



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA

ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA



Avaliação dos métodos de pré-tratamento para casca e palha de arroz: uma revisão bibliográfica

Autor: Laura Jensen Ourique

Orientador: Débora Jung Luvizetto Faccin

Porto Alegre, dezembro de 16

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
1 Introdução	1
2 Conceitos Chave	2
2.1 Bioetanol de segunda geração	2
2.2 Composição de resíduos lignocelulósicos e conversão a etanol	4
2.3 Objetivo do pré-tratamento na fermentação a partir de RLAs	7
2.4 Casca e palha de arroz	8
3 Formulação do Problema	10
4 Revisão Bibliográfica	11
4.1 Métodos de pré-tratamento para RLAs em geral	11
4.1.1 Métodos físicos	11
4.1.2 Métodos químicos	11
4.1.3 Métodos físico-químicos	14
4.1.4 Métodos biológicos	15
4.1.5 Sacarificação e fermentação simultânea	16
4.1.6 Métodos de detoxificação	17
4.2 Aplicação de métodos de pré-tratamento para casca e palha de arroz	18
4.2.1 Explosão a vapor	18
4.2.2 Hidrólise ácida	22
4.2.3 Hidrólise alcalina	24
4.2.4 Dissolução em LI	25
4.2.5 Tratamento biológico	28
5 Inferências quanto ao uso potencial dos métodos	30
5.1.1 Recuperação de todas as formas de açúcares	31
5.1.2 Não formação de inibidores fermentação necessidade de detoxificação	31
5.1.3 Demanda energética	32

5.1.4	Tempo de operação	32
5.1.5	Custo de instalação e operacional	33
5.1.6	Tecnologia com melhor potencial para aplicação em escala industrial	33
6	Conclusões	35
7	Referências	36
8	Apêndice I – Resumo das características, vantagens e desvantagens dos métodos de pré-tratamento abordados na revisão bibliográfica	40
9	Apêndice II- Resumo dos artigos abordados na revisão bibliográfica	41

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que me acompanharam durante os anos de minha graduação. Particularmente, a meus pais e meu irmão, por me apoiar em minhas decisões e partilhar todos os bons momentos, além dos não tão bons assim. A meu namorado e parceiro de vida, por toda a cumplicidade, amizade e ajuda (que foi muito além da formatação nos padrões ABNT do meu TCC).

Sou grata também aos meus colegas e professores do DEQUI. Queridos, vocês tornaram a rotina de estudos fonte de memórias eternas.

Em especial, agradeço a minha orientadora Débora, cuja paciência e dedicação foram imprescindíveis à realização deste trabalho.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita” (Mahatma Gandhi).

Resumo

O etanol de segunda geração tem processo fermentativo semelhante ao de primeira geração, diferenciando-se na etapa de pré-tratamento do meio de cultivo. Atualmente, a principal dificuldade para aplicação de resíduos lignocelulósicos diretamente na fermentação reside na natureza dessa biomassa. Ela proporciona vários inconvenientes, como estrutura química complexa, que torna a hidrólise difícil de ser alcançada com alto rendimento; matriz polimérica com açúcares na forma de pentoses e hexoses, que pode gerar problemas durante a fermentação e possível formação de compostos tóxicos indesejáveis durante o pré-tratamento, devido a reações secundárias. Nesse contexto, a escolha da tecnologia de pré-tratamento adequada pode garantir a viabilidade de comercialização desse biocombustível. Atualmente, o Rio Grande do Sul não contribui com expressividade na produção nacional de etanol. Porém, possui grande potencial futuro, uma vez que é o estado que lidera a produção nacional de arroz. De modo a dar enfoque a realidade agrícola do estado, o presente trabalho visa reunir estudos recentes em que tecnologias de pré-tratamento para casca e palha de arroz foram testadas. Para apontar o método de maior potencial de uso em escala industrial, é proposta uma metodologia de classificação dos métodos, comparando-os através de critérios (I) recuperação das formas de açúcares; (II) produção de tóxicos e necessidade de detoxificação; (III) demanda energética; (IV) tempo de operação; (V) custo de instalação e de operação. Em todos os artigos selecionados, observou-se que métodos químicos estão presentes em pelo menos uma etapa da metodologia de pré-tratamento. Ademais, nota-se a dependência de tecnologias biológicas não só na etapa da fermentação, mas também no uso da hidrólise enzimática para disponibilizar os açúcares. Concluiu-se que, entre as técnicas avaliadas, a hidrólise química é a mais vantajosa. Além disso, a hidrólise alcalina destacou-se na classificação em relação a hidrólise ácida porque, mesmo exigindo tempo mais elevado de operação, produz menos tóxicos e requer etapas com menor uso de reagentes químicos.

Palavras-chave: pré-tratamento, produção de etanol, casca de arroz, palha de arroz, explosão a vapor, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, dissolução em líquido iônico, tratamento biológico.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Esquema geral da produção de etanol a partir da fermentação (elaboração própria).....	2
Figura 2.2: Representação esquemática da produção de etanol a partir do milho, da cana-de-açúcar e dos RLAs (Adaptado de VOHRA <i>et al.</i> , 2014).....	3
Figura 2.3: Estrutura das ligações intramoleculares e intermoleculares da celulose (LI, G. C. <i>et al.</i> , 2012).	5
Figura 2.4: Alguns açúcares comuns da hemicelulose (Adaptado de GAARDLØS, 2015).	5
Figura 2.5: Unidades formadoras da lignina (Adaptado de SHIRKAVAND <i>et al.</i> , 2016). 6	
Figura 2.6: Papel esquemático do pré-tratamento na fermentação a partir de RLAs (Adaptado de HAGHIGHI <i>et al.</i> , 2013)	7
Figura 4.1: Possíveis produtos de degradação inibidores de fermentação formados a partir do tratamento ácido (Adaptado de JÖNSSON; MARTÍN, 2016).....	12
Figura 4.2: Os fluxogramas do processo de (a) a explosão de vapor catalisada por ácido sulfúrico e (b) hidrólise ácida diluída seguida de explosão a vapor (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2011).....	19
Figura 4.3: Esquema para produção de etanol a partir de palha de arroz. A etapa de condicionamento foi conduzida usando a detoxificação convencional pelo método <i>overliming</i> e pela neutralização alcalina (Adaptado de LIN <i>et al.</i> , 2012).....	20
Figura 4.4: Fluxograma do processo de explosão a vapor na presença de ácido para o sistema de pré-tratamento contínuo em escala piloto (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2013) .	21
Figura 4.5: Diagrama simplificado do fluxograma da metodologia dos experimentos (Adaptado de MA <i>et al.</i> , 2011).	23
Figura 5.1: Representação das metodologias de pré-tratamento para casca e palha de arroz empregadas nos artigos selecionados. As caixas representam as operações unitárias, onde a cor amarela retrata métodos físico-químicos; a azul, químicos; a verde, biológicos; a roxa; físicos; a rosa; de detoxificação e a marrom, de fermentação. As setas representam as transições entre as operações unitárias, sendo a de cor preta, a transição da primeira para a segunda operação; vermelha, da segunda para a terceira; azul, da terceira para a quarta; cinza, da quarta operação para a fermentação (<i>elaboração própria</i>).	30

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Composição percentual em base seca de diferentes RLAs.....	6
Tabela 5.1: Classificação dos métodos de pré-tratamento abordados na revisão bibliográfica de acordo com os parâmetros definidos (elaboração própria).	33

Lista de Abreviaturas e Siglas

RLA	Resíduo lignocelulósico agroindustrial
HMF	5-hidrometil-2-furaldeído
LI	Líquido Iônico
SSF	Sacarificação e fermentação simultânea (tradução do termo em inglês “ <i>simultaneous saccharification and fermentation</i> ”)
SHF	Hidrólise enzimática e fermentação separados (tradução do termo em inglês “ <i>separate hydrolysis and fermentation</i> ”)
FPU	Atividade de celulases totais (tradução do termo em inglês “ <i>Filter Paper Units</i> ”)
FT-IR	Análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
BET	<i>Brunauer– Emmett–Teller</i>
DRX	Difração de raios-X
[BMIM] Cl	Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
[EMIM] Cl	Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIM] Ac	Acetato de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIM] Su	Hidrogeno-sulfato de 1-etil-3-metilimidazólio
[EMIM][EtSO ₄]	1-etil-3-metilimidazólio etilsulfato
THTDPD	Decanoato de trihexil fosfato
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
[Ch][OH]	Hidróxido de colina
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
DMI	1,3-dimetil-2-imidazolidinona
[BMIMO] Ac	Acetato de 1-butil-3- metilimidazolio

DMSO	Sulfóxido de dimetilo
TGA	Análise termogravimétrica
NMR-H	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

1 Introdução

Ao longo da última década, o interesse pela produção de combustíveis a partir de fontes renováveis tem provocado vários estudos. A motivação é originada principalmente pela industrialização e pelo acréscimo da população mundial, que acarretam em acréscimo da demanda energética. Nesse contexto, é esperado aumento na demanda por etanol, em substituição a gasolina (PEREIRA, 2010).

O etanol de primeira geração já é explorado em diversos países, que utilizam como fonte de açúcar alimentos como milho, aveia e melaço de cana para fermentação. Contudo, para sustentar a demanda energética que está por vir, precisa-se discutir outras fontes de açúcares fermentescíveis. Assim, garante-se apelo ao etanol de segunda geração, gerado a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais (RLAs) (GALBE; ZACCHI, 2012).

O processo de fermentação do etanol em geral consiste em três passos principais: (I) tratamento da solução que contém açúcares fermentescíveis; (II) conversão dos açúcares a etanol através da fermentação; (III) separação e purificação do etanol frente aos demais produtos obtidos durante a fermentação. A principal diferença ao empregar resíduos RLAs ao invés de milho ou cana-de-açúcar como fonte de açúcares fermentescíveis está no tratamento que deve ser conferido ao meio de cultivo antes da fermentação (pré-tratamento). Nesse trabalho, todas as operações unitárias anteriores à fermentação são consideradas parte do pré-tratamento.

A função dessas etapas é permitir alteração da estrutura da lignocelulose, através do aumento da área superficial e porosidade da biomassa; modificação e remoção da lignina, polimerização parcial e extração das hemiceluloses e redução da cristalinidade da celulose. O etanol de segunda geração ainda não é comercializado devido a uma série de obstáculos. Nesse aspecto, o emprego da tecnologia de pré-tratamento adequada para o RLA de interesse é decisiva para tornar o processo viável (LIM *et al.*, 2012).

Para contemplar a perspectiva de nosso estado, casca e palha de arroz foram escolhidas como o RLA focado do presente estudo. Apesar de não participar da produção nacional de etanol atualmente (UNICA, 2016; CONAB, 2016), o Rio Grande do Sul possui grande potencial futuro, já que é o estado que lidera a produção de arroz no Brasil (UNICA, 2016; CONAB, 2016).

Este trabalho almeja reunir pesquisas realizadas que utilizaram casca e palha de arroz para fermentação, de modo a discutir as tecnologias de pré-tratamento recentemente testadas. É proposta uma metodologia de classificação dos métodos, comparando-os através de critérios pré-estabelecidos e apontando a tecnologia com melhor potencial para aplicação em escala industrial.

Os parâmetros avaliados foram: (I) recuperação das formas de açúcares; (II) produção de tóxicos e necessidade de detoxificação; (III) demanda energética; (IV) tempo de operação; (V) custo de instalação e de operação. A metodologia de busca de artigos baseou-se no estudo de Binod e colaboradores (2010), em que as principais tecnologias de pré-tratamento para palha de arroz são abordadas.

2 Conceitos Chave

Nesse capítulo serão apresentados conceitos importantes para a compreensão das tecnologias de pré-tratamento de casca e palha de arroz, de modo a viabilizar a comparação dos métodos existentes. Além disso, também são apontados dados sobre a produção de etanol e culturas agrícolas em que ocorre geração potencial de RLAs, para contextualizar o Rio Grande do Sul no cenário global.

2.1 Bioetanol de segunda geração

A industrialização e aumento da população mundial são os principais responsáveis pelo aumento da demanda energética mundial. Além da apreensão em atender o consumo crescente, a dependência de combustíveis fósseis na matriz energética tem atraído maior atenção de debates políticos e pesquisas científicas. Preocupações incluem flutuações e aumento nos preços dos combustíveis, emissões de gases tóxicos ao meio ambiente atreladas ao seu uso e esgotamento das reservas naturais (BEHERA *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o interesse pela produção de combustíveis a partir de fontes renováveis tem movido diversos estudos ao longo da última década. Em especial, é esperado aumento na demanda por etanol, em substituição a gasolina (PEREIRA, 2010). Em diversos países, o uso de fontes de açúcar, como milho, aveia e melaço de cana já são explorados para esse fim, na produção do etanol de primeira geração. Ainda, para suprir as demandas energéticas futuras, outras fontes de matéria-prima devem ser discutidas, o que garante o apelo ao etanol de segunda geração (GALBE; ZACCHI, 2012).

Produzido a partir de RLAs, o etanol de segunda geração tem recebido grande atenção devido a abundância e ampla distribuição mundial da fonte de carbono empregada em seu processo fermentativo. Além disso, sua utilização na obtenção de etanol pode aliviar o conflito atual causado por outras fontes de amido que também são usadas na produção de alimentos, já que ocorre competição (GALBE; ZACCHI, 2012).

O processo de fermentação do etanol em geral consiste em três passos principais: primeiramente, obtém-se a solução que contém açúcares fermentescíveis; por conseguinte, converte-se os açúcares a etanol através da fermentação e, por fim, separa-se e purifica-se o etanol dos demais produtos obtidos durante a fermentação (VOHRA *et al.*, 2014). Dessa forma, conforme é mostrado na Figura 2.1, pode-se esquematizá-lo em três estágios principais: pré-tratamento, fermentação e recuperação, onde todas as operações unitárias que precedem a fermentação são consideradas parte do estágio de pré-tratamento.

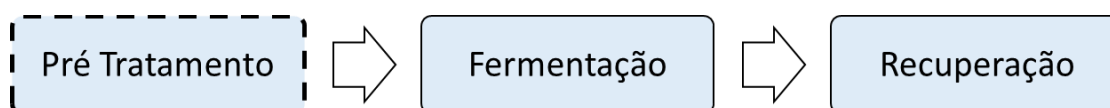


Figura 2.1: Esquema geral da produção de etanol a partir da fermentação (elaboração própria).

A Figura 2.2 representa a obtenção de etanol a partir do milho, da cana e de materiais lignocelulósicos. Os três processos envolvem etapas de fermentação e de recuperação similares, porém usam diferentes métodos para liberar açúcares fermentescíveis e geram resíduos distintos. O açúcar proveniente da cana pode ser empregado diretamente na fermentação. Já quando o milho é usado, dois tipos de moagem podem ser utilizados, gerando diferentes subprodutos: de milho úmido e de milho seco (VOHRA *et al.*, 2014).

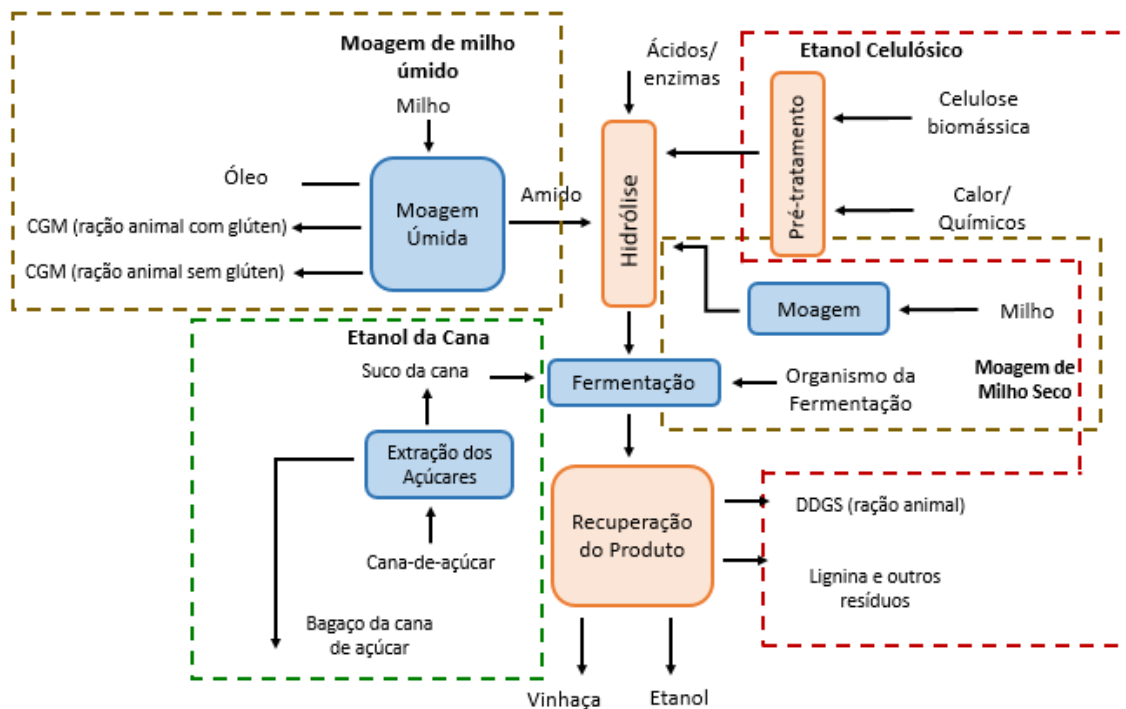


Figura 2.2: Representação esquemática da produção de etanol a partir do milho, da cana-de-açúcar e dos RLAs (Adaptado de VOHRA *et al.*, 2014).

Contudo, quando RLAs são usados, diferentes métodos de pré-tratamento podem ser usados para disponibilizar os açúcares para fermentação. A natureza do resíduo é determinante para escolha do método mais eficiente. O pré-tratamento ainda é o gargalo biotecnológico atrelado a produção de etanol a partir de RLAs em escala industrial, razão pela qual ele ainda não é comercializado e justificativa para condução de mais pesquisas (GALBE; ZACCHI, 2012; SINGH, A. *et al.*, 2011; VOHRA *et al.*, 2014).

No mundo, os Estados Unidos lideram a produção de etanol, atingindo em 2015 a marca de 62,1 milhões de m³, seguido pelo Brasil, que no mesmo ano obteve 33,9 milhões de m³ (MME, 2016). Enquanto o primeiro utiliza majoritariamente o milho como fonte de açúcar para a fermentação, o Brasil usa a cana-de-açúcar. A região sudeste lidera a fabricação nacional, respondendo por 59 % do volume total em 2015, seguido pelo centro-oeste, com 29 % (UNICA, 2016). Existem também no país algumas usinas que operam na tecnologia *flex*, sendo capazes de fermentar milho ou cana-de-açúcar, dependendo da disponibilidade da matéria-prima. Contudo, o emprego de tal tecnologia ainda depende políticas públicas que favoreçam investimentos futuros (MILANEZ *et al.*, 2014)

Quanto a produção de etanol de segunda geração, o Brasil tem um grande potencial. Atualmente, o país é o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, segundo maior de soja e está entre os dez primeiros maiores fornecedores de arroz. Ainda, atrelada a produção desses alimentos, está com expressividade a geração de RLAs (CONAB, 2016). O Rio Grande do Sul, no entanto, não contribui com relevância para a produção da cana do país. Por consequência também não participa da produção nacional de álcool etílico atualmente (UNICA, 2016; CONAB, 2016).

Ainda assim, nosso estado possui grande potencial futuro, já que é o estado que lidera a produção de arroz no Brasil (UNICA, 2016; CONAB, 2016). O emprego da tecnologia adequada para utilização do arroz na fermentação do etanol é a chave para tornar o processo viável (LIM *et al.*, 2012). Para contemplar a perspectiva de nosso estado, a casca de arroz foi escolhida como o RLA de interesse do presente estudo.

2.2 Composição de resíduos lignocelulósicos e conversão a etanol

Gerados a partir de biomassas de diferentes naturezas, os RLAs adequados para geração do bioetanol de segunda geração são geralmente oriundos da prática agrícola (palha de trigo, de cevada, de milho e de arroz, por exemplo) ou do processamento de produtos agrícolas e do manejo de florestas (madeira compensada, casca de arroz, talos de milho, bagaço da cana, por exemplo). Ainda, usualmente respondem pela totalidade ou maior fração da corrente de rejeitos (BEHERA *et al.*, 2014; VOHRA *et al.*, 2014). A lignocelulose é o principal componente dos RLAs. Ainda, essa fonte de biomassa conta com cinzas (minerais como alumínio, sílica e magnésio) e impurezas (ácidos graxos, compostos fenólicos, entre outros) (SHIRKAVAND *et al.*, 2016; SINGH, A. *et al.*, 2011).

A lignocelulose responde por cerca de metade da composição da biomassa das plantas que é produzida via fotossíntese. Possui estrutura química complexa e formada por três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. Eles são ligados por forças não covalentes e por ligações cruzadas covalentes. Dependendo da natureza da biomassa, o percentual desses compostos varia na matriz polimérica (SÁNCHEZ, 2009):

- *Celulose*: Sua fórmula geral é $(C_6H_{10}O_5)_n$. A Figura 2.3 ilustra um esquema da estrutura da celulose. Maior componente da lignocelulose, é um biopolímero linear formado por monômeros de D-glicose conectados pela ligação glicosídica β - (1-4), formando o dímero celobiose. Esse polímero forma longas cadeias, unidas por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. Usualmente, a maior fração da celulose na biomassa apresenta estrutura cristalina, porém uma parte apresenta forma amorfa. A segunda conformação apresenta maior susceptibilidade a degradação ácida ou enzimática (SÁNCHEZ, 2009; SHIRKAVAND *et al.*, 2016).

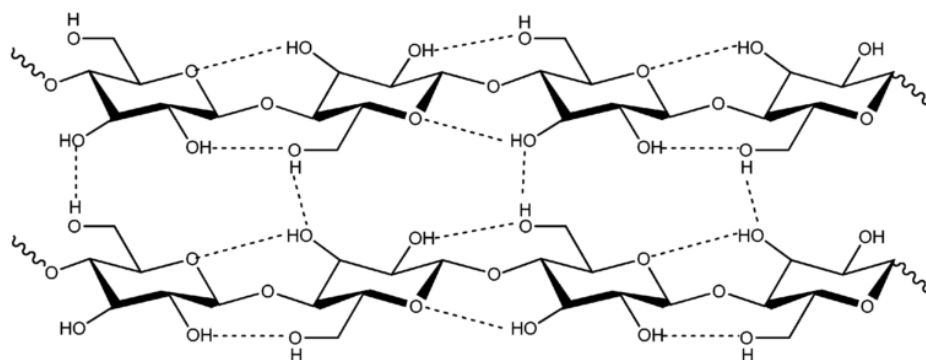


Figura 2.3: Estrutura das ligações intramoleculares e intermoleculares da celulose (LI, G. C. *et al.*, 2012).

• **Hemicelulose:** Sua fórmula geral é $(C_5H_4O_8)_b$. É um biopolímero ramificado, composto por pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose) e hexoses (β -D-manose, β -D-glucose e α -galactose) e/ou ácidos urônicos (SHIRKAVAND *et al.*, 2016). Possui estrutura aleatória e amorfa, ligada por ligações glicosídicas β - (1-4) e β - (1-3), o que garante maior resistência à hidrólise que a da celulose (SÁNCHEZ, 2009; SINGH, A. *et al.*, 2011). A Figura 2.4 ilustra alguns açúcares comuns da hemicelulose.

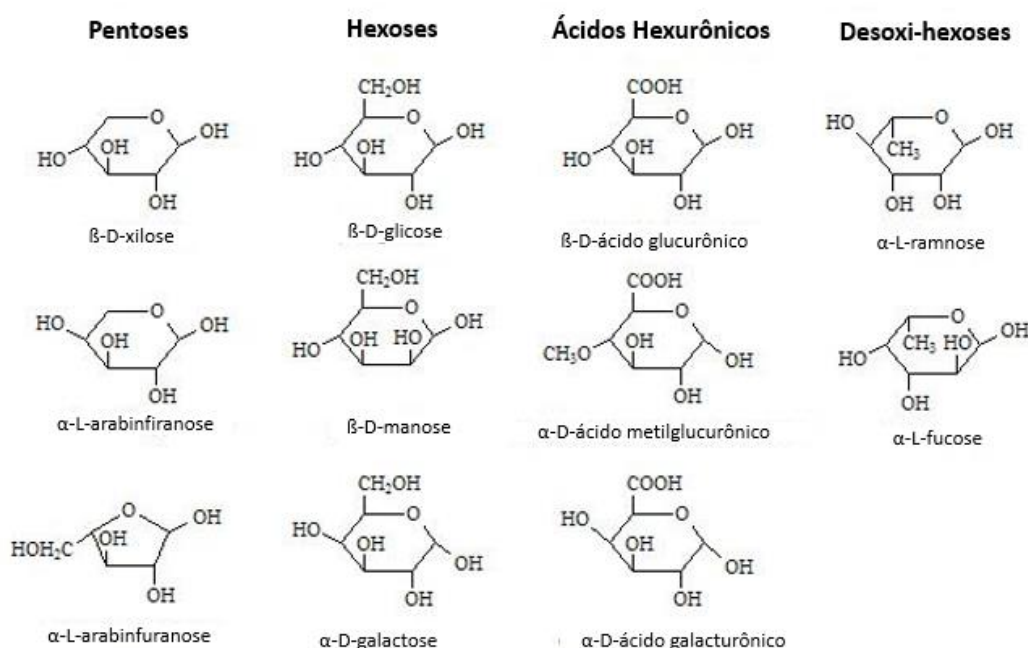


Figura 2.4: Alguns açúcares comuns da hemicelulose (Adaptado de GAARDLØS, 2015).

• **Lignina:** Sua fórmula geral é $(C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7})_c$. É um biopolímero aromático, amorfo, não-solúvel em água e opticamente inativo. Sua estrutura é formada a partir de precursores fenilpropanoides, como a siringila, guaiacila e p-hidroxifenol. Ligada covalentemente à hemicelulose e a celulose, forma uma complexa conformação. Sua função é proteger a biomassa de degradação, transportar a água dentro do caule da planta e aumentar a sua resistência mecânica (SÁNCHEZ, 2009; SHIRKAVAND *et al.*, 2016). A Figura 2.5 representa as principais unidades formadoras da estrutura polimérica da lignina.

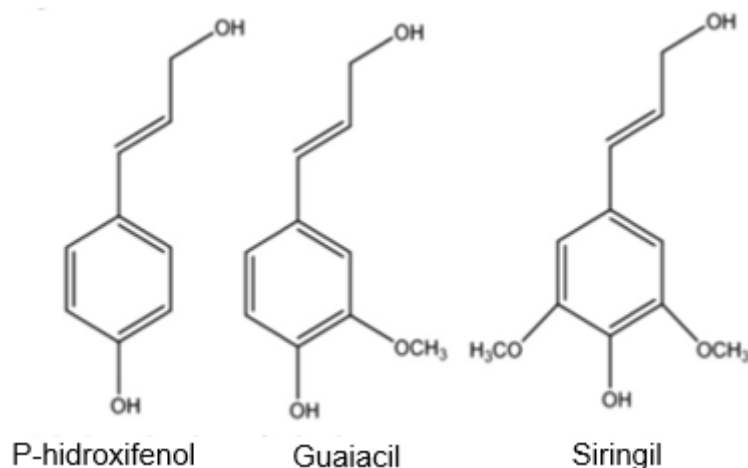


Figura 2.5: Unidades formadoras da lignina (Adaptado de SHIRKAVAND *et al.*, 2016).

O percentual de participação dos polímeros formadores da estrutura lignocelulósica varia bastante de acordo com a natureza do RLA, além de características climáticas e do solo onde é feita a cultura (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). A

Tabela 2.1 compara RLAs produzidos no Brasil em grande escala quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina. De acordo com esta bibliografia, o bagaço da cana de açúcar destaca-se pelo baixo teor de lignina e alto de celulose e hemicelulose, enquanto palha e casca de arroz apresentam um alto teor de lignina quando comparados aos demais RLAs. Ainda, de acordo com Lim e colaboradores (2012), a palha e casca de arroz teriam conteúdo semelhantes.

Biomassa Lignocelulósica	Celulose	Hemicelulose	Lignina Total	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	43	31	11	(SHIRKAVAND <i>et al.</i> , 2016)
Caca de cevada	34	38	19	
Palha de milho	38	26	17	
Palha de trigo	30	22	17	
Palha de arroz	32	36	22	(LIM <i>et al.</i> , 2012)
Casca de arroz	29	29	24	
Talos de soja	35	25	10	
Casca de soja	38	10	3	(HICKERT, 2014)

Tabela 2.1: Composição percentual em base seca de diferentes RLAs.

Ademais, Binod e colaboradores (2010) descrevem as características da casca e a palha de arroz, comparando-a com a palha de trigo. A baixa qualidade de matéria-prima da palha de arroz é atrelada principalmente por um alto teor de cinzas (10-17 %) em relação à palha de trigo (cerca de 3 %) e alto teor de sílica em cinzas (o teor de SiO₂ é 75 % no arroz e 55 % no trigo). Assim, justifica-se a importância de mais estudos acerca de tecnologias que tornem viável a utilização de resíduos da cultura do arroz para fermentação.

2.3 Objetivo do pré-tratamento na fermentação a partir de RLAs

Diversos autores (BINOD *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2012; VOHRA *et al.*, 2014) afirmam que a hidrólise enzimática é um passo essencial na fermentação de RLAs. Seu papel é a conversão de celulose em glicose e hemicelulose em pentoses e hexoses, que então podem ser fermentadas por microrganismos. Ainda, seguindo esse entendimento, a hidrólise enzimática não faria parte das reações de pré-tratamento, que compreendem as etapas anteriores a esta.

No entanto, pesquisas recentes têm objetivado realizar a fermentação sem utilizar enzimas, já que sua obtenção é cara e a reação de hidrólise, demorada. Com o intuito de discutir as possíveis alternativas biotecnológicas para fermentação da casca e palha de arroz, no presente trabalho a etapa de hidrólise enzimática, quando usada, será considerada parte das reações de pré-tratamento.

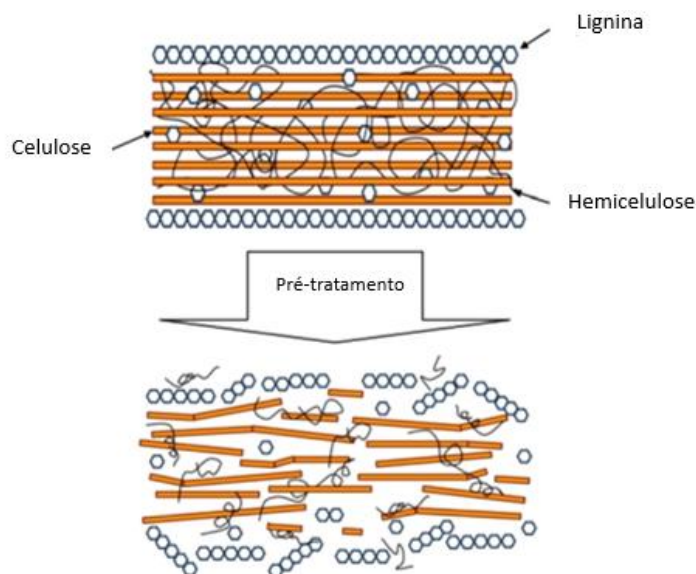


Figura 2.6: Papel esquemático do pré-tratamento na fermentação a partir de RLAs (Adaptado de HAGHIGHI *et al.*, 2013)

O pré-tratamento permite alterar a estrutura da lignocelulose através do aumento da área superficial e porosidade da biomassa; modificação e remoção da lignina, polimerização parcial e extração das hemiceluloses e redução da cristalinidade da celulose. O etanol de segunda geração ainda não é comercializado devido a uma série de obstáculos. Nesse aspecto, a escolha do pré-tratamento é muito importante, já que tem grande

influência na eficiência de todos os outros passos do processo. A Figura 2.6 ilustra o mecanismo do pré-tratamento sobre a estrutura dos RLAs.

De acordo com Galbe e Zacchi (2012) e Jönsson e Martín (2016), o principal entrave para aplicação dos RLAs diretamente na fermentação reside na sua estrutura, que proporciona dificuldades como:

- A conformação química complexa da biomassa, que torna a hidrólise difícil de ser alcançada com alto rendimento;
- A mistura de açúcares na forma de pentoses e hexoses, que pode gerar problemas durante a fermentação, já que pentoses não são facilmente fermentadas;
- A possível formação de compostos tóxicos indesejáveis durante o pré-tratamento devido às reações secundárias, que podem inibir ou até impedir a etapa de hidrólise enzimática ou fermentação subsequente. A escolha da tecnologia do pré-tratamento influencia diretamente a natureza e quantidade desses componentes. A maior parte dos compostos tóxicos observados são resultados da solubilização e degradação da lignina e/ou açúcares em geral. No entanto, produtos obtidos durante a fermentação também podem originá-los.

Estratégias para evitar a formação desses compostos incluem seleção da matéria prima lignocelulósica, para que gere menos compostos inibitórios; engenharia genética, de modo a tornar o microrganismo fermentador mais resistente a meios de cultura com condições adversas; entre outras alternativas. Ainda, etapas de detoxificação após o pré-tratamento para remoção de compostos inibitórios podem ser usadas. (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). No presente trabalho, para comparar as diferentes tecnologias, quando o estudo empregar a etapa de detoxificação, ela será considerada parte da etapa de pré-tratamento.

2.4 Casca e palha de arroz

O arroz é um alimento de primeira necessidade para cerca de metade da população mundial. O continente asiático produz sozinho cerca de 90 % da produção, sendo a China e a Índia os maiores responsáveis. Nesse cenário, como dito anteriormente, o Brasil é um dos dez maiores produtores mundiais, sendo o Rio Grande do Sul o estado de maior contribuição. Dois RLAs são gerados durante a produção do grão de arroz: palha do arroz, gerada durante o cultivo e que permanece no campo após a colheita do grão; e a casca do arroz, produzida durante o processamento do grão (etapas de limpeza, peneiração e trituração) (LIM *et al.*, 2012).

Para cada quilo de arroz colhido, são gerados cerca de 0,41 a 3,96 kg de palha. Já a casca representa entre 20 % e 33 % do peso de grãos colhidos. Até hoje, talvez a prática mais comum para descarte desses resíduos seja a sua queima em campo aberto, especialmente na Ásia. Além de ser um desperdício de energia, essa atividade é uma ameaça à saúde humana e animal, já que contribui para o aumento do efeito estufa e da emissão de poluentes. Entre os gases tóxicos emitidos durante a combustão, destaca-se o

dióxido de carbono, monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio e enxofre e outros particulados (BINOD *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2012).

Devido à preocupação ambiental, vários países já impuseram restrições para a queima em campo aberto, o que traz maior apelo a tecnologias para dispor esses resíduos. Tal política garante apelo ao bioetanol de segunda geração (LIM *et al.*, 2012). Apesar do potencial de uso da palha, a aplicação em maior escala é mais complexa quando comparado ao da casca devido a aspectos de logística de suprimento que a tornam mais cara. A disponibilidade desse resíduo está condicionada à época de colheita, manuseio e transporte da palha originada no campo. Assim, as tecnologias para uso da palha de arroz para gerar etanol devem compensar os altos custos envolvidos na etapa de suprimento desse RLA (BINOD *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2012).

3 Formulação do Problema

O presente estudo teve por objetivo reunir trabalhos realizados utilizando casca e palha de arroz como biomassa para fermentação, comparando-os através de parâmetros definidos e apontando a tecnologia com melhor potencial para aplicação em escala industrial. Diversos estudos têm sido feitos para encontrar métodos de pré-tratamento para RLAs eficazes, rápidos e que resultem em uma estrutura facilmente hidrolisável. Comum a todos os estudos é a exigência de se obter um material que possa ser processado posteriormente para produção de etanol com um rendimento elevado.

Desse modo, de acordo com Galbe e Zacchi (2012) e Haghghi *et al.* (2013), para ser eficaz o método de pré-tratamento deve ter um número de características, que foram usadas como parâmetros no presente estudo.

- Resultar em alta recuperação de todas as formas de açúcares;
- Não gerar, ou produzir em quantidades limitadas, produtos de degradação da lignocelulose (inibidores da fermentação). É preferível fermentar o líquido do pré-tratamento sem detoxificação;
- Possuir baixa demanda energética, ou ser realizado de forma que a energia possa ser reutilizada em outras fases do processo na forma de calor secundária;
- Tempo de operação baixo, quando comparado às demais etapas do processo;
- Exigir baixo custo de instalação e operacional.

A metodologia de busca de artigos baseou-se no estudo de Binod e colaboradores (2010), em que as principais tecnologias de pré-tratamento para palha de arroz são abordadas. Com o intuito de atualizar esse trabalho e discutir as alternativas recentemente usadas, foram priorizados estudos científicos com data de publicação a partir de 2010. A busca foi feita por artigos com palavras-chave como “*rice straw*” (palha de arroz), “*rice hull*” (casca de arroz), “*ethanol production*” (produção de etanol), “*pretreatment*” (pré-tratamento) e “*fermentation*” (fermentação) através do site “*ScienceDirect*”. Ainda, a busca foi direcionada para abranger diferentes métodos de pré-tratamento aplicados em casca e palha de arroz.

Devido a limitação de páginas do trabalho e tempo de execução, optou-se por abranger variadas técnicas, priorizando as que possuem maior viabilidade econômica. Desse modo, o presente trabalho não contemplará todos os estudos publicados no período estipulado de publicação com as palavras-chave escolhidas.

4 Revisão Bibliográfica

A revisão bibliográfica dos métodos de pré-tratamento de casca e palha de arroz foi dividida em duas partes. Na primeira, é dada uma visão geral dos principais métodos de pré-tratamento para RLAs e, na segunda, são abordados os métodos utilizados para pré-tratamento em casca e palha de arroz.

4.1 Métodos de pré-tratamento para RLAs em geral

No presente trabalho o agrupamento das estratégias será baseado no princípio de atuação durante de pré-tratamento. Com base nesse critério, os métodos podem ser classificados em químicos, físicos, físico-químicos e biológicos. (BINOD et al., 2010). Nas pesquisas abordadas nesse estudo, essas técnicas são em geral aplicadas de forma combinada, de modo a aumentar a eficiência final da reação.

4.1.1 Métodos físicos

Normalmente, métodos físicos são os passos iniciais do pré-tratamento de qualquer biomassa em qualquer escala. As técnicas abordadas nos estudos desta revisão bibliográfica incluem trituração, moagem e irradiação de micro-ondas. Na literatura, não parece haver autores que atribuam a formação de compostos inibitórios de fermentação a qualquer método físico.

- *Moagem e trituração*: Binod e colaboradores (2010) conferem a moagem e trituração a redução parcial da cristalinidade da biomassa. No entanto, apesar dessas operações de redução de tamanho serem usadas na maioria dos estudos envolvendo otimização de pré-tratamentos de RLAs, há pouca informação disponível sobre as características do consumo de substrato e de energia no processo de redução de tamanho. (BEHERA et al., 2014).

- *Irradiação de micro-ondas*: A técnica de irradiação de micro-ondas é uma alternativa ao aquecimento convencional. As vantagens deste método incluem menor tempo de operação e menor requerimento de energia. Seu mecanismo de ação sobre os RLAs altera a estrutura da celulose, degrada e em certas condições remove parcialmente a lignina e hemicelulose, de modo a aumentar a susceptibilidade enzimática. A tecnologia já tem sido amplamente utilizada em muitas áreas, devido a sua elevada eficiência de aquecimento e de fácil operação (BEHERA et al., 2014; BINOD et al., 2010; HAGHIGHI et al., 2013).

4.1.2 Métodos químicos

Entre as técnicas existentes, essa tecnologia parece ser a mais promissora e próxima de ser implementada em escala industrial. As alternativas apresentadas neste trabalho incluem o pré-tratamento ácido, alcalino, por dissolução em líquidos iônicos (LI) e por agente oxidante.

- *Pré-tratamento ácido*: é o método químico mais comumente usado, geralmente por meio de ácido sulfúrico. Contudo, outros ácidos podem ser empregados, tais como o

nítrico, fosfórico e o carboxílico. Esses reagentes atuam sem discriminação sobre as cadeias poliméricas, resultando em uma mistura de várias substâncias químicas, como produtos de degradação do açúcar e compostos aromáticos. No entanto, algumas das substâncias formadas podem ser prejudiciais ao desempenho da fermentação, o que é uma desvantagem quando se emprega essa tecnologia (BEHERA *et al.*, 2014; BINOD *et al.*, 2010; GALBE; ZACCHI, 2012).

A Figura 4.1 mostra os possíveis produtos de degradação originados quando essa alternativa é usada. No tratamento sob condições ácidas típicas, as pentoses e ácidos urônicos derivados da hidrólise das hemiceluloses podem originar 2-furaldeído (também chamado furfural) quando desidratadas. Já as hexoses, quando sofrem a mesma reação, são capazes de gerar 5-hidrometil-2-furaldeído (HMF) (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

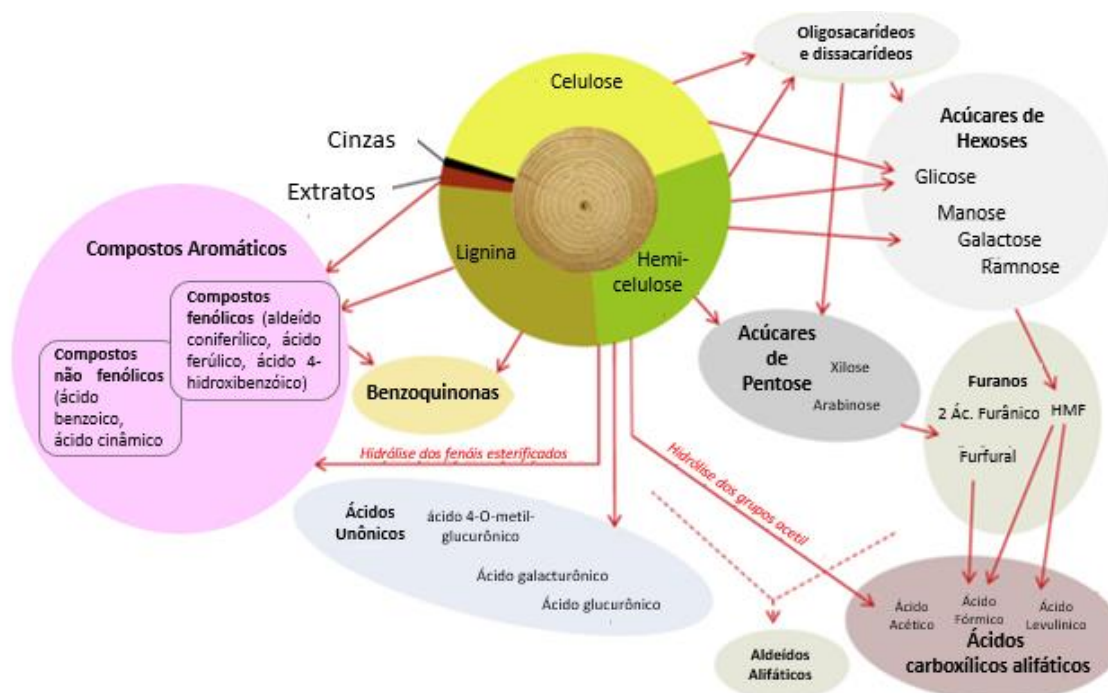


Figura 4.1: Possíveis produtos de degradação inibidores de fermentação formados a partir do tratamento ácido (Adaptado de JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Sob condições reacionais severas (longo período de pré-tratamento, concentrações altas de ácido e altas temperaturas), o HMF e o furfural podem ainda passar por desidratação adicional. Nesse caso, o HMF forma ácidos levulínicos e fórmicos, enquanto o furfural produz resinas e ácidos fórmicos. Ainda nesse contexto, dependendo do tipo de biomassa e condições de operação, ácido acético é gerado a partir da hidrólise dos grupos acetílicos, além de compostos fenólicos e não fenólicos aromáticos, que também capazes de sofrer nova degradação (JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

Além da formação de compostos tóxicos, o tratamento ácido possui outros inconvenientes. Entre eles, destaca-se o elevado custo dos materiais utilizados para a construção de reatores, que devem suportar agentes corrosivos, formação de sulfato de cálcio durante a reação e posteriores etapas de recuperação do ácido, para tornar o processo economicamente viável. A reação pode ser conduzida utilizando altas

concentrações de ácido e baixas temperaturas ou baixas concentrações de ácido e altas temperaturas. A primeira opção é mais econômica devido às condições de operação. No entanto, a segunda possibilita maior aplicabilidade, uma vez que gera menores quantidades de inibidores da fermentação (HAGHIGHI *et al.*, 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

- *Pré-tratamento alcalino*: uma alternativa ao tratamento ácido é o alcalino, que assim como o primeiro também tem sido extensivamente estudado na literatura. Essa tecnologia emprega condições de temperatura e pressão ligeiramente mais baixas do que a ácida, o que é atraente do ponto de vista operacional. Seu mecanismo de ação inclui reações de liberação e saponificação, que provocam o inchaço dos poros da biomassa e resultam no rompimento das ligações entre lignina e os polímeros de carboidratos, podendo ainda ocorrer a solubilização parcial da lignina. O principal efeito é o maior acesso para as enzimas de hidrólise à estrutura interna do RLA, aumentando assim a área superficial disponível, enquanto que o grau de polimerização é reduzido (BEHERA *et al.*, 2014; GALBE; ZACCHI, 2012).

Comparado com o tratamento ácido, o método alcalino gera menor número de inibidores por conta de seu mecanismo seletivo sobre as cadeias poliméricas. Ainda assim, entre os possíveis tóxicos, estão incluídos ácidos carboxílicos, ácido fórmico, acético e láctico. As principais desvantagens dessa alternativa são o longo tempo de residência (de horas a dias) e a necessidade de neutralização da suspensão de pré-tratados. Os reagentes mais usados são hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio e amônia para essa reação (HAGHIGHI *et al.*, 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

- *Dissolução de RLA em Líquido Iônico*: Líquidos Iônicos (LIs) são sais orgânicos compostos por grandes cátions orgânicos e pequenos ânions inorgânicos ou orgânicos. Tipicamente líquidos à temperatura ambiente, possuem ponto de fusão em torno de 100 °C. O mecanismo de reação do pré-tratamento é basicamente químico: formam-se ligações de hidrogênio entre os íons não hidratados de LIs e os prótons hidroxila dos açúcares, conduzindo à degradação da rede complexa de celulose, hemiceluloses e lignina (HAGHIGHI *et al.*, 2013; RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Contudo, a composição da biomassa parece sofrer somente ligeira alteração após o pré-tratamento com LI. Após regenerada, no entanto, a celulose torna-se amorfa e porosa, forma que é muito mais suscetível à degradação por celulasas que a original, cristalina. Desse modo, a tecnologia de dissolução em LI é alvo de discussão na literatura, já que alguns autores a classificam como um método físico-químico (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Ainda não está claro se o mecanismo do LI tem algum efeito adverso no metabolismo dos microrganismos fermentadores, embora as pesquisas feitas não tenham indicado problemas. No pré-tratamento, além da natureza do LI empregado, a temperatura e tempo utilizados no processo de são as variáveis que governam a eficiência da operação (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

Por possuir características intrínsecas úteis, tais como pressão de vapor negligenciável, estabilidade química e térmica elevada e a capacidade de dissolver uma vasta gama de compostos orgânicos e inorgânicos, alguns LIs são considerados "solventes verdes". As vantagens dos LIs em comparação com os outros métodos convencionais incluem condições de processo menos perigosas e menor uso de produtos químicos. Por outro lado, a incompatibilidade do LI com a celulase, que leva à inativação da enzima, é considerada como uma de suas desvantagens mais importantes (HAGHIGHI *et al.*, 2013; LIU, C.-Z. *et al.*, 2012; RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

A aplicação dessa alternativa em escala industrial enfrenta três grandes desafios. Primeiramente, grande quantidade de LI é necessária para a reação e sua obtenção é cara. Por conseguinte, a reciclagem do LI com alta pureza, necessária uma vez que a sua toxicidade e biodegradabilidade ainda não são bem compreendidas, é uma operação de alto requerimento energético. Por fim, durante o pré-tratamento, a solução pode torna-se viscosa, por consequência, difícil de manusear (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

- *Pré-tratamento com agente oxidante:* Essa técnica envolve a adição de um composto oxidante, como peróxido de hidrogênio e ácido peracético, à biomassa suspensa em água. Diversas reações podem ocorrer com o uso desse método, tais como substituição eletrofílica, deslocamento de cadeias laterais, quebra de ligações de alquilaril-éter ou clivagem oxidativa de núcleos aromáticos. Em particular, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio é capaz de promover a separação e solubilização parcial da lignina, desestruturando a matriz lignocelulósica. Não parece haver formação de tóxicos com o uso desse reagente, que é o único agente oxidante abordado entre os artigos selecionados (BINOD *et al.*, 2010; JÖNSSON; MARTÍN, 2016).

4.1.3 Métodos físico-químicos

Essas técnicas combinam efeitos químicos e físicos de modo a otimizar a dissolução de hemicelulose e alteração da estrutura da lignina, o que proporciona maior acessibilidade da celulose (BEHERA *et al.*, 2014). Existem diversas estratégias debatidas na literatura, no entanto o presente trabalho incluirá somente o pré-tratamento a vapor e por ultrassom.

- *Explosão a vapor:* também chamado de "pré-tratamento a vapor", o que sugere que, durante a reação, a biomassa é rompida quando a pressão diminui rapidamente após sair da câmara da reação. No entanto, o principal mecanismo da explosão a vapor é semelhante ao da hidrólise ácida diluída, embora realizada com maior quantidade de biomassa seca e vapor, em vez de um líquido quente. Quando tratados em altas temperaturas em meio aquoso, os RLAS liberam ácidos orgânicos (principalmente ácido acético), o que provoca a auto hidrólise das ligações hemicelulósicas. A auto hidrólise é um tipo mais suave de hidrólise ácida, uma vez que o pH inicial da reação é quase neutro e o final é entre 3,5 - 4, dependendo da quantidade de ácido liberado (GALBE; ZACCHI, 2012).

Para alguns tipos de RLAs, antes de entrar na câmara de vapor um ácido deve ser usado para impregnar o material, pois o baixo teor de ácidos orgânicos na hemicelulose do material não é capaz de hidrolisar sozinho a matriz polimérica do resíduo. A adição de ácidos como o sulfúrico, clorídrico ou fosfórico reduzem o pH inicial da reação para cerca

de 2 e aumentam a eficiência da reação e da hidrólise enzimática subsequente. Contudo, assim como no pré-tratamento ácido, a degradação dos açúcares pode formar compostos inibitórios da fermentação, como furfural e HMF. Desse modo, o pré-tratamento com explosão a vapor pode possuir desvantagens semelhantes ao ácido, dependendo das condições reacionais aplicadas (GALBE; ZACCHI, 2012; HAGHIGHI *et al.*, 2013).

- *Pré-tratamento por ultrassom*: Quando materiais em uma suspensão líquida são tratados através de ultrassom, suas partículas são submetidas a erosão superficial (por colapso resultante da cavitação) ou redução de tamanho (devido à fissão através da colisão entre partículas ou ao colapso das bolhas de cavitação formadas na superfície). Maiores rendimentos de hidrólise enzimática após o pré-tratamento por ultrassom podem ser atribuídos a erosão e desgaste das partículas, que aumenta o transporte de macromoléculas enzimáticas para a superfície do substrato. Além disso, os impactos mecânicos, produzidos pelo colapso das bolhas de cavitação, proporcionam maior abertura da superfície de substratos sólidos para a ação de enzimas (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010; YU *et al.*, 2009).

4.1.4 Métodos biológicos

O pré-tratamento biológico não requer o uso de reagentes químicos, tem consumo energético pequeno e as condições reacionais são moderadas. Por isso, a tecnologia é considerada uma alternativa amigável ao meio-ambiente. Contudo, ainda enfrenta alguns inconvenientes que afetam negativamente sua aplicação comercial em maior escala. Estes incluem tempo de reação longo, exigência de grande espaço de instalação e a necessidade de monitoramento contínuo do crescimento dos microrganismos ao longo da operação (HAGHIGHI *et al.*, 2013).

Tamanho de partícula, teor de umidade, tempo de pré-tratamento e temperatura são as variáveis que controlam o desempenho dessa alternativa (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). No processo fermentativo, microrganismos podem ser usados para:

- *Sacarificar diretamente os açúcares contidos no RLA*: Diversas espécies de bactérias e fungos são capazes de hidrolisar celulose e hemicelulose em monossacarídeos, através de enzimas naturalmente produzidas por seus organismos. Contudo, esses açúcares são intermediários de seus metabolismos, sendo muito difícil impedir o seu consumo durante o andamento da reação. Por conseguinte, a sacarificação enzimática, em que microrganismos são utilizados apenas para extrair as enzimas hidrolíticas capazes de realizar hidrólise, é explorada (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

- *Realizar a hidrólise enzimática a partir de enzimas previamente extraídas*: Conforme mencionado anteriormente, a etapa de hidrólise enzimática é considerada por diversos autores essencial para a fermentação a partir de RLAs, apesar de seu custo e tempo elevados. Para a hidrólise da celulose, as celulasas são as enzimas primárias. Já para a hemicelulose, as xilanases devem ser empregadas (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016). As variáveis que intervêm sobre a hidrólise enzimática podem ser relacionadas a enzima ou ao substrato, embora muitos deles estejam relacionados entre si (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010).

- *Realizar uma etapa de delignificação intermediária no processo fermentativo*: essa etapa é também chamada de fermentação de estado sólido. A maioria dos microrganismos lignocelulolíticos, além do complexo enzimático lignocelulósico, produz outras enzimas, como pectinases, proteases, lipases e fitases. Por conta disso, juntamente com a remoção de lignina, uma porção de hemicelulose e celulose também é biodegradada, gerando perda de açúcares fermentescíveis. Uma solução para melhorar a seletividade é o isolamento das enzimas ligninolíticas e a sua utilização posterior diretamente sobre os RLAs (RABEMANOLONTSOA; SAKA, 2016).

4.1.5 Sacarificação e fermentação simultânea

De acordo com BINOD e col. (2010) a conversão de RLAs a etanol pode ser feita via sacarificação e fermentação simultânea (SSF) ou processos separados de hidrólise enzimática e fermentação (SHF). A chave do processo SSF é a capacidade para converter rapidamente os açúcares em etanol, logo que eles são formados pelas enzimas, diminuindo seu acúmulo no meio. Como os açúcares geralmente são mais inibitórios para o processo de conversão do que o etanol, é esperado que o SSF possa atingir maior rendimento em comparação com o processo SHF. Ainda, o SSF oferece uma operação mais fácil e um requer menos equipamentos do que o processo SHF, uma vez que não são necessários reatores de hidrólise enzimática. Por fim, a presença de etanol no caldo torna a mistura reacional menos vulnerável à ação de microrganismos indesejáveis (VOHRA *et al.*, 2014).

No entanto, a SSF tem o inconveniente de que as condições ótimas para a hidrólise e fermentação são diferentes, o que implica um difícil controle e otimização do processo. Enquanto a sacarificação com enzimas celulolíticas tem melhor performance em condições brandas (temperaturas e pH em torno de 4,8 e 50 °C, respectivamente) a maioria dos microrganismos fermentativos tem temperatura ideal para a fermentação de etanol entre 28 a 37 °C, além de meios de cultura mais ácidos. Desse modo, cepas de microrganismos termotolerantes capazes de fermentar etanol tornam-se atrativas (VOHRA *et al.*, 2014).

A tecnologia de SSF e co-fermentação aparentam ser soluções viáveis para aumentar a eficiência energética da etapa de hidrólise enzimática e conversão de etanol. O trabalho de Phitsuwan e col. (2016), utilizou o pré-tratamento de imersão em amônia aquosa para remover lignina da palha de arroz. Utilizando a mesma dosagem enzimática, a sacarificação e a fermentação simultâneas utilizando uma monocultura de *Saccharomyces cerevisiae* e co-cultura com *Candida tropicalis* produziram concentrações de etanol correspondentes às eficiências de fermentação de 96 % (em relação a glicose) e 86 % (em relação a glicose e xilose), respectivamente.

Já no trabalho de Hickert e colaboradores (2013), a co-fermentação e a sacarificação simultânea do hidrolisado de casca de arroz foram investigadas para a produção de etanol e xilitol por *Saccharomyces cerevisiae*, *Spathaspora arborariae*, ou a combinação de ambas. O hidrolisado da casca de arroz foi tratado por hidrólise ácida diluída e não foi feita operação de detoxificação ou suplementação ao hidrolisado. Os resultados mostraram boas perspectivas para usar co-culturas de *S. cerevisiae* e *S. arborariae* para a bioconversão de casca de arroz em etanol e de xilitol sem detoxificação.

Embora a sacarificação e fermentação conjunta seja uma abordagem promissora, não será discutida mais adiante no presente trabalho por dificultar a comparação. Fez-se essa escolha pois, uma vez que os processos são simultâneos, não é possível avaliar a influência individual do pré-tratamento.

4.1.6 Métodos de detoxificação

A eficácia de um método de detoxificação depende do tipo de inibidor presente no hidrolisado e dos microrganismos que serão usados para a fermentação subsequente. Várias técnicas (físicas, químicas e biológicas) podem ser empregadas para converter compostos inibidores em materiais inertes ou para reduzir a sua concentração no meio de cultura. No presente trabalho, serão abordados três métodos químicos (*overliming*, neutralização e lavagem com água), e biológico, também chamado bioabatemento (tradução livre, do inglês “*bio-abatement*”).

- *Overliming*: Essa alternativa consiste na adição gradual de um reagente básico (geralmente $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou NaOH) enquanto o hidrolisado sofre leve aquecimento e agitação (em torno de 50 °C, 250 rpm) até que o pH da solução atinja cerca de 10. Nesse processo, um precipitado (contendo os compostos inibitórios) é formado, que é então removido por filtração da solução. Por conseguinte, o pH da solução é neutralizado com a adição de um reagente ácido (comumente H_2SO_4). As condições exatas da reação (temperatura, pH final) são parâmetros a serem otimizados no estudo. Amplamente aplicada após o pré-tratamento ácido, essa metodologia demonstrou auxiliar a remoção de compostos inibidores voláteis tais como furfural e HMF do hidrolisado (HUANG *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2012, 2016).

No entanto, o método *overliming* não é uma forma efetiva de reduzir a toxicidade causada por ácidos orgânicos, como o ácido fórmico e o ácido acético. Além disso, o tratamento com excesso de base geralmente leva à perda de açúcares, que podem ser degradados durante o estágio em que o pH é significativamente elevado. Outra desvantagem associada a tecnologia *overliming* é a necessidade de instalações adicionais e sistemas de processo para remover o precipitado que é produzido como um subproduto, que aumenta significativamente o investimento de capital necessário para a instalação da planta (HUANG *et al.*, 2009).

- *Neutralização e lavagem com água*: essas técnicas são alternativas químicas que requerem menor uso de reagentes que o método *overliming*. O pH dos hidrolisados ácidos deve ser aumentado para o nível apropriado para o organismo de fermentação. Nesse contexto, sabe-se que o ajuste do hidrolisado a um pH básico, seguido por re-acidificação para atingir o pH de fermentação ótimo pode ter efeitos significativos de detoxificação. Entretanto, seu mecanismo não parece ser bem conhecido na literatura. Diversas bases têm sido propostas para realizar a neutralização. Alternativamente, a lavagem até o substrato atingir pH neutro também foi testada por diversos pesquisadores (KIM *et al.*, 2014; PIENKOS; ZHANG, 2009; SWAIN; KRISHNAN, 2015).

- *Biológico*: A detoxificação biológica é baseada no tratamento enzimático, empregando enzimas peroxidase e lacase, produzidas naturalmente por fungos

ligninolíticos como *Trametes versicolor*, *Aspergillus nidulas* e *Trichoderma reesei*. A alternativa tem a vantagem de ser adequada para o tratamento de misturas sólido - líquido, sem necessidade de insumos químicos e sem geração de resíduos. Desafios ligados ao tratamento biológico incluem o tempo necessário para a operação e a tendência dos microrganismos de consumir açúcar, o que diminui o rendimento global do processo.(BEHERA *et al.*, 2014; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; NICHOLS *et al.*, 2014).

4.2 Aplicação de métodos de pré-tratamento para casca e palha de arroz

Nessa seção serão abordados os pré-tratamentos dos artigos selecionados de acordo com os critérios discutidos no capítulo 3. As técnicas abordadas incluem tratamento com vapor, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, dissolução em LI e tratamento biológico.

4.2.1 Explosão a vapor

Essa técnica vem recebendo atenção especial do *Institute of Nuclear Energy Research*, de Taiwan, um dos países que mais produzem arroz no mundo. Huang e colaboradores (2009) desenvolveram uma cepa *P. stipitis* adaptada para tolerar inibidores do tratamento em baixos valores de pH através de sua adaptação a palha de arroz hidrolisada por meio ácido. Para investigar o sucesso da adaptação, ensaios de fermentação foram feitos empregando a palha de arroz como substrato quando submetida a duas formas de pré-tratamento.

Primeiramente, a palha de arroz sofreu tratamento com vapor com adição prévia de ácido sulfúrico diluído 1-3 % (em massa). Para detoxificação, foi empregado o método *overliming* com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, bem como tratamento básico usando NaOH. Experimentos de fermentação testaram o substrato tratado com os dois métodos descritos. Ademais, prepararam-se meios de fermentação suplementados com ácido sulfúrico ou furfural ao hidrolisado neutralizado com NaOH para testar a tolerância do microrganismo adaptado. Por fim, foi investigada a habilidade da cepa adaptada de fermentar xilose através de um cultivo em meio sintético, de modo a excluir o efeito de outros compostos na cinética de crescimento do microrganismo.

Os resultados obtidos para a palha de arroz tratada pelos dois métodos foram semelhantes. O rendimento de etanol para ambos os tipos de hidrolisado a pH 5,0 atingiu $0,45 \text{ g}_p \cdot \text{g}_s^{-1}$, o que equivale a 87 % da conversão máxima possível de etanol. Além disso, a *P. stipitis* adaptada demonstrou tolerância significativamente aumentada a sulfato e furfural. A conversão de etanol poderia ser mantida a 60 % ou acima quando o hidrolisado neutralizado continha 3,0 % de sulfato e $1,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de furfural. Não obstante, a cepa ambientada utilizou a xilose completamente nos ensaios em meio sintético, produzindo em apenas 29 horas um rendimento de etanol de $0,47 \pm 0,01 \text{ g}_p \cdot \text{g}_s^{-1}$.

Chen e colaboradores (2011), também pesquisadores do *Institute of Nuclear Energy Research*, buscaram comparar dois métodos de pré-tratamento usando casca de arroz: hidrólise ácida diluída seguida de explosão a vapor somente e explosão a vapor com adição de ácido sulfúrico. Nas duas alternativas, foram feitos ensaio de hidrólise enzimática. O tratamento proposto em duas etapas objetiva digerir a celulose com alta eficiência (condições severas) sem degradar xilose: primeiro, o ácido disponibilizaria a hemicelulose,

segundo, o vapor degradaria a celulose. Figura 4.2 traz o esquema dos dois pré-tratamentos utilizados no estudo.

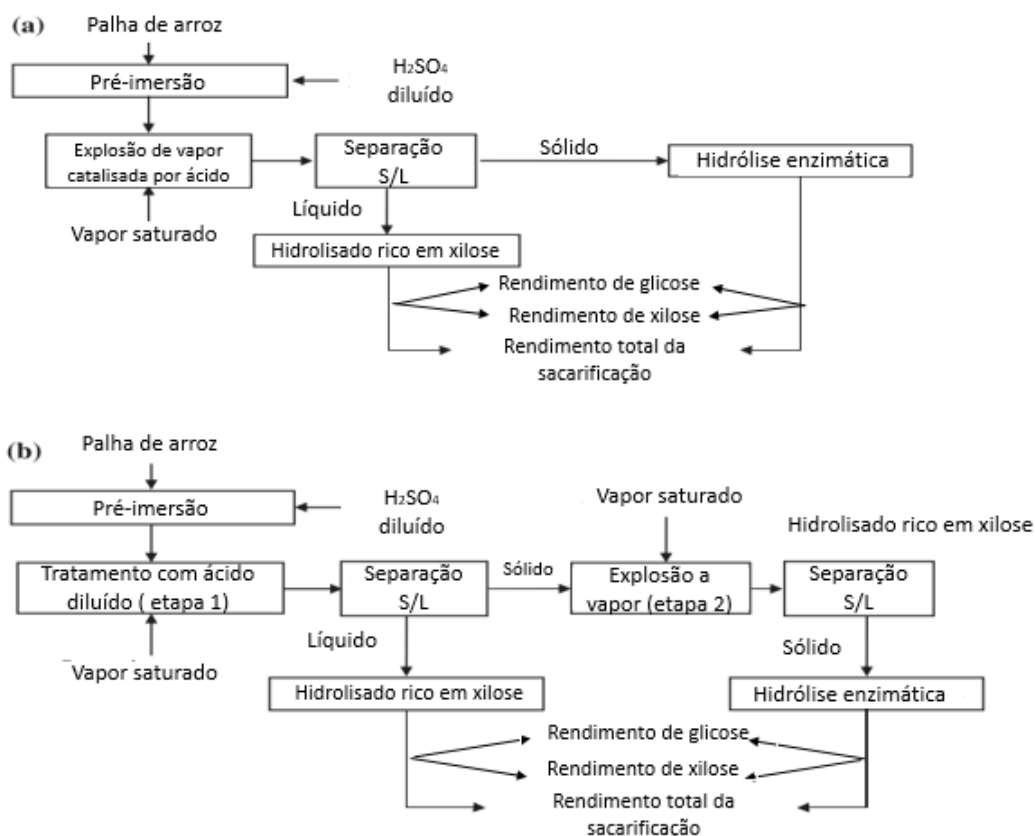


Figura 4.2: Os fluxogramas do processo de (a) a explosão de vapor catalisada por ácido sulfúrico e (b) hidrólise ácida diluída seguida de explosão a vapor (Adaptado de CHEN *et al.*, 2011).

Além da determinação da composição química depois das reações de pré-tratamento, foram investigadas as alterações nas propriedades físicas da palha de arroz (cristalinidade, área superficial, tamanho médio das partículas). O efeito da concentração na explosão a vapor com adição de ácido foi estudado numa faixa entre 1 % e 15 % a 180 °C durante 2 min. A fim de desenvolver um processo integrado, também se analisou a influência do tempo de residência da explosão a vapor no pré-tratamento combinado e as condições ótimas para a etapa de hidrólise de ácido diluído.

A combinação mais favorável de condições operacionais para o processo integrado foram, para o primeiro passo de hidrólise de ácido diluído, de 165 °C durante 2 min com H_2SO_4 a 2 %. Para a segunda etapa de explosão a vapor, de 180 °C durante 20 min. O rendimento total para as condições otimizadas foi de 75% do máximo teor de sacarificação total para o processo de pré-tratamento integrado em duas etapas, após 72 h de hidrólise enzimática com concentração, expressa em FPU (do inglês “Filter Paper Units”, atividade de celulasas totais) por mL de celulose corresponde a 20. Sob a perspectiva do processo consolidado, a metodologia proposta aumentou 1,5 vezes o rendimento global de açúcar, quando comparado com a explosão a vapor com adição de ácido.

Com base nos bons resultados acima descritos, Lin e colaboradores (2012), pesquisadores do *Institute of Nuclear Energy Research*, conduziram o primeiro estudo que se tem registro em que etanol a partir de hidrolisados de palha de arroz foi obtido em escala piloto, em um fermentador de 100 L, utilizando a cepa de *P. stipitis* anteriormente adaptada para hidrolisados neutralizados com NaOH. O processo de pré-tratamento proposto está ilustrado na Figura 4.3.

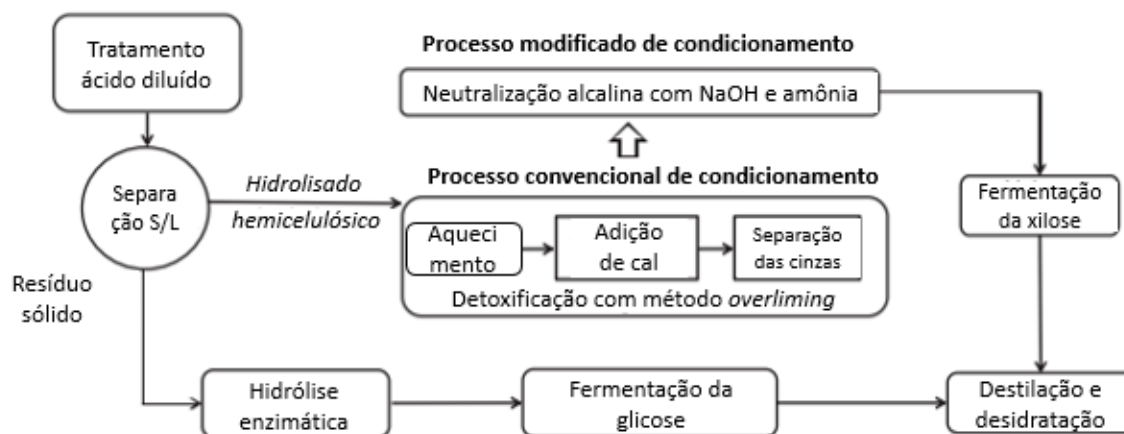


Figura 4.3: Esquema para produção de etanol a partir de palha de arroz. A etapa de condicionamento foi conduzida usando a detoxificação convencional pelo método *overliming* e pela neutralização alcalina (Adaptado de LIN *et al.*, 2012).

Duas formas de conduzir a hidrólise ácida diluída foram investigadas nesse estudo: em duas fases (tratamento com ácido diluído seguido de explosão a vapor em reatores separados) e em único reator (explosão a vapor com adição de ácido), conforme já havia sido explorado anteriormente (CHEN *et al.*, 2011). Resíduos pré-tratados com explosão a vapor a 200 °C obtiveram um rendimento de glicose de 80 % após a hidrólise enzimática, que foi muito melhor do que os rendimentos de glicose 70 % e 54 % observados usando ácido diluído em duas fases a 160 °C e 130 °C, respectivamente.

Assim, objetivando a produção máxima de etanol, a fermentação de xilose utilizando o pré-tratamento sob condições severas parece ser mais prática. Todos as experiências adicionais neste estudo utilizaram hidrolisados de palha de arroz produzidos por pré-tratamento ácido diluído a 160 °C e explosão a vapor a 200 °C. Não foi apontado na descrição da metodologia experimental do artigo quais foram as condições da reação de hidrólise enzimática.

O maior rendimento de etanol foi de $0,44 \pm 0,02 \text{ g}_p \cdot \text{g}_s^{-1}$ a uma taxa de aeração de 0,05 vvm usando hidrolisados detoxificados pela técnica *overliming*. Para a mesma taxa de aeração, o rendimento com hidrolisados condicionados por amônia e NaOH foi de $0,39 \pm 0,01$ e $0,34 \pm 0,01 \text{ g}_p \cdot \text{g}_s^{-1}$ respectivamente. No entanto, no artigo não fica claro para qual método de hidrólise (em duas fases, a 160 °C, ou em um único reator, a 200 °C) corresponde o rendimento otimizado. Considerando a perda de xilose resultante dos processos de

condicionamento, o rendimento real de etanol proveniente da fermentação do hidrolisado com neutralização de amônia foi semelhante ao do hidrolisado tratado por *overliming*.

Além disso, o rendimento de etanol a partir de hidrolisados neutralizados com amônia pode ser otimizado aumentando a densidade celular inicial por duas vezes ou reduzindo a concentração combinada de furfural e HMF para $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este estudo demonstrou o potencial para a produção comercial de etanol de palha de arroz via fermentação da xilose.

Tendo em vista a continuação dessa linha de pesquisa, Chen e colaboradores (2013), também pesquisadores do *Institute of Nuclear Energy Research*, desenvolveram um sistema contínuo de pré-tratamento a vapor com adição de ácido em escala piloto. Os parâmetros otimizados nesse artigo foram a concentração do ácido, a temperatura de reação, o tempo de residência, o tamanho da matéria-prima, a pressão de explosão e a velocidade da trituradora. A eficiência do pré-tratamento foi medida através da quantificação de xilose e glicose ao final da hidrólise enzimática. A Figura 4.4 contém o fluxograma do processo proposto.

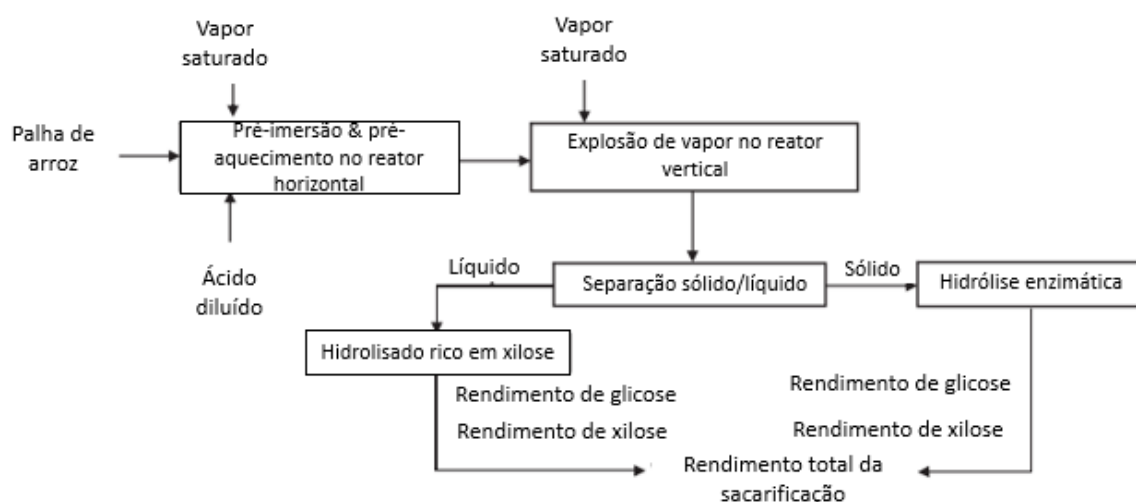


Figura 4.4: Fluxograma do processo de explosão a vapor na presença de ácido para o sistema de pré-tratamento contínuo em escala piloto (Adaptado de CHEN *et al.*, 2013)

Para o reator horizontal, as condições otimizadas de operação foram de 1,7 rpm e 100-110 °C, com uma concentração de ácido de 1,3 % (em massa). Para o reator vertical, de 185 °C durante 2 min. Aproximadamente 73 % do rendimento total de sacarificação foi obtido depois da palha de arroz foi pré-tratada sob condições ótimas e submetida a hidrólise enzimática (empregando celulase, $15 \text{ FPU}\cdot(\text{g de celulose})^{-1}$) com um fator de severidade combinado de 0,4 - 0,7. Além disso, observou-se boa estabilidade a longo prazo e a durabilidade do sistema de pré-tratamento em operação contínua. Um total de 52 corridas foram feitas, incluindo algumas replicatas.

Quanto a eficiência da hidrólise enzimática, a seletividade de xilose em relação a glicose variou entre 1,5 a 3,2, aumentando com o acréscimo do pH do hidrolisado. No entanto, a conversão de xilose e glicose oligomérica diminuiu com o aumento pH do meio. Ademais, quando a palha de arroz foi lavada, o rendimento de glicose aumentou significativamente (de 50–79 % para 77–89 %).

Isso indica que menores valores de pH levam a formação de inibidores, e a etapa de lavagem é necessária para um bom rendimento da reação. A xilose foi obtida em maior parte no pré-tratamento, enquanto a glicose foi obtida em maior parte na hidrólise enzimática. Os resultados ainda sugerem que o tamanho da palha de arroz e a pressão do vapor de explosão não afetam significativamente as concentrações de açúcar do hidrolisado da resultante do pré-tratamento.

O último artigo publicado por pesquisadores do *Institute of Nuclear Energy Research* que segue a linha de pesquisa com pré-tratamento a vapor é o de Lin e col. (2016). Nele, o aumento da produção de etanol lignocelulósico foi demonstrado com sucesso em escala piloto com a adição extra de palha de arroz ao hidrolisado hemicelulósico de madeira compensada. O estudo demonstra a aplicabilidade desta tecnologia em uma variedade de processos de etanol lignocelulósicos devido à conversão eficiente de xilose. Por não focar em casca ou palha de arroz, o estudo não será abordado em detalhe neste trabalho.

Complementando os estudos a respeito do pré-tratamento com vapor, Bin e Hongzhang (2010) conduziram em seu trabalho o pré-tratamento da palha de arroz usando explosão a vapor sem adição de ácido, com e sem lavagem empregando água. Posteriormente, foram feitos ensaios de hidrólise enzimática utilizando celulase. O estudo investiga a ação de cátion comuns presentes nas cinzas da palha de arroz sobre a atividade das enzimas.

Verificou-se que os cátions K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} e Zn^{+2} mostraram efeitos inibitórios sobre a celulase em diferentes níveis. Contudo, Ca^{+2} e Mg^{+2} demonstraram efeitos estimulantes sobre a β -glucosidase. O estudo cinético da hidrólise enzimática indicou que, em comparação com a palha de arroz não lavada, a velocidade máxima de hidrólise com lavagem anterior foi aumentada em 12,5 %. Portanto, a remoção de cinzas por lavagem pode facilitar a hidrólise enzimática.

4.2.2 Hidrólise ácida

Esse método de pré-tratamento é talvez o mais usado por pesquisas recentes, especialmente com ácido sulfúrico, conforme mencionado anteriormente na seção 4.2.1 deste trabalho. Objetivou-se, nessa seção, a busca por artigos científicos que utilizem processos ou reagentes ácidos alternativos ao convencional tratamento com sulfúrico, para investigar outras opções também viáveis de aplicação.

Em sua pesquisa, Ang, Ngho, e Chua (2013) comparam a performance de tratamento alcalino (NaOH and $Ca(OH)_2$) com tratamento ácido (H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 , CH_3COOH e HNO_3) em casca de arroz. As condições reacionais foram de (I) concentração de reagente, 0,5 % (massa/ volume); (II) carregamento de casca de arroz, 10,0 % (massa/ volume); (III) carregamento com água, 10,0 $mg \cdot L^{-1}$; (IV) temperatura de pré-tratamento, 100 ± 1 °C; (V) duração do pré-tratamento, 2 h. O conteúdo de açúcar totais foi usado como medida de eficiência das reações. O maior valor foi observado para HCl ($15,0 \pm 0,6$ $mg \cdot mL^{-1}$), seguido de HNO_3 ($12,2 \pm 0,1$ $mg \cdot mL^{-1}$) e H_2SO_4 ($7,2 \pm 0,3$ $mg \cdot mL^{-1}$). Curiosamente, o pré tratamento usando CH_3COOH , H_3PO_4 , NaOH, e $Ca(OH)_2$ produziu menos de 1 $mg \cdot mL^{-1}$ de açúcares, resultado similar ao tratamento só com água.

As condições de hidrólise para o HCl foram então investigadas usando a ferramenta estatística de planejamento de experimental *BOX-Behnken*. Os parâmetros otimizados foram a alimentação de reagentes (0,5 % (massa/volume de solução)), temperatura e tempo de aquecimento (125 °C, 1,5 h). Quantidades mínimas de furfural (em torno de 5 % do teor de açúcares total) foram detectadas, enquanto HMF não foi detectado. O artigo ainda faz análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de determinação de área de superfície *Brunauer–Emmett–Teller* (BET), buscando estudar o mecanismo de reação do HCl sobre a casca de arroz.

Já o artigo de Ma e co-autores (2011) compreende o pré-tratamento, hidrólise enzimática e separação dos subprodutos da casca de arroz. Os subprodutos incluem a glicose a partir de celulose, sílica, e sulfato de sódio cristalino ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Para isso, a casca de arroz é submetida a um pré-tratamento com ácido diluído seguido de hidrólise com ácido concentrado. A Figura 4.5 contém a metodologia usada nos experimentos.

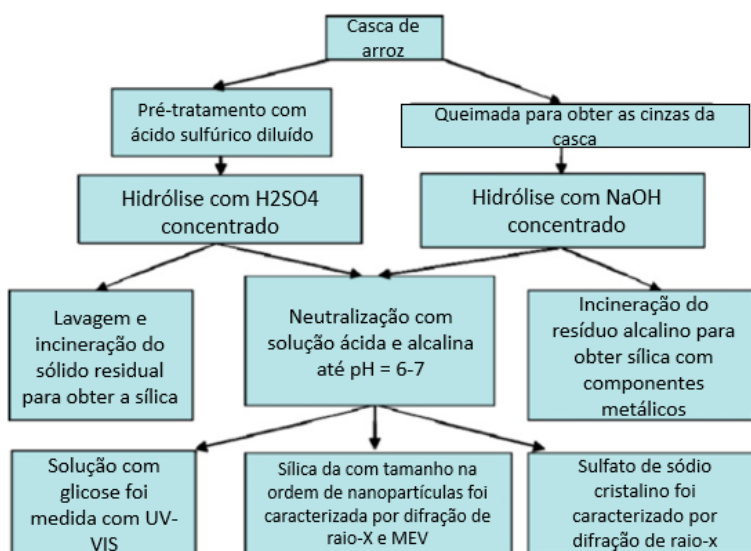


Figura 4.5: Diagrama simplificado do fluxograma da metodologia dos experimentos (Adaptado de MA *et al.*, 2011).

As condições ótimas de hidrólise foram de concentração de H_2SO_4 de 72 %, temperatura de 50 °C, tempo de 5 minutos e relação volume de solução de H_2SO_4 (mL) para a massa de casca de arroz (g) de 10: 1, que levaram a conversão de 45,6 % de glicose (base mássica). O pó de sílica foi abaixo de 50 nm quando caracterizado por difração de raios-X (DRX) e MEV. O sulfato de de sódio, principal subproduto cristalino, foi caracterizado por DRX e fotografias.

Por fim, no estudo de Kim e colaboradores (2014), o HNO_3 foi avaliado como ácido para o pré-tratamento da palha de arroz e, depois da neutralização, como única fonte de nitrogênio para a fermentação subsequente. Os ensaios de fermentação empregaram a cepa *P. stipitis*. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para se obter a condição de pré-tratamento que maximizasse o rendimento para a xilose. O rendimento

de xilose máximo de 86,5 % e uma digestibilidade enzimática de 83,0 % de glicose foram alcançados para a condição de pré-tratamento de 0,65 % de HNO₃, 158,8 °C e 5,86 min.

Quando a concentração do ácido ou tempo de reação foram aumentados, a recuperação de xilose foi reduzida. Isto ocorreu provavelmente por causa da decomposição parcial da xilose liberada em furfural. É típico que tais produtos de degradação sejam acumulados no hidrolisado sob condições reacionais severas. Quando o rendimento de xilose foi maior do que 80 %, as concentrações máximas de ácido acético, furfural e HMF de 1,68 g·L⁻¹, 1,18 g·L⁻¹ e 0,15 g·L⁻¹, respectivamente. De acordo com o autor, estas quantidades são inferiores a valores reportados como sendo inibidores para de fermentação para a *P. stipitis*, por isso assumiu-se que não haveria interferência no processo de fermentação subsequente.

Para avaliar a eficiência da hidrólise enzimática, comparou-se a performance da palha pré-tratada com HNO₃ e H₂SO₄ nas condições otimizadas empregando celulase, a uma concentração de 30 FPU·(g de celulose)⁻¹. O rendimento mais elevado de glicose após 72 h de hidrólise foi alcançado para o HNO₃ (47,7 g·L⁻¹), maior do que para o H₂SO₄ (43,8 g·L⁻¹). Além disso, a maior parte dos polímeros de xilose (> 99 %) foi convertido a monômero de xilose por HNO₃, enquanto que pequena parte (6,3 %), manteve-se depois do pré-tratamento com H₂SO₄.

Um dos benefícios que distingue o uso do ácido nítrico para o pré-tratamento reside no passo da fermentação subsequente, já que é possível que o ácido neutralizado sirva como uma fonte de nitrogênio para fermentação do microrganismo, conforme foi demonstrado pelos autores em seu trabalho.

4.2.3 Hidrólise alcalina

Para complementar o estudo de Ang, Ngoh e Chua (2013), explicado na seção 4.2.2, procurou-se artigos em que a hidrólise alcalina fosse otimizada. No trabalho de Swain e Krishnan (2015), a produção de etanol e xilitol a partir de palha de arroz foi otimizada utilizando pré-tratamento com amônia aquosa, seguido de hidrólise enzimática e fermentação.

As condições de hidrólise alcalina foram avaliadas usando a palha de arroz e variando a concentração de amônia aquosa de 5 a 20 %, na proporção sólido - líquido de 1: 10. As condições de operação usadas foram de 120 °C durante 60 min num vaso de pressão. Após resfriadas à temperatura ambiente, as amostras foram lavadas com água da torneira até o pH da biomassa atingir 7,0. Além da caracterização dos açúcares antes e depois do pré-tratamento, foram feitas análises de MEV, FT-IR e DRX. Essas mostraram mudanças significativas na estrutura físico-química da biomassa, favorecendo hidrólise enzimática.

O rendimento de açúcares aumentou conforme o acréscimo de amônia na etapa de pré-tratamento. Na concentração de 15 % foi obtido o nível mais alto de glicose e xilose. Para os experimentos com concentração de amônia em 20 %, o rendimento de xilose observado foi menor. Segundo o autor, esse resultado pode ser atribuído a tendência da amônia em dissolver hemiceluloses de lignocelulose em condições severas. A lignina

insolúvel em ácido foi mais removida da palha de arroz do que a solúvel em ácido. O nível da segunda permaneceu o mesmo após o pré-tratamento com diferentes concentrações de amônia, embora o nível da primeira diminuísse conforme a concentração de base aumentasse.

Quantos aos ensaios de hidrólise enzimática, foi empregada celulase e hemi-celulase, onde foram feitos experimentos que avaliaram sua performance individual e combinada, em diferentes razões. O coquetel de enzimas com melhor desempenho foi o de proporção de celulase para hemi-celulase 1: 3 com uma dosagem de 20–30 FPU / g de biomassa seca que correspondeu a uma hidrólise de 97 % de açúcares totais.

Por fim, a fermentação do hidrolisado resultante do pré-tratamento e hidrólise enzimática otimizados foram avaliadas por meio de fermentações em batelada repetida com reciclagem de células. Foram empregadas as espécies *S. cerevisiae* e *C. tropicalis*. Um rendimento de etanol de 98 % foi atingido até três lotes de reciclagem de células de *C. tropicalis*, enquanto para as mesmas condições o rendimento obtido pela *S. cerevisiae* foi de 79 %.

Já no artigo de Singh e col. (2011), ferramentas estatísticas de planejamento experimental foram empregadas para o pré-tratamento por micro-ondas seguido de hidrólise alcalina com NaOH de palha e casca de arroz. No primeiro momento, parâmetros do processo importantes no pré-tratamento da biomassa foram identificados pelo delineamento *Plackett-Burman*. Por conseguinte, e os parâmetros com efeitos significativos foram otimizados utilizando a ferramenta de planejamento *BOX-Behnken*.

Os resultados experimentais mostram que a concentração de NaOH, o tempo de irradiação e a concentração de substrato são os principais fatores que regem a hidrólise alcalina de palha e casca de arroz. Para palha de arroz, as condições ótimas de pré-tratamento foram concentração de NaOH de 2,75 %, tempo de irradiação de 22,50 min e concentração de substrato de 30 g·L⁻¹. Para casca de arroz, não foram mostradas as condições ótimas. As reações foram conduzidas com tempo de tratamento variável, temperatura de até 100 °C e poder de radiação entre 200 e 600 W. Depois da radiação, lavagem, filtração e secagem a 45°C. Após o pré-tratamento, a biomassa foi lavada extensivamente com água deionizada até atingir pH neutro.

Para medir a eficiência da operação, a composição da biomassa foi medida antes e depois do pré-tratamento. Para a palha de arroz (antes – depois): teor de celulose (38 % - 52 %), hemicelulose (26 % - 32 %), lignina (7 % - 3,5 %) e teor de cinzas (15 % - 8 %). Já para a casca de arroz: celulose (35 % - 46 %), hemicelulose (13 %, 20 %), lignina (15,2 % - 7,2 %) e cinzas (20 % - 12 %). Posteriormente, o substrato tratado com as condições de pré-tratamento otimizadas foi empregado em cultivos de fermentação em estado sólido, para produzir as enzimas lignocelulolíticas do *Aspergillus heteromorphus*.

4.2.4 Dissolução em LI

Complementando os estudos que utilizam tratamento alcalino, no artigo de Nguyen e colaboradores (2010), é proposto um pré-tratamento usando amônia e líquido iônico para

a recuperação de celulose biodigerível de palha de arroz. Foi avaliada a influência da dissolução em LI e da hidrólise alcalina individualmente e em conjunto. Por fim, foram feitos ensaios de hidrólise enzimática empregando um coquetel de enzimas (celulase e β -glucosidase). Quatro LIs, cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIM] Cl), cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIM] Cl), acetato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIM] Ac) e hidrogeno-sulfato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIM] Su) foram testados para dissolver a palha de arroz.

Para o pré –tratamento com LI, 1 g de palha de arroz foi misturada com 20 mL de LI e incubadas num forno a 130 °C durante 24 h. Após dissolução, 20 mL de etanol foi adicionado à solução para precipitar e regenerar a palha de arroz. Então, a biomassa foi separada da solução através de filtração. Por fim, a solução foi tratada para recuperação do LI e o sólido foi lavado com água destilada e secado antes da hidrólise enzimática.

Já para o tratamento com amônia, 1 g de palha de arroz e 10 mL de 10 % (em volume) solução de amônia foram misturados e incubados a 100°C durante 6 h. Depois do pré-tratamento, a biomassa também foi filtrada e seca. Para o tratamento combinado, a palha de arroz foi primeiro tratada com a solução de amônia e, por conseguinte, com o LI, conforme os procedimentos anteriormente descritos.

O LI que teve melhor desempenho na dissolução da palha de arroz foi o [Emim]Ac. Para esse LI, o pré-tratamento combinado teve recuperação de celulose de 82 %, com 97 % de conversão em glicose após a hidrólise enzimática. Esse resultado foi significativamente mais elevado do que o obtido pela hidrólise alcalina (84 % e 52 %) ou dissolução com LI (79 % e 76 %). Ainda, o tempo de dissolução da palha de arroz em LI pôde ser reduzido para até 6 h, embora a maior porcentagem de celulose recuperada foi obtida após 24 h de reação. Quando a palha sofreu somente a dissolução de LI, o tempo de dissolução foi de 24 h e o máximo de celulose regenerada foi obtido com 48 h de reação.

Quanto a viabilidade econômica, o líquido iônico foi reciclado com sucesso mais de 20 vezes. Para o tratamento combinado, o 20-reciclado ([Emim] Ac) mostrou 74 % de recuperação de celulose e 78 % da conversão da glicose a palha de arroz. Curiosamente, quando a concentração da enzima foi reduzida em 50 e 10 %, a conversão de glicose obtida foi de 92 % e 83 %, o que demonstra potencial de aplicação.

Por outro lado, o trabalho de Yang e Fang (2014) investiga a aplicação de ultrassom e LIs na degradação da palha de arroz sob diferentes processos de pré-tratamento. Inicialmente, a biomassa foi tratada com ultrassom. Depois, o material resultante foi ou conduzido diretamente para a hidrólise enzimática ou tratado com LI. Dois tipos diferentes de LI foram testados: 1-etil-3-metilimidazólio etilsulfato e decanoato de trihexil fosfato ([EMIM][EtSO₄] e THTDPD) e hidróxido de colina [Ch][OH]). As alterações estruturais da composição da biomassa devido ao pré-tratamento foram verificadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX).

Após a reação com líquido iônico, a biomassa foi lavada com água deionizada e seca. A eficiência do pré-tratamento foi avaliada através da reação de hidrólise enzimática

empregando celulase. Para estudar a influência do ultrassom, oito substratos ao total foram testados (quatro tipos de pré-tratamento, com e sem ultrassom): palha de arroz em pó não tratada; palha de arroz tratada por [EMIM][EtSO₄] e THTDPD com ultra-som a 300 W / (40 kHz, 28 kHz); palha de arroz tratadas por [Ch] [OH] com ultra-som em 300 W / 40 kHz. Na hidrólise enzimática mediada por ultrassom, o melhor rendimento de açúcares redutores totais foi convertido a partir da palha de arroz tratada com [Ch] [OH], atingindo até 96,22 % (19,5 % maior do que sem irradiação) em 240 minutos.

Por fim, no trabalho de Hou e col. (2015), um sistema de solvente consistindo de 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), e o líquido iônico acetato de 1-butil-3- metilimidazolio ([BMIMO] Ac) foi usada para separar os polissacarídeos de casca de arroz e farelo de trigo. O DMI foi aplicado para substituir o uso do co-solvente sulfóxido de dimetilo (DMSO), já que esse é tóxico e pode causar severo impacto ambiental. Os efeitos da razão de DMI / [BMIMO] Ac, influência da temperatura e tempo na dissolução de casca de arroz e farelo de trigo foram investigados, bem como a interferência de não-solventes na regeneração dos polissacarídeos ricos em açúcar. As amostras de casca de arroz foram analisadas pelas técnicas analíticas de análise termogravimétrica (TGA) e FT-IR. Além disso, foram feitas análises para checar a pureza do líquido iônico reciclado utilizando espectroscopia por ressonância magnética nuclear (H-NMR).

Na reação de pré-tratamento, 5 g de casca de arroz foram adicionados a 100 g sistema de solventes (razão de [BMIMO] Ac e DMI de 3:1). A mistura foi aquecida num banho de óleo, por diferentes tempos de reação e temperaturas. Após incubação, uma suspensão de biomassa foi obtida e a mistura foi subsequentemente filtrada para remover o resíduo não dissolvido. Em sequência, o não- solvente (água, água / acetona (1: 1 em volume) ou etanol) foi adicionado aos licores claros para precipitar a biomassa dissolvida. Neste processo, material rico em polissacáridos foi regenerado a partir do licor. O material regenerado não dissolvido foi lavado com o não- solvente para remover completamente o solvente e em seguida secou-se a vácuo.

A viscosidade do LI foi reduzida com a adição de DMI como co-solvente. Além disso, o sistema de solvente é mais poderoso para dissolver casca de arroz e de trigo do que o [BMIMO] Ac puro. O sistema de solventes reciclados exibiu capacidade constante para separar polissacarídeos partir de casca de arroz e farelo de trigo. O aumento da temperatura promoveu maior dissolução da biomassa. No entanto, a 120 °C, a suspensão de casca de arroz tornou-se muito viscosa, dificultando a remoção do resíduo não dissolvido a partir da solução de casca de arroz. Por conseguinte, foi utilizada a temperatura de 110 °C.

Mesmo em condições otimizadas, a taxa de dissolução da casca de arroz foi de apenas 29,7 %. Já para o farelo de trigo a taxa de extração de polissacarídeos atingiu 71,8 % a apenas 50 °C. Segundo os autores, esse resultado pode ser atribuído ao alto teor de SiO₂ da casca de arroz, que no farelo de trigo é menor. A fim de obter uma taxa de dissolução mais elevada a partir de casca de arroz, seriam necessárias temperaturas elevadas. No entanto, o aumento viscosidade limita a extração em maiores temperaturas.

Embora não houvesse diferença significativa na taxa de extração, o conteúdo de celulose em material regenerado a partir da casca de arroz foi significativamente maior quando se utilizou acetona / água como não-solvente. A composição da casca antes – depois da reação foi de 37,3 % - 91,3 % de celulose, 17,5 % - 3,1 % de hemicelulose, 23,2 % - 0,3 % de lignina e 20,7% - 5,3 % de cinzas. Para o farelo de trigo, o teor de polissacáridos no material regenerado pôde atingir até 94,4 % quando o etanol foi utilizado como não-solvente.

4.2.5 Tratamento biológico

Conforme abordado nas seções 4.1.4 e 4.1.6, os métodos biológicos podem ser aplicados para aumentar a disponibilidade de açúcar (diretamente ou através de hidrólise enzimática), para efetuar uma etapa de delignificação intermediária ou como método de detoxificação. A hidrólise enzimática é usada amplamente nos estudos selecionados que abordam o pré-tratamento a partir de casca e palha de arroz (11 dos 16 artigos). Por isso, foi procurado abordar formas alternativas de utilizar microrganismos dentro do processo fermentativo para obtenção de etanol a partir da casca e palha de arroz.

No artigo de Nichols e colaboradores (2014), a casca de arroz após tratamento ácido diluído (1 % (base volumétrica) de H_2SO_4 , a 150 ° C, aproximadamente 1 h de operação) foi submetida ao bioabateimento de inibidores pelo fungo *C. ligniaria* e, posteriormente, a ensaios de hidrólise enzimática e fermentação. Os ensaios de fermentação utilizaram três microrganismos diferentes: a levedura convencional *S. cerevisiae* D5a, a cepa FBR5 de *E. coli* manipulada para produção de etanol de alto rendimento e a *S. cerevisiae* YRH400, uma cepa manipulada para fermentação com xilose.

Para a fermentação de bioabateimento, o fungo foi previamente cultivado em meio sintético e inoculado na casca de arroz que havia sofrido a hidrólise ácida diluída. As concentrações de tóxicos ao longo do cultivo foram monitoradas para avaliar a eficiência da detoxificação. Logo após a hidrólise ácida, o furfural e HMF tinham concentração de $14,8 \pm 6,3$ mM e $3,0 \pm 0,5$ mM. Em 22 h de cultivo, furfural foi consumido 81% em média, enquanto HMF foi reduzido em 43 % da sua concentração inicial. Entre 22 e 24h, 0,04 % (massa/ volume), que corresponde a 5 % de glucose solúvel do hidrolisado, tinha sido consumido pela levedura, e pentoses não foram consumidas.

Quanto ao acetato, apenas 9,5 % havia sido esgotado após 48 h. Experimentos mais longos tiveram melhor resultado: em 96 h cultivo, 74 % foi consumido. No entanto, tempos maiores de fermentação talvez não sejam desejáveis já que, em relação aos monômeros iniciais, 38 % de glucose e 0,7 % de xilose foram consumidos nesse tempo de reação. Por isso, os experimentos de fermentação subsequentes, foi empregado o tempo de bioabateimento de 20-22 h.

Para o substrato que sofreu bioabateimento, a glicose foi convertida em etanol a 0,58 % (massa/ volume) por *S. cerevisiae* D5a, que corresponde a mais de 100 % do rendimento teórico. Enquanto isso, nos cultivos sem detoxificação, a levedura não saiu da fase de latência ou teve o rendimento de etanol reduzido (80 % do teórico). Em fermentações com *S. cerevisiae* YRH400, o bioabateimento de hidrolisados melhorou de forma semelhante as

fermentações. Contudo, o metabolismo da xilose foi fortemente afetado pelo pH e concentração de acetato. Por fim, a fermentação de xilose e arabinose pela *E. coli* FCH5 produziu etanol a partir de amostras bioabatidas e não bioabatidas de 2,25 % e 0,05 % (massa/ volume), respectivamente.

No âmbito de diminuir o tempo requerido para delignificação do RLA por fungos e ainda assim ser uma alternativa amigável ao meio-ambiente, o trabalho de Yu e col. (2009) propôs um pré-tratamento em 3 passos para casca de arroz. Primeiro, a etapa física ou química (ultrassom e H₂O₂), seguida de tratamento biológico (empregando o fungo *Pleurotus ostreatus*). Além de análises da casca antes e depois da reação, foram feitas análises das atividades de ligninases e das observações de MEV. O pré-tratamento com ultrassom não levou a alterações distintas dos principais componentes da casca de arroz, enquanto que o pré-tratamento com H₂O₂ pôde levar apenas à degradação parcial da lignina.

Ambos induziram a ruptura de estrutura lignocelulósica. Contudo, mesmo com aumento em relação a casca não tratada, a taxa de açúcares hidrolisados após a reação enzimática ainda se manteve em um nível baixo. Já o pré-tratamento fúngico combinado pode aumentar a eficiência da hidrólise enzimática. No entanto, conduziu a perdas consideráveis de carboidratos devido ao longo tempo de residência. As combinações de H₂O₂ (2%, 48 h) e *P. ostreatus* (18 d), que obtiveram o melhor resultado após a hidrólise enzimática, levaram a 39,8 % e 49,6 % de rendimentos de açúcares totais dissolvidos e glicose, respectivamente. Esse resultado foi cerca de 5,8 vezes e 6,5 vezes maior do pré-tratamento somente com fungo (18 d).

5 Inferências quanto ao uso potencial dos métodos

A Figura 5.1 ilustra as metodologias de pré-tratamento dos artigos abrangidos na seção 4.1.5 e 4.2. Observa-se que até quatro operações unitárias podem anteceder a fermentação, sendo que a maioria (11 dos 16 estudos) utilizou a etapa de hidrólise enzimática. Nota-se ainda que os métodos químicos estão presentes em todos os artigos abordados. Nos estudos em que foram exploradas alternativas em condições reacionais mais brandas, foi optado pela inclusão de um método físico, físico-químico ou biológico anterior a etapa química.

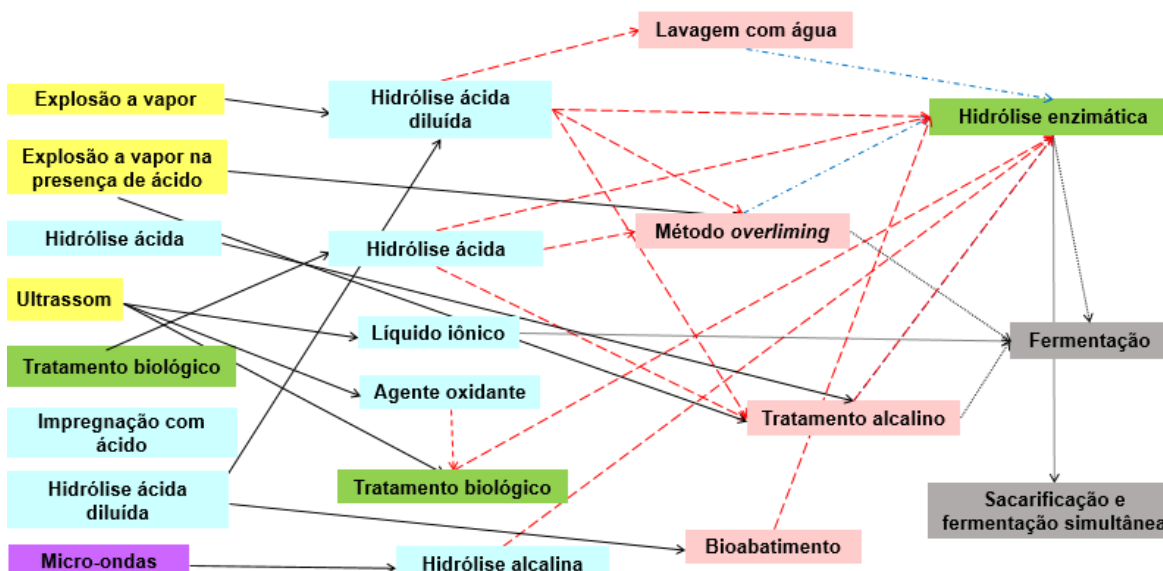


Figura 5.1: Representação das metodologias de pré-tratamento para casca e palha de arroz empregadas nos artigos selecionados. As caixas representam as operações unitárias, onde a cor amarela retrata métodos físico-químicos; a azul, químicos; a verde, biológicos; a roxa, físicos; a rosa, de detoxificação e a marrom, de fermentação. As setas representam as transições entre as operações unitárias, sendo a de cor preta, a transição da primeira para a segunda operação; vermelha, da segunda para a terceira; azul, da terceira para a quarta; cinza, da quarta operação para a fermentação (*elaboração própria*).

Desse modo, pode se inferir que a implementação de técnicas com condições reacionais menos severas e menor uso de reagentes químicos está atrelada a inclusão de mais etapas de pré-tratamento, visando obter a máxima recuperação de todas as formas de carboidratos. Nesse sentido, diversas combinações de métodos podem ser exploradas, conforme abordado nesta revisão bibliográfica.

O único estudo em que realizou-se fermentação sem hidrólise enzimática foi o de Huang e colaboradores (2009), que empregou uma cepa da espécie *P. stipitis* (naturalmente capaz de fermentar pentoses) adaptada a compostos inibidores da fermentação (ver seção 4.2.1). Ainda assim, nos estudos que deram a continuidade da linha de pesquisa, quando a escala de produção foi aumentada incluiu-se a hidrólise enzimática como parte do pré-tratamento. Logo, ela parece ser de fato um passo chave na fermentação de casca e palha de arroz, conforme afirmado na literatura (ver seção 4.1.4).

Fica clara, portanto, a dependência de tecnologias biológicas no processo de produção de etanol a partir de casca e palha de arroz não só na etapa de fermentação, mas também nas reações de pré-tratamento. Conforme explanado na seção 4.1.4, apesar de serem considerados amigáveis ao meio-ambiente, os métodos biológicos ainda enfrentam entraves que limitam sua aplicação em maior escala. Por consequência, novas pesquisas que objetivem a viabilidade econômica do processo devem ser conduzidos.

No apêndice I, estão resumidas as características, vantagens e desvantagens de cada método de pré-tratamento abordado. Para comparar os métodos de tratamento discutidos na seção 4.2, atribuiu-se uma nota de 1 a 3 em relação a cada parâmetro de eficiência apontado na seção 3. Para garantir maior sensibilidade a análise, atribuiu-se pesos maiores aos parâmetros considerados mais importantes.

A classificação de acordo com cada parâmetro será discutida nas seções a seguir. Visto que a maior parte dos artigos emprega hidrólise enzimática, foram considerados parte do tratamento biológico somente os estudos compreendidos na seção 4.2.5.

5.1.1 *Recuperação de todas as formas de açúcares*

Esse parâmetro foi considerado de máxima importância (peso 3) para a escolha de uma metodologia de pré-tratamento porque representa o objetivo final dessas reações. Para avaliar os artigos quanto a recuperação de açúcares, elaborou-se um resumo das metodologias e resultados reportados pelos diferentes autores que estão incluídos nesta revisão bibliográfica. A tabela que contém esse resumo está incluída no apêndice II.

Ao método biológico atribuiu-se a menor nota, pois quando foi usado como uma etapa de deslignificação intermediária (YU *et al.*, 2009) obteve rendimento inferior de glicose quando comparado às demais tecnologias. Além disso, nos testes de bioabastecimento (NICHOLS *et al.*, 2014) foi reportado consumo de açúcar pelo microrganismo durante a cultura.

Quanto aos demais métodos, foi encontrada dificuldade para diferenciar os rendimentos de açúcar reportados pelos autores. Diversas unidades foram usadas para apontar o resultado obtido e alguns estudos só realizaram a caracterização dos açúcares totais, sem efetuar hidrólise enzimática. Ainda, dentre os que realizaram, diferentes tipos e concentrações (expressas em unidades variadas) de enzima foram testadas.

Atribuiu-se ao método de explosão a vapor nota inferior a dos demais porque os estudos que empregaram essa tecnologia reportaram rendimento de açúcares totais menores ou iguais a 80 %. Já para a tecnologia de hidrólise ácida ou alcalina e dissolução em LI, rendimentos de até 97 % foram encontrados.

5.1.2 *Não formação de inibidores de fermentação e necessidade de detoxificação*

Apesar de afetar as reações subsequentes, a formação de inibidores de fermentação pode ser contornada com a inclusão de etapas de detoxificação ao processo. No entanto, o maior número de operações influencia diretamente a viabilidade econômica do processo,

de modo que é preferível evitá-la. Tendo isso em vista, foi considerado que esse parâmetro tem peso 2 na escolha da tecnologia de pré-tratamento.

Os métodos que são reportados na literatura por gerar inibidores de fermentação devido a degradação de RLAs são os químicos e, em menor quantidade, alguns físico-químicos (seções 4.1.2 e 4.1.3). Desse modo, ao tratamento biológico e a dissolução em LI foi dada a nota máxima em relação a esse parâmetro.

Entre os métodos conhecidos por formar inibidores na literatura, a hidrólise ácida acarreta a formação de maior número de inibidores, e em maior quantidade. Nos artigos selecionados em que a hidrólise alcalina foi empregada, só a lavagem com água foi suficiente para retirar esses compostos indesejados. Já para a explosão a vapor e hidrólise ácida, o uso de reagentes químicos é necessário para remoção adequada. Por essa razão, à hidrólise ácida foi dada nota inferior a da alcalina e a da explosão a vapor.

5.1.3 *Demanda energética*

A demanda energética está ligada não só aos os custos da planta, mas também à utilização de recursos naturais e segurança de operação. Entende-se, no entanto, que a viabilidade de um processo se baseia primariamente em parâmetros de eficiência reacionais e custos de instalação e operação, uma vez que são encontrados na indústria plantas com alta conversão em operação, mesmo possuindo alta demanda energética. Assim, a esse parâmetro foi atribuído o peso 2.

Ao tratamento biológico foi dada a nota 3 para esse parâmetro, já que seu apelo é a utilização de condições reacionais brandas, menor uso de reagentes e de energia (seção 4.1.4). À tecnologia de explosão a vapor foi dada a nota mínima, uma vez que ela faz uso de até quatro operações, empregando altas temperaturas e pressões, além de etapas de detoxificação.

Já a tecnologia de dissolução em LI requer a recuperação do LI após a dissolução da biomassa, o que aumenta a demanda energética do processo. No entanto, não necessita de etapa de detoxificação, ao contrário da hidrólise ácida e alcalina. Tendo isso em vista, para esses métodos foi dada a nota 2. Nota-se que ocorre relação inversa entre o uso de reagentes e escolha de condições reacionais severas, que por consequência comprometem a demanda energética operacional.

5.1.4 *Tempo de operação*

O tempo de operação é determinante para a integração de todos os processos dentro de uma planta. No entanto, no processo de produção de etanol a etapa cujo tempo de operação é mais importante é a fermentação, de modo que as demais passos podem ser ajustados. Por isso, foi considerado peso 1 para esse parâmetro.

Conforme descrito nos artigos selecionados, os métodos com tempo de operação mais longos são os biológicos (podendo durar até 61 d), por isso estes receberam nota 1. Já o método de explosão a vapor e hidrólise ácida são os mais rápidos (cerca de 2 h de

operação), assim obtiveram nota 3. Por fim, a hidrólise alcalina e a dissolução em LI podem ser usadas com tempos intermediários (de 2 a 6 h), de modo a receber nota 2.

5.1.5 Custo de instalação e operacional

Entende-se que esse parâmetro tem máximo peso entre os definidos, conforme já explanado anteriormente. Os métodos que tiveram pior pontuação foram a dissolução de LI e explosão a vapor, pois o custo de instalação e operacional são os maiores entraves para a aplicação dessas tecnologias em escala industrial. Para a tecnologia de dissolução em LI, o maior custo está na obtenção e a recuperação posterior do LI (seção 4.2.4). Conquanto, para a tecnologia de explosão a vapor, o maior custo é proporcionado pelas inúmeras etapas de reação, além das altas temperaturas e pressões usadas (seção 4.1.3).

Aos demais métodos foi conferido nota 2, pois é difícil diferenciá-los quanto a esse parâmetro. Todos possuem vantagens e inconveniências em relação aos custos. O método biológico apresenta baixo custo de instalação. Em contrapartida, possui recuperação de açúcares menor e tempo de operação maior comparado as outras tecnologias, o que aumenta seu custo operacional. Já a hidrólise ácida e alcalina proporcionam maior recuperação de açúcares, mas maior uso de reagentes e necessidade de detoxificação da biomassa antes da fermentação.

5.1.6 Tecnologia com melhor potencial para aplicação em escala industrial

A Tabela 5.1 apresenta o resumo da pontuação total. Observa-se que, em relação aos estudos com casca e palha de arroz avaliados nesta revisão bibliográfica, a hidrólise química é a tecnologia de pré-tratamento para esses RLAs com maior potencial de aplicação industrial de acordo com a metodologia de classificação proposta. A hidrólise alcalina destaca-se na classificação em relação a ácida porque, apesar de ter tempo mais elevado de operação, produz menos tóxicos e exige etapas com menor uso de reagentes químicos.

Tabela 5.1: Classificação dos métodos de pré-tratamento abordados na revisão bibliográfica de acordo com os parâmetros definidos (elaboração própria).

Método	Resultar em alta recuperação de todas as formas de açúcares	Não produzir tóxicos / fermentação sem detoxificação	Possuir baixa demanda energética	Minimizar o tempo de operação	Baixo custo de instalação e operacional	Total
Explosão a vapor	2	2	1	3	1	1,63
Hidrólise ácida	3	1	2	3	2	2,18
Hidrólise alcalina	3	2	2	2	2	2,27
Dissolução em LI	3	3	1	2	1	2,00
Tratamento biológico	1	3	3	1	2	2,00
Peso	3	2	2	1	3	11

Na seção 4.2.2, foi descrito o trabalho de Ang; Ngh; Chua (2013), que comparou a performance de reagentes ácidos com alcalinos. Nesse estudo, a performance de reagentes alcalinos teve ação similar à da água, e o químico de melhor desempenho foi o HCl. Fica claro, portanto, a dependência das condições reacionais para o rendimento final da reação. Nesse estudo, todos os reagentes foram testados para as mesmas condições reacionais (concentração de reagente, razão de massa de biomassa / volume de reação, temperatura e tempo de pré-tratamento). No entanto, conforme descrito nas seção 4.2.3, em condições reacionais otimizadas o tratamento alcalino alcança bons resultados, com rendimentos de até 97 % de açúcares totais após a hidrólise enzimática (SWAIN; KRISHNAN, 2015).

Curiosamente, a tecnologia de explosão a vapor ficou como a última opção entre as avaliadas, apesar de ser a única em que experimentos foram conduzidos em escala piloto. Suas principais desvantagens são a alta demanda energética e custos do processo que, de acordo com a metodologia de classificação proposta, a torna menos interessante comparada às demais. Por fim, o método de tratamento biológico e dissolução em LI ficaram empatados na classificação. Ambos possuem vantagens, como foi discutido anteriormente, mas ainda tem entraves que tornam sua aplicação em maior escala menos atrativa.

6 Conclusões

Diferentes tecnologias de pré-tratamento para casca e palha de arroz foram discutidas, de forma a avaliar suas vantagens e inconveniências. Para apontar qual técnica seria a tecnologia de maior potencial para aplicação em escala industrial, foi proposta uma metodologia de classificação com base em cinco critérios, aos quais foram atribuídos diferentes pesos de acordo com sua importância.

Em todos os artigos selecionados, observou-se que métodos químicos estão presentes em pelo menos uma etapa da metodologia de pré-tratamento. Infere-se que a implementação de técnicas com condições reacionais menos severas e menor uso de reagentes químicos está atrelada a inclusão de mais etapas de pré-tratamento.

Ademais, mostrou-se que a hidrólise enzimática é um passo chave na fermentação de casca e palha de arroz. Por consequência, fica clara a dependência de tecnologias biológicas no processo de produção de etanol a partir desse RLA não só na etapa de fermentação, mas também nas reações de pré-tratamento. Apesar de serem considerados amigáveis ao meio-ambiente, os métodos biológicos ainda enfrentam entraves que limitam sua aplicação em maior escala. É evidenciado, portanto, a necessidade de novas pesquisas que objetivem a viabilidade econômica do processo.

Foi possível concluir que a hidrólise química é a técnica mais vantajosa. Ainda, a hidrólise alcalina destaca-se na classificação em relação a hidrólise ácida porque, apesar de ter tempo mais elevado de operação, produz menos tóxicos e exige etapas com menor uso de reagentes químicos.

Apesar de ser a única em que experimentos foram conduzidos em escala piloto, a tecnologia de explosão a vapor ficou como a última opção entre as avaliadas. Suas principais desvantagens são a alta demanda energética e custos do processo. Por fim, o método de tratamento biológico e dissolução em LI ficaram com empatados na classificação. Ambos possuem aspectos positivos e negativos, no entanto, de acordo com a classificação proposta, sua aplicação em maior escala é menos atrativa frente aos métodos químicos.

7 Referências

ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : a review. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, p. 4851–4861.

ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Comparative study of various pretreatment reagents on rice husk and structural changes assessment of the optimized pretreated rice husk. **Bioresource technology**, 2013. v. 135, p. 116–119.

BEHERA, S. *et al.* Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2014. v. 36, p. 91–106.

BIN, Y.; HONGZHANG, C. Effect of the ash on enzymatic hydrolysis of steam-exploded rice straw. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, n. September 2008, p. 9114–9119.

BINOD, P. *et al.* Bioethanol production from rice straw : an overview. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, p. 4767–4774.

CHEN, W. *et al.* Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource technology**, 2011. v. 102, p. 2916–2924.

CHEN, W. *et al.* Ethanol production from rice straw hydrolysates by pichia stipitis. **Energy procedia**, 2012.

CHEN, W. *et al.* Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. **Bioresource technology**, 2013. v. 128, p. 297–304.

GAARDLØS, M. **Expression and characterization of lytic polysaccharide monoxygenases from myriococcum thermophilum**. [S.l.]: Norwegian University of Life Sciences, 2015. Disponível em: <https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/293718/gaardl0s_master2015.pdf?sequence=3>.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment : the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and bioenergy**, 2012. v. 6, p. 0–8.

HAGHIGHI, S. *et al.* Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2013. v. 27, p. 77–93.

HICKERT, L. R. *et al.* Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *saccharomyces cerevisiae* icv d254 and *spathaspora arborariae* nr1 y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource technology**, 2013. v. 143, p. 112–116.

HICKERT, L. R. **Bioconversão de hidrolisados de casca de arroz e soja a etanol e xilitol por leveduras**. [S.l.]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

HOU, Q. *et al.* Separation of polysaccharides from rice husk and wheat bran using solvent system consisting of bmimoac and dmi. **Carbohydrate polymers**, 2015. v. 133, p. 517–523.

HUANG, C. *et al.* Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of pichia stipitis. **Bioresource technology**, 2009. v. 100, p. 3914–3920.

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

KIM, I. *et al.* Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw. **Carbohydrate polymers**, 2014. v. 99, p. 563–567. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.092>>.

LI, G. C. *et al.* Ionic liquid processing of cellulose. **Chem soc rev**, 2012. n. 4.

LIM, J. S. *et al.* A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2012. v. 16, p. 3084–3094.

LIN, T. *et al.* Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting pichia stipitis. **Bioresource technology**, 2012. v. 116, p. 314–319.

_____. The addition of hydrolyzed rice straw in xylose fermentation by pichia stipitis to increase bioethanol production at the pilot-scale. **Biomass and bioenergy**, 2016. v. 91, p. 204–209. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.012>>.

LIU, C.-Z. *et al.* Ionic liquids for biofuel production: opportunities and challenges. **Applied energy**, 2012. v. 92, p. 406–414. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261911007288>>.

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

MILANEZ, A. Y. *et al.* **A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar : avaliação ambiental , econômica e sugestões de política**. Revista do bndes.

MME. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo?gasnatural?>>.

NGUYEN, T. A. D. *et al.* Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource technology**, 2010. v. 101, n. 19, p. 7432–7438. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.053>>.

NICHOLS, N. N. *et al.* Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to ethanol using conventional and engineered microbes. **Biomass and bioenergy**, 2014. v. 67, p. 79–88.

PEREIRA, F. **Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e pentoses em bioetanol por *SPATHASPORA ARBORARIAE***. [S.l.]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/56598>>.

PHITSUWAN, P. *et al.* Evaluation of fuel ethanol production from aqueous ammonia-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation. **Biomass and bioenergy**, 2016. v. 93, p. 150–157. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.012>>.

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, 2009. v. 16, n. 4, p. 743–762.

RABEMANOLONTSOA, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource technology**, 2016. v. 199, p. 83–91. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>>.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, 2009. v. 27, p. 185–194.

SHIRKAVAND, E. *et al.* Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment – a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, 2016. v. 54, p. 217–234.

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

SWAIN, M. R.; KRISHNAN, C. Improved conversion of rice straw to ethanol and xylitol by combination of moderate temperature ammonia pretreatment and sequential fermentation using *Candida tropicalis*. **Industrial crops and products**, 2015. v. 77, p. 1039–1046.

VOHRA, M. *et al.* Bioethanol production: feedstock and current technologies. **Journal of environmental chemical engineering**, 2014. v. 2, p. 573–584.

YANG, C. Y.; FANG, T. J. Combination of ultrasonic irradiation with ionic liquid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource technology**, 2014. v. 164, p. 198–202. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.004>>.

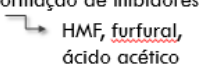
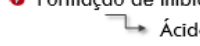
YU, C. T. *et al.* Microscopic structure features changes of rice straw treated by boiled acid solution. **Industrial crops and products**, 2008. v. 9, p. 308–315.

YU, J. *et al.* Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource technology**, 2009. v. 100,

p. 903–908.

8 Apêndice I – Resumo das características, vantagens e desvantagens dos métodos de pré-tratamento abordados na revisão bibliográfica

Tratamentos físicos:		Tratamentos físico-químicos:	
<p>Moagem/Redução de tamanho</p> <p>Micro-ondas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Etapa inicial; • Tempo de operação; • Sem tóxicos. • Demanda energética; 		<p>Explosão a vapor</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mecanismo semelhante ao da hidrólise ácida; • Tempo de reação menor; • Desvantagens semelhantes às do ácido; • Maior custo; 	<p>Ultrassom</p> <ul style="list-style-type: none"> • Erosão superficial / redução de tamanho; • Condições brandas; • Etapa intermediária;

Tratamentos químicos:			
<p>Hidrólise ácida</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mais comum; • Atua sem discriminação; • Tempo de operação; • Formação de inibidores  • Etapas de recuperação/detoxificação; • Custo; 	<p>Hidrólise alcalina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mecanismo seletivo - rompimento ligações lignina; • Condições mais brandas que as ácidas; • Formação de inibidores;  • Etapas de recuperação/detoxificação; • Tempo de operação; 	<p>Dissolução em LI</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rompimento de ligações – formação de pontes de H₂; • Celulose regenerada amorfa; • “Solvente verde” • Condições brandas; • Menor uso de reagentes • Custo/reciclagem do LI; • Viscosidade; 	<p>Agente oxidante</p> <ul style="list-style-type: none"> • Separação/ solubilização parcial lignina; • H₂O₂: Não há formação de tóxicos • Etapa intermediária;

<p>Tratamento Biológico:</p> <p>Sacarificação direta</p> <p>Delianificação intermediária</p> <p>Hidrólise enzimática</p> <ul style="list-style-type: none"> • Amigável ao meio ambiente; • Etapa intermediária; • Tempo de operação; 	<p>Consumo do substrato;</p> <p>Custo;</p>	<p>Métodos de detoxificação:</p> <p>Overliming</p> <ul style="list-style-type: none"> • Usado após tratamento ácido; • Aumento do pH brusco até que a formação de precipitado; • Adição de ácido para neutralização • Capaz de remover HMF e furfural; • Instalação adicional; • Não remove alguns ácidos orgânicos; • Custo; 	<p>Tratamento alcalino e lavagem com água</p> <p>Bioabatimento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alternativas com menor custo energético;
---	--	--	---

9 Apêndice II- Resumo dos artigos abordados na revisão bibliográfica

Tipo de Pré-tratamento	Usou hidrólise enzimática?	Qual enzima?	Rendimento	Faz fermentação?	Referência
Explosão a vapor+ácido diluído+overliming e método alcalino	Não		Não diz o rendimento, mas mede a quantidade de açúcares e inibidores presente no meio após a hidrólise ácida	Sim	HUANG <i>et al.</i> , (2009)
Explosão a vapor (2 passos) e explosão a vapor catalisada por ácido	Sim	Celulase, 20 FPU/mL	75% do rendimento total de açúcares	Não	CHEN <i>et al.</i> , (2012)
Explosão a vapor catalisada por ácido, primeiro em escala piloto, neutralização com NaOH e overliming	Sim	Não diz. Foca nos métodos de condicionamento e no rendimento de etanol.	80 % de glicose, não fala do rendimento total de açúcares	Sim	LIN <i>et al.</i> , (2012)
Sistema contínuo de pré-tratamento, explosão a vapor catalisada por ácido+neutralização com NaOH e overliming	Sim	Celulase, 15 FPU / g de celulose	73 % do rendimento total de açúcares	Sim	CHEN <i>et al.</i> , (2013)
Explosão a vapor catalisada por ácido, palha de arroz + compensado de madeira	Sim	Não abordado	Não abordado	Sim	LIN <i>et al.</i> , (2016)

Tipo de Pré-tratamento	Usou hidrólise enzimática?	Qual enzima?	Rendimento	Faz fermentação?	Referência
Explosão a vapor sem ácido + lavagem com água	Sim	Celulase, diferentes concentrações enzimáticas	Não se aplica, estudou a influência dos cátions das cinzas na atividade enzimática	Não	BIN; HONGZ HANG, (2010)
Compara alcalino (NaOH e Ca(OH) ₂) com ácido (H ₂ SO ₄ , HCl, H ₃ PO ₄ , CH ₃ COOH e HNO ₃)	Não		Reagentes ácidos tiveram melhor desempenho em relação aos alcalinos. Rendimento de açúcar total em concentração (HCl=15 mg/mL)	Não	ANG; NGOH; CHUA, (2013)
Ácido diluído + ácido concentrado (H ₂ SO ₄) + neutralização	Não		45,6 % de glicose (base mássica)	Não	MA <i>et al.</i> , (2011)
Ácido com HNO ₃ , comparou com H ₂ SO ₄	Sim	Celulase, 30 FPU/g celulose	83 % de glicose, total de xilose	Sim	KIM <i>et al.</i> , (2014)
Amônia aquosa + lavagem com água	Sim	celulase e hemicelulase, 30 FPU/g de biomassa seca	97 % de açúcares totais	Sim	SWAIN; KRISHN AN, (2015)

Tipo de Pré-tratamento	Usou hidrólise enzimática?	Qual enzima?	Rendimento	Faz fermentação?	Referência
Micro-ondas + NaOH + lavagem cm água em casca e palha de arroz	Não		<p>Palha de arroz: teor de celulose (38 % - 52 %), hemicelulose (26 % - 32 %), lignina (7 % - 3,5 %) e teor de cinzas (15 %, - 8 %).</p> <p>Casca de arroz: celulose (35 % - 46 %), hemicelulose (13 %, 20 %), lignina (15,2 % - 7,2 %) e cinzas (20 % - 12 %)</p>	Não	SINGH <i>et al.</i> , (2011)
Amônia aquosa + 4 Lis: (BMIM] Cl), EMIM] Cl, EMIM] Ac e EMIM] Su + lavagem com água	Sim	Celulase e β -glucosidase, 2 FPU/ 0,1 g de biomassa seca e 20 CBU/ 0,1 g de biomassa seca	97 % de rendimento de glicose	Não	NGUYEN <i>et al.</i> , (2010)
Ultra-som + LI (EMIM][EtSO ₄] e THTDPD e [Ch][OH]	Sim	Celulase	96,22 % de açúcares totais	Não	YANG; FANG, (2014)
DMI + [BMIMO] Ac	Não		Taxa de dissolução da casca de arroz foi de apenas 29,7 %.	Não	HOU <i>et al.</i> , (2015)
Ácido diluído + bioabatemento	Sim	Não se aplica	Não se aplica, estudou a cinética de bioabatemento	Sim	NICHOLS <i>et al.</i> , (2014)
Ultrassom e H ₂ O ₂ + tratamento biológico	Sim	Não se aplica	39,8 % e 49,6 % de rendimentos de açúcares totais dissolvidos e glicose, respectivamente.	Não	YU <i>et al.</i> , (2008)
Contagem (Sim/Total)	11/16			7/16	