permanecendo constante após 24 horas de fermentação.

Embora a formação de ácido acético sempre venha acompanhada do decréscimo do pH, no presente trabalho, por ter sido utilizado meio tamponado, não houve variação do pH (dados não mostrados).

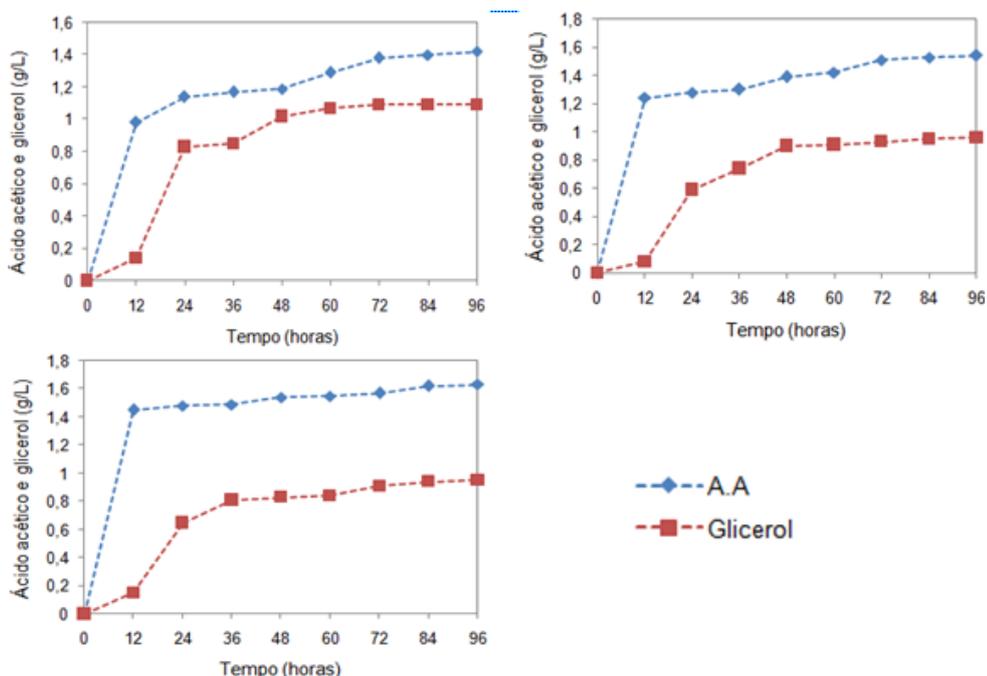


Figura 20 Concentração de ácido acético e glicerol em SSF de casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (T3).

5.6.2 Parâmetros fermentativos

Na Tabela 10 estão demonstrados os parâmetros fermentativos da SSF. A maior produção de etanol foi alcançada em 24 horas de fermentação nos três tratamentos, sendo que T1 apresentou a maior concentração de etanol (10,24 g/L). A produtividade volumétrica máxima em etanol (Q_P) de 0,61 g/L.h foi observada no tratamento T3, em 12 horas, seguido de T1 e T2, também em 12 horas. Os rendimentos máximos em etanol ($Y_{P/S}$) ficaram bem próximos entre os meios avaliados, tendo sido observados em 24 horas. Os valores de parâmetros fermentativos do processo de SSF através da casca de arroz pela levedura *K. marxianus* estão demonstrados na Tabela 10, pela comparação somente entre 12 e 24 horas de fermentação, período em que a produção foi maior para os três tratamentos em todos os parâmetros estudados, embora o processo tenha sido monitorado por 96 horas. A partir de 24 horas, observou-se consumo de etanol pela levedura, mesmo comportamento observado na parte I deste trabalho (Figura 9).

Castro e Roberto (2014), ao estudarem a sacarificação simultânea à fermentação de palha de arroz pré-tratada com ácido, a 30 e 45 °C, utilizaram *K. marxianus* NRRL Y-6860 e encontraram valores máximos de $Y_{P/S}$ 0,44 e 0,24 g/g, Q_P 3,63 e 3,63 g/L.h, respectivamente.

Tabela 10 Parâmetros fermentativos e máxima produção de etanol durante o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) de casca de arroz pré-tratada com *K. marxianus* ATCC 36907

Tratamento	T1		T2		T3	
	12 (h)	24 (h)	12 (h)	24 (h)	12 (h)	24 (h)
Fermentação (h) ^a	12 (h)	24 (h)	12 (h)	24 (h)	12 (h)	24 (h)
Etanol (g/L)	6,96	10,21	6,64	10,05	7,24	9,78
Glicose residual (g/L)	0,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,36	0,51	0,35	0,52	0,37	0,51
Q_P (g/L.h)	0,58	0,43	0,55	0,42	0,61	0,41

Notas: ^atempo em que foi observada a maior concentração de etanol;

$Y_{P/S}$: fator de conversão de glicose potencial em etanol;

Q_P : produtividade volumétrica total em etanol considerando o tempo de fermentação;

T1: tratamento com meio suplementado com YMP;

T2: tratamento com meio suplementado com farelo de arroz;

T3: tratamento com meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio.

5.7 Sacarificação e fermentação separadas (SFS)

5.7.1 Pré-sacarificação

Na Figura 21 está representada a formação de açúcares na pré-sacarificação da casca de arroz, realizada a 50 °C, 150 rpm, por um período de 72 horas. Nota-se que houve um aumento da concentração de glicose com o decorrer do tempo, passando de 20,41 g/L em meio suplementado com farelo de arroz (T2), 20,42 g/L em meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio (T2) e 22,15 (g/L) em meio YMP (T1) com 4 horas de processo para 63,92, 62,88, 62,97 (g/L), respectivamente, no final das 72 horas. O aumento na concentração de glicose foi semelhante entre os tratamentos, durante todo o período. Entre 60 e 72 horas a concentração de glicose foi constante, indicando o fim do processo de pré-sacarificação. O comportamento da liberação da xilose foi semelhante para os meios testados, com uma concentração máxima final de, aproximadamente, 6,4 g/L. No entanto, com relação à celobiose, verificou-se uma menor liberação quando se utilizou a biomassa pré-tratada em meio T2. Diferentemente da glicose e xilose, a liberação da celobiose se estabilizou após 24 horas, permanecendo constante até o final de 72 horas.

A biomassa pré-tratada com H₂O₂ 5% + NaOH 2% se mostrou adequada para a sacarificação enzimática e a enzima mostrou não sofrer interferência negativa pelos nutrientes do meio.

Diaz et al. (2013) avaliaram o pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio para a conversão da casca de arroz em açúcares simples através da hidrólise enzimática para a produção subsequente de etanol. Utilizaram três concentrações, 2,5, 5 e 7,5% (w/v), temperatura 90 °C, por duas horas. A concentração de peróxido de hidrogênio mostrou um efeito positivo na degradação da estrutura lignocelulósica da casca de arroz, proporcionando maior acesso às enzimas. Assim, melhores rendimentos (soma do pré-tratamento e rendimentos de hidrólise) foram obtidos quando se utilizou a concentração de 7,5% com um rendimento total de 86,48%.

A presença de açúcares na casca de arroz é fundamental para alcançar o rendimento de etanol desejado de *K. marxianus* durante a fermentação. Considerando que as leveduras requerem uma variedade de substâncias para a síntese de material celular e energia (como carbono, oxigênio, nitrogênio), a presença desses nutrientes é importante para um bom desempenho do microrganismo nos processos de fermentação (FERREIRA et al., 2011).

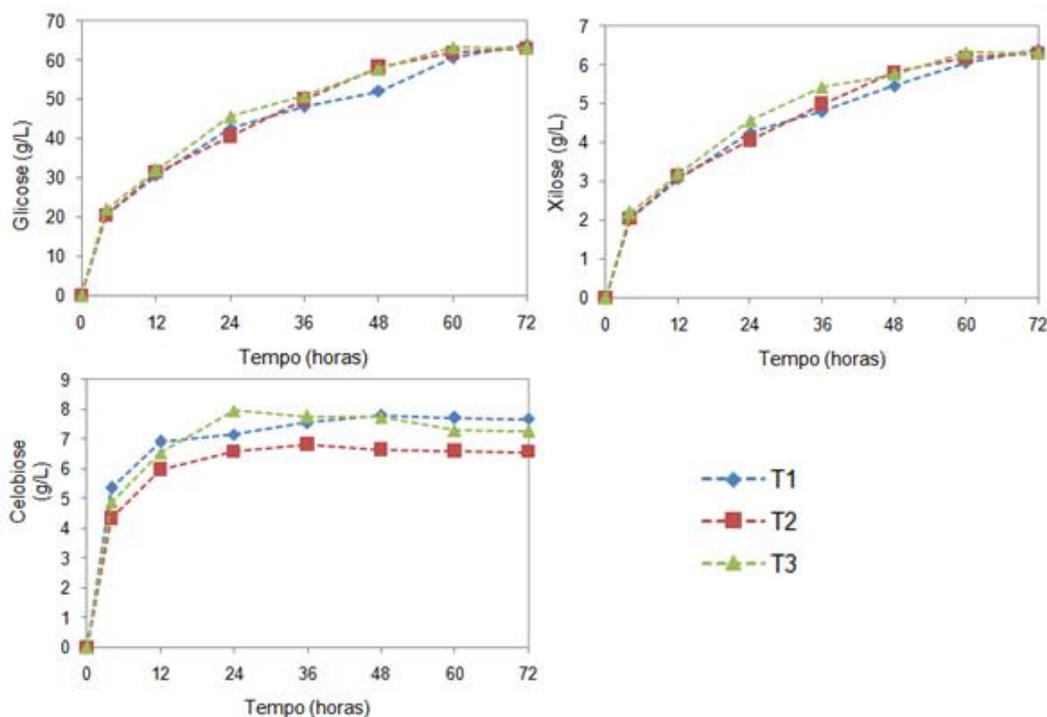


Figura 21 Concentração (g/L) de glicose, celobiose e xilose em função do tempo de pré-sacarificação da biomassa pré-tratada em meio YMP (T1); suplementado com farelo de arroz (T2); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T3).

As maiores velocidades de liberação de açúcares obtidas foram registradas nas primeiras 4 horas de reação, demonstrando que a eficiência do processo de pré-sacarificação quanto à estabilidade da enzima, concentração de produto liberado e ocorrência ou não de inibição depende do tempo de reação.

Diante disso, ao se avaliar a etapa da pré-sacarificação, quanto ao rendimento de açúcares em relação ao tempo, determinou-se o melhor momento para inocular a levedura e iniciar a fermentação. Definiu-se esse tempo como 72 horas, pois, foi nesse momento que a concentração de glicose atingiu maior valor, conforme experimentos prévios realizados, descritos no item 5.4.

5.7.2 Sacarificação e fermentação separadas (SFS)

Na Figura 22, pode-se observar que no início do processo fermentativo havia uma grande concentração de glicose (aproximadamente 63 g/L). A máxima produção de etanol ocorreu no tempo 24 horas, 13,08 g/L, quando a concentração de glicose já era praticamente nula, indicando utilização de todo substrato. Caso o processo ocorresse por mais tempo, não aumentaria a produção de etanol, pois não havia mais glicose no meio para ser fermentada. No momento em que toda a glicose é consumida, a atuação da

levedura diminui e a produção de etanol se estabiliza. Com o passar do tempo, a taxa de fermentação diminui e a levedura, não tendo mais glicose para consumir, começa a utilizar o etanol como fonte de carbono para sua manutenção.

O rápido consumo de glicose na SFS do presente trabalho também já foi observado por outros autores em estudos com a palha de arroz (CASTRO; ROBERTO, 2014) e bagaço de maçã (RODRIGUES et al., 2011). Castro (2014) verificou o consumo de 100% de glicose por *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi verificado no hidrolisado celulósico da palha de arroz obtido por hidrólise enzimática.

O consumo de etanol também foi verificado durante a SSF (Figura 19) e também na parte I deste trabalho (Figura 10), conforme já comentado.

O perfil cinético da produção etanol foi semelhante ao da SSF, com concentrações máximas observadas em 24 horas e consumo de etanol a partir desse período.

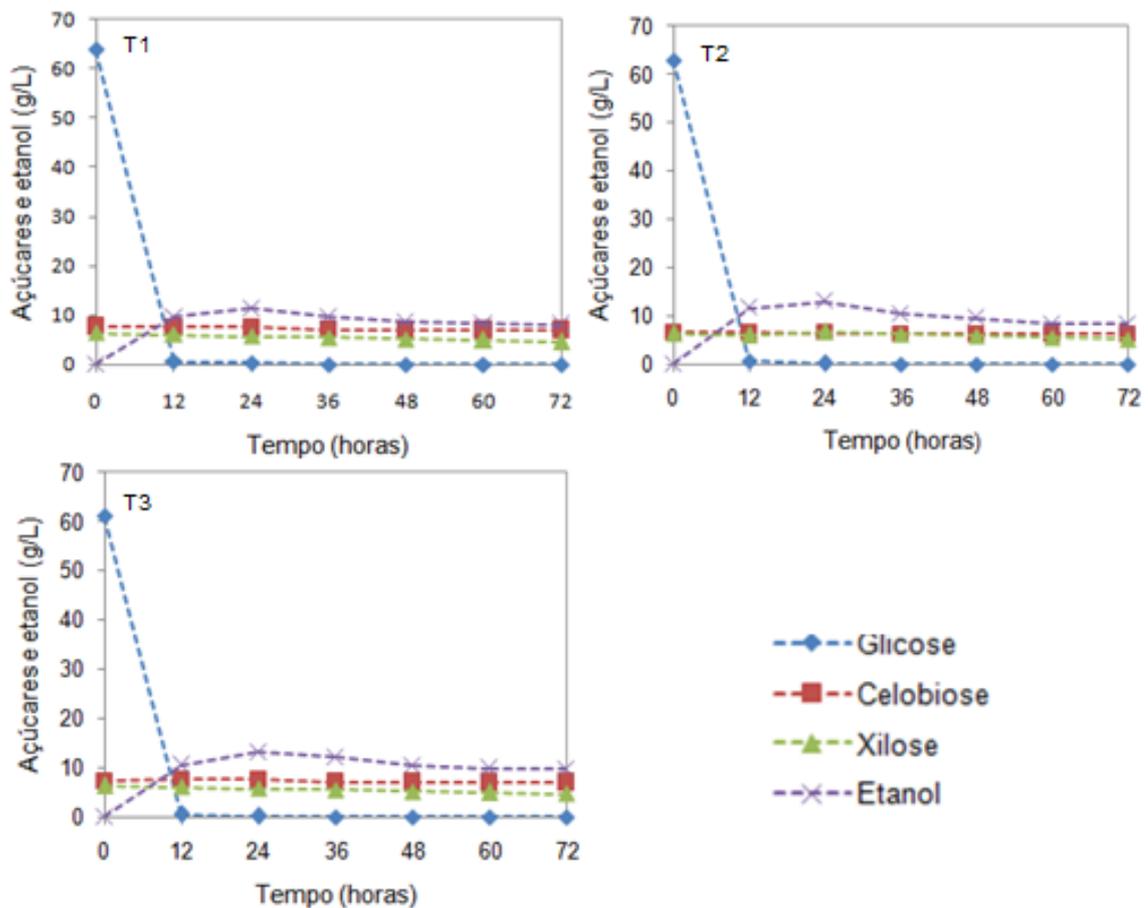


Figura 22 Variação das concentrações de glicose, celobiose, xilose e produção de etanol durante a SFS da casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* ATCC 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T3).

5.7.3 Formação de subprodutos

Os resultados da produção de ácido acético e glicerol na SFS por *K. marxianus* estão apresentados na Figura 23 e mostram que a produção de ácido acético no processo de SFS foi maior quando comparada à SSF, no qual obteve produção máxima de 1,63 g/L de ácido acético no tratamento em meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T2). As concentrações de ácido acético foram de 2,71, 2,81 e 3,31 g/L no tempo inicial, alcançando valores de 3,49, 3,41 e 4,22 g/L, em 72 horas de fermentação, para os tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente, valores superiores aos verificados na SSF. Wilkins et al. (2008) também relataram a formação de cerca de 2 g/L de ácido acético quando *K. marxianus* IMB 4 foi cultivada em meio contendo 20 g/L de glicose e xilose em SSF.

Observou-se que, a partir de 36 horas, houve formação de glicerol e, ao final da fermentação, uma concentração de 0,51, 0,50 e 0,22 g/L estava presente nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente, valores inferiores aos verificados na SSF.

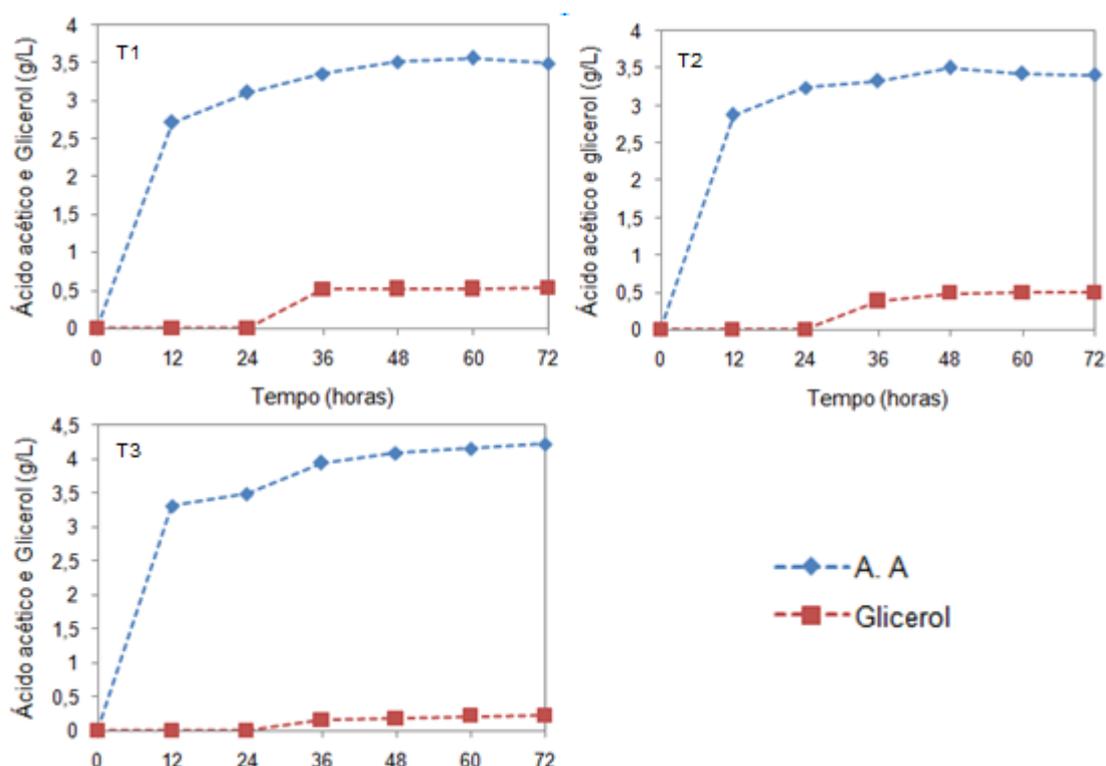


Figura 23 Concentração de ácido acético e glicerol durante a SFS da casca de arroz pré-tratada por *K. marxianus* ATCC 36907 em meio suplementado com YMP (T1); meio suplementado com farelo de arroz (T2); meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio (T3).

Na Tabela 11 estão demonstrados os parâmetros fermentativos obtidos na SFS, para os tratamentos T1, T2 e T3. Os resultados mais satisfatórios, em termos de produção de

etanol, foram observados em 24 horas de fermentação, com um máximo de 13,08 g/L, observado para T3. O valor máximo de produtividade foi observado para T2 (0,96 g/L.h), com 12 horas de fermentação.

Com relação ao rendimento em etanol $Y_{P/S}$ (g/g) e Q_P (g/L.h) os valores observados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 Parâmetros fermentativos e máxima produção de etanol durante o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SFS) de casca de arroz pré-tratada com *K. marxianus* ATCC 36907

Tratamento	T1		T2		T3	
Fermentação (h) ^a	12 (h)	24 (h)	12 (h)	24 (h)	12 (h)	24 (h)
Etanol (g/L)	9,63	11,36	11,61	12,96	10,51	13,08
Glicose residual (g/L)	0,58	0,41	0,61	0,11	0,42	0,20
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,15	0,18	0,19	0,21	0,17	0,21
Q_P (g/L.h)	0,80	0,47	0,96	0,54	0,88	0,55

Notas: ^atempo em que foi observada a maior concentração de etanol;

$Y_{P/S}$: fator de conversão de glicose potencial em etanol;

Q_P : produtividade volumétrica total em etanol considerando o tempo de fermentação;

T1: tratamento com meio suplementado com YMP;

T2: tratamento com meio suplementado com farelo de arroz;

T3: tratamento com meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio.

5.8 Comparação da produção de etanol entre os métodos SSF e SFS

Diante dos resultados obtidos nas diferentes estratégias de sacarificação e fermentação empregando *K. marxianus* ATCC 36907, considerou-se importante realizar uma comparação da produção de etanol entre elas, apresentada na Figura 24.

O perfil fermentativo apresentado pelo método SSF foi similar ao observado no método SFS, em que grande parte do substrato foi consumido nas primeiras 12 horas de fermentação, apesar de que no método SFS a concentração inicial de glicose tenha sido muito superior, aproximadamente 60 g/L na SFS e 20 g/L na SSF. Entretanto, a maior produção de etanol foi observada após 24 horas de fermentação, com a máxima concentração de etanol de 11,61 g/L na SSF e 13,06 g/L na SFS. É importante ressaltar que mesmo com uma concentração inicial maior de açúcar, não houve produção significativa de etanol, com rendimentos ($Y_{P/S}$) baixos, variando entre 0,15 a 0,20 g/g.

Saha e Cotta (2008) avaliaram a produção de etanol por *Escherichia coli* em casca de arroz 15 % (p/p) pré-tratada com 7,5% de H₂O₂ (v/v), pH 6,5, 35 °C em 24 horas no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF), no processo sacarificação e

fermentação separados (SFS) realizados a 45 °C e pH 5,0 por 48 horas, obtendo a concentração de etanol de 8,2 na SSF e 8,0 g/L na SFS, resultados inferiores aos encontrados no presente experimento que foram de 10,21 e 13,07 g/L na SSF e SFS, respectivamente.

GARCÍA-APARICIO et al. (2011) estudaram a palha de cevada pré-tratada por explosão a vapor com diferentes cargas de substrato (2-15 % m/v), utilizando a levedura *K. marxianus* CECT 10875 em processos de SFS e SSF. No processo SFS a 42 °C com concentração inicial de glicose de 56,4 g/L, os autores obtiveram maior concentração de etanol de 23 g/L, após 72 horas de fermentação com carga de 15 % de substrato, com a mesma carga ao avaliarem o processo SSF a concentração de etanol aumentou para 29 g/L.

Dahnum et al. (2015) estudaram o desempenho dos processos de SSF e SFS para a obtenção do etanol a partir de cascas de frutas, avaliaram diferentes cargas enzimáticas (10, 20, 30 e 40 FPU/g de biomassa). Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer agitados. Os resultados demonstraram que, quando se utilizou a maior carga enzimática (40 FPU), foi produzido 6,05 % de etanol em 24 horas de fermentação pelo processo SSF e 4,74% de etanol, em 72 horas de fermentação pelo processo SFS. Portanto, nesse trabalho, considerou-se que o método SSF é mais eficiente devido à rápida produção e maior concentração de etanol produzido.

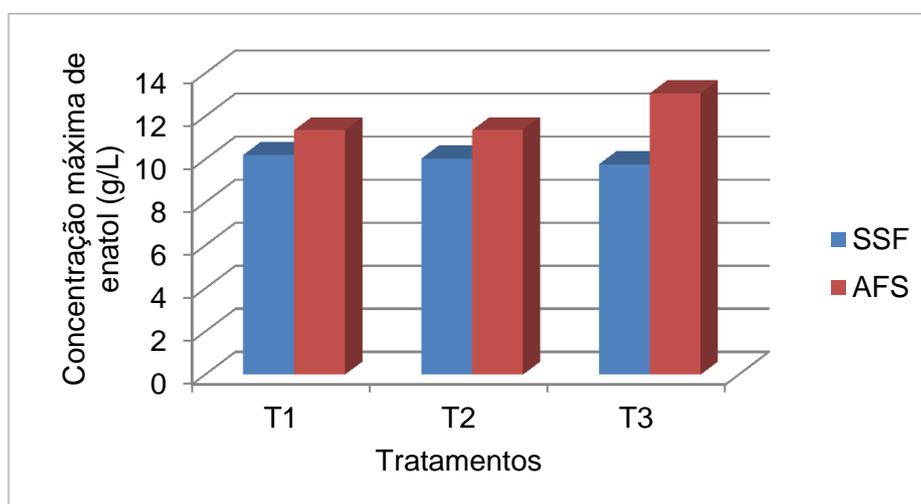


Figura 24 Comparação da concentração máxima de etanol nos processos de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e sacarificação e fermentação separadas (SFS).

Por meio de análise estatística (Tabela 12), observou-se que não ocorreu interação das variáveis de SSF e SFS e tratamentos com diferentes meios ($F = 3,516$). Deste modo, as variáveis foram analisadas de forma independente, verificando que os processos utilizados para sacarificação apresentaram níveis de significância ($F = 48,109$).

Tabela 12 Análise de variância (ANOVA) para análise da produtividade volumétrica máxima dos processos em SFS (sacarificação e fermentação separadas) e SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) em 24 de fermentação comparando os diferentes meios de cultura

Fontes de Variação	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F _{calculado}	p-valor
Fermentação	36,089	1	36,089	48,109	0,00002
Nutrientes	2,467	2	1,233	1,644	0,220
Fermentação * Nutrientes	5,275	2	2,637	3,516	0,051
Erro	13,503	18	0,750		

Nota: ^a soma dos quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios.

Na SFS parte do açúcar consumido foi direcionada para uma maior produção de ácido acético. Em ambos os processos, verificou-se a importância de encerrar a produção em 24 horas, pois, a partir desse momento, o etanol passa a ser consumido. Quanto à produção de biomassa, está não pôde ser monitorada devido à turbidez do meio e presença de partículas de biomassa que dificultaram a análise por turbidimetria e contagem microscópica.

Em relação à produção máxima de etanol (Tabela 13), verificou-se que a SFS apresentou maior produção de etanol em todos os tratamentos, no entanto, apenas nos tratamentos T2 e T3 houve diferença estatística entre os dois processos de fermentação.

Tabela 13 Análise de variância (ANOVA) para análise da produção máxima de etanol dos processos em SFS (sacarificação e fermentação separadas) e SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) em 24 de fermentação

Tratamentos	T1	T2	T3
SSF	10,21 aA	10,04 aB	9,78 aB
SFS	11,36 aA	12,96 aA	13,07 aA*

Notas: *Medias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

T1: tratamento com meio YMP;

T2: tratamento com meio suplementado com farelo de arroz;

T3: tratamento com meio suplementado com farelo de arroz + CaCl₂ + sulfato de amônio

6 CONCLUSÕES

Ao avaliar o farelo e a casca de arroz como matérias primas para a produção de etanol de segunda geração, conclui-se que:

- A levedura *K. marxianus*, quando cultivada em meio suplementado com extrato hidrossolúvel de farelo de arroz e meio suplementado com farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio teve desempenho semelhante ao meio comercial YMP, com concentrações máximas de etanol de 25,50, 25,0 e 24,88 g/L, respectivamente;
- O pré-tratamento alcalino NaOH 2% + H_2O_2 5% foi o que proporcionou maior recuperação de celulose;
- O farelo de arroz mostrou-se uma fonte viável e de baixo custo de nitrogênio para o crescimento e produção de etanol por *K. marxianus*, podendo, portanto, ser utilizada em substituição ao YMP;
- O perfil fermentativo apresentado pelo método SSF foi similar ao observado no método SFS, em que grande parte da glicose liberada foi consumida nas primeiras 12 horas de fermentação. Entretanto, a maior produção de etanol foi observada após 24 horas de fermentação, com a máxima concentração de etanol de 11,61 g/L na SSF e 13,06 g/L na SFS. Em ambas as técnicas, SSF e SFS, observou-se consumo de etanol após 24 horas, devido ao esgotamento da glicose, embora outras fontes de carbono como xilose e celobiose ainda estivessem presentes no meio;
- Os rendimentos $Y_{P/S}$ foram menores na SFS do que na SSF, provavelmente porque o substrato foi direcionado para maior produção de ácido acético e biomassa na SSF. Não foram observadas diferenças nos rendimentos quanto aos nutrientes YMP, farelo de arroz, e farelo de arroz + CaCl_2 + sulfato de amônio utilizados na SSF e SFS;
- A casca de arroz mostrou-se uma biomassa alternativa para produção de etanol por *K. marxianus* pelos métodos SSF e SFS, em meio suplementado com farelo de arroz ou YMP.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para a composição química da casca de arroz foram semelhantes aos disponíveis na literatura. Estes resultados revelaram um alto teor de celulose, fator importantes para o bom desempenho na produção de etanol de segunda geração.

O pré-tratamento alcalino foi bastante eficiente na separação dos três principais componentes da casca do arroz, pois, além de promover uma maior solubilização das hemiceluloses e boa recuperação de glicose após o pré-tratamento, aumentou a acessibilidade da celulose, fator importante para maximizar o rendimento na produção de etanol celulósico.

Entretanto, ainda se faz necessário avaliar diferentes pré-tratamentos na casca de arroz que possibilitem aumentar a acessibilidade da celulose às enzimas, visando aumentar o rendimento da hidrólise, promovendo maior liberação da glicose a partir da casca de arroz.

Avaliar outros fatores que interferem na produção de etanol por *K. marxianus* ATCC 36907, tanto em meio sintético quanto a partir da casca de arroz, tais como: tolerância ao etanol, necessidades nutricionais e um estudo mais aprofundado sobre as condições de oxigenação requerida por esta levedura.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; ANSUMALI, S. Global potential of rice husk as a renewable feedstock for ethanol biofuel production, **BioEnergy Research**, v. 3, p. 328-334, 2010.

AGÊNCIA BRASIL- **Etanol deve alcançar recorde de produção com 33,14 bilhões de litros**. 2018. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2019-04/etanol-deve-alcancar-recorde-de-producao-com-3358-bilhoes-de-litros>> Acesso em: 10 jan. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Produção de derivados de petróleo e processamento de gás natural**. 2018. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-derivados-de-petroleo-e-processamento-de-gas-natural>> Acesso em: 07 de jan, 2019.

AGROLINK – **Síntese das projeções do agronegócio 2011- 2021 do Mapa**. 2019. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/sintese-das-projecoes-do-agronegocio-2011-2021-do-mapa_133166.html#. Acesso em: 10 jan. 2019.

ALENCAR, M. L. C. B.; ALVARENGA, M. G. Farelo de arroz (I): composição química e seu potencial como alimento. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba - PR, v. 34, n. 1, p. 95-9 108, 1991.

AMIN, F. R.; KHALID, H.; ZHANG, H.; RAHMAN, S. ZHANG, R.; LIU, G.; CHEN, C. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **Amb Express**, v.7, n. 72, p. 1-12, 2017.

AMISSAH, J. G. N.; ELLES, W. O.; ODURO, I.; MANFUL, J. T. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control**, v. 14, p. 21-24 2003.

AMORES, I.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; SÁEZ, F.; MICHELENA, G.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. **Electronic Journal of Energy & Environment**, Temuco, v. 1, n. 1, p. 25-36, 2013.

ARAMRUEANG, N.; ZICARI, S. M. ZHANG, R. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of sugar beet leaves into fermentable sugars for bioethanol production. **Scientific Research Publishing**, n. 8, p. 51-67, 2017.

ARGYROPOULOS, D.S.; MENACHEM, S.B. In: Kaplan, D. L. (Ed.), **Biopolymers from renewable resources**. Springer, Berlin, 1998. 292 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington, 1995. v. 2, 474p.

ASSUMPÇÃO, S. M. N.; PONTES, L. A. M.; CARVALHO, L. S.; CAMPOS, L. M. A.; ANDRADE, J. C. F.; SILVA, E. G. Pré-Tratamento combinado H₂SO₄/H₂O₂/NaOH para obtenção das frações lignocelulósicas do bagaço da cana-de-açúcar. **Revista Virtual da Química**, Niterói - RJ, v.8, n. 3, p. 803-822, 2016.

AZEVEDO, V. Q.; SILVA, C. F. L.; LEMÔES, J. S. FARIAS, S. P. Caracterização de biomassa visando à produção de etanol de segunda geração. **Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade**, n.2, v.2, p.61-65, 2016.

AZIZ, S.; JALAL, F. ; NAWAZ, M.; NIAZ, B.; SHAH, F. A.; MEMON, M. H. R.; LAFIF, F.; NADEEM, S.; BAJOKA, M. I. Hyper production and Thermal Characterization of a novel

invertase from a double mutant derivative of *Kluyveromyces marxianus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 465-473, 2011

BAHRIN, E. K.; BAHARUDDIN, A. S.; IBRAHIM, M. F.; RAZAK, M. N. A.; SULAIMAN, A.; ABD- AZIZ, S.; HASSAN, M. A.; SHIRAI, Y.; NISHIDA, H. Physicochemical property changes and enzymatic hydrolysis enhancement of oil palm empty fruit bunches treated with superheated steam. **BioResources**, v.7, n. 2, p. 1784-1801, 2012.

BAKAR, B. H. A.; PUTRAJAYAC, R.; ABDULAZIZ, H. Malaysian rice husk ash – improving the durability and corrosion resistance of concrete: pre-review. **Concrete Research Letters**, v. 1, p. 6-13, 2010.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 852-875, 2011.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1843-1848, 2004.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL – BNDES. **Etanol 2G**: inovação em biocombustíveis. Disponível em: <https://www.bndes.gov.br/wps/portal/site/home/conhecimento/noticias/noticia/etanol-2g-inovacao-biocombustiveis>>. Acesso em: 24 jan. 2019.

BARAKAT, A.; MAYER-LAIGLE, C.; SOLHY, A.; ARANCON, R. A. D.; VRIES, H.; LUQUE, R. Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. **View article Online**, v. 4, n. 89, p. 48109–48127, 2014.

BARAKAT, A.; VRIES, H.; ROUAU, X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 362-373, 2013.

BARCELOS, C.A.; MAEDA, R.N.; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA-JR, N. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste and Biomass Valorization**, Netherlands, v. 4,n. 2, p.341-346,2013.

BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria - RS, v. 19, n. 2, p. 1365-1391, 2015.

BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, E. M. Arroz como alimento. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 222, p. 101-108, 2004.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN., V.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY. S. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**. v.101, n. 13, p.4767-4774. 2010.

BONDESSON, P.-M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 11, 2013.

BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Research**, p. 1-17, 2011.

BRUNECKY, R.; HOBDEY, S. E.; TAYLOR, L. E.; TAO, L.; TUCKER, M. P.; HIMMEL, M. E.; DECKER, S. R. High temperature pre-digestion of corn stover biomass for improved product yields. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 170, p. 1-7, 2014.

BURANOV, A.U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v.28, p.237-259, 2008.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. 1 ed. Botucatu/SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, 2002. 430 p.

CAMARGO, D.; SENE, L.; VARIZ, D. I.; FELIPE, M. G. A. Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorghum forage biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 175, n. 8, p. 3628-3642, 2015.

CAMARGO, D; GOMES, S. D.; SENE, L. Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 11, p. 2235 - 2242, 2014.

CANELLA, D.; HSIEH, C. C.; FELBY, A. JORGENSEN, H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content, **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 26, p. 1-10 , 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 333-336, 2008.

CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T.; QUEIROZ, J. H. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, v. 56, p. 64-76, 2012.

CARVALHO, J. L. V.; BASSINELLO, P. Z. Aproveitamento industrial. *In*: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. 2. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. Cap. 24. p. 1007-1042.

CARVALHO, J. L. V.; VIEIRA, N.R. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. Cap.22, p.605-621.

CASTRO, R. C. A.; ROBERTO, I. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1553-1564, 2014.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ENERGIA E MATERIAIS – CNPEM. 2017. **Etanol de segunda geração tem menos custo**. Disponível em: <<http://cnpem.br/etanol-de-segunda-geracao-tem-menor-custo/>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

CHANDEL, A. K.; RAJEEV, K.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and whet straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 135-159, 1998.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização de bioprocessos. **Nucleous**, Ituverava - SP, v. 6, n. 2, p. 1-14, 2009.

CHEN, H-Z.; LIU, Z-H. Multilevel composition fractionation process for high-value utilization of wheat straw cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 137, 2014.

CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R.; KESHWANI, D.; CHEN, C. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochem. Biotechnology**, v. 142, p. 276-290, 2007.

CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOLMES, J.; U, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, n.8, p. 1-10, 2013.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, G. R. Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. **Renewable Energy**, v. 36, p. 3541-3549, 2011.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, 2010.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 342-346, 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**. Safra 2015/2016 – Produtos de verão, Brasília, DF, v.3, p. 1-130. 2015.

COSTA, D. A. **Caracterização de leveduras termotolerantes para a produção de etanol celulósico**. 2011. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.

CROCKER, M.; ANDREWS, R. The rationale for biofuels, in: CROCKER (Ed.), Thermochemical conversion of biomass to liquid fuels and chemicals, **Royal Society of Chemistry**, p. 1-25, 2010.

CRUZ, S. F. **Síntese e caracterização de metilcelulose produzida a partir do caroço de manga para aplicação como aditivo em argamassas**. 2011. 114 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R. SEHNEM, N. T.; SOUZA-CRUZ, P. B. ROSA, C. A. AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218- 4225, 2011.

DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 363-368, 2013.

DAHNUM, D.; TASUN, S. O.; TRIWAHYUNI, E.; NURDIN, M.; ABIMANYU, H. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. **Energy Procedia**, v. 68, p. 107-116, 2015.

DALANHOL, K. C. F. Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. Dissertação em biotecnologia Industrial. LORENA, SP, 2014.

DIAS, L. C. G. D.; REYES, F.; CAMARGO, J. L. V.; RODRIGUES, M. A. M. Conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina no farelo de arroz fresco. **Revista Nutrição**, PUCCamp, v. 7, p. 62-71, 1994.

DIAZ, A.; TOULLEC, J. L.; BLANDINO, Q.; ORY, I.; CARO, I. Pretreatment of rice hulls with with alkaline peroxide to enhance enzyme hydrolysis for ethanol production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 949-957, 2013.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, (S. I.), v. 1, p. 2–17, 2009.

DUPONT, J. On the Solid, Liquid and Solution Structural Organization of Imidazolium Ionic Liquids, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 3, P. 341-350, 2004.

EQRA, N.; AJABSHIRCHI, Y.; SARSHAR, M. Effect of azonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of sugarcane bagasse. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. 16, n. 1, p. 151-156, 2014.

FELIX, E.; TILLEY, D. Integrated energy, environmental and financial analysis of ethanol production from cellulosic switchgrass. **Energy**, v. 34, n. 4, p. 410-435, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

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

FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 339–354, v. 79, 2008.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. **Chemical of Engineering**, v. 108, p. 41-65, 2007.

GALLO, J.M.R.; BUENO, J.M.C.; SCHUCHARDT, U. Catalytic transformations of ethanol for biorefineries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 2229-2243, 2014.

GARCÍA-APARÍCIO, A. M. P.; OLIVA, J. M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLES, A.; NEGRO, M. J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, **Fuel**, v. 90, p. 1624-1630, 2011.

GASPAR, M.; KÁLMÁN, G.; RÉCZEY, K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1135–1139, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, North Carolina, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4775-4800, 2010.

GÓMES, S. M. R.; ANDRANDE, R. R.; SANTANDER, C. G.; COSTA, A. C.; MACIEL, R. F. Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 321-326, 2010.

GUPTA, V. K. et al. Application of low-cost adsorbents for dye removal: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2313-2342, 2009.

HERGERT, H.L. Condensed tannins in adhesives: introduction and historical perspectives. In: HEMINGWAY, R.W. et al. (Eds.) Adhesives from renewable resources. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1989. p. 155-171.

HOFFPAUER, D. W. New applications for whole rice bran. **Cereal Foods World**, v.50, n. 4, p. 173 – 174, 2005.

HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. **Journal Biotechnol.**, v. 130, n. 2, p. 114-123, 2007.

HUANG, S. C.; SHIAU, C. Y.; LIU, T. E.; CHU, C. L.; HWANG, D. F. Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. **Meat Science**, v. 70, p. 621-626, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. Ed., 1 ed. Digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JOSHI, G.; SHUKLA, A.; SHUKLA, A. Synergistic response of auxin and ethylene on physiology of *Jatropha curcas* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 67-77, 2011.

JUNGINGER, M.; GOH, C. F.; FAAIJ, A. **International bioenergy trade: history, status & outlook on securing sustainable bioenergy supply, demand and markets**. New York: Ed. Springer, 2010.

KAHLON T. S. Rice bran: production, composition, functionality and food applications, physiological benefits. In: CHO, S. S.; SAMUEL, P. **Fiber ingredients: food applications and health benefits**. Florida: CRC; 2009. p. 305-316.

KANG, H. W.; KIM, Y.; KIM, S. W.; CHOI, G. W. Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, p. 115-122, 2012

KAUR, U.; OBEROI, H. S.; BHARGAV, V. K.; SHIVAPPA, R. S.; DHALIWAL, S. S. Ethanol production from alkali-andozone-treated cotton stalks using thermotolerant pichia kudriavzevii HOP-1. **Industrial Crops and Products**, v.37, p. 219-226, 2012.

KIM, S. R.; SKERKER, J. M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A. P.; JIN, Y. S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; Boekhout, T. Summary of species characteristics. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The yeasts: a taxonomic study* p. 223-277, 2011.

LABORATÓRIO NACIONAL DE CIENCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL – CTBE. 2017. **Etanol de segunda geração poderá ser economicamente viável a partir de 2025.** Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/etanol-de-segunda-geracao-podera-ser-economicamente-viavel-a-partir-de-2025/26272/>>. Acesso em: 12 jan. 2019

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R; WOLFE, K.H.; O'BYRNE C.P.; MORRISSEY J.P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Stuttgart, n. 100, p. 507-519, 2011.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 17–26, 2010.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; Rodman, D.; The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, 23, pp. 367-380 (2002).

LEBRON, Y. A. R.; DIAS, G. D.; BERNARDONI, K. B.; SANTOS, K.; FREIRE, S.; MOREIRA, V. R. PALLADINO, F. Evaluation of Rice bran as supplement in the fermentation process using *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bioethanol. **The Biomass and Bioenergy Congress**, Universidade Federal de Lavras, 2018.

LEE, Y. J. **Oxidation of sugarcane bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide.** Thesis. Master of Science (MS). State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2005.

LIM, J. S.; ABDUL MANAN, Z.; WAN ALWI, S. R.; HASHIM.H. A. Review on utilization of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.16, p.3084–3094, 2012.

LORA, E. E. S.; CORAL, D. D. S. O.; ROCHA, M. H. Plataformas termoquímica e bioquímica para uso da biomassa, concepção; **Rendimentos e Economia**, p. 1-18, 2008.

LUDUEÑA, L.; FASCE, D.; ALVAREZ, D.F.; STEFANI, P. B. Nanocellulose from rice husk following alkaline treatment to remove silica, **BioResources**, v. 6, p. 1440-1454, 2011.

LYNAM, J. G.; REZA, M. T.; VASQUEZ, V. R.; CORONELLA, C. J. Pretreatment of rice hulls by ionic liquid dissolution. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 629-636, 2012.

MARTINIANO, S. E.; PHILIPPINI, R. R.; CHANDEL, A. K.; ROSA, C. A.; PAGNOCCA, SILVA, S. S. Evaluation of Rice Bran Extract as a Nitrogen Source for Improved Hemicellulosic Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by New Xylose-Fermenting Yeast Strains Isolated from Brazilian Forests. **Sugar Tech**, v. 16, p. 1-8, 2013.

McINTOSH, S.; VANCOV, T. Optimization of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 3094- 3103, 2011.

McMILLAN, J. Enzymatic conversion of biomass for fuels production. *In*: Himmel M, Baker J, Overend R, editors. **Pretreatment of lignocellulosic biomass**. Washington, DC: American Chemical Society; 1994. p. 292 e 324.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose 56 accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 150-158, 2014.

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

MIAH, M. A. S.; JABIN, S. A.; ABEDIN, N.; ARA, U. Nutritional composition and stabilization of local variety rice bran BRRI-28. **International Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 5, p. 306-313, 2014.

MILESSI, T.; ANTUNES, A. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate, **Biotech**, v. 3, n. 5, p.373-379, 2013.

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

MINAS GERAIS. Companhia Energética de Minas Gerais - CEMIG. **Alternativas energéticas: uma visão CEMIG**. Belo Horizonte, 2011. 373 p.

MIURA, T.; LEE, TS-H.; INOUE, S.; ENDO, T. Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 182-186, 2012.

MOCHIDZUKI, K.; KOBAYASHI, S.; WANG, H.; HATANAKA, R.; HIRAIDE. Effect of Rice Bran as a Nitrogen and Carbohydrate Source on Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Bioethanol from Rice Straw. **Journal of the Japan institute of Energy**, n. 94, p. 151-158, 2015.

MONCADA, J.; TAMAYO, J. A.; CARDONA, C. A.; Integrating first, second, and third generation biorefineries: Incorporating microalgae into the sugarcane biorefinery, **Chemical Engineering Science**, v. 118, p. 126-140, 2014.

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

MOON, H. M.; JEONG, H. R.; KIM, D. H. Bioethanol production from acid-pretreated rice hull. **Journal of Chemical Engineering**, v. 7, p. 2016-211, 2010.

MORAIS, S.; MORANG, E.; BARAK Y.; GOLDMAN, D.; HADAR, Y.; LAMED, R.; SHOHAM, Y.; WILSON, D. B.; BAYER, E. A. . Deconstruction of lignocellulose into soluble sugars by native and designer cellulosomes. **MBio**, v. 3, n. 6, p.1-12, 2012.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLZAPPLER, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MSHANDETE, A.; BJORNSSON, L.; KIVAISI, A. K.; RUBINDAMAYUGI M.S.T.; MATTIASSON B. Effect of particle size on biogas yield from sisal fiber waste. **Renewable Energy**, v. 31, p. 2385- 2392, 2006.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3801-3806, 2005.

MUSSATTO, S. I. Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic. **Feedstock Based Biorefinery**, p. 1-15, 2016.

NACHAIWIENG, W.; LUMYONG, S.; YOSHIOKA, K.; WATANABE, T.; KLANONGNUCH, C. Bioethanol production from rice husk under elevated temperature simultaneous saccharification and fermentation using *Kluyveromyces marxianus* CK8. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. p.543–549, 2015.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

NIKZAD, M.; MOVAGHARNEJAD, K.; NAJAFPOUR, G. D.; TALEBNIA, F. Comparative studies on the Effect of Pretreatment of Rice Husk on Enzymatic Digestibility and Bioethanol Production. **International Journal of Engineering**, v. 26, n. 5, p. 455-464, 2013.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS, A. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato** v. 14 n. 2, p.113-238, 2013.

ODA, Y.; NAKAMURA K, SHINOMIYA, N.; OHBA, K. Ethanol fermentation of sugar beet thick juice diluted with crude cheese whey by the flex yeast *Kluyveromyces marxianus* KD-15. **Biomass Bioenerg.** v. 34, p. 1263-1266, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, São Paulo, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO. FAO, 2018.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

PEREIRA JUNIOR, N. Biorrefinarias. Rota bioquímica. *In*: MELO, L. C. P. **Química verde no Brasil: 2010-2030**. Brasília: Centro de Gestão e estudos Estratégicos – CGEE, 2010. p. 19-76.

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

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise Enzimática de Casca de Arroz Utilizando-se Celulases, Efeitos de Tratamentos Químicos e Fotoquímicos. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 21, n. 2, p. 141-144, agosto 1997.

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

ROCHA, J. D.; PÉREZ, J. M.; CORTEZ, L. A. B. Aspectos teóricos e práticos do processo de pirólise de biomassa. Curso Energia na indústria de açúcar e álcool. Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI, Itajubá, 2004.

RODRIGUES, A. C.; HAVEN, M. O.; LINDEDAM, J.; FELBY, C.; GAMA, M. Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 79, p. 70-77, 2015.

RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G.; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 929-943, 2011.

ROGERS, R. D.; SEDDON, K. R. **In ionic liquids**: industrial applications to green chemistry. ACS Symposium Series 818. American Chemical Society: Washington, DC, 2002.

ROSA, M. F.; MEDEIROS, E. S.; MALMONGE, J. A.; GREGORSKI, K. S.; WOOD, D. F.; MATTOSO, L.H.C.; GLENN, G.; ORTS, W.J.; IMAM, S.H. Cellulose nano whiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p. 83-92, 2010.

ROUHOLLAH, H.; IRAJ, N.; GITI, E.; SORAH, A. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisaea*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 9, p. 1110-1114, 2007.

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

SAHA, B. C. , Enzymes as biocatalysts for conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars. In: **Handbook of Industrial Biocatalysis**, ed. C. T. Hou, Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 1-12.

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

SAHA, B.; COTTA, M. S. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of Rice hulls to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.32, p. 971-977, 2008.

SAHA, B. C.; ITEN, L.B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **Biotechnology Progress**, v.21, p. 816-822, 2005.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, J.R.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 33, p. 904-908, 2010.

SIGNORI, I.; PASSOLUNGI, S.; RUOHONEN, L.; PORRO, D.; BRANDUARDI. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 14, p. 1-13, 2014.

SILVA, D. D. V.; CÂNDIDO, E. J.; ARRUDA, P. V.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. New cultivate medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane bagasse using rice bran extract, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1469-1475, 2014.

SILVA, J. D.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos**: métodos químicos e biológicos.3. ed. – 4. Reimp. Viçosa: UFV, 2009. 235 p.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – USP, Escola de Engenharia de Lorena - SP, 2009.

SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F.J.V; MANTOVANI, H.C; PASSOS, F.M.L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxidoreductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. **Enz. Microb. Technol.** v. 36, n. 7, p. 930-936, 2005.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. **Bioresource Technology**, p. 76-82, 2015.

SÓCRATES, G. **Infrared and raman characteristic group frequencies**. 3. ed. England: John Wiley & Sons, 2004. cap. 16.

SOOKKUMNERD, C.; ITO, N.; KITO, K. Financial viability of husk-fueled steam engine as energy-saving technology in Thai rice mill. **Applied Energy**, v. 82- 64, p. 80, 2005.

SREE, N. K.; SRIDHAR, M.; SURESH, K.; BANAT, I. M.; RAO, L. V. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 72.p. 43-46, 2000.

STEVANIE, J.; KARTAWIRIA, I.; ABIMANYU, H. Kinetic studies of the enzymatic hydrolysis of cellulose from pre-treated corn cob. **International Symposium on Applied Chemistry**, v. 1803, 2016.

STEWART, D. Lignin as a base material for materials applications: chemistry, application and economics. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 2002-207, 2008.

STICKLEN, M. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.433-443. 2010.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY. A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009

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

SURYAWATI, L.; WILKINS, M. R.; BELMMER, D. D.; HUHNE, R. L. MANESS, N. O.; BANAT, I. M. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnol Bioeng**, v. 10, n. 5, p. 894-902, 2008.

SWANN, G.E.A.; PATWARDHAN, S.V. Application of fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for assessing biogenic silica sample purity in geochemical analyses and palaeoenvironmental research. **Climate of the Past**, v. 7, p. 65–74, 2011.

SWATLOSKI, R.P., SCOTT, K. S.; SPEAR, S.K., HOLBREY, J.D. ROGERS, R.D., Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**. v. 124, p. 4974-4975, 2002.

TADESSE, H.; LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. **Energy & Environmental Science**, n. 4, p. 3913-3929, 2011.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 4, p. 707-738, 2007.

TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L.; BORSA, J.; RÁCZ, I. Hydrophilic/hydrophobic character of grafted cellulose. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 79, p. 467-470, 2010.

TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw, **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, p. 637–643, 2005.

TARZIA, A. **Efeito do processamento pós-colheita sobre as frações polissacarídicas dos grãos de café (*coffea arabica*) e suas bebidas**. 2010. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Programa Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

TAVARES, B.; FELIPE, M. G. A.; SANTOS, J. C. S.; PEREIRA, F. M. GOMES, S. D.; SENE, L. an experimental and modeling approach for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in stirred tank bioreactor using vacuum extraction as a strategy to overcome product inhibition. **Renewable energy**, v. 131, p. 261-267, 2018.

TAVARES, B.; FELIPE, M. G. A. SANTOS, J. C.; PEREIRA, F. M. GOMES, S. D.; SENE, L. An experimental and modeling approach for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in stirred tank bioreactor using vacuum extraction as a strategy to overcome product inhibition. **Renewable Energy**, v. 131, p. 261-267, 2019.

TOMÁS-PEJÓ, M.; GARCÍA-APARICIO, M.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 890-895, 2009.

TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M.; COCA, M.; DA-SILVA. R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 332-229, 2013.

VAN SOEST, P. J. Integrated feeding systems. *In*:_____. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. Ed. Ithaca: Cornel University Press, 1994. p. 140-155.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 7, p. 136-140, 2007.

VIEIRA, J. G. **Produção de metilcelulose a partir de celulose do bagaço de cana-de-açúcar usando dois agentes metilantes: sulfato de dimetila e iodometano, para aplicação como aditivo na formulação de argamassas**. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2012.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experiências de Bioquímica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 780 p.

WANG, Y.; YANG, Z.; QIN, P.; TAN, T. Fermentative L-(+)-lactic acid production from de-fatted rice bran. **View Journal**, v. 4, p. 8907-8913, 2014.

WANG, Z.; LI, J.; BARFORD, J. P.; HELLGRADT, K.; MCKAY, G. A comparison of chemical treatment methods for the preparation of rice husk cellulosic fibers. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 2, n. 1, 2016.

WI, S. G.; CHOI, I. S.; KIM, K. H.; KIM, H. M.; BAE, H. J. Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. **Biotechnology for Biofuel**, v. 6, n. 166, p.1-7, 2013.

WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p.346–350, 2008.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A.; ZACCHI, G. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous saccharification and fermentation - based bioethanol process. Technical and economic evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 485-499, 2005.

WYMAN, C. E., SPINDLER, D. D.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p.301-307. 1992.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; & LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 54-60, 2011.

XU, F. Structure, ultrastructure, and chemical composition. In: Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels. Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and cellulose. **Elsevier Science**, p. 9-47, 2010.

XU, J.; CHEN, Y.; CHENG, J. J.; SHARMA-SHIVAPPA, R.; BURNS, J. Sodium hydroxide pretreatment of switchgrass for ethanol production. **Energy and Fuels**, v. 24, p. 2113-2119, 2010.

YANG, T.; ZHANG, H.; MU, H.; SINCLAIR, A.J.; XU, X. Diacylglycerols from butterfat: Production by glycerolysis and short path distillation and analysis of physical properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, p. 979–987, 2004.

YANG, C. Y.; SHEIH, C.; FANG T.J. Fermentation of rice hull by *Aspergillus japonicus* under ultrasonic pretreatment, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, p. 687-691, 2012.

YOO, J. Y. **Technical and Economical Assessment of Thermo-Mechanical Extrusion Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production**. Thesis. Kansas State University, Manhattan, KS, US. 2011.

YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull, **Bioresource Technology**, v. 100, p. 903-908, 2009.

ZAID, A. A.; TAIWO, O. G. Comparative utilization of biodegraded Rice husk in the diets of *Clarias gariepinus*. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, Nigeria, v. 3, n. 5, p. 312-319, 2008).

ZHANG, S., KESHWANI, D. R., XU, Y., HANNA, M. A. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 352-357, 2012.

ZHANG, X. Y.; XU, C. Y.; WANG, H. X. Pretreatment of bamboo residues with *coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 104, p. 149–151, 2007.

ZHU, J. Y.; PAN, X.; ZALESNY, R. S. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, n. 3, p.847-857, 2010.